

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EMMELY VITÓRIA DE SANTANA CABRAL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Paecilomyces* sp.
TP08 UTILIZANDO ENGAÇO DE UVA E FARELO DE TRIGO COMO
SUBSTRATOS NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

JOÃO PESSOA - PB

2024

EMMELY VITÓRIA DE SANTANA CABRAL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Paecilomyces* sp. TP08
UTILIZANDO ENGAÇO DE UVA E FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATOS NA
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Andréa Farias de Almeida.

JOÃO PESSOA, PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C117a Cabral, Emmely Vitória de Santana.

Avaliação da produção de enzimas por *Paecilomyces* sp. TP08 utilizando engaço de uva e farelo de trigo como substratos na fermentação em estado sólido / Emmely Vitória de Santana Cabral. - João Pessoa, 2024. 53 f. : il.

Orientação: Andréa Farias de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Resíduo agroindustrial - Tratamento. 2. Celulases. 3. Pectinases. 4. Enzimas fúngicas. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 628.54(043)

EMMELY VITÓRIA DE SANTANA CABRAL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Paecilomyces* sp. TP08
UTILIZANDO ENGALO DE UVA E FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATOS NA
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 22 de agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Andréa Farias de Almeida
Prof^ª Dr^ª Andréa Farias de Almeida – DBTC/UFPB
(Orientadora)

Sharline Florentino de Melo Santos
Prof^ª. Dr^ª. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/UFPB
(Examinadora Interna ao Programa)

Cristiani Viegas Brandão Grisi
Dr^ª. Cristiani Viegas Brandão Grisi – PPGEQ/UFPB
(Examinadora Interna ao Programa)

Adna Cristina B. de Sousa
Prof^ª. Dr^ª. Adna Cristina Barbosa de Sousa – DBCM/UFPB
(Examinadora Externa ao Programa)

Aos meus amados e dedicados pais Ednery e Armando,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por seu supremo amor e misericórdia. E a Virgem Maria, por sua intercessão e cuidado.

Agradeço aos meus pais, por todo o incentivo e investimento na minha educação. Nunca mediram esforços para me apoiar. Além de todo o amor, cuidado e carinho com os quais me criaram.

Agradeço à minha família, por torcerem por mim, e serem compreensivos com as minhas ausências. Em especial, a minha prima-irmã Ana Karoline, por estar sempre ao meu lado, me apoiando no que fosse necessário.

Agradeço ao meu companheiro, Tadeu Lima Jr, que foi o meu porto seguro em tantos momentos, cuidando de mim com tanto amor, carinho e dedicação.

Agradeço a minha Orientadora Prof.^a Dr.^a Andréa Farias de Almeida, por aceitar me conduzir em mais essa jornada, por toda sua compreensão e paciência, além de seus valiosos direcionamentos.

Agradeço aos professores e funcionários de PPGEQ, que fizeram a experiência da pós-graduação ser mais leve e muito proveitosa. Em especial a Professora Sharline, a coordenadora e Professora Andréa Almeida, e aos secretários Fabrício e Nicholas.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Nattanael, Hellen, Maria Luíza, Alysson, Bárbara e “Gabriéis”, que tanto me auxiliaram na realização dos experimentos, quanto animaram as horas que passamos trabalhando juntos. Sem vocês, nada do que aqui será apresentado, seria possível.

Agradeço ao Fundo de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba, FAPESQ, pelo apoio financeiro concedido.

Agradeço a UFPB por ter sido minha casa e lugar de formação profissional e pessoal desde a graduação. Local onde conheci pessoas incríveis e aprendi muito sobre a vida.

Agradeço a minha banca avaliadora, Professoras Adna e Sharline e Dr.^a Cristiani, pelas contribuições e disponibilidade na avaliação e enriquecimento desse trabalho. Além de toda a contribuição e importância que possuem em minha jornada acadêmica e pessoal.

“... Até aqui nos ajudou o Senhor.”

1Samuel, 7:12

RESUMO

A gestão responsável dos resíduos agroindustriais é crucial para mitigar os impactos ambientais de seu descarte inadequado. O engaço de uva composto principalmente por lignocelulose, pode representar até 5-7% do resíduo gerado durante o processamento da uva. Já o farelo de trigo, representa de 10 a 15% do total do trigo processado. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi empregar o engaço de uva e o farelo de trigo como substratos alternativos no cultivo em estado sólido pela ação do fungo filamentoso *Paecilomyces* sp. TP08 para produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas. Um planejamento experimental fatorial 2^3 , com triplicata o ponto central, foi realizado e considerou como variáveis independentes a influência da variação de umidade (60%, 70% e 80%), concentração de inóculo (1×10^6 , 10^7 e 10^8 esporos por grama de substrato) e porcentagem de engaço de uva (25%, 50% e 75%) adicionado ao farelo de trigo, totalizando 11 cultivos em estado sólido (28 °C por 120h) com retiradas de amostras a cada 24h para obtenção do extrato bruto enzimático, utilizado nas análises e determinação das atividades enzimáticas através do método DNS. Os resultados obtidos mostraram que nas condições de 60% de umidade, 25% de engaço em relação ao farelo de trigo e concentração de inóculo 1×10^8 esporos por grama de substrato, foi possível obter uma máxima produção de FPase e CMCase em 48 h de cultivo com valores de 9,7 U/g e 18,96 U/g, respectivamente. E nas condições 60% de umidade, 25% de engaço em relação ao farelo de trigo e concentração de inóculo 1×10^6 esporos por grama de substrato foi obtida uma produção máxima de Pectinases também em 48 h com 44,5 U/g de atividade enzimática. Já como resultado do planejamento experimental, foi possível observar que o substrato foi o fator que mais influenciou na produção enzimática, seguido da concentração de inóculo. Dessa forma, a partir dos resultados alcançados, torna-se evidente o potencial de produção enzimática ao utilizar o engaço de uva em substituição parcial ao farelo de trigo como substratos em cultivo em estado sólido nas condições propostas.

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial; Celulases; Pectinases; Enzimas fúngicas.

ABSTRACT

Responsible management of agro-industrial waste is crucial to mitigate the environmental impacts of its improper disposal. Grape stalks, composed mainly of lignocellulose, can represent up to 5-7% of the residue generated during grape processing. Wheat bran, on the other hand, represents 10-15% of the total wheat processed. In this context, the objective of this study was to use grape stalks and wheat bran as alternative substrates in solid-state cultivation by the action of the filamentous fungus *Paecilomyces* sp. TP08 for the production of cellulolytic and pectinolytic enzymes. A 2^3 factorial experimental design, with triplicate as the central point, was carried out and considered as independent variables the influence of humidity variation (60%, 70% and 80%), inoculum concentration (1×10^6 , 10^7 and 10^8 spores per gram of substrate) and percentage of grape stalks (25%, 50% and 75%) added to the wheat bran, totaling 11 solid-state cultivations (28 °C for 120h) with samples taken every 24h to obtain the crude enzymatic extract, used in the analysis and determination of enzymatic activities through the DNS method. The results obtained showed that under conditions of 60% humidity, 25% of stalks in relation to wheat bran and inoculum concentration of 1×10^8 spores per gram of substrate, it was possible to obtain maximum production of FPase and CMCase in 48 h of cultivation with values of 9.7 U/g and 18.96 U/g, respectively. And under conditions of 60% humidity, 25% of stalks in relation to wheat bran and inoculum concentration of 1×10^6 spores per gram of substrate, maximum production of Pectinases was also obtained in 48 h with 44.5 U/g of enzymatic activity. As a result of the experimental design, it was possible to observe that the substrate was the factor that most influenced the enzymatic production, followed by the inoculum concentration. Thus, based on the results achieved, the potential for enzyme production when using grape stalks as a partial replacement for wheat bran as substrates in solid-state cultivation under the proposed conditions becomes evident.

Keywords: Agro-industrial waste; Cellulases; Pectinases; Fungal enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Representação de alguns resíduos da vinificação	17
Figura 3.2 – Organização estrutural do cacho da uva	18
Figura 3.3 – Estrutura do grão de trigo, evidenciando o farelo	20
Figura 3.4 – Estruturas das celulases	21
Figura 3.5 – Estrutura da parede celular vegetal contendo o arranjo das moléculas de pectina e celulose	22
Figura 3.6 – Modo de ação das enzimas pectinolíticas	23
Figura 3.7 – Ação da pectinase na extração do mosto	24
Figura 3.8 – Aspectos macroscópicos e microscópicos do fungo <i>Paecilomyces variotii</i>	26
Figura 4.1 – Engaços de uva lavados e secos	28
Figura 5.1 – Atividade celulolítica durante o processo de produção enzimática por <i>Paecilomyces</i> sp. TP08 com engaço de uva e farelo de trigo como substratos	40
Figura 5.2 – Atividade de endoglucanases durante o processo de produção enzimática por <i>Paecilomyces</i> sp. TP08 com engaço de uva e farelo de trigo como substratos	42
Figura 5.3 – Atividade de pectinases durante o processo de produção enzimática por <i>Paecilomyces</i> sp. TP08 com engaço de uva e farelo de trigo como substratos	44
Figura 5.4 – Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis substrato, inóculo e umidade na expressão de celulases totais (FPase)	45
Figura 5.5 – Superfície de resposta para expressão de FPase em função do substrato e umidade (A), substrato e inóculo (B), inóculo e umidade (C)	46
Figura 5.6 – Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis substrato, inóculo e umidade na expressão de endoglucanases (CMCase)	47
Figura 5.7 – Superfície de resposta para expressão de CMCase em função do substrato e umidade (A), substrato e inóculo (B), inóculo e umidade (C)	48
Figura 5.8 – Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis substrato, inóculo e umidade na expressão de pectinases	49
Figura 5.9 – Superfície de resposta para expressão de Pectinases em função do substrato e umidade (A), substrato e inóculo (B), inóculo e umidade (C)	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Planejamento experimental 2^3 com triplicata no ponto central – matriz codificada e valores reais 31

Tabela 5.1 – Caracterização físico-química do engaço de uva (seco e triturado) e farelo de trigo (*in natura*) 38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL:	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	16
3.1.1 Cenário da vitivinicultura no Brasil e sua geração de resíduos	16
3.1.1.1 Engaço de Uva	18
3.1.2 Farelo de Trigo	19
3.2 ENZIMAS DE ORIGEM MICROBIANA	20
3.2.1 Celulases	21
3.2.2 Pectinases	22
3.5 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	24
3.6 Fungo <i>Paecilomyces</i> sp.	25
4 METODOLOGIA	27
4.1 COLETA E PREPARO DOS SUBSTRATOS	27
4.1.1 Engaço de Uva	27
4.1.2 Farelo de Trigo	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS	28
4.2.1 Umidade	28
4.2.2 pH	29
4.2.3 Densidade aparente	29
4.2.4 Densidade real	29
4.2.5 Porosidade do leito	30
4.2.6 Teor de açúcar redutor total (ART)	30
4.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	31
4.3.1 Planejamento Experimental	31
4.3.2 Microrganismo	32
4.3.3 Inóculo	32
4.3.4 Cultivo em estado sólido	33
4.4 EXTRAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO	34
4.5 ANÁLISE DO EXTRATO ENZIMÁTICO	34
4.5.1 Determinação da atividade de celulases totais (FPase)	34

4.5.2 Determinação da atividade de endoglucanases (CMCase)	35
4.5.3 Determinação da atividade de pectinases (poligalacturonases)	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS	38
5.2 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	39
5.2.1 Celulases totais – FPase	39
5.2.2 Endoglucanases – CMCase	42
5.2.3 Pectinases	43
5.3 ANÁLISE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	45
5.3.1 Celulases totais – FPase	45
5.3.2 Endoglucanases – CMCase	47
5.3.3 Pectinases	48
6. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria, responsável por cerca de 5,9% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, destaca-se como um dos setores líderes na geração de resíduos orgânicos no país. O descarte inadequado desses produtos é uma prática comum, resultando não apenas na poluição ambiental, mas também na impossibilidade de reutilização desses resíduos (RICARDINO, SOUZA e NETO, 2020; EMBRAPA, 2020). Observa-se, nos dias de hoje, um aumento significativo nos investimentos das agroindústrias, especialmente voltados para a ampliação da capacidade de processamento. Esse crescimento na produção resulta na geração de quantidades expressivas de subprodutos, parte dos quais é reaproveitada de maneira sustentável como ração animal (NASCIMENTO FILHO, 2015). Assim, visto que a agroindústria é um setor importante para a economia do Brasil, é necessário lidar de forma responsável e sustentável com os seus resíduos orgânicos. Isso inclui garantir que esses subprodutos e resíduos sejam gerenciados de maneira a reduzir os impactos ambientais e incentivar práticas mais conscientes nesse setor.

