



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

RAYSSA FALCÃO LIMA RÉGIS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *Achaetomium lippiae*
E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DA FIBRA DE COCO VERDE**

Recife
2023

RAYSSA FALCÃO LIMA RÉGIS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *Achaetomium lippiae*
E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DA FIBRA DE COCO VERDE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Química da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Régis, Rayssa Falcão Lima.

Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Achaetomium lippiae* e sua aplicação na degradação da fibra de coco verde. / Rayssa Falcão Lima Régis. -Recife, 2023.

67 : il., tab.

Orientador(a): Pedro Ferreira de Souza Filho
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal dePernambuco, Centro de Tecnologia e
Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2023.
Bacharelado em Engenharia Química.

1. *Achaetomium lippiae*. 2. celulases. 3. coco verde. 4.
fermentação submersa. 5. hidrólise enzimática e pré-
tratamento alcalino. I. Souza Filho, Pedro Ferreira de .
(Orientação). II. Título.

660 CDD (22.ed.)


RAYSSA FALCÃO LIMA RÉGIS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *Achaetomiumlipppiae*
E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DA FIBRA DE COCO VERDE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Química da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.


Aprovado em: 15/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 PEDRO FERREIRA DE SOUZA FILHO
Data: 18/09/2023 10:48:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ
Data: 18/09/2023 09:53:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 GLORIA MARIA VINHAS
Data: 16/09/2023 06:48:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Glória Maria Vinhas (Examinador Interno)

À minha irmã, por ter sido meu suporte emocional nos momentos mais difíceis de minha vida e por ter sido o motivo das minhas maiores lembranças de felicidade.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Dra. Celmy Maria Bezerra de Menezes Barbosa e Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha pela compreensão, ajuda e paciência que tiveram comigo ao longo da minha graduação.

Ao meu orientador Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho pela ajuda e paciência durante o desenvolvimento do meu TCC.

Às minhas tias Elvira Pedrosa, Rilda Falcão e Rosane Falcão por terem sido uma segunda mãe para mim sempre que precisei.

Aos meus pais, Rogério e Rosimar, por todo carinho, amor e atenção dados a mim e por terem me dado meus maiores presentes: meus irmãos.

À minha irmã Rayana por ser meu apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos Emanuel e Otávio pela alegria que trouxeram à minha vida nesses últimos anos.

Aos meus avós Elpídio Régis, Lúcia Régis, Neuza Falcão e Roque Rodrigues por terem estado ao meu lado o máximo que puderam e por todo carinho que me foi dado.

Aos meus amigos de infância Alana Paulina, Aline Lira, Natália Cavalcanti e Saulo Brasileiro.

Aos meus amigos que fizeram parte da minha trajetória pelo IFPE: Ariane, Carol, Clara, Lorena, Mikaella, Natália e Vítor.

À UFPE e seus docentes.

“Tudo o que posso fazer é seguir os meus instintos, porque nunca vou agradar todo mundo” (Emma Watson).

RESUMO

Materiais lignocelulósicos, constituídos principalmente por hemicelulose, lignina e celulose, são caracterizados por apresentarem uma notória resistência à degradação e têm despertado interesse industrial por ser fonte de açúcares fermentescíveis, presentes nas frações de celulose e hemicelulose. Em especial, há um grande destaque dado ao coco verde, devido ao seu alto teor de lignina, que dá a característica da rigidez e promove a dificuldade de degradação. Objetivando amenizar tais impactos ambientais, uma alternativa viável recorrente na literatura é o uso da hidrólise enzimática na sua degradação. As celulasas, por sua vez, estão entre as enzimas mais aplicadas nesse processo e são sintetizadas por microrganismos, principalmente fungos. Com base nisso, neste trabalho, foi feito um estudo sobre a produção de celulasas a partir da linhagem endofítica *Achaetomium lippiae* cultivada por fermentação submersa. A linhagem fúngica foi induzida a crescer inicialmente em um meio sólido de PDA e depois foi inoculada em meio líquido contendo glicose como substrato. Os ensaios fermentativos foram conduzidos em triplicata e, após serem filtrados, pesou-se a massa de fungo crescido nos meios, constando como 0,419 g. Essa biomassa foi transferida para um novo meio contendo celulose como fonte de carbono para induzir a produção de celulase. Os extratos enzimáticos obtidos foram analisados quanto à atividade de celulasas (FPase), sendo os açúcares redutores quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico. Por meio de tal análise, ficou evidente que a espécie apresentou atividade celulolítica máxima igual a 0,13 U/mL de FPase após o 6º dia de fermentação em meio líquido de celulose e, valendo-se do teste do Biureto, foi verificada uma atividade específica de 0,12 AE/mg de proteínas totais. A aplicação das celulasas também foi acompanhada em diferentes temperaturas (40-70°C) e aquela que obteve uma maior atividade de celulasas foi selecionada para a realização da hidrólise enzimática do resíduo do coco verde. A maior atividade enzimática foi detectada para o ensaio realizado a 50°C com 0,0585 U/mL de FPase. O pré-tratamento alcalino da casca do coco verde foi eficaz na liberação de açúcares fermentescíveis presentes na celulose, apresentando concentração máxima de aproximadamente 9,72 g.L⁻¹ após 48 horas. Por fim, pela análise de DRX, observou-se que a amostra de coco verde pré-tratado apresentou um aumento na sua cristalinidade, possivelmente ocasionado pela remoção parcial da lignina e/ou hemicelulose. Os dados obtidos mostraram que o índice de cristalinidade variou de 43,13% (*in natura*) para 71,40% (pré-tratado).

Palavras-chave: *Achaetomium lippiae*, celulasas, coco verde, fermentação submersa, hidrólise enzimática, pré-tratamento alcalino.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials, primarily composed of hemicellulose, lignin, and cellulose, are characterized by their notable resistance to degradation and have attracted industrial interest because of their potential as sources of fermentable sugars present in cellulosic and hemicellulosic fractions. Particularly, a great emphasis is given to the green coconut due to its high lignin content, which gives the characteristic of rigidity and promotes the difficulty of degradation, attracting more interest. Aiming to soften such environmental impacts, a viable alternative that recurs in the literature is the use of enzymatic hydrolysis in its degradation. Cellulases are among the most commonly used enzymes in this process and are synthesized by microorganisms, primarily fungi. Based on this, in this work, a study was carried out about the production of cellulases from the endophytic strain *Achaetomium lippii* cultured through submerged fermentation. The fungal strain was initially grown on a solid PDA medium and then inoculated into a liquid medium containing glucose as substrate. Fermentation assays were conducted in triplicate, and after filtration, the mass of fungus grown in the media weighed 0.419 g. This biomass was then transferred to a new media containing cellulose as carbon source to induce the synthesis of cellulases. The enzymatic extracts obtained were analyzed for cellulase activity (FPase) using the DNS method to quantify the reducing sugars. Through this analysis, it became evident that the species exhibited maximum cellulase activity of 0.13 U/mL of FPase on the 6th day of fermentation in a liquid cellulose medium. Using the Biuret test, the presence of 0.12 AE/mg of total proteins was verified. The application of the cellulase was also monitored at different temperatures (40-70°C), and the temperature that achieved the highest cellulase activity was selected for the enzymatic hydrolysis of green coconut residue. The highest enzymatic activity was detected in the assay conducted at 50°C with 0.0585 U/mL of FPase. Alkaline pretreatment of green coconut husk effectively released fermentable sugars present in cellulose, with a maximum concentration of approximately 9.72 g/L after 48 hours. Finally, XRD analysis showed that the pre-treated green coconut sample exhibited an increase in crystallinity, possibly caused by the partial removal of lignin and/or hemicellulose. The data obtained demonstrated that the crystallinity index ranged from 43.13% (raw) to 71.40% (pre-treated).

Keywords: *Achaetomium lippii*, cellulases, green coconut, submerged fermentation, alkaline pretreatment, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Classificação do <i>Achateomium lippiae</i> .	21
Figura 2 –	Composição da casca do coco verde.	26
Figura 3 –	Composição da parede celular vegetal.	28
Figura 4 –	Cadeia linear da celulose.	29
Figura 5 –	Estrutura da hemicelulose.	30
Figura 6 –	Álcoois fenilpropionícos.	31
Figura 7 –	Estrutura da lignina.	31
Figura 8 –	Reação de redução do ácido 3-5-dinitrossalicílico e oxidação do açúcar redutor.	38
Figura 9 –	Colônias do fungo <i>Achaetomium lippiae</i> URM 604 em meio sólido PDA ao fim dos 7 dias de cultivo.	47
Figura 10 –	Atividade específica (AE/mg de proteína) para a linhagem <i>Achaetomium lippiae</i> .	51
Figura 11 –	Atividade da celulase (FPase) para diferentes temperaturas (40-70°C).	54
Figura 12 –	Rendimento de glicose no coco verde pré-tratado.	57
Figura 13 –	Difratograma de raios-X para a casca do coco verde <i>in natura</i> (cor vermelha) e pré-tratado (cor azul).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição química de biomassas lignocelulósicas.	27
Tabela 2 –	Composição do meio de glicose.	40
Tabela 3 –	Composição do reagente de Biureto.	44
Tabela 4 –	Concentração de glicose (g.L ⁻¹) no meio fermentativo ao longo do tempo.	48
Tabela 5 –	Determinação da atividade de celulasas (U.mL ⁻¹) em cada dia fermentativo utilizando meio líquido de celulose.	50
Tabela 6 –	Determinação da atividade enzimática para celulasas totais produzidas pelo fungo <i>Achaetomium lippiae</i> em diferentes condições de temperatura (40-70°C).	53
Tabela 7 –	Determinação da liberação de açúcares redutores pelo fungo <i>Achaetomium lippiae</i> na degradação da casca do coco verde após pré-tratamento alcalino.	55
Tabela 8 –	Índice de cristalinidade do coco verde <i>in natura</i> e pré-tratado.	58

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNS	Ácido 3-5-dinitrossalicílico
DRX	Difratometria de Raios-X
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EnG	Endoglucanases
ExG	Exoglucanases
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
ICr	Índice de Cristalinidade
I _c	Intensidade Máxima de Difração da Estrutura
I _{am}	Intensidade de Difração Amorfa
PDA	Potato Dextrose Agar
T08	<i>Trichoderma</i> sp. Endofítico
TH	<i>Trichoderma harzianum</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	18
1.1.1 Objetivos específicos	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS	19
2.1.1 Gêneros <i>Chaetomium</i> e <i>Achaetomium</i>	20
2.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR MICRO-ORGANISMOS	21
2.2.1 Celulase	22
2.2.2 Fatores que interferem na atividade enzimática	23
2.2.2.1 Temperatura	23
2.2.2.2 pH	24
2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA	24
2.3.1 Fermentação submersa	25
2.4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	25
2.4.1 Casca do coco verde	26
2.4.2 Composição bioquímica da biomassa	28
2.4.2.1 Celulose	29
2.4.2.2 Hemicelulose	30
2.4.2.3 Lignina	30
2.4.3 Pré-tratamento da biomassa	32

2.4.3.1 Pré-tratamento ácido	33
2.4.3.2 Pré-tratamento alcalino	34
2.4.3.3 Pré-tratamentos combinados	35
2.4.4 Hidrólise enzimática	35
2.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DNS	36
2.5.1 Método do Ácido 3-5-dinitrossalicílico	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 MICRO-ORGANISMO	39
3.2 CULTIVO DO FUNGO	39
3.2.1 Preparo do meio líquido de ativação	39
3.2.2 Preparo do meio sólido PDA (Agar Batata Dextrose)	40
3.3 MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	40
3.4 PREPARO DO INÓCULO DO MEIO DE GLICOSE	41
3.4.1 Análise da glicose pelo método do DNS	41
3.5 CULTIVO EM MEIO DE CELULOSE	42
3.5.1 Preparo do meio de celulose	42
3.5.2 Produção de celulase	42
3.5.3 Separação do caldo enzimático	42
3.5.4 Determinação da atividade enzimática	42
3.5.4.1 Ensaio enzimático	43
3.5.5 Determinação de proteínas	44
3.6 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DA ENZIMA CELULASE	44

3.7 AÇÃO DA CELULASE SOBRE A FIBRA DO COCO VERDE	45
3.8 CARACTERIZAÇÃO DO COCO VERDE	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 CRESCIMENTO MICROBIANO	47
4.2 ANÁLISE DO CONSUMO DA GLICOSE	47
4.3 PRODUÇÃO DE CELULASE	49
4.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE	52
4.5 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA CASCA DO COCO VERDE	54
4.6 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	57
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

Diversos processos industriais são responsáveis por gerar resíduos lignocelulósicos difíceis de serem degradados no meio ambiente. No mercado brasileiro, por exemplo, a indústria do coco representa um grande obstáculo agrícola diante da grande quantidade de resíduos gerados. Apesar do seu extenso litoral ser vantajoso na comercialização do coco verde, proporcionando-lhe 5% da produção mundial, estima-se que a cocoicultura gera cerca de 850.000 toneladas de resíduos (Azevedo, 2022; Cabral, 2015). Embora o coco verde seja muito valorizado comercialmente diante do valor nutricional da sua água, suas cascas, que representam aproximadamente 80-85% do seu peso bruto, são descartadas, ficando acumuladas em lixões ou às margens de estradas, gerando impactos ambientais (Gervásio, 2017). Como a minimização do acúmulo da casca de coco verde ocasionaria a redução da atividade produtiva do produto bruto, o seu aproveitamento torna-se necessário (Azevedo, 2022). Nesse aspecto, uma rota em potencial para diminuir estes impactos é a degradação das fibras presentes em sua casca.

Bacchin *et al.* (2010) citam que um dos meios de degradar resíduos lignocelulósicos ocorre por intermédio da hidrólise enzimática e fermentação. Apesar das enzimas lignocelulósicas apresentarem um elevado nível de especificidade e seletividade em suas atividades, o seu valor elevado instiga a investigação por outros tipos de micro-organismos capazes de obter enzimas com as mesmas propriedades e a um custo reduzido (Araújo *et al.*, 2021; Azevedo, 2022; Oliveira, 2019).

