

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO ROBERTO SILVA VILLA REAL

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *TRICHODERMA ASPERELLUM*
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E UMA PROPOSTA DE APLICAÇÃO DO EXTRATO
BRUTO NA SACARIFICAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE MICROALGAS

PALOTINA

2025

JOÃO ROBERTO SILVA VILLA REAL

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *TRICHODERMA ASPERELLUM*
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E UMA PROPOSTA DE APLICAÇÃO DO EXTRATO
BRUTO NA SACARIFICAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE MICROALGAS**

Monografia apresentada como requisito parcial à
aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de
Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tania Sila Campioni Magon



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E EXATAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000
Telefone: 3360-5000 - <https://ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

Aos quatro dias do mês de julho de dois mil e vinte e cinco, às catorze horas, na Sala 22 do Bloco Didático IV, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Trichoderma asperellum* utilizando resíduos agroindustriais e uma proposta de aplicação do extrato bruto na sacarificação da parede celular da algas", apresentado pelo discente João Roberto Silva Villa Real, orientado pela Profa. Dra. Tania Sila Campioni Magon, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra ao discente, para exposição do trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem), Prof. Dr. Luis Fernando Souza Gomes, nota: 100 (cem), e Profa. Dra. Tania Sila Campioni Magon, nota: 100 (cem). A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 100 (cem). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelo discente sob acompanhamento da orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **TANIA SILA CAMPIONI MAGON, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/07/2025, às 16:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **LUIS FERNANDO SOUZA GOMES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/07/2025, às 19:41, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 08/07/2025, às 16:47, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **7903516** e o código CRC **649BB159**.

Dedico este trabalho ao meu filho Miguel, razão maior de cada esforço, que você
sempre encontre alegria em aprender e crescer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Angela e Roberto, por todo apoio emocional e moral, e amparo nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu irmão André pelas conversas que me aliviaram a pressão, pelo companheirismo de sempre e por toda a ajuda, direta ou indireta, para que eu chegasse até aqui.

Agradeço a minha esposa Nathielly por toda a compreensão durante minhas ausências, pelo carinho que me deu forças, por segurar as pontas tantas vezes e por ser a inspiração diária para eu não desistir dos meus sonhos.

Agradeço a minha orientadora Tania por sua orientação precisa e dedicada, pela paciência em esclarecer minhas dúvidas, pelos valiosos ensinamentos e acreditar no potencial deste projeto desde o início, pela liberdade que me deu para explorar novas ideias.

Agradeço os técnicos Susiana e Ademir por pelo profissionalismo, pela atenção e pelo suporte técnico essencial que garantiram o bom andamento das atividades no laboratório. Sou muito grato pela dedicação de vocês.

Agradeço aos meus amigos por sua amizade leal, pela torcida sincera, por ouvirem meus desabafos e por me lembrarem da importância do equilíbrio, mesmo nos momentos de maior dedicação a este trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de estudo e pela infraestrutura oferecida.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Luis Fernando e a Profa. Dra. Adriana Fiorini, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições e sugestões.

RESUMO

O aproveitamento sustentável de resíduos agroindustriais e o desenvolvimento de biocombustíveis são estratégias essenciais para a bioeconomia circular. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de diferentes resíduos agroindustriais utilizados como substrato para a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Trichoderma asperellum* e, subsequentemente, aplicar o extrato enzimático bruto na sacarificação da biomassa da microalga *Scenedesmus* sp., visando a produção de açúcares fermentescíveis. A produção de enzimas foi realizada por fermentação submersa utilizando, palha de milho, palha de trigo, sabugo de milho e bloco de composto pós-cultivo (SMS) do cogumelo *Pleurotus pulmonarius*. A biomassa da microalga foi submetida a diferentes pré-tratamentos físicos (autoclavagem, sonificador e ruptura mecânica) e químicos (hidrólise com HCl, H₂SO₄ e NaOH) para otimizar a liberação de glicose, previamente à sacarificação enzimática. Os resultados demonstraram que o composto pós-cultivo de cogumelo (SMS) foi o substrato mais eficaz para a indução de celulasas totais, alcançando uma atividade enzimática de 0,37 U/mL. Na etapa de pré-tratamento da biomassa microalgal, a autoclavagem (121 °C por 30 min) destacou-se como o método mais eficiente, produzindo, após a sacarificação enzimática (a 50 °C e pH 4,8), a concentração de 1,45 g/L de glicose em 15 dias, um rendimento mais de 300% superior à biomassa não tratada. O aumento de escala em biorreator, contudo, foi interrompido por contaminação, atingindo um pico de apenas 0,84 g/L de Açúcares Redutores Totais (ART). Conclui-se, portanto, que a rota biotecnológica proposta é cientificamente viável, validando o SMS como um substrato superior para produção de enzimas e a autoclavagem como um pré-tratamento indispensável para a sacarificação de *Scenedesmus* sp. Embora as concentrações de glicose obtidas ainda sejam um desafio para a produção industrial de etanol, o estudo aponta para a necessidade de otimizações em maior escala e controle de assepsia.

Palavras-chave; Bioetanol; *Trichoderma asperellum*; *Scenedesmus* sp; Sacarificação; Resíduos Agroindustriais.

ABSTRACT

The sustainable use of agro-industrial residues and the development of third-generation biofuels are essential strategies for the circular bioeconomy. This study aimed to evaluate the potential of different agro-industrial residues as substrates for production of cellulolytic enzymes by the fungus *Trichoderma asperellum* and, subsequently, to apply the crude enzyme extract for the saccharification of the microalgae *Scenedesmus* sp. biomass, aiming at the production of fermentable sugars. Enzyme production was carried out through submerged fermentation using soybean meal, corn straw, wheat straw, corn cob, and spent mushroom substrate (SMS) from the fungus *Pleurotus pulmonarius*. The microalgal biomass was subjected to different physical (autoclaving, sonication, and mechanical disruption) and chemical (hydrolysis with HCl, H₂SO₄, and NaOH) pretreatments to optimize glucose release. The results demonstrated that the spent mushroom substrate (SMS) was the most effective substrate for cellulase induction, reaching an enzyme activity of 0.37 U/mL. In the microalgal biomass pretreatment stage, autoclaving (121 °C for 30 min) stood out as the most efficient method, yielding, after enzymatic saccharification (at 50 °C and pH 4.8), a glucose concentration of 1.45 g/L in 15 days, a yield over 300% higher than that of the untreated biomass. The scale-up in a bioreactor, however, was interrupted by contamination, reaching a peak of only 0.84 g/L of Total Reducing Sugars (TRS). It is concluded, therefore, that the proposed biotechnological route is scientifically viable, validating SMS as a superior substrate for enzyme production and autoclaving as an indispensable pretreatment for the saccharification of *Scenedesmus* sp. Although the glucose concentrations obtained remain a challenge for industrial ethanol production, the study points to the need for larger-scale optimizations and aseptic control.