A maioria dos resíduos agrícolas consiste em uma matriz lignocelulósica, sendo uma grande parte composta por carboidratos. Os resíduos agroindustriais são em geral, naturalmente ricos em nutrientes, promovendo o crescimento microbiano. Uma maneira de aproveitá-los é através do uso de microrganismos e/ou produtos microbianos com propriedades adequadas para o aproveitamento e a produção de diversos produtos de valor agregado, incluindo biomoléculas de importância industrial (ALENCAR et al., 2020).

Nesse contexto, alguns subprodutos e resíduos gerados durante o processo de vinificação apresentam valor econômico, representando uma fonte de benefícios para os empresários ou outras indústrias que podem empregar esses resíduos como matéria-prima em seus produtos. Dentre as oito etapas comumente presentes no processo de vinificação, cinco delas geram resíduos, sendo esses: o engaço, o bagaço e a borra. E tais resíduos possuem grande potencial para produção de compostos bioativos (ATATOPRAK et al., 2021).

No entanto, a maioria desses resíduos é utilizada pelos produtores como fertilizantes nas plantações ou é descartada no ambiente sem passar por nenhum tratamento. Essas práticas podem causar desequilíbrios nos níveis minerais do solo, entre outros problemas, destacando

a gestão dos resíduos sólidos como um ponto crítico para a continuidade de uma produção sustentável (BAPTISTA et al., 2023).

Assim, a valorização de tais resíduos torna-se um importante campo de pesquisa para minimizar o impacto ambiental e gerar compostos de valor agregado. Sendo então o objetivo do presente trabalho avaliar a produção de enzimas fúngicas a partir da utilização do engaço de uva e farelo de trigo como substratos no cultivo em estado sólido do fungo *Paecilomyces* sp. TP08.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a utilização de engaço de uva como substituição parcial do farelo de trigo como substrato no cultivo em estado sólido para produção de celulasas e pectinases pela ação do *Paecilomyces* sp. TP08.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar físico-quimicamente o engaço de uva e o farelo de trigo quanto ao teor de umidade, pH, densidades real e aparente, teor de açúcares redutores totais e grau Brix.
- Avaliar a produção de celulasas e pectinases pelo fungo *Paecilomyces* sp. TP08, utilizando engaço de uva e farelo de trigo como substratos.
- Quantificar as enzimas produzidas através de análises de atividade enzimática.
- Avaliar as melhores condições de produção enzimática: diante as variáveis estudadas: teor de umidade, concentração de inóculo e porcentagem de engaço de uva adicionado ao farelo de trigo.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A abordagem global para lidar com resíduos impulsiona a chamada biotecnologia sustentável, promovendo a ideia de desperdício zero. Essa intervenção não apenas combate à poluição ambiental, mas também desempenha um papel significativo na economia, estimulando estrategicamente a utilização desses resíduos na produção de itens de alto valor (ALENCAR et al., 2020).

O aproveitamento de resíduos representa um considerável benefício econômico para os processadores de alimentos, sendo uma tendência observada em mercados como o gerenciamento de resíduos e a recuperação de produtos. Anualmente, a biomassa residual atinge milhões de toneladas globalmente. Esses resíduos, considerados importantes fontes de biomassa, podem ser utilizados como matérias-primas de grande interesse industrial, contribuindo para a produção de produtos de valor agregado, como biocombustíveis, biopolímeros, produtos químicos e fertilizantes (DAMIANI, MARTINS e BECKER, 2020). A aplicação desses resíduos na fermentação em estado sólido (FES), devido à sua fácil disponibilidade, alta biodegradabilidade e riqueza em nutrientes como carbono, não apenas reduz os custos de produção, mas também minimiza o impacto ambiental associado à sua disposição (ALENCAR et al., 2020).

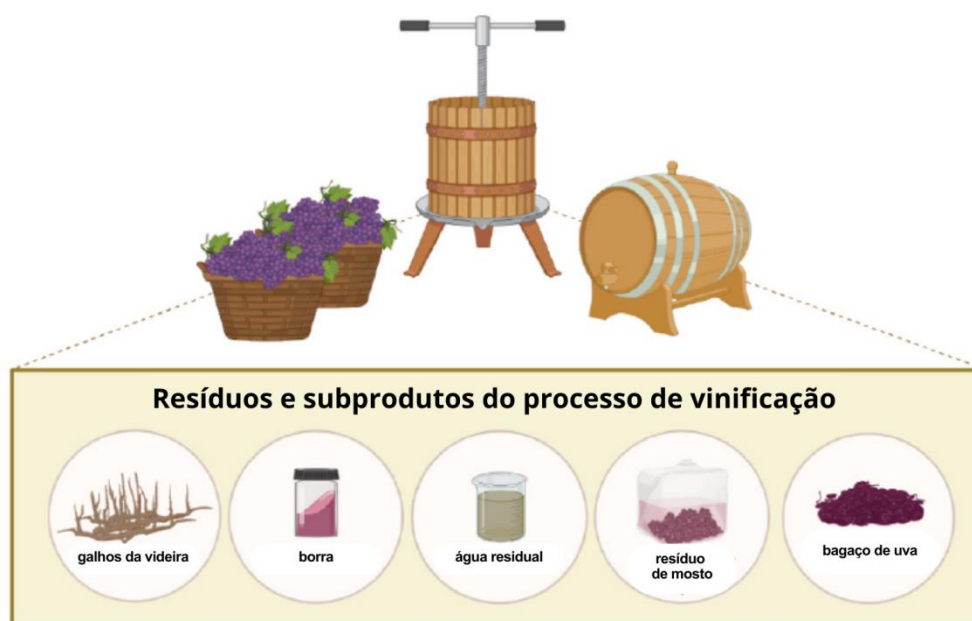
3.1.1 Cenário da vitivinicultura no Brasil e sua geração de resíduos

A produção de uvas destaca-se como uma das principais atividades econômicas no Brasil. Conforme os dados do Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, referentes a maio de 2020, o cultivo de videiras abrange uma área total de 75.731 hectares no país. A maior parte desse cultivo ocorre na Região Sul, compreendendo 55.501 hectares, o que representa aproximadamente 73,29%. Em seguida, as Regiões Nordeste e Sudeste contribuem com 10.485 hectares (13,85%) e 9.514 hectares (12,56%), respectivamente. A participação da Região Centro-Oeste é de 200 hectares (0,26%), enquanto o cultivo na Região Norte é mais limitado, com apenas 31 hectares (0,04%) (RIOS, BARROSO e CASTELO BRANCO, 2020).

Assim, a viticultura brasileira se apresenta dividida em alguns pólos, uns direcionados à produção de uvas de mesa e outros à produção de uvas para o processamento, elaboração de vinho e sucos. O país é considerado uma das melhores regiões do mundo para o cultivo de uvas que irão produzir vinhos espumantes, exportando esse produto para vários países, dentre os quais Estados Unidos, Alemanha e Inglaterra (LEITE e SANTOS, 2020).

Os subprodutos e resíduos dos processos da indústria vitivinicultura incluem os galhos da videira, o engaço, o bagaço e borra. Além do resíduo de mosto e água residual. O engaço da uva (5-7%) é obtido na etapa de desengace, o bagaço da uva (20-25%) após prensagem – consistindo em cascas (10-12%) e sementes (3-6%). Já as borras (2-6%) são produzidas ao longo das etapas de fermentação e sedimentação e contêm células de levedura mortas. A água residual da vinícola é um resíduo líquido (0,5-14 L/litro de vinho) resultado dos processos de lavagem de equipamentos e garrafas (ATATOPRAK et al., 2021).

Figura 3.1 – Representação de alguns resíduos da vinificação



Fonte: Adaptado de Baptista et al. (2023)

A produção global de vinhos e sucos a partir do processamento de uvas gera anualmente milhões de toneladas de resíduos (KAPCSÁNDI et al., 2021). Esses resíduos orgânicos provenientes das indústrias de sucos e vinhos representam desafios, tanto do ponto

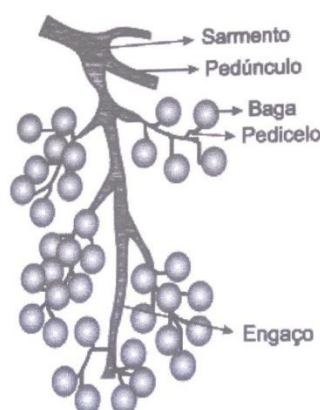
de vista econômico quanto ambiental. Atualmente, existem poucas alternativas amplamente adotadas para o aproveitamento desses resíduos. Em alguns casos são utilizados em pequena escala na produção de fertilizantes orgânicos ou como componente da nutrição animal. Entretanto, uma parcela significativa ainda é descartada no ambiente sem qualquer tipo de tratamento (VAZ JR, 2020).

Assim, a utilização eficiente dos resíduos provenientes do processamento do vinho tinto e sucos de uva têm o potencial de reduzir não apenas os prejuízos econômicos, mas também impactos sociais e/ou ambientais. Isso possibilita a criação de novos produtos e oportunidades de lucratividade a partir de um subproduto que usualmente é desperdiçado ou empregado apenas como adubo e ração animal. (LEITE e SANTOS, 2020).

3.1.1.1 Engaço de Uva

O cacho da uva (Figura 3.1) é constituído de uma parte herbácea, chamada de engaço ou ráquis (eixo de inflorescência). O engaço é o primeiro resíduo gerado na indústria de processamento da uva, separado da baga antes mesmo do início do processamento, para não causar adstringência em excesso ou sabor desagradável no produto final, devido à sua composição rica em taninos adstringentes. (LAGO-VANZELA, 2015).

Figura 3.2 - Organização estrutural do cacho da uva



Fonte: Adaptado de Lago-Vanzela (2015)

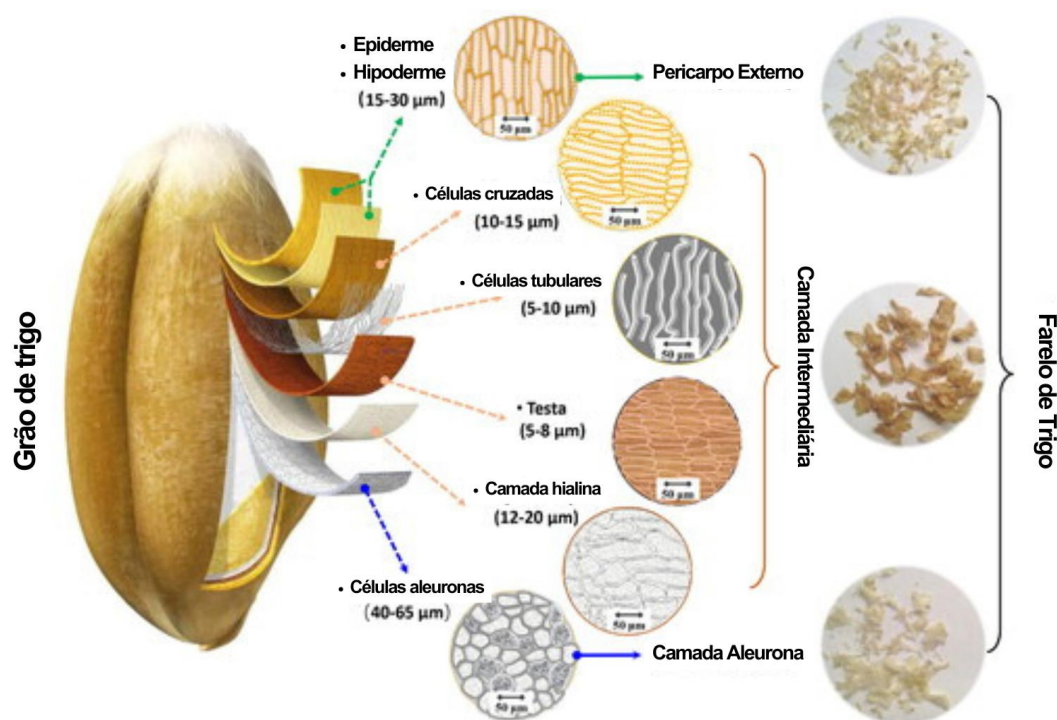
O engaço é um resíduo com potencial para produção ou extração substâncias bioativas. Sua destinação comum é para alimentar animais ou são despejados no solo e tais práticas podem gerar acúmulos que se tornam problemas ambientais por sua composição de compostos orgânicos e fenólicos. Sendo um resíduo lignocelulósico, este possui grande potencial para reaproveitamento e valorização através de bioprocessos (ATATOPRAK et al., 2021).