Deve-se ressaltar que, diante da diversidade de enzimas celulolíticas geradas durante o processo fermentativo, a celulase é uma das mais importantes e de maiores aplicações. Em virtude do seu enorme potencial biotecnológico, a celulase começou a ser difundida em meados da década de 1980, com aplicação na clarificação de vinhos e em ração animal, por exemplo, chegando a ocupar cerca de 20% de toda a fabricação enzimática industrial (Inforsato; Porto, 2016). Atualmente a sua produção engloba diversos setores como os têxteis, na desfibrilação de tecidos; de biocombustíveis, na geração de etanol celulósico; fabrico de papel de celulose, na alteração das características mecânicas da polpa de celulose; na indústria de polímeros e nos mais diversos outros processos (Inforsato; Porto, 2016). Aliado a isso, o fato de serem sintetizadas por vários micro-organismos e serem capazes de degradar diversos materiais lignocelulósicos a torna uma alternativa viável e

ecologicamente eficaz (Maftukhah; Abdullah, 2018).

Em geral, enzimas celulolíticas são divididas em três grupos (endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases), que apresentam diferentes funções e atuam diretamente na hidrólise do material celulósico para liberar glicose (Santos, 2021; Castro; Pereira Jr., 2010). Além do mais, elas podem ser sintetizadas por micro-organismos endofíticos, principalmente por fungos filamentosos, como o da espécie *Achateomium lippiae* que é cultivado por intermédio de processo fermentativo, em estado sólido ou submersa (Santos, 2021; Azevedo, 2022).

Em consonância com Cunha *et al.* (2020) e Viniegra-González *et al.* (2002), a fermentação em estado sólido (FES), quando comparada com a fermentação submersa (FS), torna-se uma alternativa mais vantajosa, visto que, além de promover um rendimento enzimático maior, pode fazer uso de resíduos agroindustriais, prejudiciais ao meio ambiente bem como envolve menores gastos de energia e índices de contaminação. Apesar de levar um maior tempo fermentativo, a FES continua sendo uma melhor opção diante da FS, pois esta última exige um maior controle dos parâmetros essenciais para o cultivo do fungo, como pH, concentração de oxigênio, agitação do meio e temperatura (Santos, 2021). Anexo a isso, a presença total de água no meio da fermentação submersa, reduz consideravelmente o crescimento microbiano e a geração de composto bioativos se comparada com a fermentação em meio sólido (Castro; Pereira Jr., 2010).

Em resumo, o coco verde, por ser um resíduo lignocelulósico, é uma fonte potencial na obtenção do etanol de segunda geração (Bacchin *et al.*, 2010). No entanto, como a hidrólise enzimática, usualmente empregada na degradação da biomassa, apresenta desafios significativos, como o alto custo na produção das enzimas celulolíticas, a sua sensibilidade diante das condições de reação e o tempo necessário para que ocorra a quebra completa das moléculas de glicose da celulose. Apesar desses desafios, a pesquisa contínua por novos micro-organismos que sintetizem celulasas e a otimização dos processos de hidrólise são fundamentais para avançar na produção sustentável de biocombustíveis e produtos químicos a partir de recursos renováveis (Nascimento, 2016).

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo analisar a produção de celulase pelo fungo filamentoso *Achaetomium lippiae*, visando utilizar a solução enzimática obtida para a degradação da casca do coco verde, um resíduo lignocelulósico, obtendo-se, assim, açúcares fermentescíveis que poderão ser utilizados para fins biotecnológicos e industriais.

1.1.1 Objetivos específicos

- Analisar o efeito que o tempo de fermentação exerce na produção enzimática;
- Determinar a temperatura ótima de ação da enzima;
- Analisar o efeito da enzima sobre a biomassa de coco verde;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

O termo endofítico remete aos micro-organismos, principalmente fungos e bactérias, que possuem um vínculo de neutralidade com o seu hospedeiro, as plantas. Em virtude disso, são muitas vezes descritos como patógenos latentes (Azevedo, 2020; Azevedo *et al.*, 2022). Apesar de terem sido descobertos no início do século XIX e descrito por Bary em 1866, os micro-organismos endofíticos passaram a ser utilizados para fins terapêuticos de 1970 em diante (Viana, 2017b). Segundo alguns estudos, cada espécie de planta apresenta em média quatro espécies endofíticas presentes durante praticamente toda a vida do hospedeiro (Villas Boas *et al.*, 2020; Melo; Azevedo, 1998). Esses micro-organismos penetram nos hospedeiros não apenas através de entradas naturais, como nas raízes e estômatos, mas também em regiões que venham a apresentar fissuras ocasionadas por insetos. Em seguida, eles seguem até atingir as partes internas dos tecidos das plantas (Azevedo, 2020; Azevedo *et al.*, 2022; Prasad; Harsh, 2015; Azevedo, 1998).

Diferentemente dos micro-organismos fitopatogênicos, os endofíticos não prejudicam as plantas hospedeiras, sendo capazes de produzir compostos bioativos secundários que proporcionam o crescimento da planta e um mecanismo de defesa contra patógenos e nematoides, além de apresentarem um enorme interesse biotecnológico, agrícola e medicinal (Kamana *et al.*, 2016; Prasad; Harsh, 2015; Azevedo, 1998). Alguns apresentam propriedades anticancerígenas (sintetizam agentes anticancerígenos), como o metabólito taxol, que é produzido pelo endofítico *Taxomyces andreanae* e alcalóides do endofítico *Rhinochrysiella* sp. (Villas Boas *et al.*, 2020; Kamana *et al.*, 2016; Azevedo, 1998). Além disso, possuem também propriedades antibióticas, inibindo, por exemplo, bactérias super resistentes existentes em hospitais e as quais são responsáveis pela contaminação de pacientes hospitalizados (Azevedo, 2020; Azevedo *et al.*, 2022).

No Brasil, estudos conduzidos por Rodrigues e Menezes (2002) analisaram a influência que os fungos endofíticos exerciam em sementes de caupi na região de Serra Talhada e Caruaru. Ao cultivarem 400 sementes de caupi (IPA-201, IPA-202,

IPA-204, IPA-205 e IPA-206), os autores identificaram a existência das espécies endofíticas *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* em proporções superiores aos demais gêneros encontrados. Outras pesquisas ainda apontam a sua relativa importância em sínteses enzimáticas com fins industriais, tal qual vem acontecendo na obtenção de etanol de segunda geração. O experimento conduzido por Magalhães *et al.* (2020) constitui um dentre os inúmeros exemplos da obtenção do etanol celulósico, sendo neste caso, utilizada a batata inglesa como meio de cultura e o papel como fonte de celulose.

2.1.1 Gêneros *Chaetomium* e *Achaetomium*

Conforme citado por Wang *et al.* (2016), há mais de 400 espécies de fungos pertencentes ao gênero *Chaetomium*, sendo descritos como aqueles que têm habilidade na degradação da celulose e por sintetizarem uma multitude de compostos metabólicos. Tal qual o gênero *Chaetomium*, o gênero *Achaetomium* também possui um potencial na sintetização de diversas enzimas como as celulases e as xilanases (Azevedo, 2022). Por serem muito semelhantes ao gênero *Chaetomium*, o gênero *Achaetomium* não é reconhecido como um gênero por alguns autores (Viana, 2017a; Rodríguez *et al.*, 2004). Não obstante, em virtude de sua semelhança, são englobados na mesma família, a *Chaetomiaceae* (Rodríguez *et al.*, 2004).

Atualmente, o gênero *Achaetomium* apresenta 26 espécies catalogadas, sendo a espécie *Achateomium lippiae*, a descoberta mais recente (Figura 1) (Viana, 2017a). Seu nome tem origem em decorrência daquele de sua planta hospedeira, a *Lippia gracilis* Schauer, do qual se extraiu o fungo endofítico que apresenta uma coloração amarelada de cor marrom em sua região central (Azevedo, 2022). Pelo fato de ser um fungo filamentoso, sua grande importância se dá pela sua capacidade de excretar a enzima celulase que é capaz de degradar meios celulósicos, favorecendo, desse modo, a liberação de sacarídeos fermentescíveis utilizados nos mais diversos processos biotecnológicos e industriais (Castro; Pereira Jr., 2010).

celulase produzida foi capaz de degradar a biomassa e o caldo coletado do meio fermentado indicou a presença de etanol. Magalhães *et al.* (2020) ainda destacam que enzimas celulolíticas produzidas por fungos filamentosos, por exemplo, possibilitam um aumento da produção de etanol sem a necessidade de se ter uma maior área de cultivo.

Conforme o tipo de reação que são responsáveis por catalisar, as enzimas são, no geral, classificadas em seis diferentes grupos. Elas podem ser: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Gervásio, 2017; Azevedo, 2022). Considerando sua utilização no contexto comercial, a enzima celulase, classificada como hidrolase, é tida como uma das mais importantes, abrangendo cerca de 20% da escala de produção para comercialização (Inforsato; Porto, 2016). Sua aplicabilidade vai desde a indústria alimentícia e farmacêutica até na fabricação de papel e polpa de celulose. Tal fato funda-se na sua maior produção enzimática e por ser sintetizada por inúmeros micro-organismos, em especial, os endofíticos (Maftukhah; Abdullah, 2018).

2.2.1 Celulases

Também conhecida como enzimas celulolíticas, são sintetizadas, principalmente, por fungos filamentosos, atuando no resíduo de celulose para que ocorra a sua hidrólise e consequente liberação de açúcar fermentescível. Em consonância com o local em que atuam no substrato celulósico, são divididas em três grupos (endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases) que apresentam diferentes funções na hidrólise da celulose (Santos, 2021; Castro; Pereira Jr., 2010).

As endoglucanases (EnG), iniciam a hidrólise enzimática e são responsáveis por tornar a fibra celulósica mais solúvel e acessível ao ataque das exoglucanases (ExG), atuando na hidrólise dos sítios internos da cadeia de celulose e por intermédio da fragmentação do polímero celulósico em oligossacarídeos, gerando terminais redutores e não-redutores que serão alvo das exoglucanases (Castro; Pereira Jr., 2010; Santos, 2021; Silva, 2016a; Marco, 2012). As exoglucanases (ExG), ou celobiohidrolases, são responsáveis pelo aumento da taxa de hidrólise e atacam uma das extremidades livres, redutora ou não-redutora da celulase, liberando celobiose. Por fim, como a levedura não consegue consumir a celobiose produzida

é necessário que as β -glucosidasas hidrolisem a celobiose, e outros oligossacarídeos, em monômeros de glicose (Castro; Pereira Jr., 2010; Silva, 2016a; Santos, 2021; Gervásio, 2017).

Por serem sintetizados por via microbiana, muitos estudos sobre a celulase vêm sendo realizados com espécies fúngicas visando quantificar a sua atividade enzimática. Mayrink (2010), por exemplo, estudando a produção enzimática celulolítica para diversas espécies fúngicas, obteve, para a linhagem de *Aspergillus japonicus*, após o seu cultivo em meio líquido com farelo de trigo, a maior atividade de celulase (FPase) igual a $3,26 \pm 0,01 \text{ U.mL}^{-1}$. Em outro trabalho, Dias e Morandim-Giannetti (2022) apontam a eficácia da produção de celulases pelo fungo *Annulohypoxylon stygium* em meio líquido de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono: o bagaço de cana, a celulose, a sacarose e a glicose, para obter etanol de segunda geração.

Sua aplicabilidade ainda varia desde o seu uso no lugar do cloro no branqueamento da pasta celulósica na fabricação de papel (Orlandelli *et al.*, 2012); aumento da qualidade de bebidas alcoólicas (Galante *et al.*, 1998) e também na modificação de fibras têxteis (Marco, 2012).

2.2.2 Fatores que interferem na atividade enzimática

Existem diversos fatores que afetam a capacidade catalítica enzimática, levando à sua desativação. A temperatura e o pH podem ser citados como alguns exemplos destes fatores (Aguiar; Lucena, 2011).

2.2.2.1 Temperatura

Segundo Brito e Farias (2018), a estabilidade estrutural de uma proteína se dá por intermédio das ligações de hidrogênio e estas são rompidas durante seu processo de desnaturação.

Embora as reações tendam a ocorrer mais rapidamente em temperaturas mais elevadas, é importante ressaltar que existe um limite máximo de temperatura onde ocorre uma melhor atuação enzimática e diante da qual, acima desse valor, a enzima passa a ser desestruturada (Maftukhah; Abdullah, 2018).

2.2.2.2 pH

Da mesma maneira que a temperatura, o desenvolvimento do fungo e sua consequente produção enzimática também são afetados pelo pH do meio de cultivo. Segundo Kupski (2012), isso ocorre porque as enzimas tem melhor atuação a uma determinada faixa de pH. Para o autor, esta faixa encontra-se entre 4,5 e 8,0.

Segundo Abdel-Azeem *et al.* (2016), espécies fúngicas do gênero *Chaetomium/Achaetomium* desenvolvem-se melhor em meios com pH > 4,0. Estudos conduzidos por Inforsato e Porto (2016) também destacam que para uma faixa ácida de pH, mais precisamente entre 5 e 6, ocorre uma maior atividade enzimática da celulase.

Mayrink (2010) conduziu uma pesquisa sobre a atividade enzimática das linhagens de *Trichoderma* spp. endofíticos, como os isolados T08 (*Trichoderma* sp. endofítico) e TH (*Trichoderma harzianum*), em meio líquido composto por bagaço de cana e farelo de trigo. A autora reportou resultados otimizados para um pH entre 4,5 e 5,5.

2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA

A obtenção enzimática via microbiana se dá por processos fermentativos. De forma geral, as enzimas celulasas podem ser produzidas pelos fungos filamentosos por intermédio da fermentação em estado sólido (FES) ou pela fermentação submersa (FS). Essas se diferenciam, principalmente, pela disponibilidade de água no meio em que se cultiva o fungo, pois a FES apresenta total ou parcial ausência de água livre, diferentemente da FS, que utiliza meio líquido. Em virtude disso, a FES torna-se uma melhor opção para o crescimento do fungo filamentoso em estudo, o *Achaetomium lippiae*, uma vez que um excedente de água no meio pode ocasionar a desnaturação da enzima sintetizada, redução na produção de metabólitos secundários e uma redução no crescimento do micro-organismo (Castro; Pereira Jr., 2010). Em contrapartida, a FES apresenta um maior período de fermentação (Cunha *et al.*, 2020).

A fermentação em estado sólido é caracterizada por simular o *habitat* natural do fungo (Santos, 2021), fato que está intimamente associado ao seu alto rendimento metabólico. Contudo, a dificuldade no controle e monitoramento das variáveis

operacionais como temperatura, umidade do meio, aeração e pH, torna-o desfavorável diante da fermentação submersa.