Keywords: Bioethanol; *Trichoderma asperellum*; *Scenedesmus* sp; Saccharification; Agro-industrial Residues.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	12
2.2	ESTRUTURA CELULAR DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	15
2.2.1	Celulose	17
2.2.2	Lignina	18
2.2.3	Hemicelulose	18
2.3	MICRORGANISMOS E ENZIMAS PARA A DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA	19
2.3.1	Microrganismos degradadores de lignocelulose	19
2.3.2	O gênero <i>Trichoderma</i> como biofábrica de enzimas	20
2.3.3	O complexo enzimático lignocelulolítico	20
2.3.4	Produção de enzimas por fermentação submersa	21
2.4	MICROALGAS E A PRODUÇÃO DE BIOETANOL	21
2.4.1	O potencial das microalgas para produção de etanol de terceira geração	21
2.4.2	A parede celular e as rotas de conversão	23
2.4.3	O gênero <i>Scenedesmus</i>	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTURA	26
3.1.1	Obtenção e manutenção do fungo	26
3.1.2	Obtenção e manutenção da microalga	26
3.2	OBTENÇÃO E PREPARO DAS BIOMASSAS	26
3.2.1	Resíduos lignocelulose	26
3.3	PRODUÇÃO E ANÁLISE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS	27
3.3.1	Fermentação submersa (FSm)	27
3.3.2	Extração das enzimas	27
3.3.3	Ensaio de atividade enzimática	28
3.4	SACARIFICAÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA MICROALGAL E ENSAIOS DE GLICOSE	28
3.4.1	Pré-tratamentos da biomassa microalgal	28
3.4.2	Sacarificação e ensaio de glicose	29

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	MANUTENÇÃO DO FUNGO	31
4.2	MANUTENÇÃO DA MICROALGA	32
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	33
4.4	PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	35
4.5	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE GLICOSE APÓS PRÉ-TRATAMENTOS	37
4.6	SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL	40
5.	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO 1 - TESTE DE TUKEY E ANOVA	56

1 INTRODUÇÃO

As atividades agroindustriais representam um dos setores primários da economia de um país, principalmente daqueles que se caracterizam por altas taxas de produção de *commodities* agrícolas, como o Brasil (Pellera; Gidakos, 2017). Contudo, essas atividades geram anualmente toneladas de resíduos, cuja maioria é deixada no solo ou queimada a céu aberto, causando poluição do ar e significativos riscos ambientais (Menezes et al., 2022).

Esses resíduos agroindustriais compreendem todos os subprodutos gerados na agricultura e na pecuária, como os rejeitos de culturas (café, cacau, banana, soja, milho, etc.), dejetos animais, e os efluentes produzidos nas agroindústrias (Azelee et al., 2020).

A busca pela sustentabilidade tem incentivado fortemente o aproveitamento dessa biomassa residual, de composição, em grande parte, lignocelulósica (Santana; Durães, 2013).

Nesse cenário, o Brasil detém uma posição estratégica para liderar o aproveitamento integral desses materiais, devido a uma combinação única de fatores: a maior biodiversidade do planeta, vasta disponibilidade de matérias-primas renováveis, intensa radiação solar, abundância de água e diversidade climática. Somado a isso, o pioneirismo do país na produção de etanol combustível, desde o programa PRÓ-ÁLCOOL em 1975, em larga escala e o surgimento de novas fontes promissoras, como as microalgas, reforçam seu potencial para gerar bioenergia e produtos químicos de alto valor (CGEE, 2010).

Diante dessa abundância, a necessidade de soluções inovadoras para o manejo de resíduos lignocelulósicos impulsiona pesquisas há décadas. Diversos estudos se dedicam ao desenvolvimento de técnicas eficazes para transformar esses materiais em produtos de alto valor agregado, como biocombustíveis e biomateriais (Rabemanolontsoa; Saka, 2016; Kumari; Singh, 2018). Nessa jornada, a exploração do potencial biotecnológico de microrganismos é fundamental, abrindo caminho para um futuro mais sustentável, no qual esses resíduos deixam de ser um problema e se tornam a base para uma nova geração de produtos (Aguiar; Ferraz, 2011; Orlandelli et al., 2012).

A degradação de resíduos lignocelulósicos é eficientemente realizada por diversos fungos, com destaque para o gênero *Trichoderma*, reconhecido por sua capacidade de secretar coquetéis enzimáticos extracelulares complexos e de alta atividade (Druzhinina; Shelest; Kubicek, 2012.).

Nesse contexto, a fermentação surge como um processo biotecnológico chave, permitindo a valorização de resíduos agroindustriais de baixo custo, que servem como substratos ideais para a produção dessas enzimas. O uso dessas matérias-primas complexas é particularmente vantajoso, pois induz microrganismos a expressar justamente o conjunto de celulasas e hemicelulasas necessárias para uma hidrólise completa (Bajar; Singh; Bishnoi, 2020).

Embora tradicionalmente conhecido como agente de biocontrole, o *T. asperellum* é um candidato excelente para esta aplicação devido ao seu crescimento robusto e notável capacidade de secreção enzimática (Wang et al., 2015).

Apesar das vantagens, o alto custo de produção das enzimas ainda é um desafio para sua viabilidade em larga escala (Monteiro; Silva, 2009). Por isso, pesquisas que se dedicam ao desenvolvimento de técnicas para obtenção de enzimas mais eficientes e economicamente viáveis são de fundamental importância. Tais estudos visam viabilizar economicamente a conversão da biomassa, impulsionando a sustentabilidade e a geração de valor (Boondaeng et al., 2024).

A aplicação de complexos enzimáticos em microalgas é uma rota biotecnológica particularmente promissora, especialmente quando se considera que esta biomassa oferece vantagens únicas para um cultivo sustentável. Notadamente, o rápido ciclo de crescimento algal e a resiliência em condições ambientais adversas permitem o cultivo intensivo em terras não agricultáveis e o uso de águas salinas, o que evita a competição com a agricultura tradicional por terra e água doce. Desta forma, a versatilidade das microalgas as estabelece como uma plataforma de alto potencial para a produção futura e concomitante de diferentes biocombustíveis, incluindo biodiesel, hidrogênio, biogás e o próprio etanol (CGEE, 2010).

O conceito de biorrefinaria compreende as instalações e processos que transformam matérias-primas renováveis e seus resíduos em uma gama de produtos, como biocombustíveis, energia, alimentos e produtos químicos de alto valor agregado, assumindo uma posição estratégica na era pós-petróleo (CGEE, 2010).