3.1.2 Farelo de Trigo

O trigo, pertencente à família das gramíneas (*Triticumaestevum*), destaca-se como um dos três grãos mais produzidos globalmente, juntamente com o milho e o arroz, ocupando posição de destaque na economia mundial segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB de 2017. Outra análise de mercado realizada pela CONAB em 2020, na safra de 2018/2019, afirma que a produção brasileira de trigo atingiu aproximadamente 5,4 milhões de toneladas, cobrindo uma área de cerca de 2 milhões de hectares. O Brasil foi classificado como o 16º maior produtor mundial de trigo, e a previsão para a safra 2019/2020 foi de 5,2 milhões de toneladas, o que o manteve nessa posição.

Durante o seu processamento na indústria, especificamente na etapa de moagem do grão, são obtidos o farelo, o endosperma e o gérmen. O farelo de trigo, composto pelo pericarpo, que constitui a película externa e a camada protetora do grão, é rico em fibras e minerais (Figura 3.2). Essa película, não sendo digerida pelo organismo humano, torna o farelo um subproduto. Além disso, o farelo de trigo é um resíduo nutricionalmente rico, contendo carboidratos, proteínas e amido. Composto também por celulose, hemicelulose e lignina, é caracterizado como uma biomassa lignocelulósica (DOS SANTOS e ORLANDELLI, 2019).

Figura 3.3 – Estrutura do grão de trigo, evidenciando o farelo.



Fonte: Adaptado de Chen (2023)

Com isso, o farelo de trigo apresenta um amplo potencial de aplicação, podendo ser utilizado como substrato para a obtenção de enzimas, proteínas celulares, probióticos de origem microbiana, ácidos orgânicos e outras biomoléculas por meio de processos fermentativos (TANASKOVIĆ et al., 2021).

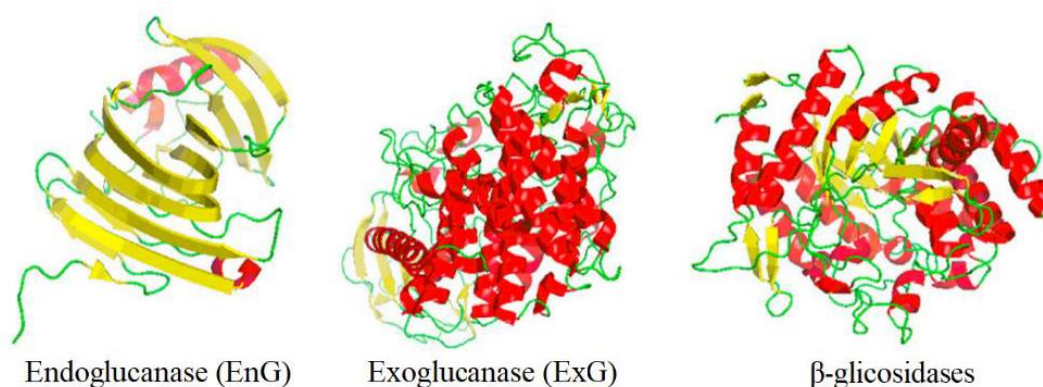
3.2 ENZIMAS DE ORIGEM MICROBIANA

As macromoléculas pertencentes à classe das proteínas globulares, as enzimas são catalisadoras de reações bioquímicas com alta especificidade pelo substrato nessas reações. Divididas em seis grandes classes - oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases – baseadas no tipo de reação que catalisam sua produção e utilização, são de grande interesse na indústria biotecnológica (KUKRETI, KUMAR e KATARIA, 2024). Na classe das hidrolases, se encontram as celulasas e pectinases, enzimas alvo do presente estudo.

3.2.1 Celulases

As celulases formam um complexo enzimático que atuam na despolimerização da celulose por meio de ação sinérgica das endoglucanases, as exoglucanases e por fim, a beta-glicosidase ou celobiase (Figura 3.4), que são assim classificadas de acordo com o local onde atuam no substrato celulósico (GAETE, TEODORO e MARTINAZZO, 2020).

Figura 3.4 – Estruturas das celulases



Fonte: Adaptado de GAETE, TEODORO e MARTINAZZO (2020)

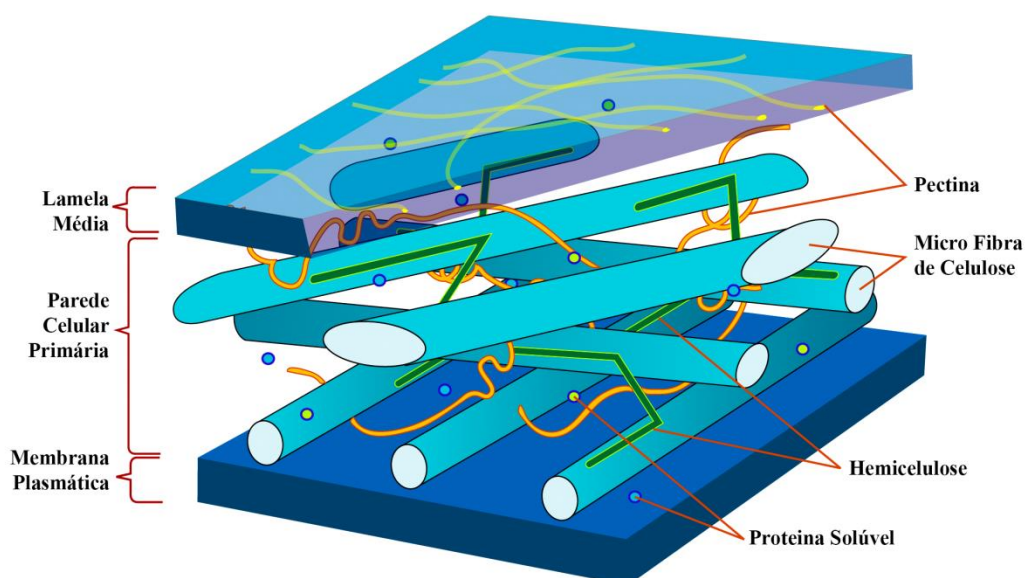
Sendo a terceira enzima mais utilizada em escala industrial, num contexto internacional, a celulase possui diversas aplicações industriais, entre elas estão à utilização nas indústrias têxtil, papel de celulose, detergentes e processamento de alimentos e sucos. (GAETE, TEODORO e MARTINAZZO, 2020).

É responsável pela degradação da celulose, polissacarídeo formado por diversos componentes de glicose ligadas entre si por ligações químicas e presente nas células vegetais. Por isso, as celulases são enzimas encontradas facilmente na matéria vegetal e em seus processos de degradação no solo. Porém, a sua obtenção ainda é um processo com muitos custos envolvidos, o que acarreta um preço final elevado. Por isso, é necessário o desenvolvimento de processos que produzam extratos enzimáticos com o menor custo possível, a exemplo dos processos com microrganismos e reaproveitamento de resíduos lignocelulósicos. (SINGH et al., 2021).

3.2.2 Pectinases

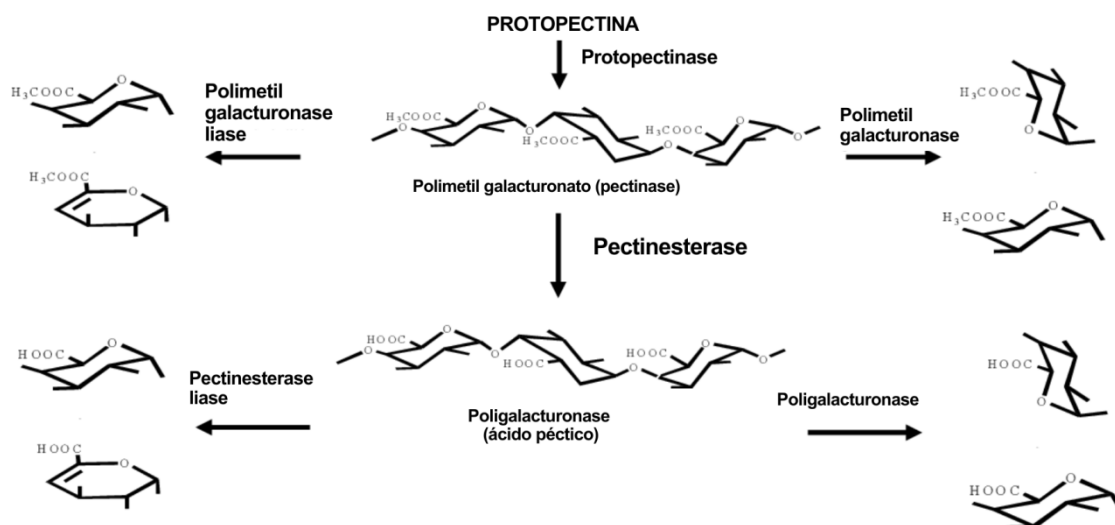
As pectinases são o complexo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécicas componentes da parede celular e da lamela média de vegetais (Figura 3.5), e são classificadas em três tipos de enzimas: protopectinases, desesterificantes (pectinesterases) e despolimerizantes (hidrolases e liases). Classificação essa, baseada em como a enzima ataca a cadeia de poligalacturônico dos polímeros pécicos (Figura 3.4). (LAGO-VANZELA, 2015).

Figura 3.5 - Estrutura da parede celular vegetal contendo o arranjo das moléculas de pectina e celulose.



Fonte: Adaptado de Rehman (2022)

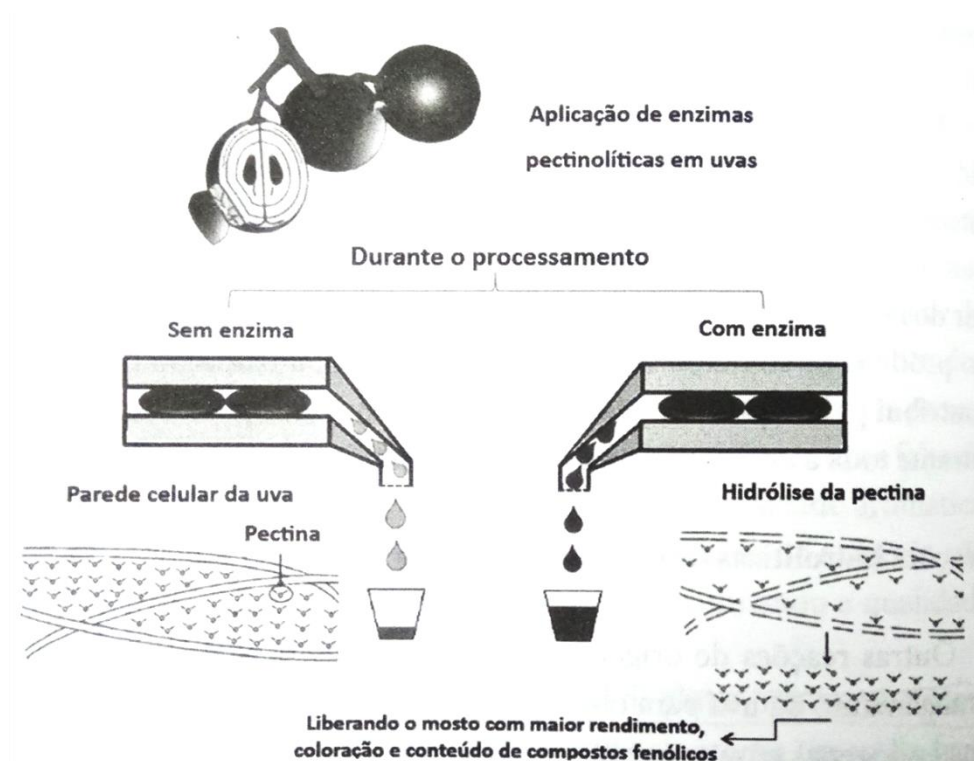
Figura 3.6 – Modo de ação das enzimas pectinolíticas.



Fonte: Adapta de Prasanna (2007)

Sendo as primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente, introduzidas na década de 30 na produção de sucos de frutas, as pectinases são hoje aplicadas industrialmente em processos de extração, maceração e clarificação, principalmente na indústria alimentar (REHMAN, 2023). Especificamente na indústria vinícola, a aplicação de pectinases apropriadas (que não promovem o aumento na quantidade de metanol dos vinhos) antes da prensagem dos mostos (Figura 3.7) proporciona um aumento no rendimento da extração, assim como reduz o tempo de clarificação, aumenta o conteúdo de compostos fenólicos e terpenos no vinho, facilita a filtração e aumenta a qualidade e estabilidade dos vinhos produzidos – quando comparados aos vinhos não tratados (LAGO-VANZELA, 2015).

Figura 3.7 – Ação da pectinase na extração do mosto



Fonte: Lago-Vanzela (2015)

3.5 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Na fermentação em estado sólido (FES), microrganismos se desenvolvem sobre substratos sólidos, com a umidade do meio encontrada absorvida ou complexada no meio e consequentemente, com pouca água livre. A fase sólida irá atuar como suporte para o crescimento das células do microrganismo, e principalmente atuar como fonte de energia, carbono e nitrogênio para o seu crescimento. (SILVA et al., 2017).