2.3.1 Fermentação submersa

Em Orlandelli *et al.* (2012), é dito que a fermentação submersa (FS) é propícia ao crescimento microbiano e à recuperação enzimática excretada pelo fungo. Ocorre em meio líquido, cujo percentual de água presente corresponde a taxas acima de 95% e apresenta uma predisposição para trabalhar com meios fermentativos que não necessitem de um elevado controle de pH e temperatura.

A fermentação submersa, ou fermentação líquida, ocorre na presença de substratos líquidos e é passível de também ser utilizada com facilidade em meios de cultivo provenientes de matérias-primas naturais ou de insumos quimicamente sintetizados. Apesar do seu alto teor de água significar um empecilho para contaminações do meio, em produções mais baixas, a FS é mais vantajosa que a FES por não correr o risco de se ter um aumento muito elevado da temperatura e não ter dificuldade no controle do pH, fatores estes que podem levar a uma redução na atividade enzimática dependendo da espécie fúngica (Orlandelli *et al.*, 2012).

2.4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As principais fontes naturais de celulose são as biomassas lignocelulósicas, que compreendem todos os resíduos que têm uma resistência à biodegradação devido à sua estrutura rígida e baixa reatividade aos micro-organismos (Azevedo, 2022). Diversos autores destacam a obtenção de insumos químicos por intermédio do uso dos mais diversos tipos de biomassas lignocelulósicas empregadas como substrato em meios fermentativos. Segundo Magalhães *et al.* (2020), a celulose, por exemplo, é passível de ser degradada por ação enzimática induzida por micro-organismos produtores de celulase e ser utilizada, posteriormente, como fonte na obtenção de etanol de segunda geração.

A sua estrutura celular é constituída, em geral, por 35-50% de fibras de celulose, cerca de 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina (Azevedo, 2022).

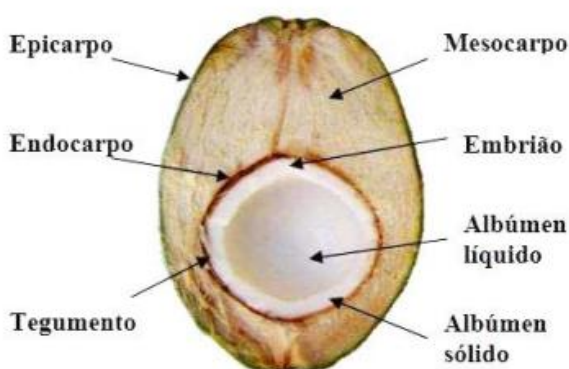
Embora essa composição química seja variável para cada biomassa, é de acordo que suas características interferem diretamente na conversão em insumos químicos.

2.4.1 Casca do coco verde

O coco verde é originário da Índia e chegou ao Brasil, mais precisamente na Bahia, no ano de 1553. A sua expansão pelo litoral do Nordeste brasileiro, no curso dos séculos, permitiu que o Brasil se tornasse hoje o 4º maior produtor mundial. Desse modo, sendo responsável por cerca de 5% da produção mundial, a indústria do coco (cocoicultura) tem uma enorme importância econômica para a região Nordeste, visto que ela é produtora de 66,5% da produção brasileira (Gervásio, 2017; Azevedo, 2022).

Em consonância com Gervásio (2017) e Azevedo (2022), o coco verde apresenta diferentes camadas. O epicarpo, ou casca, é a camada mais fina e externa; o mesocarpo, que representa 57% do peso bruto do coco, é constituído por fibras que contém celulose, hemicelulose e lignina, além de cinzas, umidade, alguns minerais e extrativos; o endocarpo, que é a camada seguinte ao mesocarpo; e, por último, o albúmen, que é camada onde em seu interior fica presente a água de coco (Santana, 2020). A estrutura do coco verde encontra-se representada na Figura 2.

Figura 2 – Composição da casca do coco verde.



Fonte: Silva (2016b).

Por apresentar fibras lignocelulósicas, a casca do coco verde é tida como uma biomassa em potencial para geração de outros insumos químicos, através de sua degradação por enzimas celulolíticas excretadas por fungos filamentosos. Em

consonância com Santana (2020), as fibras da casca do coco verde possuem: 26-33% de celulose, 30-36% de lignina e 16-29% de hemicelulose. Percentuais semelhantes são encontrados em outras fontes literárias. Em Gervásio (2017) e Han (1998), por exemplo, é descrito 33,50% de lignina na fibra do coco verde. Em outro trabalho, Santana (2020) constatou o equivalente a 27,2% de lignina para o coco verde *in natura*.

Em outro estudo, Cabral (2015) cita que o coco verde, a depender da sua idade de maturação, pode apresentar três diferentes tipos de fibras. De 8 a 10 meses de idade o coco verde possui fibras brancas e longas, enquanto que aos 12 meses, no coco maduro são encontradas fibras marrons longas ou curtas.

Apesar de serem valorizados comercialmente em decorrência do seu alto valor nutricional da sua água, o coco verde vem causando sérios impactos ambientais ocasionados pela falta de destinação adequada de suas fibras e bagaço, que são resíduos difíceis de serem degradados e representam aproximadamente entre 80-85% de sua massa (Santana, 2020; Gervásio, 2017). Aliado a isso, o seu elevado teor de lignina na biomassa, principalmente em relação a outros resíduos lignocelulósicos (Tabela 1), leva-o a ter uma maior dificuldade na sua degradação no meio ambiente.

Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósicas.

Resíduos lignocelulósicos	Composição química (%)			Referências
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Casca de coco verde	24,70	12,26	40,10	Cabral <i>et al.</i> (2017)
Espiga de milho	45	35	15	Conceição (2012)
Palha de milho	35,1	29,5	7,0	Santana (2020)
Palha de trigo	30	50	15	Costa <i>et al.</i> (2021)
Casca de arroz	49,64	22,15	24,26	Silva <i>et al.</i> (2023)

Fonte: Autor (2023).

Com isso, mesmo sendo um material biodegradável, o seu alto percentual de lignina torna o acesso à molécula de celulose, de onde são extraídos os açúcares fermentescíveis usados em processos biotecnológicos, mais dificultoso (Santana, 2020). Em decorrência disso, necessita de um tratamento que vise reduzir este alto

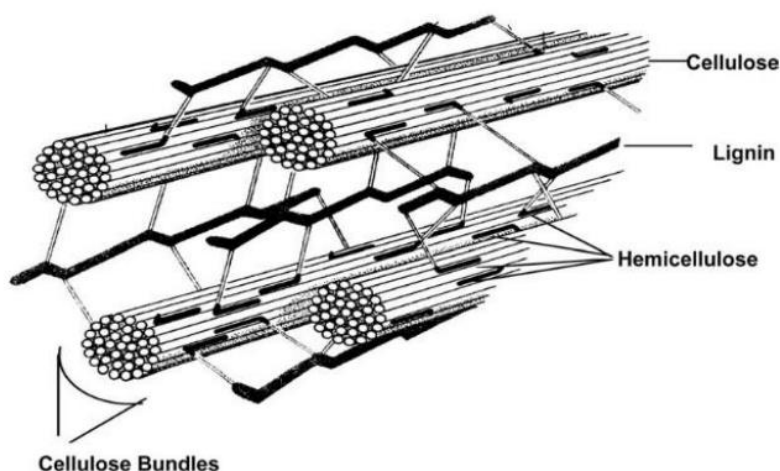
teor, pois para que ocorra a sua degradação é necessário que se tenha uma redução da lignina presente, já que esta fibra é a responsável por garantir a rigidez do resíduo e, conseqüentemente, reduzir sua acessibilidade ao ataque enzimático (Azevedo, 2022; Nascimento, 2018). Nesse sentido, o seu uso como substrato enzimático torna-se uma alternativa viável e sustentável.

2.4.2 Composição bioquímica da biomassa

Os materiais lignocelulósicos são descritos como biomassas renováveis compostas majoritariamente por frações variadas de celulose, hemicelulose e lignina, além de apresentarem pequenos teores de umidade e cinzas (Aguilar; Lucena, 2011). As quantias de cada constituinte variam, principalmente, conforme a espécie vegetal, localização geográfica e condições climáticas do ambiente em que se encontram (Nascimento, 2016).

A lignina, juntamente à hemicelulose, atua como barreira física, impossibilitando a exposição da celulose ao ataque químico e/ou enzimático. Essa propriedade, conhecida como recalcitrância, é resultante principalmente de uma formação bastante organizada da fibra lignocelulósica. Em sua estrutura, a celulose e hemicelulose são conectadas por ligações de hidrogênio e ambas são envoltas pela lignina que preenche os espaços vazios, conforme demonstrado na Figura 3 (Shimizu, 2018).

Figura 3 – Composição da parede celular vegetal.

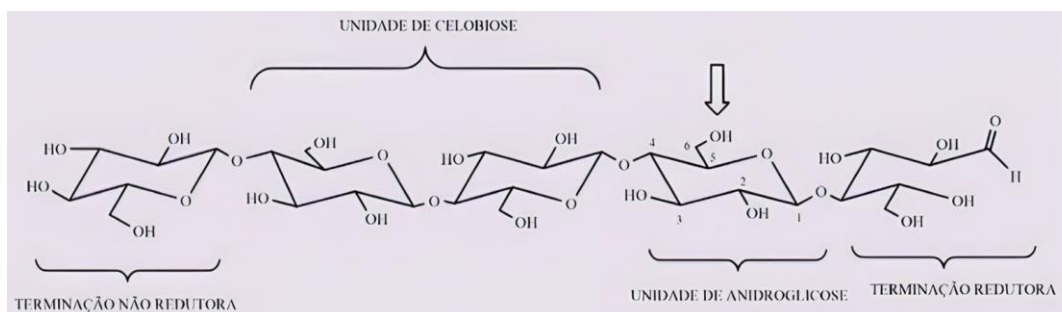


Fonte: Silva (2016b); Murphy e McCarthy (2005).

2.4.2.1 Celulose

A celulose é de um modo geral um carboidrato presente como principal constituinte das plantas, numa proporção que varia entre 20-99% em diferentes espécies. É descrita na literatura como um polímero linear com unidades monoméricas conectadas por ligações β -1,4-glicosídicas. Seus monômeros, chamados de celobiose, são dissacarídeos do tipo D-glicopirranose (Figura 4) (Costa *et al.*, 2021; Cabral, 2015; Nascimento, 2018).

Figura 4 – Cadeia linear da celulose.



Fonte: Costa *et al.* (2021).

Em virtude da presença de grupamentos hidroxilas, as moléculas de glicose são interconectadas por pontes de hidrogênio, formando longas cadeiras lineares não ramificadas e cristalinas organizadas em microfibrilas (Nascimento, 2016; Shimizu, 2018). Conforme cita Nascimento (2018), as microfibrilas da celulose são constituídas por polímeros de glicose, chamados de glucanos.

As unidades de glicose são comumente empregadas como substrato em processos fermentativos para a obtenção de bioetanol e a extração desses açúcares normalmente se dá por processos de hidrólise conduzidos pelo complexo enzimático de celulasas (Cabral, 2015; Silva, 2016b). No entanto, como a celulose não se organiza de modo uniforme, a sua estrutura fibrosa apresenta regiões cristalinas e amorfas, sendo esta última a região que é atacada em processos de hidrólise (Costa *et al.*, 2021; Nascimento, 2016).

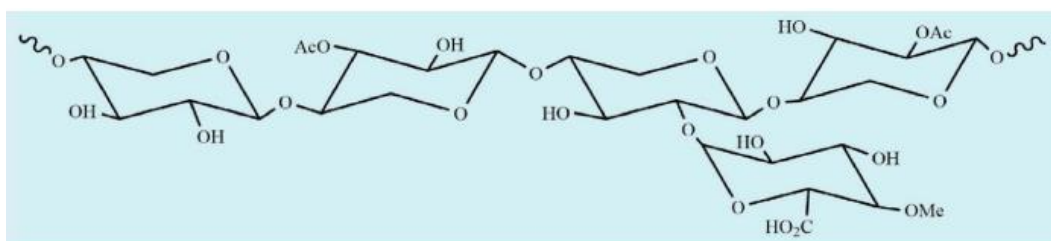
Dessa forma, devido a sua cristalinidade e alto grau de polimerização, a região cristalina da celulose, diferentemente da amorfa, não é facilmente acessível ao ataque enzimático (Costa *et al.*, 2021). Em virtude dessas características, a celulose confere resistência mecânica à fibra celulósica dificultando a sua conversão em açúcares

(Cabral, 2015).

2.4.2.2 Hemicelulose

Também chamadas de poliose, as hemiceluloses são descritas como polissacarídeos formado, principalmente, por 50-300 unidades de açúcares, como as pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, galactose e manose), além dos ácidos urônicos (glucurônico, galacturônico). Sua representação estrutural está apresentada na Figura 5 (Cabral, 2015; Azevedo, 2022; Souza, 2022). Esses açúcares, liberados após a sua hidrólise, são comumente empregados na geração de etanol e a xilose, por exemplo, é empregada na produção de ácido lático (Azevedo, 2022).

Figura 5 – Estrutura da hemicelulose.



Fonte: Costa *et al.* (2021).

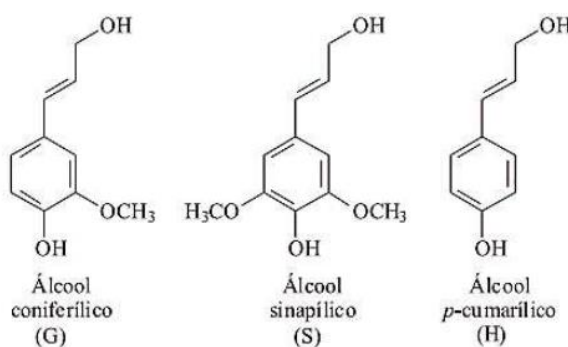
A hemicelulose é ligada à celulose por pontes de hidrogênio e à lignina por ligações covalentes. Sua presença na biomassa garante estabilidade da parede celular, visto que são responsáveis por evitar o choque entre as microfibrilas que compõem a celulose (Azevedo, 2022). Por apresentarem uma estrutura bastante ramificada, são definidas como polímeros amorfos com baixo grau de polimerização (Nascimento, 2018). Como a sua cadeia polimérica é menor que a da celulose, Costa *et al.* (2020) citam que, evidentemente, a hemicelulose é mais acessível à hidrólise.