Nesse contexto, as microalgas destacam-se como uma fonte de biomassa com alto potencial biotecnológico, capazes de produzir diferentes tipos de compostos economicamente importantes. A biomassa microalgal é rica em lipídeos e carboidratos, o que viabiliza a produção de biocombustíveis, e também é uma fonte promissora de compostos bioativos valiosos, como polímeros, vitaminas, peptídeos e carotenoides, com aplicações em diversas indústrias, incluindo a alimentícia, farmacêutica, cosméticos e de biofertilizantes (Rizwan et al., 2018).

Contudo, apesar do seu vasto potencial para a produção de biocombustíveis e outros compostos de valor, a sua utilização em larga escala enfrenta gargalos significativos. Os principais desafios residem nas etapas de pós-processamento, sendo que a extração dos compostos de dentro das células é dificultada pela robusta parede celular que possuem, exigindo métodos de hidrólise eficientes (Priya, 2021).

Desta forma, o objetivo deste estudo é o aproveitamento sustentável de resíduos agroindustriais da região oeste do Paraná, utilizando o fungo *Trichoderma asperellum* para a produção de enzimas capazes de realizar a sacarificação enzimática da parede celular de microalgas do gênero *Scenedesmus*, visando à subsequente produção de etanol de terceira geração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos englobam vários resíduos agrícolas (palhas, cascas, cavacos), madeiras duras (dicotiledôneas), madeiras moles (coníferas) e resíduos das indústrias de papel (Tamanini; Haully, 2004). Dentre os diversos materiais existentes, o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, de trigo e de milho são insumos promissores para a bioconversão em produtos de alto valor agregado (Petenuci et al., 2016).

O Brasil possui condições ímpares para se destacar na produção e uso da biomassa lignocelulósica, graças aos seus privilégios naturais e geográficos, como a vasta área agricultável com condições favoráveis de solo e clima, além da intensa radiação solar ao longo do ano (MME, 2007). Essa combinação de fatores coloca o país em posição de vanguarda para o desenvolvimento da bioeconomia, impulsionando a geração de empregos, renda e o crescimento sustentável. A TABELA 1 detalha a produção das principais culturas de grãos do país, ilustrando a magnitude do potencial de geração de biomassa.

TABELA 1 - ÁREA PLANTADA E PRODUÇÃO DE MILHO, SOJA E TRIGO NO BRASIL ENTRE 2021-2024

Safras	Total Área Plantada (ha)	Total Produção (milhões de toneladas)
Milho 2021/22	21.580,60	113.130,40
Milho 2022/23	22.269,20	131.892,60
Milho 2023/24	20.361,40	112.752,70
Soja 2021/22	41.492,00	125.549,80
Soja 2022/23	44.080,10	154.609,50
Soja 2023/24	45.177,90	146.858,50
Trigo 2022	3.086,20	10.554,40
Trigo 2023	3.473,40	8.096,80
Trigo 2024	3.264,70	9.587,90

FONTE: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), 2024.

A geração de resíduos lignocelulósicos em larga escala na agricultura, silvicultura e agroindústria exige soluções inovadoras para sua gestão e valorização. Segundo Oliveira (2022), diretor executivo da Brasil Biomassa Consultoria, a agricultura brasileira gera quase 880 milhões de toneladas de resíduos sem aproveitamento energético, representando um desafio ambiental e uma oportunidade para o desenvolvimento da bioeconomia.

As culturas de soja, milho e trigo são notáveis pela grande quantidade de resíduos que geram (TABELA 2), porém, o aproveitamento desses materiais enfrenta desafios logísticos significativos. Na produção de milho, por exemplo, a palhada (caule, folhas, sabugo e palha) é descartada diretamente na lavoura, resultando em uma grande dispersão que dificulta e encarece sua coleta, armazenamento e transporte. De forma similar, os resíduos da soja, como folhas e talos, também são deixados no campo (ABIB, 2023).

Esses materiais proporcionam um efeito benéfico para a saúde do solo (Beutler et al., 2021). No entanto, os custos adicionais com a sua coleta e transporte geralmente inviabilizam economicamente seu aproveitamento energético em usinas termelétricas. O mesmo desafio logístico se aplica à palha do trigo, que permanece no campo após a colheita, representando um obstáculo para sua valorização em larga escala (ABIB, 2023).

TABELA 2 - QUANTIDADE DE RESÍDUOS GERADOS POR CADA CULTURA

Resíduo	Quantidade (ton./ano)
Palha e Sabugo de Milho	257.370.000,00
Palha e Casca de Soja	290.625.000,00
Palha de Trigo	13.475.000,00

FONTE: Brasil Biomassa Bioenergia Bioeletricidade (ABIB), 2023.

A gestão de resíduos lignocelulósicos no Brasil está diante de um cenário que combina desafios e possibilidades. Por um lado, há a necessidade de lidar com a grande quantidade desses resíduos, buscando alternativas para seu aproveitamento. Por outro lado, vislumbra-se um futuro promissor onde esses mesmos resíduos podem ser a chave para impulsionar a bioeconomia, com potencial de serem transformados em uma variedade de aplicações de alto valor, gerando benefícios ambientais, econômicos e sociais significativos (Ballesteros, 2001). A TABELA 3 destaca os principais mercados atuais para esses materiais no país.

TABELA 3 - PRINCIPAIS USOS DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS NO BRASIL ENTRE 2021-2023

Uso	Estimativa de Mercado (toneladas/ano)	Referências
Combustão direta, cogeração, biogás, biocombustíveis de segunda geração.	12 milhões	(ABIB, 2023; CGEE, 2023)
Celulose, papel, madeira compensada, biomateriais.	10 milhões	(ABIP, 2023; IBAMA, 2023)
Compostagem, biochar.	5 milhões	(EMBRAPA, 2023; MMA, 2023)
Ração animal, biofiltros, materiais de construção.	3 milhões	(MAPA, 2023; ABC, 2023)

FONTE: O autor (2025).