Com potencial de originar vários bioprodutos, a FES apresenta dentre suas vantagens em relação à fermentação submersa (FS), uma menor complexidade na preparação do meio de cultivo, menor risco de contaminação advindo da baixa umidade do sistema e a maior viabilidade do uso de resíduos sólidos agroindustriais. Além de promover uma maior semelhança com as condições naturais de crescimento do microrganismo, em especial os fungos filamentosos. (DUAN et al., 2024).

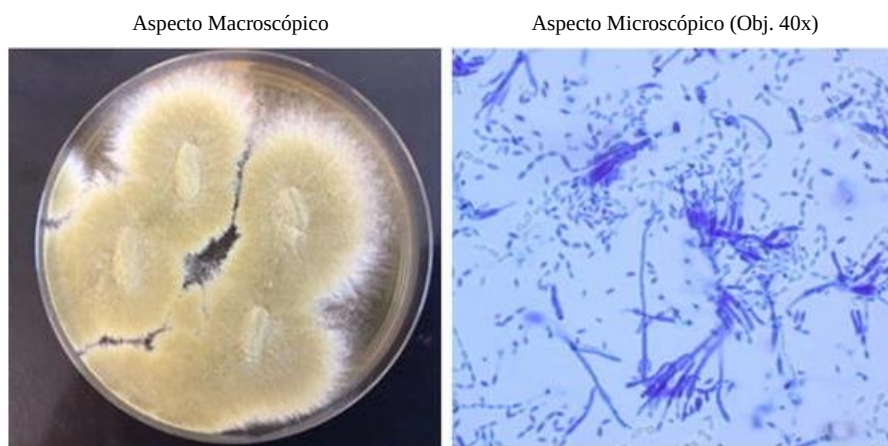
Ainda que ofereça uma maior concentração do produto obtido, em um espaço reduzido, a FES apresenta algumas limitações ao seu uso. Como a dificuldade de alguns microrganismos se desenvolverem em sistemas com pouca água livre, o difícil controle dos parâmetros de processo e principalmente, a impossibilidade de homogeneização do meio de cultivo, o que pode vir a afetar o seu crescimento pela insuficiente disponibilidade dos substratos. (SADH e DUHAN, 2018).

3.6 FUNGO *Paecilomyces* sp.

Paecilomyces sp., um fungo filamentoso saprófito - organismo que se alimenta de matéria orgânica morta, como plantas, animais e outros fungos - comum, é encontrado em diversos *habitats*, incluindo solos, florestas, pastagens, desertos, sedimentos e até mesmo lodo de esgotos. Pertencente ao filo *Ascomycotae* à ordem *Eurotiales*, *Paecilomyces* sp. apresenta hifas septadas e ramificadas, as quais produzem longas cadeias de conídios a partir das pontas de conidióforos (Figura 3.6). As colônias de *Paecilomyces* sp. inicialmente flocosas e brancas, ganham diferentes cores de acordo com seu grau de maturação e substrato. No geral, as espécies de *Paecilomyces* não apresentam riscos à saúde (DAI, WANG e LI, 2020).

Muitas espécies de *Paecilomyces* são reconhecidas como fungos entomopatogênicos, pertencendo a uma classe especializada que pode infectar ou parasitar organismos hospedeiros vivos, destacando-se como um grupo ecologicamente especializado. As espécies de *Paecilomyces* possuem a capacidade de sobreviver em uma ampla faixa de temperaturas e pH. Essa adaptabilidade permite que cresçam em diversos substratos, tornando-o uma boa fonte de produtos naturais biologicamente ativos (MOSADEGHZAD et al., 2013).

Figura 3.8 – Aspectos macroscópicos e microscópicos do fungo *Paecilomyces variotii*.



Fonte: Adaptado de Bellanger et al. (2027)

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA E PREPARO DOS SUBSTRATOS

4.1.1 Engaço de Uva

O resíduo de engaço de uva utilizado como substrato foi cedido pela empresa Sabores de Frutas Santa Maria, localizada no distrito Chã do Esquecido no município de São Vicente Férrer – PE.

Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – LEBp do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba, onde foi realizada a separação de cascas presentes no resíduo. O engaço já livre de cascas restantes, foi higienizado com solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) e lavado em água corrente (Figura 4.1).

Após a higienização, o engaço foi colocado para a esterilização a 121 °C por 15 min (1 atm), seco em estufa por 12 h a 85 °C e triturado em moinho de facas do tipo Willey (SOLAB, SL-31) numa granulometria de 30mesh. O engaço seco e triturado foi armazenado com sacos plásticos de fechamento hermético, a temperatura ambiente (25 °C).

Figura 4.1 – Engaços de uva lavados e secos.



4.1.2 Farelo de Trigo

O farelo de trigo utilizado como substrato foi cedido pela Fazenda Melo, localizada no município de São Vicente Férrer – PE, onde é empregado como ração animal. O material foi esterilizado a 121 °C por 15 min (1 atm), sem lavagem ou secagem prévia. Em seguida, foi armazenado a temperatura ambiente (25 °C) em sacos plásticos de fechamento hermético.

Não foi necessária a trituração desse material, tendo em vista que a granulometria de 16mesh encontrada no material *in natura* era adequada para sua utilização no cultivo em estado sólido, por proporcionar aeração para o crescimento micelial do fungo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Ambos os resíduos, o engaço de uva e o farelo de trigo, foram caracterizados físico-quimicamente quanto ao percentual de umidade, pH, densidade aparente, densidade real, porosidade do leito e teor de açúcares redutores totais, segundo as seguintes metodologias:

4.2.1 Umidade

Para a análise do percentual de umidade, foi pesada uma massa conhecida do material a ser analisado em uma placa de Petri previamente seca e tarada. Então, esse conjunto amostra-recipiente foi levado para estufa por 24 h a 60 °C e posteriormente pesado novamente. Assim, através da Equação 4.1, foi determinado o percentual de umidade.

$$Umidade(\%) = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (4.1)$$

4.2.2 pH

Para a determinação do valor de pH dos substratos, preparou-se uma suspensão com 50 mL de água e 5 g do material e posteriormente, homogeneizada e colocada em repouso até a precipitação. E então o pH foi determinado em um pHmetro de bancada (TECNOPON – LUCA 210).

4.2.3 Densidade aparente

A densidade aparente foi determinada por meio da Equação 4.2. Para a análise, foram pesados 2,5 g do engaço de uva, e 1 g do farelo de trigo. Os substratos pesados foram posteriormente colocados individualmente em provetas, sem compactá-los, onde foi observado o volume ocupado (IAL,1985).

$$\rho_{aparente} (g/mL) = \frac{m}{v_{ocupado}} \quad (4.2)$$

Em que:

$\rho_{aparente}$ – densidade aparente do substrato em gramas por mililitro;

m – massa do substrato em gramas;

v – volume ocupado pelo substrato em mililitro.

4.2.4 Densidade real

A determinação da densidade real foi realizada pela relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra de substrato, após o deslocamento de um fluido de volume conhecido. O óleo de soja comercial – fluido utilizado – foi colocado em uma proveta onde foi medido o seu volume. Em seguida, o material a ser analisado foi adicionado 1g desse material e foi colocado em repouso até que este estivesse depositado na base da proveta.

Então, o volume indicado na proveta foi medido novamente. E assim, o volume real ocupado pelo material analisado foi determinado pela diferença entre os volumes final e inicial, com a densidade real dada pela Equação 4.3.

$$\rho_{real} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{m_{substrato}}{(V_2 - V_1)} \quad (4.3)$$

Em que:

ρ_{real} – densidade real do substrato em gramas por mililitro;

$m_{substrato}$ - massa do substrato em gramas;

V_2 - volume do fluido em mililitro;

V_1 - volume do fluido deslocado em mililitro.

4.2.5 Porosidade do leito

A porosidade do leito foi calculada por meio da relação entre a densidade real e a densidade aparente da amostra do substrato, conforme a Equação 4.4.

$$\varphi = 1 - \frac{\rho_{aparente}}{\rho_{real}} \quad (4)$$

Em que:

φ – Porosidade do substrato;

$\rho_{aparente}$ – densidade aparente do substrato;

ρ_{real} – densidade real do substrato.

4.2.6 Teor de açúcar redutor total (ART)

Na determinação do teor de açúcares redutores totais (ART), foi utilizado o método DNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico) que é descrito por Santos (2007), alíquota de 1g do substrato foi pesada em Erlenmeyer de 250 mL e adicionado 9 mL de água destilada. Em seguida, foi colocado em mesa agitadora orbital (SOLAB – SL 223) durante 1 h a 200 rpm. Esta mistura

foi filtrada em um funil de Buchner utilizando um papel de filtro qualitativo (14 μ m), com o auxílio de uma bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581). Em um balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 1 mL do filtrado junto a 0,5 mL de HCL 2 N, que seguiu para incubação a 70 °C por 10 min. Após o tempo de incubação, foram adicionados 6 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 2N. O balão foi levemente agitado manualmente e teve seu volume completo com água destilada. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL dessa mistura e adicionados em tubos de ensaio com 0,5 mL de reagente DNS, que foram posteriormente incubados a 100 °C por 15 min. Finalizada a incubação, após o resfriamento, foram adicionados 4 mL de água destilada, e realizadas a homogeneização e leitura em espectrofotômetro (EVEN) a 540 nm.

4.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

4.3.1 Planejamento Experimental

Para o estudo da produção das enzimas, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória. As variáveis independentes foram umidade inicial do substrato para o cultivo, a concentração de inóculo do microrganismo, e a porcentagem de engaço a ser adicionada no farelo de trigo. As escolhas dos valores adotados para as variáveis seguiram critérios relacionados com limitações e valores convencionais para as fermentações em estado sólido, conforme a Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Planejamento experimental 2^3 com triplicata no ponto central – matriz codificada e valores reais.

Continua			
Ensaio	Umidade (U)	Substrato (S)	Inóculo (I)
1	-1 (60%)	-1 (25% Engaço)	-1 (1×10^6 esporos/mL)
2	+1 (80%)	-1 (25% Engaço)	-1 (1×10^6 esporos/mL)
3	-1 (60%)	+1 (75% Engaço)	-1 (1×10^6 esporos/mL)
4	+1 (80%)	+1 (75% Engaço)	-1 (1×10^6 esporos/mL)
5	-1 (60%)	-1 (25% Engaço)	+1 (1×10^8 esporos/mL)
6	+1 (80%)	-1 (25% Engaço)	+1 (1×10^8 esporos/mL)
7	-1 (60%)	+1 (75% Engaço)	+1 (1×10^8 esporos/mL)

Tabela 4.1 – Planejamento experimental 2^3 com triplicata no ponto central – matriz codificada e valores reais.

Ensaio	Umidade (U)	Substrato (S)	Conclusão
			Inóculo (I)
8	+1 (80%)	+1 (75% Engaço)	+1 (1×10^8 esporos/mL)
9	0 (70%)	0 (50% Engaço)	0 (1×10^7 esporos/mL)
10	0 (70%)	0 (50% Engaço)	0 (1×10^7 esporos/mL)
11	0 (70%)	0 (50% Engaço)	0 (1×10^7 esporos/mL)

4.3.2 Microrganismo

No preparo do inóculo para o cultivo sólido, foi realizado o repique da cultura de *Paecilomyces* sp. TP08 cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em meio sólido Ágar Sabouraud-Dextrose em placas de Petri e incubado a 30 °C durante 7 dias para crescimento, e em seguida armazenado a 4 °C.

4.3.3 Inóculo

Para os inóculos foram preparadas suspensões de conídios/esporos adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada na placa de Petri, onde estavam os fungos crescidos e, fez-se a raspagem de conídios (esporos) da superfície do meio, com o auxílio de uma alça de platina. Após homogeneização, as soluções foram transferidas para tubos centrífuga esterilizados, para a quantificação de conídios e posterior inoculação nos substratos.

A quantificação da concentração de conídios na suspensão foi feita por meio de contagem em Câmara de Neubauer, e calculada de acordo com a Equação 4.5. E o volume de suspensão a ser inoculado ao meio de fermentação foi calculado conforme a Equação 4.6, ajustado de modo a se obter um inóculo de cada concentração definida no planejamento experimental.

$$C_{conídios}(conídios/mL) = \bar{E} \times 5.10^4 \times F_d \quad (4.5)$$

Em que:

$C_{conídios}$ – concentração de conídios em conídios por mililitro;

$\bar{E}$ – média dos conídios no quadrante central da Câmara de Neubauer;

F_d – Fator de diluição;

$$V_{suspensão}(mL) = \frac{C_{inóculo}\left(\frac{conídios}{g}\right) \times m(g)}{C_{conídios}\left(\frac{conídios}{mL}\right)} \quad (4.6)$$

Em que:

$V_{suspensão}$ – volume de suspensão de conídios em mililitro;

$C_{inóculo}$ – Concentração de conídios em grama de substrato;

m – massa de substrato no processo em gramas;

$C_{conídios}$ – Concentração de conídios na suspensão em mililitros.