2.4.2.3 Lignina

A lignina é descrita como um biopolímero amorfo e tridimensional resultante da polimerização de unidades de fenilpropano: álcool p-coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Pereira, 2022). Os álcoois fenilpropionícos (Figura 6), também

designados na literatura como álcoois cinamílicos, têm sua composição variada em diferentes espécies vegetais, fato este que, segundo Nascimento (2016), diferencia angiospermas das gimnospermas. O álcool coniferil, por exemplo, representa 90% da composição das gimnospermas, já nas angiospermas essa composição é variável juntamente a outros álcoois.

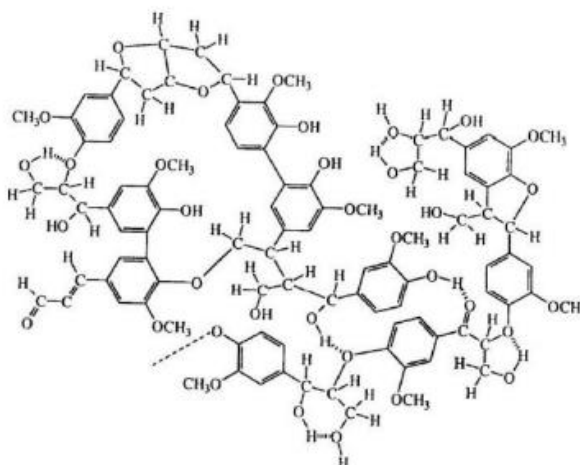
Figura 6 - Álcoois fenilpropílicos.



Fonte: Nascimento (2018) e Barbosa *et al.* (2008).

As unidades de fenilpropano são conectadas por intermédio de ligações éter (C-O-C), carbono-carbono (C-C) e ariléter. Sua estrutura está representada na Figura 7.

Figura 7 – Estrutura da lignina.



Fonte: Rosa e Garcia (2009).

Presente na parede celular, a lignina propicia a rigidez vegetal, inviabilizando, consequentemente, sua degradação química e enzimática, já que forma uma barreira

física que reduz a acessibilidade ao ataque enzimático de micro-organismos celulolíticos à celulose, dificultando a sua conversão em sacarídeos fermentescíveis (Pereira, 2022; Nascimento, 2018).

Industrialmente a lignina é empregada desde na fabricação de resinas fenólicas e adesivos para madeira até na produção de fenol e espumas de poliuretanos (Pereira, 2022). Entretanto, em virtude da sua complexidade estrutural, apresenta reduzido valor agregado, se comparado a celulose e hemicelulose. Com isso, o seu uso industrial ainda é bastante limitado, estimando-se que apenas 2% de toda a lignina extraída seja reaproveitada. A sua extração na forma pura se mostra possível de ser realizada através de métodos como Kraft, lignosulfonatos, lignina Organosolv e Soda (Salve, 2020).

2.4.3 Pré-tratamento da biomassa

Para que a biomassa lignocelulósica seja degradada e forneça açúcares fermentescíveis, é necessário que ocorra o rompimento da sua parede celular, constituída, principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina (Azevedo, 2022; Santana, 2020). A realização de um pré-tratamento na biomassa celulósica provoca o rompimento da estrutura do material celulósico, principalmente na sua forma cristalina, favorecendo a hidrólise enzimática e, conseqüentemente, facilitando a extração de açúcares fermentescíveis presentes na celulose (Santana, 2020).

Em consonância com Marco (2012), a celulose em sua forma amorfa é mais fácil de sofrer degradação. Dessa forma, segundo Santana (2020), a aplicação do pré-tratamento tende a elevar a sua fração amorfa, além de aumentar a área superficial da biomassa, facilitando a ação de agentes físico-químicos e biológicos na estrutura da macromolécula de celulose.

Com base nessas informações, em Pereira (2021) e Azevedo (2022), são relatados alguns métodos de pré-tratamento lignocelulósicos. Nesses estudos encontram-se os métodos físicos, químicos e biológicos. Conforme relatam os autores, o pré-tratamento físico é viável de ser feito por intermédio da moagem, trituração, micro-ondas ou extrusão. Eles conferem uma redução do tamanho das partículas constituintes das fibras celulolíticas mas não promovem a redução do seu

teor de lignina, em virtude disso é definido como o pré-tratamento de menor eficiência e são atrelados a outros pré-tratamentos.

Os métodos químicos atuam, porém, com o intuito de induzir a liberação do açúcar presente na biomassa por conduto da hidrólise da hemicelulose, além de diminuir o teor de lignina. São classificados como pré-tratamento ácido e pré-tratamento alcalino. Existem também os métodos biológicos, que fazem uso de micro-organismos que irão atacar a biomassa degradando-a, e por fim, conforme cita Cabral (2015), os pré-tratamentos combinados que tem a mesma finalidade dos outros métodos comumente empregados. Destacam-se nesse aspecto, o pré-tratamento a vapor e o tratamento hidrotérmico.

2.4.3.1 Pré-tratamento ácido

De forma geral, o pré-tratamento ácido atua principalmente hidrolisando a fração hemicelulósica empregando ácido diluído, como o sulfúrico (H_2SO_4) e o nítrico (HNO_3), e operando em altas condições de pressão e temperatura.

Segundo Cabral (2015), durante o pré-tratamento ácido, o material entra em contato com uma solução ácida diluída e aquecida, na sequência, a uma temperatura na faixa de 140-200°C durante um certo tempo. Em Nascimento (2016), é descrito que esse processo pode ocorrer de duas formas a depender da quantidade de fibras da biomassa. Em valores inferiores a 10% (p/v), o processo ocorre em temperaturas superiores a 160°C de modo contínuo, enquanto que entre 10-40% (p/v) o processo se dá em batelada em temperatura abaixo de 160°C. Em contrapartida, Brito (2023) afirma que o processo deve ocorrer em temperaturas mais amenas, geralmente a 120°C. A escolha desse limite de temperatura deve-se à possível alteração da estrutura cristalina da celulose, visto que temperaturas maiores podem levar à formação de agentes inibidores durante a etapa de hidrólise e até mesmo no processo fermentativo. Um exemplo que ocorre é a degradação da glicose em furfural. Além do mais, o autor ainda cita que o pré-tratamento ácido gera compostos fenólicos provenientes da degradação parcial da lignina.

Dentre os ácidos utilizados, o sulfúrico é o mais empregado na literatura. Andrade *et al.* (2023) destacam que existem relatos do seu uso na sacarificação da celulose desde 1819. Estudos recentes vêm sendo conduzidos para avaliar a

influência da concentração do ácido no desempenho na obtenção de sacarídeos fermentescíveis. Nascimento (2016) relata a alta eficiência em processos que empregam concentrações inferiores a 4% de ácido sulfúrico diluído.

2.4.3.2 Pré-tratamentos alcalino

O pré-tratamento alcalino visa um maior rendimento na remoção das frações amorfas (hemicelulose e lignina) da biomassa lignocelulósica, recorre-se ao pré-tratamento alcalino. Nesse processo, usualmente são mais empregadas soluções de hidróxido de sódio, no entanto, também podem ser utilizados outros hidróxidos, como o de cálcio e potássio, e a amônia aquosa (Brito, 2023). As soluções alcalinas atuam saponificando as ligações éster entre a hemicelulose e outros compostos da biomassa, como a lignina, desencadeando uma reação química que resulta na quebra da estrutura do material lignocelulósico (Nascimento, 2016).

Um dos principais resultados do pré-tratamento alcalino é a solubilização da lignina, o que melhora a eficiência da hidrólise enzimática. Além disso, ele elimina sítios de adsorção não produtivos e torna tanto a hemicelulose quanto a celulose mais acessíveis para processos subsequentes. Adicionalmente, os pré-tratamentos alcalinos tendem a preservar os polímeros de hemicelulose, resultando em maiores rendimentos de glicose durante a hidrólise (Nascimento, 2016). Godinho *et al.* (2019), por exemplo, verificaram que ao realizar o pré-tratamento com uma solução de NaOH a 4%, a biomassa de capim elefante BRS Capiáu tinha seu teor de lignina reduzido e ocorria um aumento no teor de celulose ao serem hidrolisados nas temperaturas de 80°C e 120°C.

O aumento da temperatura durante o pré-tratamento alcalino fragmenta a lignina e a hemicelulose em fragmentos solúveis, tornando a celulose mais suscetível às enzimas. Comparado ao pré-tratamento ácido, o pré-tratamento alcalino é conhecido por causar menos degradação dos carboidratos, operando em condições ambientais mais favoráveis, como temperaturas e pressões mais baixas. Isso se traduz em uma eficiente remoção de substâncias amorfas, como a lignina e a hemicelulose, tornando o processo mais eficaz e econômico (Andrade *et al.*, 2023).

A redução parcial da lignina é fundamental para melhorar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Vale ressaltar que os efeitos do pré-tratamento alcalino são

mais pronunciados em biomassas com baixo teor de lignina, como resíduos agrícolas. À medida que o teor de lignina na biomassa aumenta, a eficácia do pré-tratamento alcalino na remoção da lignina diminui (Nascimento, 2018).

2.4.3.3 Pré-tratamentos combinados

Um dos pré-tratamentos combinados mais descritos na literatura é o pré-tratamento hidrotérmico. O pré-tratamento hidrotérmico, ou autocatalítico, é retratado na literatura como um processo que menos gera inibidores durante a fermentação, caso seja operado em uma faixa de pH entre 4 e 7 (Nascimento, 2018). É caracterizado pelo emprego de água líquida quente como reagente principal em substituição aos catalisadores ou produtos químicos e atua em temperaturas elevadas, que variam mais ou menos entre 160-240°C. O emprego de altas temperaturas potencializa a conversão da hemicelulose em seus açúcares derivados evitando a sua degradação em aldeídos. Isso ocorre em virtude da liberação de moléculas de ácidos orgânicos e acético após o rompimento dos grupos O-acetil da hemicelulose (Nascimento, 2016; Nascimento, 2018).

O pré-tratamento por explosão a vapor é semelhante ao hidrotérmico, entretanto, consiste na aplicação de vapor saturado ao invés de água quente. Apesar de não necessitar do uso de produtos químicos, esse método leva à formação de inibidores como o furfural e ácido levulínico, responsáveis pela desidratação dos açúcares de pentoses e hexoses (Brito, 2023; Azevedo, 2022; Cabral, 2015).

2.4.4 Hidrólise

A hidrólise enzimática é um processo fundamental na conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis, que posteriormente podem ser utilizados na produção de biocombustíveis e produtos químicos sustentáveis. Este método é especialmente importante em virtude da sua seletividade para a glicose, a ausência de subprodutos indesejados, a baixa toxicidade e as condições suaves de pH e temperatura, o que o torna uma alternativa ambientalmente correta (Santana, 2020).

A hidrólise enzimática da celulose é mediada principalmente por enzimas conhecidas como celulasas, como citado anteriormente. O mecanismo de ação das

celulases passa por três etapas principais: a adsorção, que é a ligação das celulases à superfície da celulose e da lignina; a quebra de ligações β -1,4, onde as enzimas quebram as ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose, causando a expansão dos poros da celulose; e a dessorção, que envolve a liberação das enzimas da superfície da celulose.

Vários fatores podem influenciar a eficiência da hidrólise enzimática, incluindo a concentração do substrato (celulose), a carga da enzima celulase, a atividade da celulase, as condições reacionais (pH, temperatura) e a inibição do produto final. Esses fatores desempenham um papel crucial na taxa e na eficácia do processo (Converse *et al.*, 1990). Nesse complexo, também se encontram enzimas auxiliares, como as xilanases, que realizam a limpeza da fibra, permitindo que a enzima celulase aja diretamente na celulose, otimizando o processo. Dessa forma, as unidades de glicose resultantes da hidrólise da celulose são submetidas à fermentação em conjunto com o caldo ou melaço de cana pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, por intermédio do tradicional processo de fermentação alcoólica (Santana, 2020).

2.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DNS

Em muitos processos fermentativos, em especial, na produção de etanol, há a necessidade de se quantificar a concentração de açúcar que não foi fermentada, ou açúcares não redutores. Segundo Santos *et al.* (2016), a falta da medição do açúcar que é fermentado pode levar a, por exemplo, uma redução na eficiência do processo, uma vez que o consumo de glicose afeta diretamente na qualidade do produto final. Nesse sentido, recorre-se ao uso de métodos que quantifiquem o teor de açúcares redutores em amostras a fim de eliminar reações e/ou interferentes indesejáveis (Silva *et al.*, 2003).

Sabe-se que açúcares redutores são descritos como carboidratos que na forma linear apresentam um grupo carbonila em sua extremidade livre capaz de se oxidar ao reagirem com um agente oxidante presente em uma solução alcalina. Por outro lado, os açúcares não redutores são incapazes de serem linearizados a partir de sua forma cíclica, uma vez os carbonos anoméricos encontram-se unidos por intermédio da ligação glicosídica e, portanto, impedindo que a extremidade redutora seja

hidrolisada a monossacarídeos na forma linear e, conseqüentemente, a sua oxidação (Santos *et al.*, 2017; Ramos, 2018).

Dentre os açúcares redutores de importante valor industrial, destaca-se a glicose. Apresentando como agente redutor o grupo carbonila do aldeído, é constantemente utilizada como fonte de açúcar em processos fermentativos e é facilmente encontrada em resíduos lignocelulósicos, como é o caso do polímero de celulose, presente na casca do coco verde (Dias; Morandim-Giannetti, 2022; Santos *et al.*, 2017).

O teor de açúcar redutor, conforme descrito por Silva *et al.* (2003), é estimável por intermédio de metodologias como os métodos de DNS, de astrona, fenol-sulfúrico, complexométrico de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), de Luff-Schoorl, Lane-Eynon, de Sumogyi-Nelson, Munson-Walker; além dos métodos cromatográficos CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e o método físico de Refratometria na escala Brix. Destes, o mais utilizado é o método DNS, ou Método do Ácido 3-5-dinitrossalicílico.