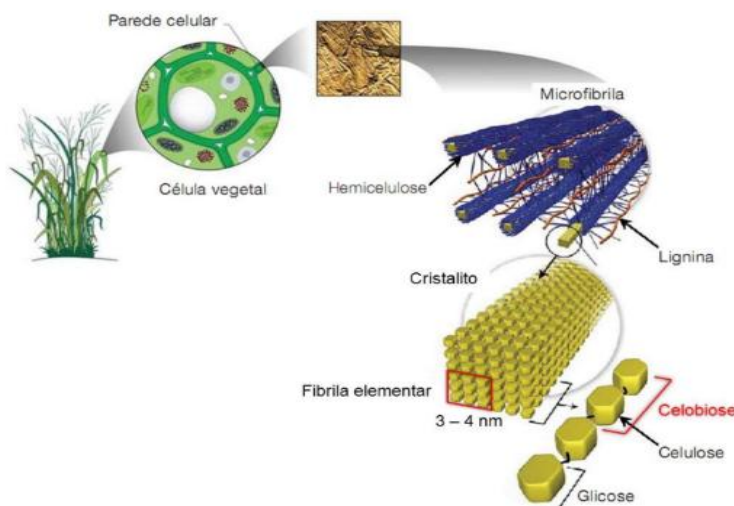
2.2 ESTRUTURA CELULAR DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A estrutura das células vegetais é caracterizada por uma parede celular rígida, constituída principalmente por polissacarídeos que correspondem a aproximadamente 70% da sua massa total. Essa parede confere características físico-químicas à planta, tais como plasticidade, elasticidade, resistência à tensão e à decomposição por microrganismos (Santos, 2012). A espessura da parede celular varia conforme a função de cada célula na estrutura da planta. Ela é formada por duas camadas: a parede primária, desenvolvida durante o crescimento celular, e a parede secundária, que se forma após a célula ter finalizado seu crescimento e a parede primária não aumentar mais sua superfície (Raven et al., 2001).

Toda biomassa lignocelulósica possui uma estrutura básica composta por três componentes principais: os polissacarídeos, como a celulose ($(C_6H_{10}O_5)_n$) e a hemicelulose ($(C_5H_8O_4)_n$), e um componente não polissacarídico, a lignina ($(C_9H_{10}O_2, C_{10}H_{12}O_3, C_{11}H_{14}O_4)_n$) (Demirbas, 2010).

Esses componentes são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam interligadas pela lignina, conforme ilustra a FIGURA 1. Nessa estrutura, as cadeias de celulose se mantêm compactadas através de ligações de hidrogênio, que promovem a rigidez da planta, ao passo que a lignina atua como um aglutinante e como uma barreira física ao ataque de microrganismos. A hemicelulose, por sua vez, proporciona a ligação entre a celulose e a lignina, formando a rede fibrosa (Rabelo, 2010)

FIGURA 1 - ESQUEMA DA ESTRUTURA CELULAR DAS PLANTAS



FONTE: Adaptada de US DOE et al. (2006).

Além dos três polímeros principais, há outros constituintes menores presentes, como compostos orgânicos, também denominados extrativos (ésteres, álcoois, esteroides, entre outros), e compostos inorgânicos (sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio). A quantidade desses constituintes depende do tipo de material (Bidlack et al., 1992).

A composição química da biomassa lignocelulósica é geralmente de 32-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina, além de uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (Santos et al., 2012). Entretanto, esta composição varia em função de fatores como o tipo de biomassa, a idade do vegetal e as condições de plantio. A TABELA 4 apresenta a composição química parcial dos principais resíduos lignocelulósicos.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA PARCIAL DOS RESÍDUOS DE MILHO E SOJA

Resíduo	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Pectina (%)	Referências
Palha de Milho	32,0 - 40,0	22,0 - 32,0	18,0 - 24,0	5,0 - 10,0	2,0 - 4,0	(SILVA et al., 2023; CARVALHO et al., 2022)
Casca de Soja	40,0 - 50,0	25,0 - 35,0	12,0 - 18,0	3,0 - 6,0	5,0 - 8,0	(GOMES et al., 2023; SILVA et al., 2022)
Palha de Trigo	35,0 - 45,0	20,0 - 30,0	15,0 - 20,0	5,0 - 8,0	2,0 - 4,0	(SANTOS et al., 2024; ROCHA et al., 2023)

FONTE: O Autor (2025).

Diante dessa estrutura complexa e recalcitrante, o aproveitamento biotecnológico dos polissacarídeos da biomassa depende de uma etapa inicial denominada, pré-tratamento. O objetivo fundamental deste processo é desestruturar a matriz lignocelulósica, reduzindo a cristalinidade da celulose e removendo parcialmente a hemicelulose e a lignina, para assim aumentar a acessibilidade dos carboidratos à hidrólise enzimática subsequente (Mood et al., 2023).

Os métodos de pré-tratamento são amplamente classificados em quatro categorias: físicos (como moagem), químicos (utilizando ácidos ou álcalis), físico-químicos (como a explosão a vapor e a hidrólise hidrotérmica) e biológicos (com o uso de microrganismos ou enzimas isoladas). A escolha da técnica mais adequada é um passo crítico e depende da natureza da biomassa e dos objetivos do processo de conversão (Foja, 2024).

2.2.1 Celulose

A celulose corresponde a aproximadamente 40% de toda a reserva de carbono disponível na biosfera, sendo a fonte mais abundante desse elemento (Rabelo, 2007). É o principal componente dos materiais lignocelulósicos, sendo uma molécula constituída por anéis de β -D-glicopirranose unidos por ligações do tipo β -D-(1,4) - glicosídicas. Sua fórmula geral ($C_6H_{10}O_5$), representa um homopolissacarídeo linear, cujo monômero é a glicose e a unidade repetitiva é a celobiose (Rabelo, 2010).

A celobiose é definida como a unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa somente a unidade fundamental das cadeias do polímero (Pitarelo, 2007). O tamanho da cadeia de celulose, medido por seu grau de polimerização (GP), pode variar de 1.000 a 15.000 unidades de glicose, dependendo da fonte e do processamento das fibras (Fengel; Wegener, 1991; Pitarelo, 2010).

As cadeias de glicose são unidas por forças de Van der Waals e por ligações de hidrogênio, que permitem um crescimento linear da macromolécula, conferindo-lhe elevada massa molecular, alto grau de cristalinidade, insolubilidade em água e estrutura rígida (Bidlack et al., 1992; Rabelo, 2007).

As moléculas de celulose ligam-se umas às outras por pontes de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, formando fibrilas que, por sua vez, são agregadas em microfibrilas (Senna, 2014). As regiões dentro das microfibrilas com elevada organização são denominadas cristalinas, enquanto as menos organizadas são chamadas de amorfas (Rabelo, 2010).

A região cristalina possui um empacotamento denso e ordenado das cadeias, o que a torna resistente à despolimerização e de difícil hidrólise. A região amorfa, por outro lado, possui menor orientação molecular e, dessa forma, é hidrolisada mais facilmente (Fengel; Wegener, 1989).

A hidrólise total da celulose gera apenas glicose, que pode ser convertida em uma série de substâncias químicas e bioquímicas. Por ter uma via metabólica comum à grande maioria dos seres vivos, a glicose pode, assim como a sacarose, ser convertida biologicamente em etanol ou utilizada na produção de outras substâncias, como ácidos orgânicos, glicerol e enzimas, por processos químicos ou bioquímicos (CGEE, 2010).