4.3.4 Cultivo em estado sólido

O cultivo sólido para produção enzimática foi realizado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 5 g de substrato composto de farelo de trigo e engaço de uva de acordo com a porcentagem definida para cada ensaio, e umidade inicial ajustada para a porcentagem a ser analisada. Em seguida, foi realizada a inoculação com a suspensão de conídios na concentração específica de cada ensaio, em cada frasco.

Para o controle da produção de cada ensaio, em um dos frascos, a concentração de inóculo foi substituída pela quantidade equivalente de água destilada esterilizada. Todos os frascos foram deixados em repouso em a 30 ± 1 °C. Durante o tempo de cultivo, num total de 120 h, foram coletadas amostras a cada 24 h para realização das análises de atividade enzimática.

4.4 EXTRAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Para obtenção do extrato enzimático bruto, foi adicionado em cada frasco Erlenmeyer, água destilada, na proporção 10mL para cada grama de substrato e a mistura foi homogeneizada em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) a 100 rpm por 1 h. Em seguida, a suspensão foi filtrada em funil de Buchner e papel de filtro qualitativo (14 µm) com auxílio de bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581) para separar o substrato processado da fração líquida contendo o complexo enzimático produzido. O filtrado coletado foi armazenado em tubos de centrífuga graduados (50 mL) a 4 °C para posteriores análises.

4.5 ANÁLISE DO EXTRATO ENZIMÁTICO

4.5.1 Determinação da atividade de celulasas totais (FPase)

A quantificação das atividades de celulasas totais foi realizada de acordo com adaptação da metodologia proposta por Oliveira Júnior (2014), onde o substrato empregado foi o papel de filtro qualitativo (14 µm) cortado em tiras de 1cm x 6cm. As tiras foram colocadas em tubos de ensaio, onde foi adicionado 0,5 mL tampão citrato (pH 4,8) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático, seguindo para o banho termostatizado por 60 min a 60 °C para ocorrência da reação enzimática. Ao final da incubação, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL da mistura reacional e foram adicionadas 0,5 mL do reagente DNS. Após a essa mistura, acrescida do reagente, foi novamente incubada a 100 °C por 5 min. Adicionou-se a mistura, após incubação, 4 mL de água destilada e foi homogeneizada em agitador de tubos (Vórtex). As amostras foram lidas em espectrofotômetro (EVEN) a 540 nm de comprimento de onda para determinação dos açúcares redutores produzidos, de acordo com o método DNS. As análises foram em triplicata, e os valores obtidos nas leituras foram comparados com curva padrão de glicose a concentração de 1 g/L.

Uma unidade de atividade de celulase é definida pela produção de 1µmol de glicose por minuto (0,18 mg), nas condições de processo, e é expressa por U/g como diz a Equação 4.7.

$$FPase \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times V \times R}{(0,18 \times t \times V_e)} \quad (4.7)$$

Em que:

A é a absorbância da amostra;

B é absorbância do branco da amostra;

f é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d é a diluição da amostra;

V é o volume total da mistura reacional (mL);

R é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g);

0,18 é o fator de conversão de miligramas para µmol de glicose;

t é o tempo de reação (minutos);

Ve é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL);

4.5.2 Determinação da atividade de endoglucanases (CMCase)

A determinação das atividades de endoglucanases foi realizada de acordo com adaptação do protocolo proposto por Oliveira Júnior (2014), no qual uma solução de carboximetilcelulose sódica (CMC) a 2% (p/v) em tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) foi utilizada como substrato específico.

Em tubos de ensaio contendo 0,5 mL do extrato enzimático obtido, foram adicionados 0,5mL da solução de CMC a 2 % (p/v), e a mistura foi incubada a 50 °C por 30 min. Após, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL da mistura reacional e adicionados 0,5 mL do reagente DNS. Os tubos foram levados ao banho termostatizado por 5 min a 100 °C. E por fim, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada e promovida a homogeneização.

Para determinação da glicose liberada pela reação com o DNS, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (EVEN) no comprimento de onda de

540nm. As análises foram realizadas em triplicata, e comparados os valores obtidos nas leituras com uma curva padrão de glicose.

Expressa por U/g, e calculada de acordo com a Equação 4.8, uma unidade de atividade de endoglucanase equivale a 1µmol de glicose liberada por minuto, nas condições do processo.

$$CMCase \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times V \times R}{(0,18 \times t \times V_e)} \quad (4.8)$$

Em que:

A é a absorbância da amostra;

B é absorbância do branco da amostra;

f é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d é a diluição da amostra;

V é o volume total da mistura reacional (mL);

R é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g);

0,18 é o fator de conversão de miligramas para µmol de glicose;

t é o tempo de reação (minutos);

Ve é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL);

4.5.3 Determinação da atividade de pectinases (poligalacturonases)

Para determinação da atividade pectinolítica foi utilizada pectina cítrica (P.A) a 0,6% (p/v) em tampão acetato (pH 5,5) como substrato específico, adicionado o caldo enzimático obtido dos cultivos, procedimento adaptado da metodologia descrita por Pinheiro (2007). Em tubos de ensaio contendo 2 mL da solução de pectina, foram adicionados 0,25 mL do caldo enzimático e em seguida incubados a 35 °C durante 30 min para proceder a reação enzimática. Após isso, foram transferidos 0,5 mL da mistura de reação para tubos de ensaio contendo 0,5 mL do reagente DNS que foram levados ao banho termostatizado a 100 °C por 5

min. Por fim, após o resfriamento, aos tubos foram adicionados 4 mL de água destilada e homogeneizados.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro (EVEN) a 540 nm, O branco da reação foi preparado adicionando-se 0,5 mL do reagente DNS a uma mistura de 2 mL da solução substrato com 0,25 mL do extrato enzimático obtido no início do processo. O branco analítico foi preparado adicionando-se 0,5mL do reagente DNS a 2 mL da solução de pectina com 0,25mL de água destilada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A determinação da atividade de pectinases (poligalacturonases) do caldo enzimático foi baseada no aumento de ácido galacturônico formado por ação da enzima na pectina cítrica. Uma unidade de atividade enzimática de pectinase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por minuto de reação enzimática, nas condições do processo. Os resultados foram expressos por U/g e calculados de acordo com a Equação 4.9.

$$PGases \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times V \times R}{(0,1941 \times t \times V_e)} \quad (4.9)$$

que:

A: é a absorbância da amostra;

B: é absorbância do branco da amostra;

f: é o fator de conversão da curva de calibração de ácido galacturônico (mg/mL);

d: é a diluição da amostra;

V é o volume total da mistura reacional (mL);

R é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g);

0,1941: é o fator de conversão de miligramas para μmol de ácido galacturônico;

t: é o tempo de reação (minutos);

Ve é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL);

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Os resultados dos parâmetros de caracterização do engaço de uva e farelo de trigo estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Caracterização físico-química do engaço de uva (seco e triturado) e farelo de trigo (*in natura*)

Parâmetro	Unidade	Engaço de Uva	Farelo de Trigo
Umidade	%	54,96	12,3
pH	-	6,80	5,40
Densidade aparente	g/mL	0,625	0,188
Densidade real	g/cm ³	1,25	1,0
Porosidade do leito	-	0,5	0,812
Teor de sólidos solúveis	°brix	1,0	3,0
Açúcares redutores totais	g/L	0,044	0,732

A presença de umidade exerce uma influência direta na atividade de água, afetando, consequentemente, a proliferação de microrganismos no ambiente. Níveis de 10 a 15% dessa variável são adequados para preservar a qualidade da amostra, indicando níveis baixos de contaminação. Assim, os teores de umidade encontrados neste trabalho para o farelo de trigo, se encontram dentro da faixa satisfatória e estão de acordo com os valores de 12,21% e 12,5% encontrados por Medeiros (2019) e Bakker, Santos e Macedo (2017), respectivamente.

O engaço caracterizado também apresentou um teor de umidade dentro dos parâmetros satisfatórios para o cultivo em estado sólido, e maior que aos valores de 20% e 15,5% obtidos por Prozil (2013) e Yahya (2015), respectivamente. A variação entre esses valores é atribuída a alguns fatores como estado de conservação no momento da coleta,

seguido a espécie da videira, ou ainda às regiões produtoras e processos de pré-tratamento desse material.

O pH do engaço de uva de 6,80 – próximo à neutralidade, dificulta a contaminação do material em seu armazenamento. Já valor de pH do farelo de trigo identificado nesse estudo foi de 5,40 que é mais ácido do que os valores encontrados por Medeiros (2019) de 6,59 e Santos et al. (2021) com 6,55. Essa condição, para o presente estudo é favorável, pois acidifica o meio ao ser associado ao engaço de uva – que obteve um valor de pH mais próximo da neutralidade – favorecendo o desenvolvimento do fungo no meio de cultivo.

A densidade aparente do engaço de uva 0,625 g/mL mostra uma tendência a não compactação do substrato, influenciando diretamente no aumento da porosidade do leito, e assim consequentemente aumentando a aeração do meio de cultivo, que permite uma melhor difusividade de gases no processo fermentativo.

A densidade aparente do farelo de trigo foi de 1,888 g/mL, bem maior do que a encontrada por Santos et al. (2021) de 0,37 g/mL. O valor mais elevado encontrado no presente trabalho mostra uma maior tendência à compactação do meio, o que pode dificultar não somente a difusividade dos gases no cultivo em estado sólido, como também afeta a etapa posterior de extração enzimática por filtração. Por outro lado, partículas menores oferecem uma maior área de contato para o microrganismo, sendo necessário o equilíbrio entre tais fatores, que é possível de alcançar numa associação de substratos.

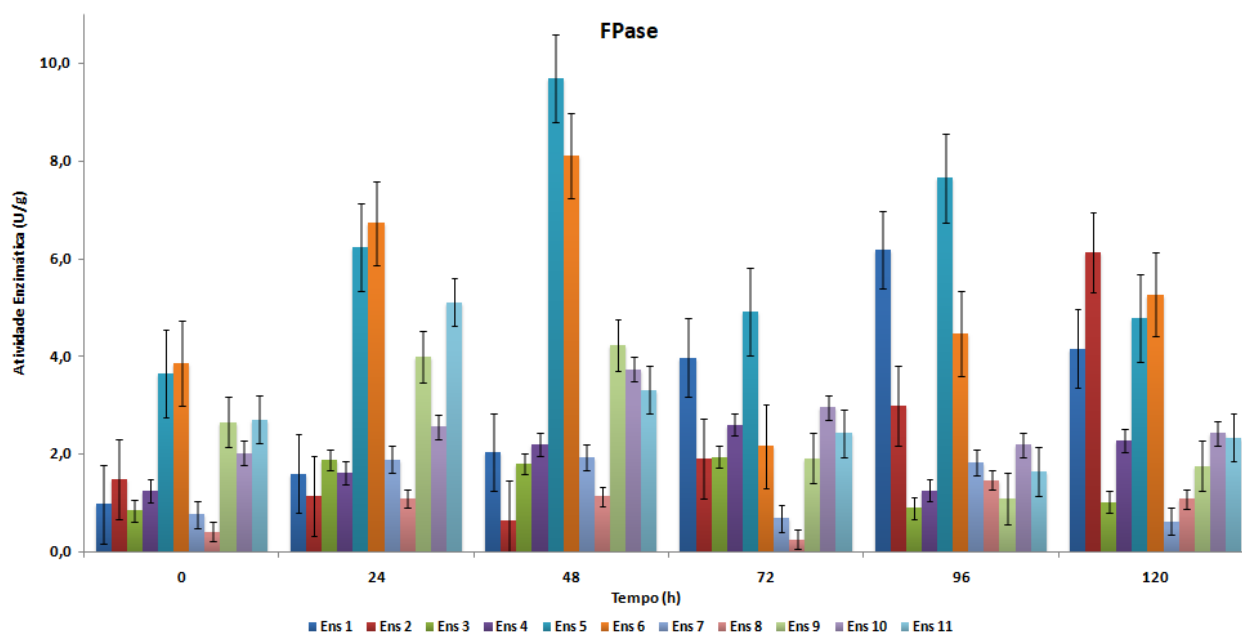
O engaço apresentou uma concentração de açúcares redutores totais de 0,044 g/L e teor de sólidos solúveis de 1,0 °Brix, que estão de acordo entre si, sendo possível observar a pouca presença de açúcares, já esperada para esse material tendo em vista sua composição lenhocelulósica. Essa baixa quantidade de açúcares evita a repressão catabólica da produção enzimática, que pode ocorrer em cultivos com substratos muito ricos em açúcares (SANTOS, 2021).