2.5.1 Método do Ácido 3-5-dinitrossalicílico

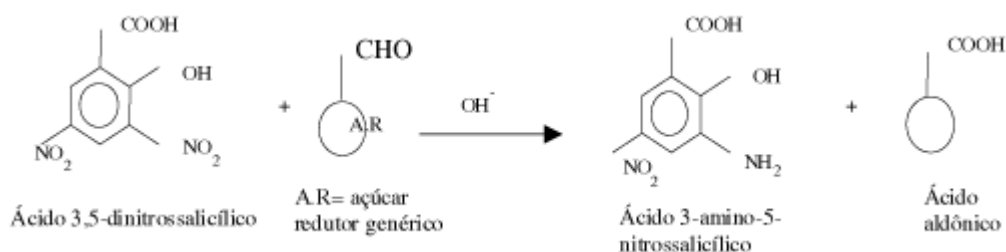
O uso do reativo DNS teve sua metodologia apresentada, primeiramente, por Sumner (1921) para analisar a quantidade de açúcares redutores presentes em amostras de urina coletadas de diferentes pacientes e verificar a diferença entre aqueles com e sem diabetes. Com base em seus estudos, Sumner (1921) constatou que o DNS conseguia absorver fortemente a luz e, com base nisso, desenvolveu uma metodologia colorimétrica entre a reação envolvendo o DNS e a amostra na presença de uma solução alcalina e em condições de aquecimento. Foi proposto que, ao misturar 1,0 mL do DNS a 2% com 1,0 mL da amostra na presença de 2,0 mL de uma solução a 1,5% de NaOH, seguidos de um aquecimento a 100°C durante 5 minutos e, posterior, diluição a 25 mL da mistura resultante, era possível determinar quantitativamente a concentração de açúcar redutor na amostra de urina fazendo uma medição colorimétrica.

No decorrer dos anos, Sumner realizou diversas modificações em sua metodologia até o ano de 1925 e abrangeu o seu uso na determinação de atividade enzimática da invertase, em 1934. Com base no seu último postulado de 1925, Miller

(1959) e Bernfeld (1955) realizaram adaptações que acabaram se tornando o método o mais empregado no curso dos anos em diversos artigos científicos e teses dissertativas (Santos *et al.*, 2017; EMBRAPA, 2013).

Esse método consiste basicamente na reação, sob condições alcalinas, entre o ácido presente no DNS e o carbono anomérico do açúcar redutor presente na amostra. Durante a reação, o ácido 3-5-dinitrossalicílico (agente oxidante de cor amarela) é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que o grupo aldeído do monossacarídeo é oxidado a ácido aldônico, conforme pode-se observar na Figura 8 (Silva *et al.*, 2003; Andrade, 2017; Santos *et al.*, 2017).

Figura 8 – Reação de redução do ácido 3-5-dinitrossalicílico e oxidação do açúcar redutor.



Fonte: Silva *et al.* (2003).

As análises de açúcares redutores são feitas em espectrofotômetro de UV-Vis, no comprimento de onda 540 nm, que corresponde ao valor de máxima absorção de luz do ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. A conversão da absorbância da amostra em concentração de glicose (g/L) é feita por intermédio do cálculo do valor de X extraído da curva padrão elaborada após o preparo da solução de DNS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco e seguiram a ordem cronológica das etapas descritas a seguir:

3.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado nesse experimento pertence à linhagem do fungo filamentoso *Achaetomium lippiae* URM604, da coleção da micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O fungo foi cultivado em meio PDA (Potato Dextrose Agar) sob condições assépticas e incubado a 30°C.

3.2 CULTIVO DO FUNGO

Inicialmente, foi feita uma inoculação da cultura pura do fungo no meio líquido de ativação (solução de glicose) previamente preparado e esterilizado em 2 Erlenmeyers. Como o fungo cresce em meio aeróbico, foi necessário colocar as amostras numa agitadora operando a 120 rpm e a 30°C durante 7 dias. Após esse período, o fungo ativado foi repicado em placas de Petri contendo meio de PDA sólido. Esta sequência deve ser seguida pois o fungo crescendo diretamente em meio sólido poderá ter sua viabilidade reduzida. Para tanto, é necessário ativá-lo primeiro no meio líquido.

3.2.1 Preparo do meio líquido de ativação

Nesta etapa foi utilizado como substrato um meio líquido de ativação, ou meio de glicose, para induzir o crescimento fúngico. Preparou-se uma solução de 200 mL de meio de glicose utilizando os reagentes apresentados na Tabela 2. Ao fim do preparo do meio, ocorreu a transferência em duplicata de 100 mL da solução para

Erlenmeyers de 250 mL e, em seguida, os meios foram levados para autoclavar a 121°C.

Tabela 2 – Composição do meio de glicose.

Componentes	Concentração
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20 g/L
Fosfato monopotássio (KH ₂ PO ₄)	2 g/L
K ₂ HPO ₄	2 g/L
Uréia (CH ₄ N ₂ O)	0,3 g
Peptona	0,75 g/L
Extrato de levedura	0,25 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 g/L
CaCl ₂	0,3 g/L

Fonte: Autor (2023).

3.2.2 Preparo do meio sólido PDA (Potato Dextrose Agar)

Para que o fungo fosse semeado em meio sólido, foi preparada aproximadamente 100 mL de uma solução líquida contendo extrato de batata (200 g/L), dextrose (20 g/L) e ágar (15 g/L). Ajustou-se o pH da solução utilizando o pHmetro (MS TecnoPon – mPA210), calibrando com a solução tampão padrão (pH 7 e pH 4), até atingir 5,5 de pH, que corresponde a faixa ótima de atuação do fungo. Fez-se necessário adicionar algumas gotas de solução de NaOH 2 N para atingir o pH ideal. Após o ajuste, o meio PDA foi vertido em placas de Petri, transferindo 20 mL da solução para cada uma das 5 placas utilizadas e esperou o meio se solidificar. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente na estufa por 2 dias a fim de garantir que não ocorresse contaminação dos meios.

3.3 MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

Para a manutenção do fungo foram realizados repiques trimestrais em meio PDA, cuja composição está descrita no item anterior.

3.4 PREPARO DO INÓCULO DO MEIO DE GLICOSE

Para a determinação do consumo de glicose durante o processo fermentativo, foi necessário preparar um outro meio de glicose, cujo inóculo foi uma alçada do fungo crescido anteriormente na placa de Petri. O meio foi distribuído igualmente em 3 Erlenmeyers e esterilizado. O fungo foi inoculado em cada meio e, em seguida, foram incubados na agitadora (Nova Ética) e mantidos sob agitação constante de 120 rpm a 30°C por um período de 7 dias. A cada 24 horas, foram retiradas amostras de 2 mL de cada meio para determinação da concentração de glicose e, posteriormente, determinar o melhor dia de crescimento fúngico para inocular nas amostras contendo celulose. As amostras coletadas foram armazenadas em tubos de ensaio de plástico e deixadas no freezer para parar o seu metabolismo.

3.4.1 Análise da glicose pelo método DNS

Para a análise de glicose pelo método DNS, as alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada amostra dos 7 dias fermentativos e transferidas para balões volumétricos sendo submetidas a diluições. Posteriormente, foram transferidos 0,5 mL de cada amostra para tubos de Follin-Wu e adicionou-se 1 mL da solução do DNS. Para o preparo do branco foram utilizados 0,5 mL de água e 1 mL de DNS. Ao fim, os tubos de Follin-Wu foram aquecidos em banho-maria a 100°C durante 5 minutos e resfriados em um banho de gelo logo em seguida para interromper a reação. O volume de cada tubo foi completado em até 12,5 mL com água destilada, vedados com filme plástico e homogeneizados. A leitura das amostras foi realizada em um espectrofotômetro UV-Visível (SPECTRUM METER, SP-1105), previamente calibrado para uma faixa de 540 nm de comprimento de onda. Os valores lidos para a absorbância foram utilizados para calcular a concentração de glicose em g.L⁻¹ mediante a Equação 1 da curva do DNS, cujo reagente se encontrava estocado no Laboratório de Microbiologia da UFPE com sua devida curva de calibração anotada.

$$y = 0,2983x - 0,027 \quad (1)$$

Onde, x é a concentração de glicose em g.L⁻¹ e y é a absorbância.

3.5 CULTIVO EM MEIO DE CELULOSE

Após os 7 dias, o fungo crescido em cada amostra de meio de glicose foi inoculado no meio de celulose, previamente preparado, para posterior análise da atividade enzimática, e deixado na agitadora durante 9 dias.

3.5.1 Preparo do meio de celulose

O método de preparo é o mesmo do meio de glicose, diferenciando apenas no uso da celulose D microcristalina no lugar da glicose como fonte de carbono.

3.5.2 Produção de celulase

Foram retiradas amostras de 2 mL durante os 9 dias fermentativos, sendo congeladas logo em seguida para posteriormente serem utilizadas no ensaio enzimático.

3.5.3 Separação do caldo enzimático

A separação do caldo fermentativo foi realizada com a remoção do micélio do caldo fermentativo por um processo de peneiramento, com o auxílio de uma peneira, sob condições assépticas.

3.5.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi feita com a solução de sobrenadante obtida após a filtração e remoção dos micélios dos meios de fermentação, seguindo a metodologia proposta por Ghose (1987). Foram utilizadas tiras de papel filtro para testar a capacidade do fungo quanto à produção celulolítica valendo-se da degradação do papel de filtro pela enzima sintetizada pelo fungo.

Os testes foram feitos em papel de especificação, Whatman nº 1 – 1 cm x 6 cm (50 mg), foi usado uma solução tampão de citrato de sódio 50 mM e pH 4,8 e uma

solução reagente de DNS para medição de glicose livre oriunda da hidrólise do papel (Inforsato e Porto, 2016).

À medida que foi sendo degradado e o papel de filtro foi liberando açúcar, conseguiu-se determinar a concentração de açúcares redutores que foram liberados. No entanto, como as amostras coletadas anteriormente à introdução do papel de filtro já continham açúcar residual, para obter a concentração exata de açúcares redutores foi necessário realizar o ensaio do tempo zero para descontar do açúcar produzido. A determinação da atividade enzimática para celulasas totais (FPase) foi feita por meio da Equação 2 (Inforsato e Porto, 2016).

$$UI = \frac{DxCxV_t}{TxV_e} \quad (2)$$

Onde, D é a diluição; C é a concentração em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$; V_t é o volume total da reação; T é o tempo de reação e V_e é o volume da solução enzimática em mL.

3.5.4.1 Ensaio enzimático

As tiras de papel de filtro foram enroladas em forma de espiral e introduzidas dentro de pequenos tubos de ensaio. Adicionou-se 1 mL da solução tampão de citrato de sódio, previamente preparado, e fez-se uma breve agitação. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C , onde permaneceram por 1 minuto. Após o período, efetuou-se a adição de 0,5 mL da solução enzimática e deixou reagir por 60 minutos. Ao fim dessa etapa, os tubos foram colocados em um banho de gelo e depois foram transferidos 0,5 mL da mistura reacional para tubos de Follin-Wu contendo apenas 1 mL da solução de DNS. Procedeu-se com a análise de DNS.

Para quantificar o açúcar residual contido no extrato enzimático e reduzi-lo do resultado obtido no ensaio enzimático foi feito o tempo zero. Os ensaios do tempo zero foram feitos em tubos contendo 1 mL do tampão e 0,5 mL da solução enzimática. Logo depois, foi feita a retirada de 0,5 mL dessa mistura e transferiu-as para outros tubos contendo 1,0 mL da solução de DNS.

As amostras foram lidas contra um branco preparado em um tubo de Follin-Wu, utilizando 0,5mL da solução tampão de citrato de sódio e 1,0 mL de DNS.

3.5.5 Determinação de proteínas

No estudo da quantidade de celulasas foi feito o teste com o reagente Biureto que seguiu a metodologia proposta por Gornall *et al.* (1949).

Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 0,5 mL da amostra, 0,5 mL de água destilada e 4,0 mL do reagente de Biureto (Tabela 3). O branco foi preparado separadamente em um outro tubo de ensaio com a adição de 1,0 mL de água destilada em 4,0 mL de biureto. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 15 minutos para posterior leitura no espectrofotômetro (SPECTRUM METER, SP – 1105) a 540 nm. É importante destacar que, como o reagente de Biureto já se encontrava preparado e disponível no laboratório de microbiologia do Departamento de Engenharia Química da UFPE, não foi necessário o seu preparo.

Tabela 3 – Composição do reagente de Biureto.

Reagentes	Concentração
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1,5 g
Tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	6,0 g
Hidróxido de sódio (NaOH) 10%	300 mL
Iodeto de potássio (KI)	1 g
Água destilada	1,5 L

Fonte: Autor (2023).

Aplicando-se a Equação 3 foi possível determinar a concentração de proteínas totais presentes em cada meio fermentativo.

$$y = 0,0442x + 0,0052 \quad (3)$$

Onde, y é a leitura da absorbância e x é a concentração de proteínas totais.

3.6 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DA ENZIMA CELULASE

Conhecido o tempo de produção máxima de celulase, o sobrenadante foi coletado para realizar o teste de atividade enzimática em diferentes temperaturas

(entre 40 e 70°C) utilizando a técnica da FPase. Após determinar a temperatura ótima de ação enzimática, a solução foi utilizada para testar a degradação da fibra do coco verde.

3.7 AÇÃO DA CELULASE SOBRE A FIBRA DO COCO VERDE

A solução enzimática foi utilizada para degradar a fibra do coco verde a fim de verificar se ocorria a liberação de açúcar fermentescível para utilizá-los com fins biotecnológicos, por exemplo, a geração de etanol. O coco verde foi coletado em um ponto de venda de água de coco, lavado com água de torneira e armazenados na estufa a 60°C por 4 dias. Após secagem, suas cascas foram fragmentadas em tamanhos menores em um moinho de facas e armazenado para posteriores análises.

O material lignocelulósico moído foi pré-tratado com uma solução de NaOH 1,0 M na razão 1:5 (m/v) e, na sequência, foi inserido na autoclave a 121 °C por 30 minutos. Após isso, o resíduo pré-tratado foi lavado repetidas vezes em água corrente até que fosse atingido um pH neutro e seco a 60 °C. Depois de seco, aproximadamente 2,5 g do material foi misturado com 50 mL do extrato enzimático e adicionou-se 10 mg de azida de sódio para evitar o crescimento de micro-organismos durante o ensaio.