2.2.2 Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante nos materiais lignocelulósicos. É um polímero complexo, incorporado à parede celular durante o amadurecimento do vegetal, sendo composto por unidades de fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa (Rabelo, 2007). Este composto se deposita entre os polissacarídeos na parede celular, formando ligações covalentes com os monossacarídeos da hemicelulose (Carvalho, 2011).

Sua estrutura é bastante heterogênea e consiste em uma rede de anéis aromáticos unidos, principalmente por ligações do tipo alquil-aril-éter, formando um arranjo com alto grau de ligações cruzadas (Argyropoulos; Menachem, 1997). Esta macromolécula possui natureza polifenólica e é produto da polimerização de três álcoois monoméricos precursores: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A complexidade deste polímero na célula lhe confere alta eficiência na condução de água da base até o topo do vegetal, além de atuar como uma barreira física na defesa contra o ataque de patógenos (Senna, 2014)

2.2.3 Hemicelulose

As hemiceluloses desempenham um papel fundamental na constituição da parede celular das plantas, pois se ligam às microfibrilas de celulose, conferindo elasticidade à parede e impedindo o contato direto entre as fibrilas (Ramos, 2003).

Assim como a celulose, as hemiceluloses são polissacarídeos, entretanto, são classificadas como heteropolissacarídeos, pois são constituídas por diferentes unidades de açúcares, como pentoses, hexoses e ácidos hexourônicos (Santos, 2012).

Sua composição inclui açúcares como glicose, manose e galactose (hexoses), além de xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos em alguns tipos de vegetais (Rabelo, 2007). Frequentemente, a xilana é o principal polissacarídeo da hemicelulose, formada por unidades de D-xilose ligadas entre si por ligações β -(1,4)-xilopiranosídicas na cadeia principal (Senna, 2014). Estruturalmente, essas macromoléculas são ramificadas, apresentam cadeias curtas, são solúveis em soluções alcalinas e possuem natureza predominantemente amorfa, o que as torna mais suscetíveis a pré-tratamentos do que a celulose (Shleser, 1994).

2.3 MICRORGANISMOS E ENZIMAS PARA A DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA

2.3.1 Microrganismos degradadores de lignocelulose

Os materiais lignocelulósicos na natureza são degradados por diversos grupos de microrganismos, como bactérias, fungos e actinomicetos, os quais secretam uma grande diversidade de enzimas eficientes que auxiliam no processo de despolimerização da biomassa (Aguiar, 2010). Dentre eles, os fungos de decomposição branca (*white-rot-fungi*) e os de decomposição parda (*brown-rot-fungi*) são considerados os mais eficientes na degradação desses materiais (Fasanella, 2009).

Os fungos, em particular, formam um grupo bastante diversificado, podendo ser encontrados na natureza em solos, vegetais e até mesmo em animais (Andrade, 2015). Eles se apresentam em duas conformações: leveduriforme (unicelular) e/ou filamentosa (Souza, 2015). Os fungos degradadores são responsáveis por um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza. Graças à sua ação, o complexo polimérico dos lignocelulósicos pode ser despolimerizado, permitindo que outros microrganismos tenham acesso às estruturas dos vegetais que não estavam previamente acessíveis (Ferraz, 2004).

2.3.2 O gênero *Trichoderma* como biofábrica de enzimas

Através de técnicas de isolamento e seleção, é possível encontrar na natureza uma vasta quantidade de fungos que produzem enzimas de interesse biotecnológico (Scheffer, 2018). O fungo filamentoso *Trichoderma asperellum*, frequentemente isolado de solos, raízes e madeira em decomposição, é amplamente estudado como um fungo micoparasita e utilizado como agente de biocontrole eficaz contra diversos microrganismos patogênicos, como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* (Samuels; Lieckfeldt; Nirenberg, 1999; Ramot et al., 2004; Marcello et al., 2010; Marx et al., 2013).

Contudo, seu potencial vai além, sendo também considerado um fungo benéfico para o crescimento de plantas e, de grande importância para a biotecnologia, um notável produtor de enzimas lignocelulolíticas (Qian et al., 2019). De fato, para a maioria dos fungos que competem nesse ambiente, a quebra das paredes celulares das plantas é de grande importância para invadir os tecidos hospedeiros e obter nutrientes (Jonkers; Rep, 2009). Essa mesma capacidade de degradar a parede celular, essencial para sua competição com patógenos, é a teoria que fundamenta seu uso para a obtenção de recursos energéticos (Sarrocchio et al., 2009), uma vez que esta espécie secreta uma série de enzimas extracelulares capazes de degradar celulose e hemicelulose, sendo a produção delas induzida pela presença de celulose no meio (Marx et al., 2013; Wang et al., 2015; Karuppiyah et al., 2021).

2.3.3 O complexo enzimático lignocelulolítico

Os fungos filamentosos produzem um vasto repertório de enzimas para a degradação de materiais lignocelulósicos, incluindo lacases, peroxidases, hemicelulases e pectinases (Van Dyk; Pletschke, 2012). Dentre elas, o conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulásico (Aguiar, 2010). Essas enzimas atuam sinergicamente para a liberação dos açúcares, mas possuem diferentes modos de ação. As três principais são denominados endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (Prasad; Singh; Joshi, 2007).

O sucesso da sacarificação da celulose depende da ação sinérgica entre essas três classes. O rendimento da hidrólise quando elas atuam em conjunto é significativamente maior do que a soma de suas ações individuais. A sinergia ocorre, por exemplo, quando as endoglucanases criam pontos de acesso para as exoglucanases (sinergia endo-exo), e quando as β -glicosidases removem a celobiose do meio, que por sua vez inibe a ação das exoglucanases (sinergia exo- β G) (CGEE, 2010).

2.3.4 Produção de enzimas por fermentação submersa

A fermentação é um processo bioquímico no qual a matéria orgânica é parcialmente degradada para a produção de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato), a "moeda energética" das células (Nelson; Cox; Hoskins, 2022). Este processo, realizado por uma ampla variedade de organismos, é a base para a produção industrial de diversos produtos de interesse, como alimentos, biocombustíveis e as próprias enzimas (Neto, 2022).

Para garantir a qualidade e a eficiência desses bioprocessos, é fundamental controlar cuidadosamente diversos parâmetros, como concentração do substrato, umidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido (Moreira, 2018). Duas técnicas principais são utilizadas na indústria: a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm). A FSm, oferece maior controle sobre os parâmetros do processo e alta produtividade, embora geralmente apresente custos mais elevados. Em contraste, a FES tem menor custo e consumo de água, mas com maior dificuldade de controle (Farinas, 2015; Moreira, 2018).