5.2 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

5.2.1 Celulases totais – FPase

A Figura 5.1 relaciona a produção de celulases totais ao longo de 120 h de fermentação, nos onze ensaios realizados.

Figura 5.1 - Atividade celulolítica durante o processo de produção enzimática por *Paecilomyces* sp. TP08 com engaço de uva e farelo de trigo como substratos



Os ensaios 1 e 2, com a menor concentração de engaço e a menor concentração de inóculo (1×10^6 esporos/mL), expressaram os maiores valores de atividade no fim do cultivo (6,19 U/g em 96 h e 6,14 U/g em 120 h). E os ensaios 5 e 6, com a mesma concentração de engaço que os ensaios mencionados anteriormente, porém com a maior concentração de inóculo (1×10^8 esporos/mL), obtiveram maiores valores de atividade enzimática no início do cultivo (9,7 U/g e 8,12 U/g em 48h).

Já nos ensaios 7 e 8, com uma maior concentração de inóculo (1×10^8 esporos/mL), e 75% de engaço em relação ao farelo de trigo — a umidade influenciou, onde a menor delas (60%) influenciou numa maior produção enzimática em menos tempo de cultivo (48 h). Os valores do ponto central, avaliados nos ensaios 9, 10 e 11 expressaram maiores valores de atividade enzimática no início do cultivo (4,24 U/g em 48 h, 2,96 U/g em 72 h e 5,12 em 24 h).

Sendo então, o maior valor de atividade enzimática de celulasas totais observado no ensaio 5 – nas condições de 60% de umidade, 25% de engaço e 1×10^8 de concentração de inóculo.

Rodrigues, D'amico e Gerage (2023) utilizando uma associação de casca de mandioca e bagaço de malte como substrato com o fungo *Aspergillus niger*, obteve sua maior atividade 4,2 U/mL em 84 h de cultivo com umidade a 60%, já com a umidade a 70% sua maior atividade foi observada em 96 h com 2,13 U/mL. Com o mesmo substrato, utilizando o fungo *Trichoderma reesei*, sua maior atividade foi a 70% de umidade com 6,38 U/mL em 72 h. Tais resultados obtidos por eles, apesar de usar substratos e fungos diferentes, é possível observar a influência da umidade na expressão da atividade enzimática, assim como o tempo de cultivo onde ocorre o pico de produção. A umidade de 70% proporcionou picos de atividade em menos horas de cultivo, tanto no presente trabalho quanto na literatura citada.

Cerqueira et al. (2023) utilizando um fungo filamentoso isolado da fibra do coco, numa concentração de 10^7 de esporos e utilizando essa própria fibra como substrato para o cultivo em 48 h, obteve uma atividade de FPase de 91,64 U/g com 70% de umidade e pH 3,0. Com a umidade a 60%, sua atividade foi de 83,51 U/g e a 80% foi de 89,32 U/g. Diante destes resultados, é possível observar novamente a influência da umidade na produção enzimática de celulasas totais.

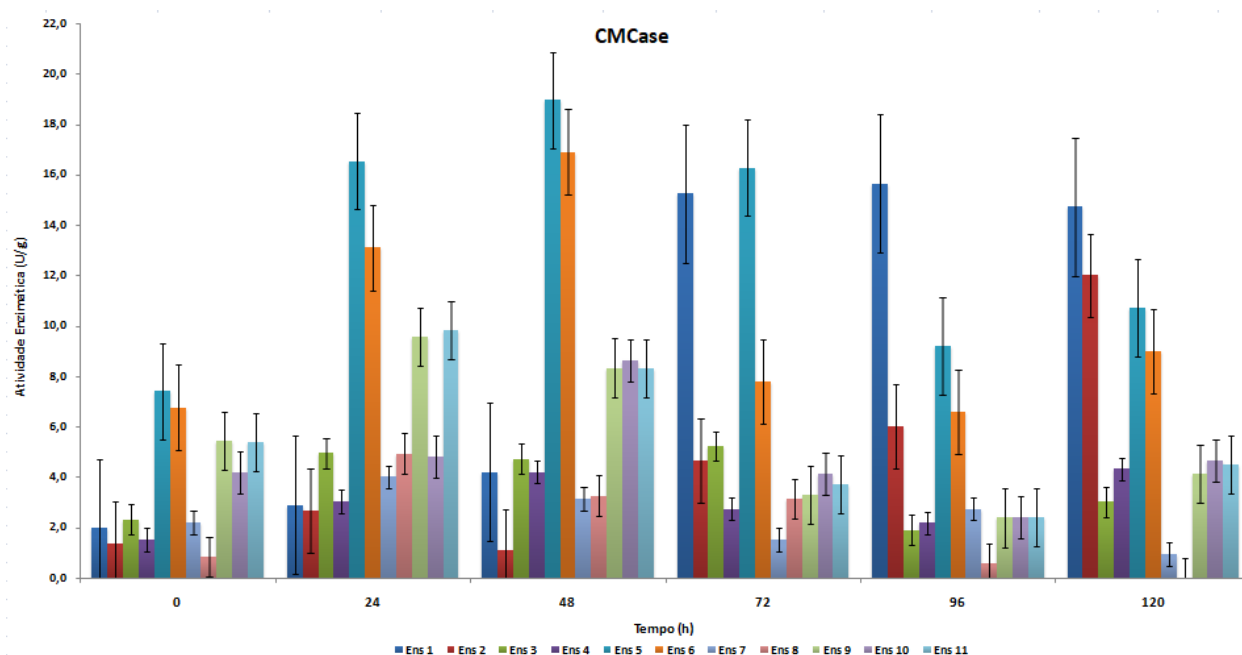
Os altos valores de atividade enzimática obtidos por Cerqueira et al. (2023), além da influência da umidade, também podem ser explicados pelo baixo pH do meio de cultivo, que favorece o crescimento dos fungos e o solvente utilizado para obtenção do extrato bruto, o Tampão Citrato de Sódio, que pode possuir afinidade pela enzima, facilitando sua extração e expressão nas análises.

Santos et al. (2021) utilizando o fungo *Penicillium* sp. FDS15 e o farelo de trigo puro como substrato, obteve sua maior atividade de celulasas totais em 168 h de cultivo com 0,70 U/g. Já com a associação do farelo de trigo com o sabugo de milho numa proporção de 1:1, a maior atividade foi observada somente em 216 h de cultivo com 1,29 U/g. Ele explica que, o fato de os maiores valores encontrados serem da associação dos substratos se dá por um equilíbrio entre as propriedades de ambos: o farelo proporciona mais nutrientes, enquanto o sabugo de milho diminui os níveis de pH e aumenta a porosidade do meio. Já no presente trabalho, observa-se que as menores porcentagens de engaço em relação ao trigo favorecem a produção enzimática, fato que se dá pelo maior valor nutricional do farelo de trigo.

5.2.2 Endoglucanases – CMCase

A Figura 5.2 relaciona a produção de endoglucanases ao longo de 120 h de fermentação, nos onze ensaios realizados.

Figura 5.2- Atividade de endoglucanases durante o processo de produção enzimática por *Paecilomyces*TP08sp.com engaço de uva e farelo de trigo como substratos



A menor concentração de inóculo (1×10^6 esporos/mL) – Ensaios 1, 2, 3 e 4 – expressou maiores valores de atividade em mais tempo de cultivo (15,65 U/g em 96 h; 12,0 U/g em 120 h; 5,23 U/g em 72 h e 4,33 U/g em 120 h), já as maiores concentrações de inóculo (1×10^7 esporos/mL e 1×10^8 esporos/mL) favoreceram uma maior atividade nas primeiras 24 h, observado através dos cultivos 7, 8, 9 e 11. Já o maior valor de atividade de endoglucanases pôde ser observado no ensaio 5, assim como ocorreu para as celulasas totais.

Santos et al. (2020), utilizando o farelo de trigo como substrato e o fungo *Aspergillus tamarii*, com umidade do cultivo a 40% em 72 h, obteve a maior atividade de endoglucanases de 0,41 U/mL, valores muito inferiores aos encontrados no presente trabalho, ainda que com as menores porcentagens de farelo de trigo em relação ao engaço de uva. Tal diferença pode ser explicada pelo microrganismo utilizado, e pela umidade do cultivo – onde uma umidade

muito baixa pode causar estresse hídrico ao fungo, limitando seu crescimento e expressão enzimática.

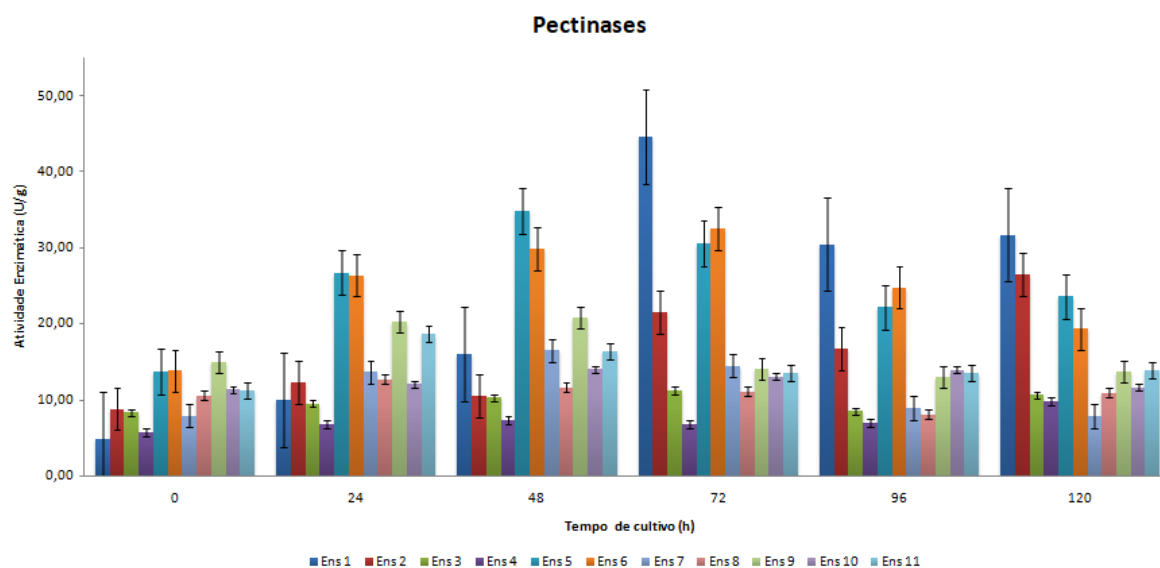
Silva et al. (2019), também utilizando apenas o farelo de trigo como substrato e o fungo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, com umidade a 70%, em 120 h de cultivo obteve atividade de endoglucanases de 63,04 U/g, um valor superior aos encontrados neste trabalho. Já utilizando outros substratos, ele obteve valores mais próximos aos encontrados no presente estudo, sendo esses substratos e seus respectivos valores de atividade enzimática: o farelo de soja, 17,57 U/g; bagaço de cana, 9,43 U/g; palha de milho, 7,33 U/g e casca de arroz, 7,25 U/g. A proximidade desses valores pode ser explicada pela composição nutricional desses substratos, se assemelhando à associação do farelo de trigo com o engaço de uva, assim como as condições de obtenção e pré-tratamento de cada um desses resíduos.

Santos et al. (2021) utilizando o farelo de trigo com o fungo *Penicillium* sp FDS15, foram bem próximos aos encontrados no ‘ensaio 1’ deste trabalho (15,65 U/g) sendo 13,7 U/g (72 h) e 17,92 U/g (168 h), respectivamente. Assim, é possível observar que mesmo com a associação do farelo de trigo com o engaço de uva (25% (p/p) de engaço), o microrganismo utilizado e as condições de cultivo propostas, obtiveram uma expressão enzimática semelhante ao farelo de trigo puro.

5.2.3 Pectinases

A Figura 5.3 representa a produção de pectinases ao longo de 120 h de processo considerando os ensaios descritos no planejamento experimental.

Figura 5.3- Atividade de pectinases durante o processo de produção enzimática por *Paecilomyces* sp. TP08 com engaço de uva e farelo de trigo como substratos.



A menor porcentagem de engaço em relação ao farelo (25% p/p), associada ao menor teor de umidade (60%) – Ensaios 1 e 5 – favoreceram expressivamente a produção de pectinases no início do cultivo. Já a associação da menor porcentagem do engaço em relação ao farelo (25% (p/p)) ao maior teor de umidade (80%) proporcionou maiores valores de expressão enzimática no fim do cultivo. Sendo destes, o maior valor encontrado no Ensaio 1, com 44,5 U/g em 72 h.