O material lignocelulósico moído foi pré-tratado com uma solução de NaOH 1,0 M na razão 1:5 (m/v) e, na sequência, foi inserido na autoclave a 121 °C por 30 minutos. Após isso, o resíduo pré-tratado foi lavado repetidas vezes em água corrente até que fosse atingido um pH neutro e seco a 60 °C. Depois de seco, aproximadamente 2,5 g do material foi misturado com 50 mL do extrato enzimático e adicionou-se 10 mg de azida de sódio. A mistura foi incubada a 50 °C durante 48 h e ocorreram retiradas de amostras nos intervalos de 12, 24 e 48 horas para serem feitas análises de glicose.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DO COCO VERDE

O coco verde *in natura* e pré-tratado foi caracterizado estruturalmente por DRX (difratometria de raios X). Foi utilizado o difratômetro SmartLab SE – Rigaku e a análise foi conduzida nas seguintes condições operacionais: radiação CuK α (1,5406 Å), corrente de 30 mA; voltagem de 40 kV, intervalo de 2 θ percorrido de 3-35°,

velocidade de varredura de $2^\circ(2\theta)/\text{min}$ e passo angular de $0,02^\circ$. O índice de cristalinidade foi calculado por intermédio da Equação 4, conforme Segal *et al.* (1959).

$$ICr = \frac{(I_c - I_{am})}{I_c} \times 100 \quad (4)$$

Onde, ICr é o índice de cristalinidade; I_c é a intensidade máxima de difração da estrutura e I_{am} é a intensidade de difração amorfa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão explanados os resultados obtidos na pesquisa deste TCC.

4.1 CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano foi realizado em meio sólido utilizando o PDA (Potato Dextrose Agar) como substrato.

Após o período de 7 dias de incubação à 30°C, percebeu-se que o crescimento das colônias da linhagem *Achaetomium lippiae* foi evidenciado pela formação de um halo micelial de aspecto aveludado e coloração esbranquiçada nas placas de Petri, conforme pode-se observar na Figura 9.

Figura 9 – Colônias do fungo *Achaetomium lippiae* URM 604 em meio sólido PDA ao fim dos 7 dias de cultivo.



Fonte: Autor (2023).

4.2 ANÁLISE DO CONSUMO DA GLICOSE

Nesta etapa, foi realizado um ensaio com meio líquido de glicose objetivando-se analisar a variação da sua concentração nos 7 dias fermentativos (desconsiderando os dias 4 e 5, nos quais não houve retiradas das alíquotas) e, com

isso, poder determinar o melhor momento para transferência do inóculo para o meio de celulose, garantindo que o fungo não ficaria sem glicose durante o preparo do inóculo.

A partir das alíquotas retiradas a cada 24 horas, foi possível realizar os ensaios de açúcares redutores e usar os valores lidos no espectrofotômetro (UV-Vis a 540 nm) para absorbância (incógnita Y) para determinar a concentração de glicose (valor da incógnita X) na curva padrão (Equação 1) obtida após o preparo do reagente DNS (Ácido 3,5 dinitrossalicílico).

A Tabela 4 apresenta os dados referentes ao consumo de glicose do *Achaetomium lippiae* em meio líquido preparado na Tabela 2. A quantificação de açúcares redutores (concentração de glicose em g.L^{-1}) foi feita a partir da leitura da absorbância de cada alíquota retirada. Os ensaios foram elaborados em triplicata e alguns necessitaram passar por diluições antes de serem lidos no espectrofotômetro UV-Vis a 540 nm. Ao fim do ensaio, foi tirada uma média da concentração de glicose em cada dia (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de glicose (g.L^{-1}) no meio fermentativo ao longo do tempo.

Dia	Concentração média de glicose (g.L^{-1})	Desvio padrão
0	19,4156	2,59851
1	20,0246	1,09981
2	18,2702	0,72522
3	15,1861	2,70876
6	10,7051	1,29155
7	5,7034	4,71003

Fonte: Autor (2023).

Após o desenvolvimento fúngico em meio fermentativo, foi possível identificar que após 7 dias não ocorreu o esgotamento da glicose no meio. Quando se observa a Tabela 4 percebe-se que os dois primeiros dias não apresentaram diferença estatística. Consecutivamente, a partir do 3º dia, a concentração média de glicose sofreu quedas até atingir um valor médio mínimo de $5,7034 \text{ g.L}^{-1}$ no último dia de incubação.

Ademais, conforme a Tabela 4, pode-se notar uma grande diferença na concentração média de glicose entre os ensaios do 1º e 7º dias fermentativos, indicando um significativo consumo de glicose do fungo *Achaetomium lippiae* e uma maior concentração de biomassa a ser inoculada no meio de celulose.

Assim decidiu-se por encerrar a fermentação no 7º dia para evitar o esgotamento da glicose e consequente mudança no metabolismo do fungo para um estado de manutenção, bem como para evitar tempos muito longos de produção de inóculo.

4.3 PRODUÇÃO DE CELULASE

Para avaliar o melhor dia de produção de atividade enzimática, um novo ensaio foi conduzido em meio líquido na presença do substrato de celulose microcristalina. A celulose microcristalina, conforme relatada por Marco (2021), é proveniente da celulose natural, sendo obtida por hidrólise ácida da polpa da madeira. Embora a celulose na forma amorfa seja mais suscetível ao ataque enzimático, a microcristalina também é viável sendo comumente utilizada em ensaios de caracterização enzimática. Baseando-se nisto, foi realizado um ensaio em meio de celulose com um inóculo extraído pós 7 dias fermentativos no meio de glicose. O ensaio indicou um valor médio de 0,419 g da massa de fungo em 100 mL de meio que cresceu após período fermentativo.

As concentrações de açúcares redutores presentes nas alíquotas retiradas em intervalos de 24 horas foram usadas como base na determinação da atividade de celulasas, cujos dados estão presentes na Tabela 5.

Tabela 5 – Determinação da atividade de celulases (U.mL⁻¹) em cada dia fermentativo utilizando meio líquido de celulose.

Dia	Atividade de Celulases (U.mL ⁻¹)
1	0,00137
2	0,00947
5	0,01552
6	0,12928
7	0,01164
8	0,02212
9	0,00729

Fonte: Autor (2023).

Na determinação da atividade de celulases, presente na Tabela 5, considerou-se a diferença da concentração de açúcares fermentescíveis entre os ensaios enzimáticos com e sem papel de filtro, uma vez que queria apenas avaliar os açúcares liberados durante a degradação da celulose (papel de filtro). Contudo, como as amostras coletadas já continham açúcares redutores, foi necessário extrair este valor residual produzido (tempo zero do ensaio enzimático).

Em consonância com a Tabela 5, as atividades enzimáticas variaram de 0,00137 (dia 1) a 0,00729 U.mL⁻¹ (dia 9), apresentando atividade máxima igual a 0,12928 U.mL⁻¹ após 6 dias de incubação a 30°C sob constante agitação em 120 rpm. Observa-se igualmente o incremento da atividade enzimática durante a maioria dos dias fermentativos indicou uma ótima adaptação do fungo ao meio fermentativo.

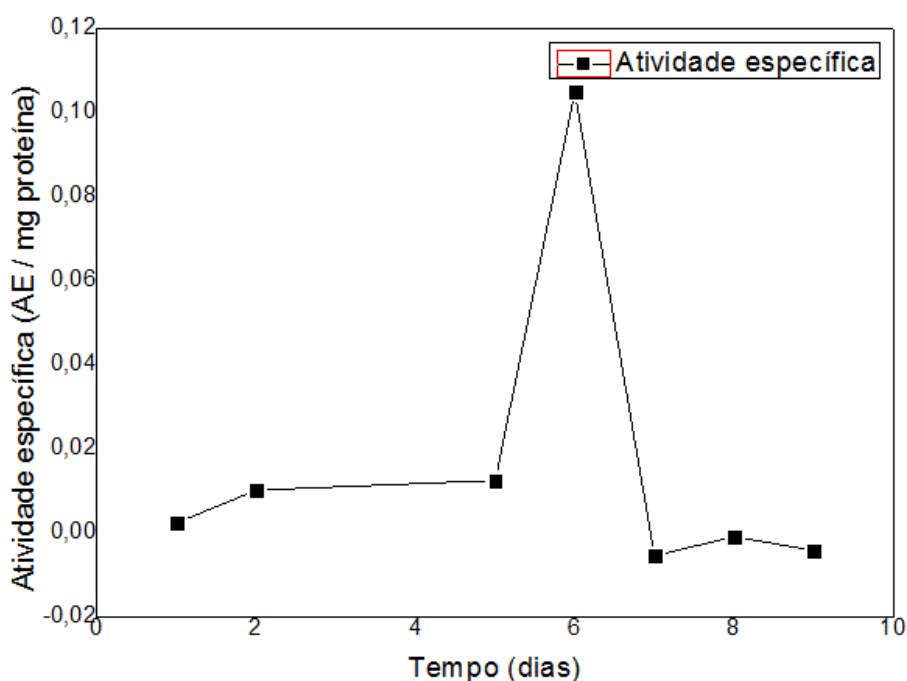
Conforme o aumento enzimático verificado na Tabela 5, Zúñiga *et al.* (2009) assumem que a produção enzimática de celulases é induzida pelo substrato. Com base nisso, constata-se que a celulose serviu de substrato para o crescimento fúngico. Assim, à medida em que os micro-organismos foram consumindo a celulose do meio, esse substrato foi sendo reduzido, dificultando a produção de celulases após o 6º dia fermentativo.

Fazendo uma comparação para indução de celulase do *Achaetomium lipipiae* com outras espécies de endofíticos, estudos anteriores mostraram que as linhagens do gênero *Chaetomium/Achaetomium* apresentaram um índice enzimático para

celulase superior ao de outras espécies endofíticas. Mayrink (2010), ao cultivar diversas linhagens de endofíticos em meio líquido utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, obteve atividades celulolíticas iguais a $0,06 \text{ U.mL}^{-1}$, $0,04 \text{ U.mL}^{-1}$, $0,05 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,07 \text{ U.mL}^{-1}$, para as linhagens/isolados endofíticas T04, T02, T05 e T07 do fungo *Trichoderma* spp.

Foram estudadas ainda a quantidade de celulases (Figura 10) presentes na concentração de proteínas totais liberadas pelo fungo (Maftukhah; Abdullah, 2018). Por intermédio da análise de Biureto, método empregado na detecção das proteínas totais liberadas pelo fungo, ficou evidente que a maior atividade específica (AE/mg de proteína) foi observada no 6º dia fermentativo ($0,12 \text{ AE/mg}$ de proteína). O gráfico apresentado na Figura 10 ainda comprovou que ocorreu uma desnaturação proteica após o dia 6.

Figura 10 - Atividade específica (AE/mg de proteína) para a linhagem *Achaetomium lippiae*.



Fonte: Autor (2023).

Anexo a isto, pode-se inferir que a redução enzimática pós 6º dia está atrelada ao processo de desnaturação proteica, uma possível consequência da liberação de proteases no meio pelo fungo.

Em contrapartida, quando comparado com valores citados na literatura, a máxima de atividade específica ($0,12 \text{ AE/mg}$) apresentou-se inferior. Dias e

Morandim-Giannetti (2022) reportaram, por exemplo, uma concentração de celulasas igual à $0,489 \text{ U.mg}^{-1}$ para o fungo *Annulohypoxyylon stygium* isolado do caule da mandioca, após 4 dias de cultivo a 55°C .

Por conseguinte, conforme apresentado na Figura 10, foi possível observar que o fungo *Achaetomium lippiae* teve produção máxima de celulasas no 6º dia fermentativo. Com isso, utilizou-se esse resultado como referência para realizar o teste enzimático em diferentes temperaturas (40 , 50 , 60 e 70°C).

4.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

Um aspecto importante a ser evidenciado é que a temperatura é um dos elementos que mais exercem influência na atividade enzimática. Isso porque temperaturas mais altas tendem a elevar a energia cinética de reação, ocasionando a quebra da estrutura secundária-terciária da enzima. É válido destacar também que cada enzima apresenta uma temperatura onde ocorre sua máxima atuação e após essa faixa ocorre a sua desnaturação (Maftukhah; Abdullah, 2018).

Ao avaliar, na Tabela 6, as atividades enzimáticas foram equivalentes a $0,0318 \text{ U.mL}^{-1}$, $0,0585 \text{ U.mL}^{-1}$, $0,0503 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,00807 \text{ U.mL}^{-1}$ para as temperaturas de 40 , 50 , 60 e 70°C , respectivamente. Verifica-se que o maior valor obtido para o consumo de açúcares redutores nesta etapa ocorreu a uma temperatura de 50°C . Este resultado demonstrou-se satisfatório e dentro do previsto diante da ótima faixa de temperatura exibida na literatura para espécimes endofíticas (Azevedo, 2022).

Tabela 6 – Determinação da atividade enzimática para celulasas totais produzidas pelo fungo *Achaetomium lippiae* em diferentes condições de temperatura (40-70°C).

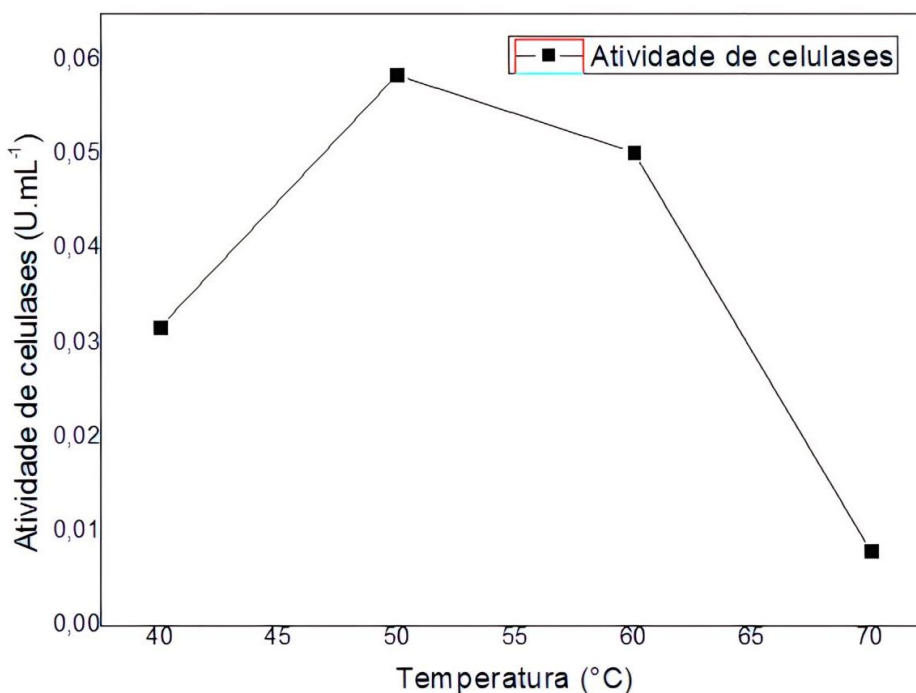
Temperatura (°C)	Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	Atividade de Celulasas (U.mL ⁻¹)
40	0,225165	0,0318
50	0,321265	0,0585
60	0,291653	0,0503
70	0,13968	0,00807

Fonte: Autor (2023).