2.4 MICROALGAS E A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

2.4.1 O potencial das microalgas para produção de etanol de terceira geração

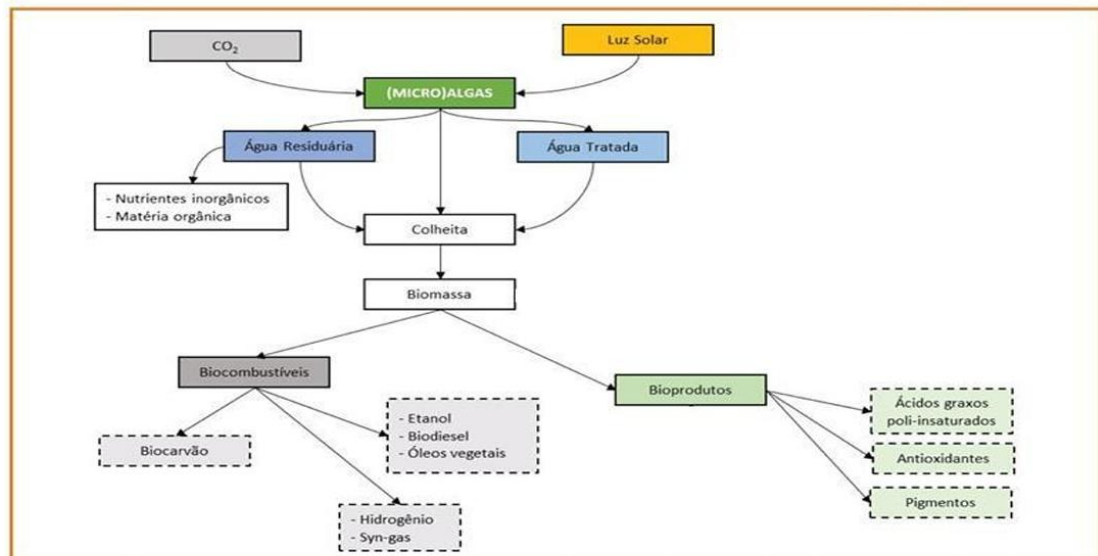
As microalgas constituem um grupo diversificado de microrganismos fotossintéticos, com estrutura eucariótica, que se destacam pela sua grande adaptabilidade e potencial biotecnológico (Lourenço, 2006; Derner et al., 2006).

No contexto das biorrefinarias, a biomassa de microalgas é extremamente promissora para a produção de diversos produtos, incluindo biocombustíveis. Elas apresentam vantagens significativas sobre as biomassas tradicionais, posicionando os produtos gerados a partir delas (como biocombustíveis) como de terceira geração.

Uma de suas principais características é a alta produtividade e a notável eficiência na fixação de CO₂, sendo capazes de utilizar o gás carbônico proveniente de fontes industriais (Chisti, 2004). Crucialmente, seu cultivo não compete diretamente com a agricultura por terras aráveis ou água potável, pois pode ser realizado em áreas marginais e utilizando águas residuais ou salinas. Esse processo, além de gerar biomassa, promove o tratamento de efluentes, valorizando um recurso que seria descartado (Demirbas, 2010; Rodolfi, 2009; Park et al., 2011). Em comparação com outras biomassas lignocelulósicas, as microalgas oferecem ainda outra vantagem estratégica: a ausência de lignina em sua parede celular, o que simplifica significativamente as etapas de hidrólise para acessar seus carboidratos e, conseqüentemente, diminui os custos associados a essa etapa no processo industrial (Alam; Wang, 2019; Chen et al., 2013; Ngamsirisomsakul et al., 2019).

A biomassa obtida é uma fonte rica de compostos que, quando processados em uma biorrefinaria, podem gerar uma gama de produtos, análogos aos derivados do petróleo em uma refinaria tradicional. Essa capacidade de gerar múltiplos produtos de alto valor, como combustíveis, produtos químicos de plataforma e outros materiais bio-baseados, é a base do conceito de biorrefinaria integrada, cujo fluxograma é apresentado na FIGURA 2. Neste modelo, para a produção de biocombustíveis como o etanol, o foco principal reside na fração de carboidratos, como a celulose, que pode ser hidrolisada para a obtenção de açúcares fermentáveis (Pancha et al., 2015).

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE BIORREFINARIA INTEGRADA
A PARTIR DA BIOMASSA DE MICROALGAS



FONTE: Adaptado de Oliveira e Bragotto, 2022; Loke Show, 2022

2.4.2 A parede celular e as rotas de conversão

Apesar do vasto potencial, a aplicação em larga escala das microalgas ainda enfrenta desafios significativos, principalmente no pós-processamento da biomassa. O principal gargalo tecnológico é a extração dos compostos intracelulares, como os carboidratos, que é dificultada pela natureza da estrutura da própria parede celular das microalgas, que, mesmo não contendo lignina, é frequentemente complexa e resistente, e cuja composição varia entre as cepas (Silva, 2022; Cristi, 2020)

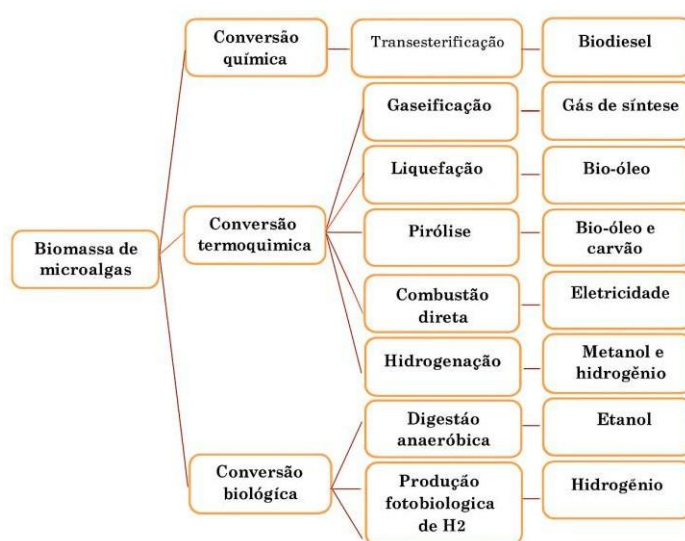
Para superar essa barreira recalcitrante e expor os polissacarídeos à ação catalítica, a aplicação de um pré-tratamento eficaz é uma etapa indispensável que visa o rompimento da parede celular. Estes métodos são amplamente classificados em físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos, utilizam energia térmica, ondas de choque ou força de cisalhamento para promover a lise e o rompimento mecânico da parede celular (Agarwalla et al 2023).

Já os métodos químicos empregam reagentes como ácidos ou álcalis para hidrolisar quimicamente os componentes estruturais da parede. Por fim, o pré-tratamento biológico utiliza a ação específica de enzimas para degradar polímeros específicos, como a celulose, enfraquecendo a estrutura da parede (Agarwalla et al., 2023).