Santos et al. (2020), utilizando o farelo de trigo como substrato e o fungo *Aspergillus tamarii*, com umidade do cultivo a 40% em 72 h, obteve a maior atividade de pectinases de 0,49 U/mL, valores muito inferiores aos encontrados no presente trabalho. Tal diferença pode ser explicada, pelo microrganismo utilizado no citado trabalho, que pode possuir menos predisposição para produção de pectinases em contraste com o *Paecilomyces* sp. TP08 utilizado neste trabalho, bem como pela baixa umidade do cultivo utilizada, e ainda, pela composição do substrato, onde o engaço de uva pode atuar como ótima fonte para produção de pectinases devido à sua composição lignocelulósica.

Corroborando com a hipótese de que o microrganismo influenciou nos resultados de atividade pectinolítica, Andrade, Alves e Fontes (2023) utilizando a água residual do beneficiamento do café arábica com o fungo *Paecilomyces formosus*, obteve maior valor de atividade enzimática de 2,11 U/mL. É um valor superior aos encontrados por Santos et al.

(2020), mas ainda muito inferior aos valores obtidos nesse estudo, o que pode ser explicado pelo substrato utilizado e a condução do cultivo, uma vez que Andrade, Alves e Fontes (2023) realizou fermentação submersa.

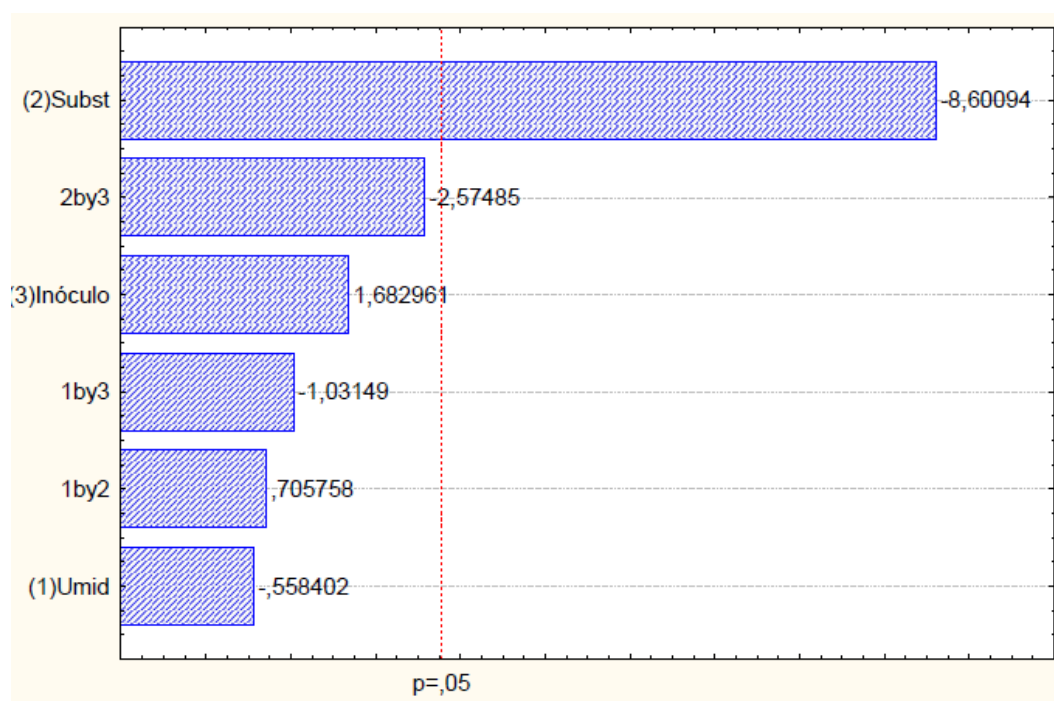
5.3 ANÁLISE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As atividades enzimáticas de celulases totais (FPases), endoglucanases (CMCases) e pectinases obtidas do processo foram analisadas em termos de significância estatística por meio do Diagrama de Pareto e Superfície Resposta dos ensaios representativos do planejamento experimental.

5.3.1 Celulases totais – FPase

A Figura 5.4 representa a análise de Pareto considerando os efeitos dos fatores: substrato, inóculo e umidade para as celulases totais.

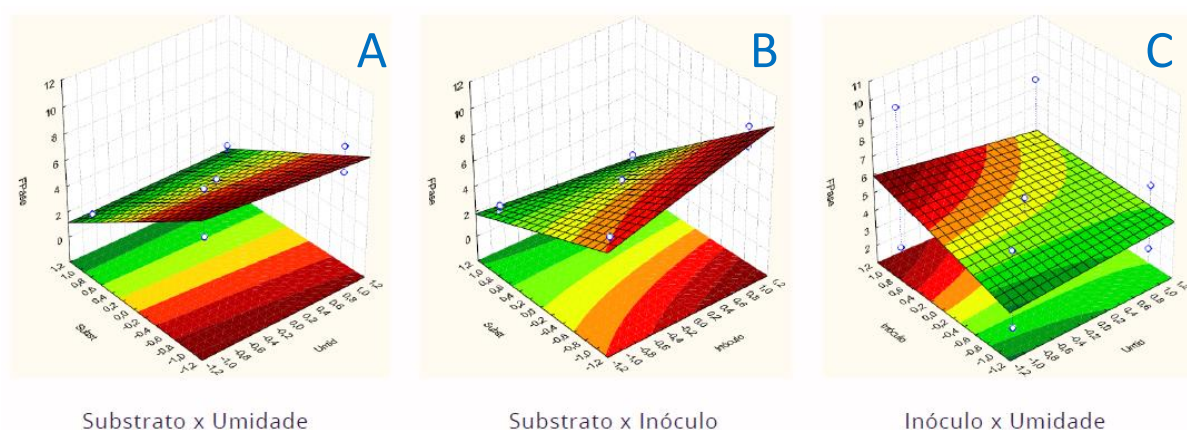
Figura 5.4- Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis substrato, inóculo e umidade na expressão de celulases totais (FPase)



Analisando o diagrama de Pareto, Figura 5.4, verificou-se que o substrato apresentou significância estatística para as celulasas totais, com efeito negativo, ou seja, quanto maior a porcentagem de engajo em relação ao farelo de trigo, menor a atividade enzimática das celulasas totais (FPase) com 95% de confiança estatística. Já os demais fatores e suas interações não apresentaram significância estatística na variável resposta.

A Figura 5.5 mostra as superfícies de resposta para os fatores de análise para expressão das celulasas totais obtidas nos ensaios realizados.

Figura 5.5 - Superfície de resposta para expressão de FPase em função do substrato e umidade (A), substrato e inóculo (B), inóculo e umidade (C).

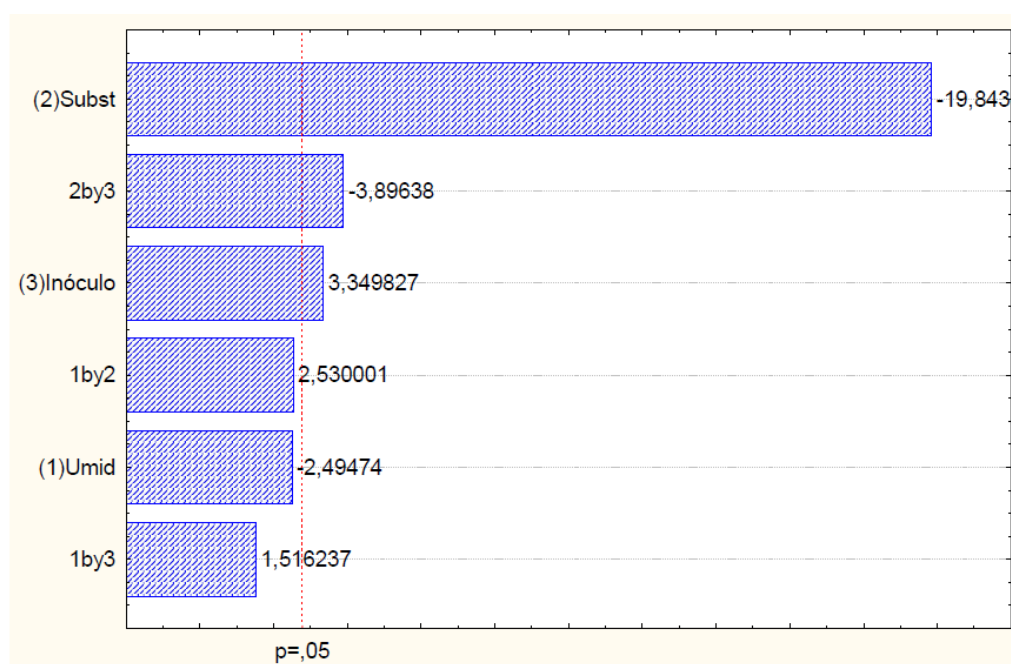


A análise das superfícies de resposta da Figura 5.5 permite observar que as regiões com a maior expressão enzimática de celulasas totais (em vermelho escuro) estão localizadas nos pontos em que há menor concentração de substrato e maior concentração de inóculo, ou seja, o valor de atividade enzimática de FPase é diretamente proporcional a diminuição do substrato e ao aumento do inóculo. Logo, uma menor porcentagem de engajo em relação ao farelo de trigo, e uma maior concentração de inóculo (esporos por grama de substrato) irão gerar uma maior produção de celulasas totais.

5.3.2 Endoglucanases – CMCase

O diagrama de Pareto para análise do efeito dos fatores em relação à variável resposta atividade de CMCase está descrito na Figura 5.6.

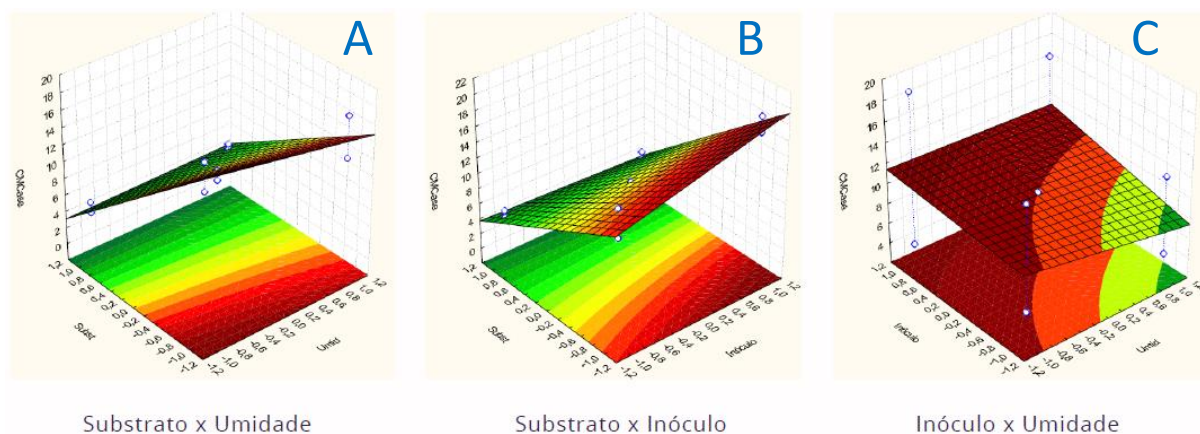
Figura 5.6- Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis substrato, inóculo e umidade na expressão de endoglucanases (CMCase)



Analisando o diagrama de Pareto apresentado na Figura 5.6, verificou-se que os fatores substrato, inóculo e a interação entre eles apresentaram significância estatística para as endoglucanases, sendo estas: quanto maior a concentração de inóculo e quanto menor a porcentagem de engaço em relação ao farelo de trigo, maior a expressão enzimática de CMCase.

A Figura 5.7 mostra as superfícies de resposta para os fatores de análise para atividade de endoglucanases do tipo CMCases obtida nos ensaios realizados.

Figura 5.7 - Superfície de resposta para expressão de CMCase em função do substrato e umidade (A), substrato e inóculo (B), inóculo e umidade (C).