Ainda observando a Tabela 6 é possível notar que a partir de 50°C passa a ocorrer uma desnaturação da celulase, indicando uma diminuição na concentração de açúcares totais liberados (Azevedo, 2022; Maftukhah; Abdullah, 2018). Para ilustrar os dados apresentados na Tabela 6, um gráfico (Figura 11) foi plotado, com o auxílio do software Origin 8, para demonstrar a atividade de celulasas (U.mL⁻¹) com a variação da temperatura.

Similarmente, Oliveira *et al.* (2009) obtiveram um extrato enzimático com atividade de FPase igual a 0,32 UI.mL⁻¹ ao cultivar sob fermentação submersa a linhagem *Aspergillus heteromorphus* utilizando avicel e a casca do coco verde *in natura* como substratos.

Figura 11 – Atividade da celulase (Fpase) para diferentes temperaturas (40-70°C).



Fonte: Autor (2023).

Em consonância com a Figura 11, notou-se novamente que o aumento da atividade enzimática foi, inicialmente, condizente com o aumento da temperatura de reação, evidenciando, portanto, a sua influência no desenvolvimento da atividade enzimática. Porém, acima de uma certa temperatura, a atividade enzimática começa a decair. Com isso, conforme descrito anteriormente, a máxima atividade enzimática da celulose atuou na temperatura de 50°C, evidenciando, portanto, que por ser pertencente ao gênero *Achaetomium*, a espécie *Achaetomium lipipiae* apresenta uma ótima atuação em temperaturas na faixa de 30-55°C (Azevedo, 2022).

4.5 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA CASCA DO COCO VERDE

A importância do pré-tratamento de resíduos celulósicos é bastante retratada na literatura. Alguns estudos envolvendo pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos indicam inclusive um aumento da atividade enzimática no meio. Por atuarem como inibidores da digestão celulósica, a lignina torna-se o principal alvo dos métodos de pré-tratamento (Maftukhah; Abdullah, 2018).

Dentre os métodos aplicados, o pré-tratamento químico confere um melhor ataque à estrutura da lignina, reduzindo, por sua vez, a rigidez da matriz celulósica. A sua escolha em detrimento do pré-tratamento ácido se dá devido à não formação de produtos secundários durante a hidrólise dos açúcares, tais como compostos fenólicos e ácido acético, além de poder ser executado em baixas condições de temperatura (Pereira, 2021). O uso do NaOH no pré-tratamento alcalino é um dos mais recomendados e citados em pesquisas literárias. Pereira (2021) ressalta que o NaOH consegue separar a hemicelulose da lignina por intermédio do rompimento da ligação de hidrogênio que as une. Outros autores, como Maftukhah e Abdullah (2018) apontam em seus estudos que o NaOH atua removendo apenas a lignina. Eles também conduziram uma avaliação do potencial enzimático da celulase do isolado *Aspergillus niger* ITBCC L74 ao ser cultivado em meio sólido. Foi verificada uma maior atividade ($5,05 \text{ U.mL}^{-1}$) nas condições de pH 4 e 60°C . Os autores ainda relataram um aumento de 21,40% para a atividade de celulases ao realizar um pré-tratamento alcalino do substrato de palha de arroz.

Com base nessas pesquisas, foi averiguada a concentração de açúcares redutores liberados pelo coco verde pré-tratado pela ação celulolítica da linhagem *Achaetomium lippiae*. O resultado obtido está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Determinação da liberação de açúcares redutores pelo fungo *Achaetomium lippiae* na degradação da casca do coco verde após pré-tratamento alcalino.

Tempo (horas)	Concentração de açúcares redutores (g.L^{-1})	Rendimento da glicose ($\text{mg glicose/g coco pré-tratado}$)
0	0,248072	4,961448
6	3,638395	72,76791
24	7,956196	159,1239
48	9,716169	194,3234

Fonte: Autor (2023).

Avaliando os resultados na Tabela 7, percebe-se que o fungo *Achaetomium lippiae* apresentou um potencial significativo na degradação da casca do coco verde,

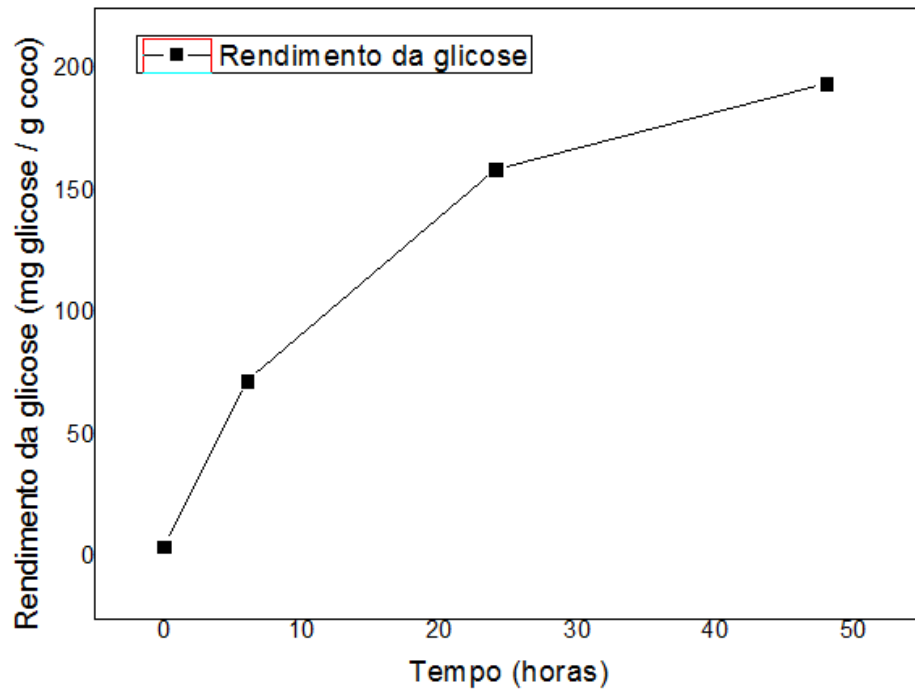
reportando um rendimento máximo igual a 194,3234 mg glicose/g coco pré-tratado com NaOH 1,0 M após 48 horas. Os dados obtidos na Tabela 6 sugerem que a concentração de açúcares redutores no meio aumentou em aproximadamente 9,4 g.L⁻¹, consequência da conversão da celulose no processo de hidrólise enzimática.

A concentração de açúcares redutores obtidos após 6 horas do processo se assemelha ao valor reportado por Pereira (2021) em uma pesquisa sobre o uso de uma solução de NaOH no pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar. O experimento foi conduzido em diferentes concentrações de NaOH (0,25 M; 0,5 M e 0,75 M), tempos de reação (20, 40 e 60 minutos) e temperaturas (60°C, 80°C e 100°C). Foi verificada uma concentração máxima equivalente a 2,42 g.L⁻¹ de açúcares redutores extraídos da biomassa pré-tratada com NaOH na concentração de 0,75 M em 60 minutos de reação a 100°C.

Cabe ressaltar também que o aumento abrupto da atividade celulolítica a 50°C, após o pré-tratamento com NaOH a 2%, pode estar correlacionado às consecutivas filtrações com água as quais a biomassa foi submetida, até que fosse atingido um pH neutro. Azevedo (2022) descreve que a lavagem da biomassa, de forma subsequente ao pré-tratamento alcalino, com água ajuda na estabilização do pH e, conseqüentemente, leva a um aumento do rendimento do processo de conversão.

O máximo rendimento de glicose também está evidenciado no gráfico (Figura 12) plotado pelo software Origin 8. O gráfico mostra que a atividade enzimática máxima para a celulase ocorreu para a amostragem de 48 horas.

Figura 12 - Rendimento de glicose no coco verde pré-tratado.

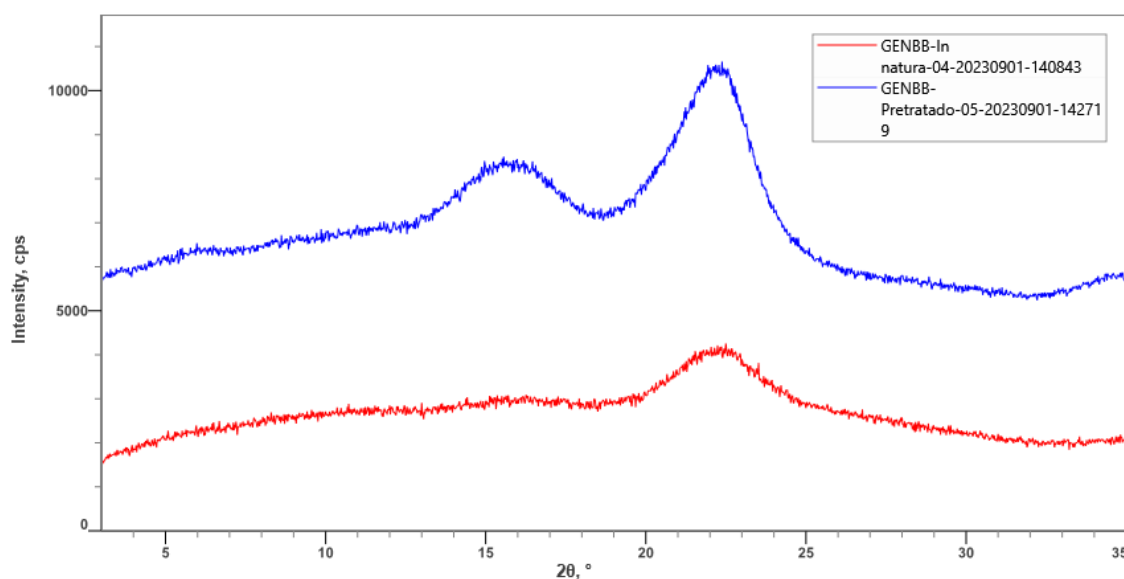


Fonte: Autor (2023).

4.6 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A partir da difração de raios-X foi possível analisar o efeito que o pré-tratamento alcalino exerce na cristalinidade do coco verde. A Figura 13 mostra os perfis da cristalinidade da fibra do coco verde *in natura* e pré-tratado com NaOH 1,0 M.

Figura 13 – Difratoograma de raios-X para a casca do coco verde *in natura* (cor vermelha) e pré-tratado (cor azul).



Fonte: Autor (2023).

Ao se avaliar os difratogramas, observa-se que a amostra *in natura* apresentou no eixo 2θ picos máximos ($16,33^\circ$ e $22,26^\circ$) relativamente próximos aos valores descritos na literatura para a forma polimórfica da celulose tipo I (15° e $22,5^\circ$) (Brito, 2023).

Face ao resultado mostrado no difratograma do pré-tratado (Figura 13) notou-se que a intensidade dos picos (região cristalina e amorfa) da amostra pré-tratada aumentou significativamente, não apresentando mudança polifórmica da celulose uma vez que manteve picos referente à celulose do tipo I. A região cristalina manteve-se com uma intensidade superior à da região amorfa mesmo após o pré-tratamento. A mudança na sua estrutura da celulose após o pré-tratamento foi averiguada com base no cálculo dos índices de cristalinidade, que relaciona as intensidades dos picos máximos das regiões amorfa e cristalina. Esses valores estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Índice de cristalinidade do coco verde *in natura* e pré-tratado.

Coco verde	ICr (%)
<i>In natura</i>	43,13
Pré-tratado	71,40

Fonte: Autor (2023).

Observa-se na Tabela 8 que o pré-tratamento alcalino com NaOH 1,0 M levou a um aumento da intensidade dos picos e, consequentemente, do ICr. A caracterização por difração de raios-X indicou um aumento de 28,27% na cristalinidade do coco verde.

Embora o pré-tratamento vise reduzir a cristalinidade da biomassa lignocelulósica, a sua aplicação também resulta na extração parcial de seus componentes amorfos (lignina e hemicelulose) (Araújo, 2016). Desse modo, com o aumento da cristalinidade reportada na Tabela 8, pode-se supor que ocorreu a remoção de parte da lignina e hemicelulose, levando a uma reorganização estrutural do polissacarídeo residual. Diante disso, considera-se que a diminuição da parte amorfa foi resultante do pré-tratamento alcalino (NaOH 2%) aplicado na casca do coco verde pois, segundo Gallindo *et al.* (2019) e Azevedo (2022), o pré-tratamento alcalino apresenta vantagem na remoção da lignina e solubilização de grupos acetil presentes na cadeia da hemicelulose.

No geral, pode-se dizer que índice de cristalinidade é diretamente afetado pelas regiões amorfas que compõem a biomassa. O valor reportado na Tabela 8 foi semelhante a outros resultados encontrados na literatura. Vale ressaltar que os demais trabalhos fizeram uso de pré-tratamentos combinados.

Em seus estudos, Brito (2023) relatou que fibra do coco verde teve seu índice de cristalinidade aumentado de 29,82% (*in natura*) para 65,45%, quando submetido a pré-tratamento ácido/alcalino (ácido sulfúrico e hidróxido de sódio 4%), e para 52,75%, com hidróxido de sódio 4% (v/v) combinado a explosão de vapor. A cristalinidade da casca do coco verde também foi estudada por Araújo (2016). O autor obteve um ICr igual a 51,05% ao utilizar um pré-tratamento químico (alcalino/ácido) e 28,99% no tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a 7,35% (v/v).

Assim, pode-se confirmar o efeito positivo do pré-tratamento aplicado sobre a biomassa de coco verde, expondo as fibras celulósicas ao ataque enzimático, fato esse que resultou na liberação de açúcares redutores na etapa de hidrólise.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram analisados o potencial da espécie endofítica *Achaetomium lippiae* na obtenção de celulases, a maior temperatura de sua atuação e o emprego dessas enzimas hidrolíticas na degradação da casca do coco verde.