Uma vez que a biomassa está pré-tratada e desestruturada, a etapa de sacarificação (a conversão dos polissacarídeos em açúcares simples) pode ser realizada com alta eficiência. Neste processo, a hidrólise enzimática se apresenta como a abordagem mais sustentável e específica, pois ocorre em condições brandas de temperatura (40 a 50°C) e não gera os compostos inibidores da fermentação, comuns nos métodos químicos (Juturu; Wu, 2014). A sacarificação da celulose presente na parede celular é mediada por um coquetel sinérgico de enzimas fúngicas, principalmente as celulolíticas (endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases), que atuam em conjunto para degradar as fibras em glicose (Silva, 2022; Demirbas, 2010; Prasad; Singh; Joshi, 2007; Facundes, 2014; Rosa, 2014).

A eficiência dessa sinergia enzimática é, portanto, um passo crucial para viabilizar economicamente a produção de etanol e outros produtos a partir de microalgas. As diferentes rotas tecnológicas para a conversão da biomassa em bioenergia são detalhadas no esquema da FIGURA 3.

FIGURA 3 - FORMAÇÃO DE PRODUTOS A PARTIR DA BIOMASSA DE ALGAS



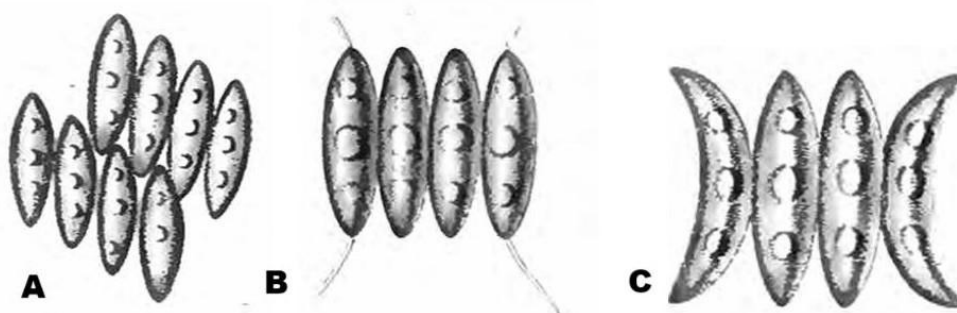
FONTE: Gris (2011), Adaptado

2.4.3 O gênero *Scenedesmus*

Dentre a vasta diversidade de microalgas, o gênero *Scenedesmus* (família *Scenedesmaceae*) é frequentemente destacado em estudos biotecnológicos. Tipicamente encontrado em águas doces e salgadas, seus fósseis indicam uma presença na Terra de 70 a 100 milhões de anos atrás (Hegewald, 1997). Estes organismos formam colônias de 4 a 16 células (FIGURA 4) e, assim como outras clorófitas, apresentam crescimento rápido e alta tolerância a diferentes condições de cultivo, justificando seu uso em diversas aplicações (Lürling, 1999; Rodrigues, 2008; Lourenço, 2006; et al.).

A relevância do gênero *Scenedesmus* para este estudo é acentuada por seus mecanismos de defesa, que incluem a formação de paredes celulares notavelmente espessas e resistentes (Lürling, 1999; Lürling e Donk, 2000). Essa característica robusta, embora vantajosa para a sobrevivência do organismo, o torna um modelo ideal para investigar os desafios da hidrólise e avaliar a eficácia dos pré-tratamentos enzimáticos discutidos na seção anterior.

FIGURA 4 – MORFOLOGIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *SCENEDESMUS*



FONTE: Comas Gonzáles (2020)

LEGENDA: **A)** *obliqua*; **B)** *quadricauda*; **C)** *dimorpha*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTURA

3.1.1 Obtenção e manutenção do fungo

A cepa do fungo filamentoso *Trichoderma asperellum*. foi obtida por doação do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA/UFPR). Após o recebimento, o fungo foi repicado em meio ágar PDA (Ágar Batata Dextrose) para manutenção e, em seguida, incubado em estufa a 28 °C por 7 dias.

3.1.2 Obtenção e manutenção da microalga

A microalga do gênero *Scenedesmus* sp. foi doada pelo Laboratório de Aquariologia e Produção de Alimento Vivo (UFPR). Com base na metodologia de Sipaúba-Tavares e Rocha (2001), a microalga foi cultivada em um meio contendo 70 g de NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio) e 30 g de ureia, dissolvidos em um volume final de 2 litros de água previamente decolorada com anticloro de aquário. A cultura permaneceu por 15 dias sob iluminação e aeração contínuas.

3.2 OBTENÇÃO E PREPARO DAS BIOMASSAS

3.2.1 Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos agroindustriais, incluindo palha de milho, palha de trigo e sabugo de milho, foram cedidos por uma cooperativa agroindustrial da região de Palotina, PR. Adicionalmente, foi utilizado um bloco de composto pós-cultivo (*Spent Mushroom Substrate* - SMS) do cogumelo *Pleurotus pulmonarius*, obtido por doação do trabalho de iniciação científica do discente Leo Vicente Ortega. A composição do SMS consistia em 80% de serragem (*Pinus elliottii*), 20% de farelo de trigo e 1% de carbonato de cálcio sobre o peso total. Após o recebimento, todas as amostras de resíduos foram moídas até atingirem partículas de 1 mm e, em seguida, secas em estufa a 30 °C por 24 horas.

As amostras secas e moídas foram encaminhadas ao Laboratório de Nutrição Animal (LANA/UFPR) para a caracterização da parede celular, onde foram determinados os teores de Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA) e Lignina, seguindo a metodologia sequencial descrita por Van Soest (1967) e Van Soest e Wine (1967).

3.3 PRODUÇÃO E ANÁLISE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

3.3.1 Fermentação submersa (FSm)

A produção de enzimas foi realizada por Fermentação Submersa (FSm). Para cada tipo de resíduo agroindustrial, o experimento foi conduzido em triplicata.

O cultivo foi realizado em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 80 mL de meio de cultura e 1,6 g (2% m/v) de resíduo agroindustrial. O meio, com pH inicial ajustado para $6,66 \pm 0,3$, era composto por 0,11% de K_2HPO_4 ; 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$; 0,06% de KCl; 0,1% de $NH_4H_2PO_4$; 0,0017% de $MgSO_4$; 0,0028% de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1% de extrato de levedura e 1% de sacarose.

Os frascos contendo o meio de cultura foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos e, após o resfriamento, foram inoculados com o fungo. As culturas foram incubadas em agitador orbital (*shaker*) a 180 rpm e 28 °C por 15 dias. Amostras de 1 mL foram coletadas de cada frasco a cada três dias para análises posteriores.