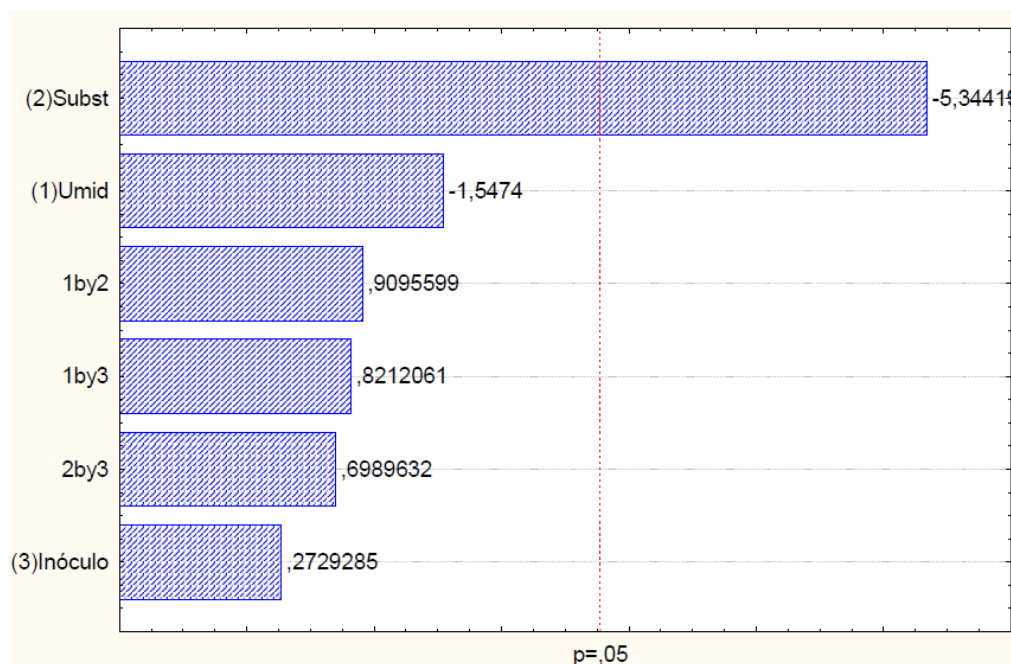


A análise das superfícies de resposta da Figura 5.8 permite observar que as regiões com a maior expressão enzimática de endoglucanases (em vermelho escuro) estão localizadas nos pontos onde há menor concentração de substrato e maior concentração de inóculo, ou seja, o valor de atividade enzimática de CMCase é inversamente proporcional ao aumento do substrato e diminuição do inóculo. Logo, uma maior porcentagem de engaço em relação ao farelo de trigo, e uma menor concentração de inóculo irão gerar uma menor produção de endoglucanases.

5.3.3 Pectinases

O diagrama de Pareto para análise do efeito dos fatores em relação à variável resposta atividade de pectinases está descrito na Figura 5.8.

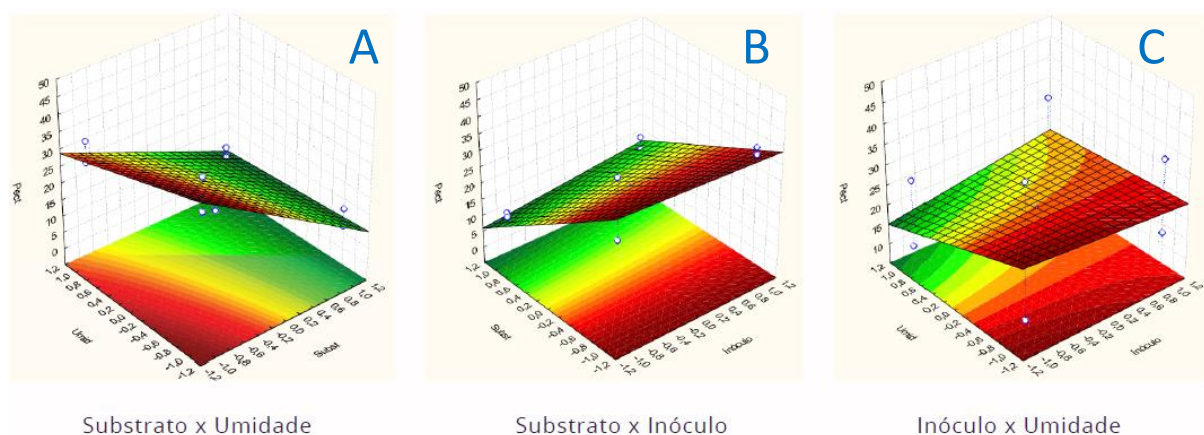
Figura 5.8 - Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis substrato, inóculo e umidade na expressão de pectinases



Analisando o diagrama de Pareto apresentado na Figura 5.8, verifica-se que assim como ocorreu para as celulasas totais, o fator substrato apresentou significância estatística para as pectinases, sendo esta: quanto maior a porcentagem de engaço em relação ao farelo de trigo, menor a expressão enzimática de pectinases.

A Figura 5.9 mostra as superfícies de resposta para os fatores de análise para expressão das atividades das pectinases obtidas nos ensaios realizados.

Figura 5.9 - Superfície de resposta para expressão de Pectinases em função do substrato e umidade (A), substrato e inóculo (B), inóculo e umidade (C).



A análise das superfícies de resposta da Figura 5.9 permite observar que as regiões com a maior expressão enzimática de pectinases (em vermelho escuro) estão localizadas nos pontos onde há menor concentração de substrato, sem influência da concentração do inóculo ou teor de umidade, ou seja, o valor de atividade enzimática de FPase é diretamente proporcional a diminuição do substrato. Logo, uma menor porcentagem de engajo em relação ao farelo de trigo, irá gerar uma maior produção de pectinases.

6. CONCLUSÕES

- A utilização do farelo de trigo com engaço de uva como meio de cultivo apresentou potencial de produção enzimática pelo *Paecilomyces* sp. TP08.
- Houve uma expressiva produção de pectinases, que possuem ampla aplicabilidade na indústria.
- Os maiores valores de produção enzimática foram observados nas condições de: 25% (p/p) de engaço em relação ao farelo, umidade de 60% e concentração de inóculo de 1×10^8 esporos/mL.
- A porcentagem de engaço em relação ao farelo foi a variável de maior significância estatística observada.

Conclui-se, ainda, que estudos devem ser realizados para otimização do processo de acordo com os resultados obtidos do planejamento experimental, e análises quanto à estabilidade térmica e ao pH das enzimas produzidas.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, V.; BATISTA, J.; NASCIMENTO, T.; CUNHA, M.; LEITE, A. Resíduos agroindustriais: Uma alternativa promissora e sustentável na produção de enzimas por microrganismos. 10.31692/ICIAGRO. 0478, 2020.
- ANDRADE, M.C., ALVES, G.S.C., FONTES, P.R.. Hydrothermal Treatment of Coffee Residues for the Production of Pectinases by *Paecilomyces* Formosus. **Waste Biomass Valor** v. 14, 2375–2388, 2023. DOI: 10.1007/s12649-022-01981-w
- ATAOPRAK, T.; AMORIM, M. M.; RIBEIRO, T.; PINTADO M.; MADUREIRA, A. R.; Grape stalk valorization for fermentation purposes. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 4, 2021. DOI:0.1016/j.fochms.2021.100067
- BAKKER, C. M. C. N.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R.. Produção de Xilanases por Fermentação em Estado Sólido de Farelo de Trigo Utilizando Consórcios Fúngicos. **Higiene Alimentar**, v. 31, p. 80-84, 2017. Disponível em <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-833330>.
- BABPTISTA, S. L.; ROMANI, A.; CUNHA, J. T.; DOMINGUES, L. Multi-feedstock biorefinery concept: Valorization of winery wastes by engineered yeast, **Journal of Environmental Management**, v. 326, part A, 2023. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.116623
- CERQUEIRA, K. S.; SILVA, G. N.; SILVA, K. M.; RODRIGUES, J. R. S.; SOUZA, R. R.; LOBATO, A. K. C. L.; Production of cellulolytic enzymes from microorganism isolated from coconut fiber. **CONCILIUM**, Vol. 23, Nº 3, 2023
- DAI, Z.-B.; Wang, X.; Li, G.-H. Secondary Metabolites and Their Bioactivities Produced by *Paecilomyces*. **Molecules** 25:5077, 2020.
- DAMIANI C; MARTINS GAS; BECKER FS. (Org.) Aproveitamento de resíduos vegetais: potenciais e limitações – Palmas, TO: EDUFT, 2020.
- DOS SANTOS, L. M.; ORLANDELLI, R. C. Xilanases fúngicas: aproveitamento do farelo de trigo em processos fermentativos e panificação. **Evidência**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 243–258, 2019. DOI: 10.18593/eba.v19i2.21819.
- DUAN Z, WANG Q, WANG T, KONG X, ZHU G, QIU G, YU H. Application of microbial agents in organic solid waste composting: a review. **J Sci Food Agric**. Aug 15;104(10):5647-5659. 2024. doi: 10.1002/jsfa.13323.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ciência que Transforma: Resultados e Impactos Positivos da Pesquisa Agropecuária na Economia, no Meio Ambiente e na Mesa do Brasileiro. Embrapa, 2020.
- GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. de S.; MARTINAZZO, A. P. Use of agro-industrial waste for cellulase production: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. e567985785, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.5785.
- KAPCSÁNDI, V., Hanczné Lakatos, E., Sik, B. et al. Antioxidant and polyphenol content of different *Vitis vinifera* seed cultivars and two facilities of production of a functional bakery product. **Chem. Pap.** v. 75, pag. 5711–5717, 2021.

KUKRETI, N.; KUMAR, P.; KATARIA, R. Sustainable biotransformation of lignocellulosic biomass to microbial enzymes: An overview and update. **Industrial Crops and Products**, v. 222 - Part 1, 2024. DOI: 10.1016/j.indcrop.2024.119432.

LEITE, AAM; SANTOS, PVS; Identificação de produtos secundários da vinificação: um estudo de caso. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 650-666, 2020.

MOSADEGHZAD, Z., Zuriati, Z., Asmat, A. et al. Chemical components and bioactivity of the marine-derived fungus *Paecilomyces* sp. Collected from Tinggi Island, Malaysia. **Chemistry of Natural Compounds** ed49, pg621–625, 2013.

NASCIMENTO FILHO WB; FRANCO CR. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, 7(6), 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, S.D. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2014.

REHMAN, H. U. Applications of Pectinolytic Enzymes in Process Industries. **IntechOpen**, 2023. DOI: 10.5772/intechopen.110033.

RICARDINO IEF; SOUZA MNC; NETO IFS. Vantagens e Possibilidades do Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1 n. 8, 2020.

RIOS, DAM; BARROSO RIOS FJ; CASTELO BRANCO GFN. Resíduo sólido na agroindústria vitivinícola e perfil da vinivicultura no cerrado – Goiás. Resíduos Sólidos: Desafios e perspectivas / Organizador Rômulo Maziero. Belo Horizonte, MG: Synapse Editora, 2020.

RODRIGUES, E. M. G.; D'AMICO, C. C.; GERAGE, K. R. G. Produção de celulasas por fungos filamentosos utilizando fermentação em estado sólido. **Bioenergia em revista: diálogos**, v.. 13, n. 2, P. 32-44jul./dez. 2023.

SADH, P.K., DUHAN, S. & DUHAN, J.S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresour. Bioprocess.** 5, 1, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>

SANTOS, A. F. A.; ANDRADE, V. D.; CARDOSO, B. A.; SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S.; PORTO, C. S.; Bioprospecting of enzymes produced by *Aspergillus tamaritii* URM 4634, isolated from Caatinga soil, by solid state fermentation. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 6, n.5, p.25663-25676 may. 2020.

SANTOS, F. A.; CARVALHO-GONÇALVES, L. C. T.; SIMÕES, A. L. C.; SANTOS, S. F. M. Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, 2021. DOI: doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100648.

SILVA, G. A.; SANTOS, M. S. M.; SANTOS E. G.; LEITE S. R. L.; BATIOTOTE, M. Fungo do cerrado com potencial para produção de enzima celulase. **Revista Eletrônica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 2, 2019. DOI: 10.5892/ruvrd.v17i2.5067

SILVA, V. M. A., Cruz, R., Fonseca, J. C., de Souza-Motta, C. M., de Sena, A. R., & Moreira, K. A. (2017). Juice clarification with tannases from *Aspergillus carneus* URM5577 produced by solid-state fermentation using *Terminalia catappa* L. leaves. **African Journal of Biotechnology** , 16(19), 1131-1141, 2017.

SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications, **Bioresource Technology Reports**, v. 14, 2021. DOI: 10.1016/j.biteb.2021.100652.

TANASKOVIĆ, S. J.; ŠEKULJICA, N.; JOVANOVIĆ J.; GAZIKALOVIĆ I., GRBAVČIĆ S.; ĐORĐEVIĆ N.; SEKULIĆ, M. V.; HAO J.; LUKOVIĆ N.; ZORICA KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ Z. Upgrading of valuable food component contents and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition. **Journal of Cereal Science**, v. 99, 2021.

VAZ JR., S. Treatment of Agroindustrial Biomass Residues: A Sustainable Approach. **Treatment of Agroindustrial Biomass Residues**, 2020.