De início, o crescimento do fungo foi induzido pelo meio líquido de ativação e ele mostrou-se, posteriormente, bem adaptado à fermentação submersa tendo a celulose D microcristalina como substrato. Ao fim do período fermentativo (7 dias), o fungo apresentou uma massa de crescimento correspondente a 0,419 g para 100 mL de meio.

Em termos de atividade enzimática, o fungo *Achaetomium lippiae* se mostrou versátil na sintetização de celulases. Sua atividade enzimática foi otimizada na temperatura de 50°C (0,0585 U.mL⁻¹), apresentando-se dentro da faixa descrita para espécies do gênero *Achaetomium*, 30-55°C. A análise de Biureto permitiu a quantificação de celulases contidas nas proteínas totais produzidas pelo fungo e indicou cerca de 0,12 AE/mg de proteína.

Anexo a isso, o pré-tratamento alcalino com NaOH 2% auxiliou na degradação do coco verde facilitando, conseqüentemente, a extração de açúcares fermentescíveis contidos na biomassa. Prova disso foi o aumento na concentração de glicose presente no extrato enzimático, alcançando 9,72 g.L⁻¹ após 48 horas.

Diante da problemática ambiental envolvendo a difícil decomposição do coco verde, a hidrólise enzimática contribuiu para a redução de regiões amorfas (lignina e hemicelulose) levando a um aumento de 28,27% do índice de cristalinidade da celulose da casca do coco verde.

6. 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.
- AGUIAR, C. M de.; LUCENA, S. L de. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.
- ANDRADE, J. C. F de. **Catálise heterogênea da celulose proveniente do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de açúcares redutores**. 59f. Dissertação (Bacharelado em Química do Petróleo) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2017.
- ANDRADE, T. C. C.; SIQUEIRA, L. N de.; SOUZA, D. A de.; SILVA, F. V.; GUARDA, P. M.; GUARDA, E. A. Análise da influência do pré-tratamento químico e físico sob a caracterização das frações celulose e lignina de diferentes biomassas e seu potencial para produção de etanol de segunda geração. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 3, Maringá (PR), 2018. DOI: 10.17765/2176-9168.2018v11n3p955-974.
- ARAÚJO, C. K. C. **Avaliação da influência de surfactantes químico e biológico na hidrólise enzimática da casca do coco verde após pré-tratamento ácido/alcalino e com peróxido de hidrogênio alcalino**. 93f. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2016.
- ARAÚJO, J. A.; FERREIRA, A. S. C.; ALVEZ, Y. F. M.; SILVA, C. I.; 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. 1. W.; MARIM, R. A.; KASSEM, A. S. S.; SANTANA, T. T.; DO VALLE, J. S. Produção de biomassa micelial e enzimas lignocelulolíticas de *Plenrotus* spp em meio de cultivo liquido. **Resenrci, Society and Development**, v. 10, n. 1, 2021.
- AZEVEDO, B de. **Produção de celulasas e xilanases por uma nova espécie – Achaetomium lippiae URM 7547 – utilizando a fibra de coco verde pré-tratada por explosão a vapor**. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2022.
- AZEVEDO, B.; SILVA, O. L.; MATIAS, S. C. B.; BEZERRA, P. K. S. B.; FILHO, P. F. S.; SANTOS, E. S. dos. Avaliação do potencial de nova espécie de fungo endofítico Achaetomium lippiae URM-7547 na indução de enzimas hidrolíticas. Trabalho apresentado no 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ). Gramado/RS, 2020.

AZEVEDO, J. L. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS. In: Melo, I. S de.; AZEVEDO, J. L de. (org.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

BACCHIN, A. L. G.; CUNHA, F. M da.; ZANGIROLAMI, T. C.; FARINAS, C. S. Quantificação indireta do crescimento de *Aspergillus niger* em meio contendo sólidos visando à produção de celulases. Trabalho apresentado no 18º Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEO). Foz do Iguaçu/PR, 2010.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHAE, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, p.149-157, 1955. DOI: 10.1016/0076-6879(55)01021-5.

BRITO, C. A.; FREITAS, L. V de. Caracterização de proteínas via método de biureto como proposta interdisciplinar para o ensino de química de coordenação. **Experiências em Ensino de Ciências**, v. 13, n. 5, 2018.

BRITO, H. G de. **Aplicação de diferentes estratégias de pré-tratamento para conversão da fibra de coco verde em etanol celulósico**. 101f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, jul. 2023.

CABRAL, M. M. S. **Aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol de segunda geração**. 76f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2015.

CABRAL, M. M. S.; ABUD, A. K de. S.; ROCHA, M. S. R dos. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; GOMES, M. A. Composição da fibra da casca de coco verde *in natura* e após pré-tratamentos químicos. **ENGEVISTA**, v. 19, n. 1, p. 99-108, jan. 2017. ISSN: 1415-7314.

CASTRO, A. M de; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CONCEIÇÃO, F. R da. **Investigação da interação enzimática e das suas mudanças estruturais durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica através de metodologia óticas**. 2012. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2012.

CONVERSE, A. O.; OOSHIMA, H.; BURNS, D. S. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on lignin and cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 67-73, 1990.

COSTA, B. E. B.; CRUZ, R. S da.; RANGEL, F. C.; MENEGHETTI, S. M. P. Comparação entre a hidrólise química e enzimática da biomassa lignocelulósica para

a produção de bioetanol: uma revisão. **Ver. Virtual Quim.**, v. 13, n. 1, 2021. ISSN: 1984-6835.

CUNHA, L. P da.; GARCIA, RL.; VICENTE, IV.; THOMÉO. J. C. Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* ICB425 por cultivo em estado sólido com uso de resíduos como substrato. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 12, n.1, abr. 2020.

DIAS, G. B.; MORANDIM-GIANNETTI, A de. A. Otimização da produção de celulases pelo fungo *Annulohypoxylon stygium* para aplicação na produção de etanol 2G. Trabalho apresentado no XII Simpósio de Iniciação Científica, Didática e de Ações Sociais da FEI, São Bernardo do Campo, 2022.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. 1.ed. Fortaleza, CE, 25 p., dez. 2013. ISSN: 1679-6543.

GALANTE, Y.; DE CONTI, A.; AND MONTEVERDI, R. Application of Trichoderma Enzymes in Textile Industry. In: Harman, G.F. and Kubicek, C.P., (eds.) *Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*, Taylor and Francis, London, v.2, p. 311-326, 1998.

GALLINDO, A. de A. S.; LIMA, E. G.; BARROS, S. R. R. C de.; GALDINO, P. O.; RODRIGUES, M. G. F. Avaliação da composição da casca do coco verde in natura e pós-tratamento químico como biomassa adsorvente. Trabalho apresentado no 4º Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências (CONAPESC). Campina Grande/PB, 2019.

GERVÁSIO, D. K. L. **Utilização do resíduo do coco verde para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido**. 59f. Dissertação (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2017.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GODINHO, E. Z.; PERIN, A. A.; BAUMGARTNER, T. R. da S.; HASAN, S. D. M. Pré-tratamento hidrotérmico alcalino e alcalino-oxidativo sobre os teores de celulose e lignina em biomassa de capim elefante BRS Capiacu. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 6, n. 3, p. 51-96, jul. 2019. DOI: 10.18067/jbfs.v6i3.263.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, feb. 1949, p. 751-766. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)57021-6.

HAN, J. S. Properties of Nonwood Fibers. 1998. Disponível em: <https://www.fpl.fs.usda.gov/documnts/pdf1998/han98a.pdf>. Acesso em: 17 de março de 2023.

INFORSATO, F. J.; PORTO, A. L. M. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, 23 nov. 2016.

KAMANA, S.; HEMALATHA, K.P.J.; CHANDANAVINEELA, K.; KALYANI, P.; HEMALATHA, V. Endophytic fungi: as source of bioactive compound. **WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES**, Índia, v. 5, n. 12, p. 1026-1040. DOI: 10.20959/wjpps201612-8224.

KUPSKI, Karine. **Produção de celulases a partir do resíduo da indústria arrozeira empregando *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei***. 116f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, RS, 2012.

MAFTUKHAH, S.; ABDULLAH, A. Cellulase Enzyme Production From Rice Straw Using Solid State Fermentation and Fungi *Aspergillus niger* ITBCC L74. **MATEC Web of Conferences**, v. 156, 2018.

MAGALHÃES, T. C.; MOURA, A. C de; CUNHA, M. I. T dos S.; MORENO, T. F. Acompanhamento do comportamento de figos filamentosos endofíticos visando a produção de etanol celulósico. Trabalho apresentado no Congresso Internacional de Biomassa (CIBIO), Curitiba/PR, dez. 2020.

MARCO, Évilin Giordana de. **Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp.** 98f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2012.

MAYRINK, Maria Isabel Cristina Batista. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulases na sacarificação da celulose**. 94f. Dissertação (Pós-graduação em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguarina: EMBRAPA – CNPMA, 1998.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MURPHY, J. D.; MCCARTHY, K. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. **Applied Energy**, v. 82, n. 2, p. 148–166, 2005.

NASCIMENTO, A. R. B do. **Deslignificação do bagaço da casca do coco verde para aplicação em processos biotecnológicos**. 60f. Dissertação (Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB, 2018.

NASCIMENTO, R. J. A do. **Monitoramento em tempo real da hidrólise enzimática do bagaço da casca do coco verde por espectroscopia no infravermelho**

próximo (NIRS). 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2016.

OLIVEIRA, S. L. R. et al. Produção de celulase por *Aspergillus heteromorphus* URM 269 utilizando a casca do coco verde (*cocos nucifera* L.) como substrato. In: IX ENPPG, IX ENICIT, III SIMPIT, 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2009.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, set.-dez., 2012. ISSN: 1980-002.

PEREIRA, A. B. B. **Pré-tratamento do sabugo de milho aplicando sal alcalino e argila bentonita acidificada.** 71f. Dissertação (Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB, 2022.

PEREIRA, L. V. B. **Avaliação do pré-tratamento alcalino da palha de cana-de-açúcar visando seu aproveitamento para produção de etanol.** 51f. Dissertação (Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, nov. 2021.

PRASAD, R.; HARSH, N. S.K. Fungal Endophytes. In: ICFRE State of Knowledge Series-II Advances in Mycorrhiza & Useful Microbes in Forestry. (N.S.K. Harsh and Ashwani Kumar, eds.). **Greenfield Publishers**, Dehradun, India, p. 183-191, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/309930930_Fungal_Endoplytes. Acesso: 10 de dezembro de 2022.

RAMOS, H. R. Carboidratos redutores. 17 abr. 2018. 1 vídeo (26 min 53 seg). Disponível em: <https://youtu.be/Xhpm0ePqCrg?si=N6Bt-bVHfyGhfijH>. Acesso em 20 de abril de 2023.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 532-537, set. 2002.

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

ROSA, S da.; GARCIA, J. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, p. 117–155, 2009.

SALVE, A. P. **Métodos de extração e aproveitamento da lignina proveniente de biomassa vegetal.** 33f. Dissertação (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2020.

SANTANA, J. C. **Pré-tratamento de biomassa pelo método organosolv utilizando glicerol para obtenção de açúcares redutores.** 139f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2020.

SANTOS, A. A dos.; DEOTI, J. R.; MÜLLER, G.; DÁRIO, M. G.; STAMBUK, B. U.; JUNIOR, S. L. A. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, p. 1-9, 2017. ISSN: 1981-6723.

SANTOS, A. A dos.; DEOTI, J. R.; MÜLLER, G.; DÁRIO, M. G.; STAMBUK, B. U.; JUNIOR, S. L. A. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, 2017. DOI: 10.1590/1981-6723.11315.

SANTOS, F. A. **Produção de celulasas por *Penicillium* sp. FSDE15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho**. 87f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2021.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN Jr, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, p.786-794, 1959.

SHIMIZU, F. L. **Remoção de lignina e hemicelulose: Influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática**. 76f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, 2018.

SILVA, F. F da.; MENDES, D. B.; SOUSA, R. N de.; GUARDA, P. M.; GUARDA, E. A. Determinação de teores químicos da casca de arroz (*Oryza sativa*) e pseudocaule da bananeira (*Musa cavendishii*) no Tocantins: análise comparativa. **REVISTA OBSERVATORIO DE LA ECONOMIA LATINOAMERICANA**, Curitiba, v.21, n.8, p. 9654-9674, 2023. ISSN: 1696-8352.

SILVA, J. A da. **Catálise enzimática na produção de etanol de segunda geração**. 27f. Dissertação (Bacharelado em Química) – Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2016b.

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**. 63f. Dissertação (Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB, 2016a.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

SOUZA, R. R de. **Otimização do pré-tratamento ácido da casca do coco para produção de bioetanol**. 29f. Trabalho apresentado ao Programa de Iniciação Voluntária (PICVOL) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a 67haetom for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 47, p. 5-9, 1921. DOI:10.1016/S0021-9258(18)86093-8.

VIANA, M. G.; A. 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, 2017a.

VIANA, M.G. **Isolamento de micro-organismos 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**. 217f. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia) – Rede Norte e Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2017b.

VILLAS BOAS, D. F.; LUIZ, J. H. H.; MALPASS, G. R.; OKURA, M. H.; SOUZA, C. P de.; GRANATO, A. C. Micro-organismos endofíticos como fonte de compostos de interesse medicinal-uma breve revisão. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 5, n. 1, p. 70, 19 fev. 2021. DOI: 10.18554/rbcti.v5i1.3600.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUIAR, C. N.; RÓMERO-GOMEZ, S de. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 157-167, mar. 2003. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00128-6.

WANG, X. W.; HOUBRAKEN, J.; GROENEWALD, J. Z.; MEIJER, M.; ANDERSEN, B.; NIELSEN, K. F.; CROUS, P. W.; SAMSON, R. A. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and *chaetomium*-like fungi from indoor environments. **Studies in Mycology**, v. 84, n. 1, p. 145-224, 1 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.simyco.2016.11.005.

ZÚÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por fermentação semisólida do bagaço de cana-de-açúcar por *Aspergillus niger* usando planejamento experimental. 2009. **Anais da I Jornada Científica** - Embrapa São Carlos - 28 e 29 de outubro de 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/92587/1/Proci-09.00283.pdf>. Acesso em 7 de fevereiro de 2023.