3.3.2 Extração das enzimas

Para a recuperação das enzimas, o caldo fermentado foi submetido a um processo de duas etapas. Primeiramente, realizou-se a separação da biomassa fúngica e dos sólidos maiores por meio de filtração em tecido de *nylon*. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min. O sobrenadante límpido, que constitui o extrato enzimático bruto, foi então cuidadosamente coletado para uso nos ensaios subsequentes.

3.3.3 Ensaio de atividade enzimática

A atividade celulolítica total foi determinada pela metodologia descrita por Ghose (1987), utilizando papel de filtro *Whatman* nº 1 como substrato. A mistura reacional, preparada em triplicata, foi composta por uma tira de papel de filtro (1,0 x 6,0 cm), 1,0 mL de tampão citrato 0,1 M (pH 4,8) e 0,5 mL do extrato enzimático bruto. Os tubos foram incubados em banho-maria a 50 °C por 60 minutos.

Após a incubação, a reação foi interrompida e a quantificação de açúcares redutores liberados foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), conforme Miller (1959) sendo a absorbância da mistura medida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de glicose foi determinada por interpolação em uma curva padrão (0,1 a 1,5 g/L), preparada simultaneamente aos ensaios.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades de Papel Filtro por mililitro (FPU/mL). Conforme a definição de Ghose (1987), uma unidade FPU corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 2,0 mg de glicose a partir do substrato em 60 minutos, sob as condições descritas no ensaio.

3.4 SACARIFICAÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA MICROALGAL E ENSAIOS DE GLICOSE

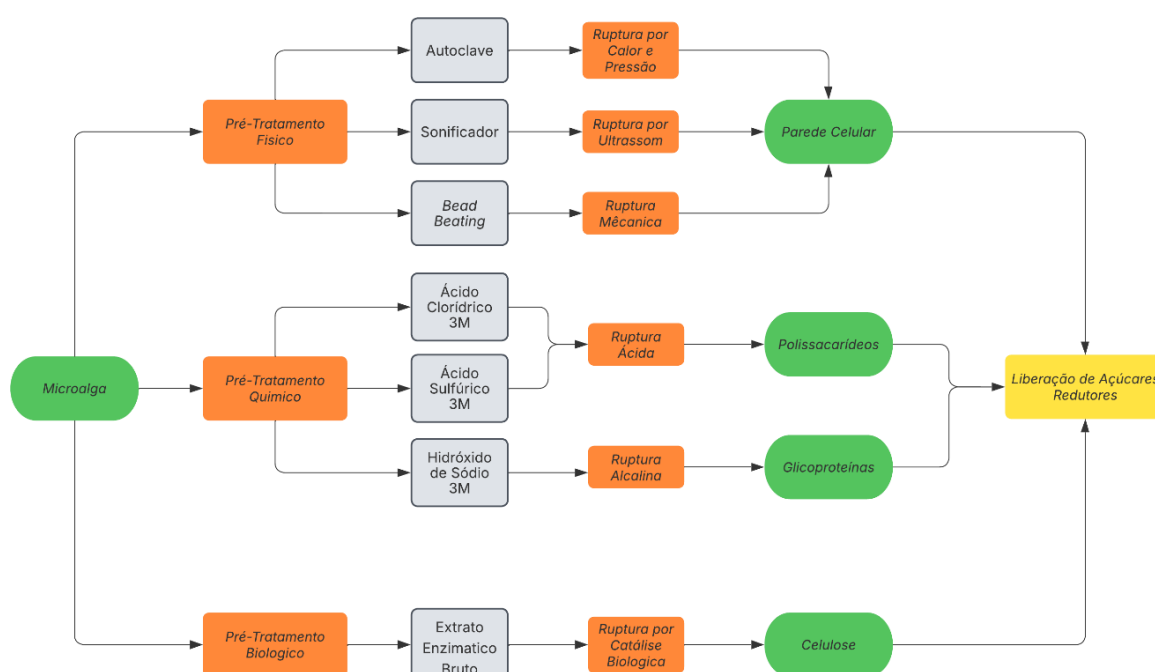
3.4.1 Pré-tratamentos da biomassa microalgal

Com o objetivo de avaliar diferentes métodos de rompimento da parede celular, a biomassa da microalga foi submetida a distintos pré-tratamentos, divididos em métodos termo-químicos, físicos e biológicos.

O pré-tratamento termo-químico consistiu na suspensão de 2,5 mL de biomassa úmida em 5 mL de soluções 3 M de Ácido Clorídrico (HCl), Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) e Hidróxido de Sódio (NaOH), seguida por autoclavagem a 121 °C por 30 minutos. Os pré-tratamentos físicos foram realizados com uma suspensão de 2,5 mL de biomassa em 5 mL de água, incluindo: tratamento térmico por autoclavagem (121 °C por 30 min); ruptura por ultrassom (sonicação) a 100 W em 5 ciclos de 30 segundos; e ruptura mecânica (*Bead Beating*) com 900 mg de esferas de vidro em 5 ciclos de 1 minuto, sendo que os dois últimos métodos tiveram intervalos de resfriamento em banho de gelo.

Por fim, o pré-tratamento biológico foi realizado com 2,5 mL de biomassa úmida, 5 mL de extrato enzimático bruto de *Trichoderma asperellum* e 3 mL de tampão citrato 0,1 M (pH 4,8), incubados em banho-maria a 50 °C por 15 dias. Após cada um dos tratamentos, amostras foram coletadas para a quantificação de açúcares redutores liberados. Um fluxograma esquemático, detalhado o delineamento experimental e as diferentes rotas de pré-tratamento aplicadas à biomassa, é apresentado na FIGURA 5.

FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS (FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS), SEUS RESPECTIVOS MECANISMOS DE RUPTURA E ALVOS NA PAREDE CELULAR DA MICROALGA *SCENEDESMUS SP*



FONTE: O autor (2025).

3.4.2 Sacarificação e ensaio de glicose

Os ensaios iniciais de triagem, para avaliar a atividade de cada extrato enzimático bruto sobre a biomassa de origem e a eficácia dos pré-tratamentos, foram realizados em tubos de ensaio. A mistura reacional consistiu em 9 mL da suspensão de biomassa microalgal, 1 mL de tampão citrato 0,1 M (pH 4,8) e 5 mL do extrato enzimático bruto. Os ensaios foram incubados a 50 °C sob agitação constante em banho-maria.

Para avaliar a significância estatística da eficácia dos pré-tratamentos, as concentrações finais de glicose obtidas por cada método foram comparadas com o tratamento controle (hidrólise enzimática da biomassa sem pré-tratamento). A análise foi conduzida por meio de Análise de Variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando o software Microsoft Excel.

A sacarificação otimizada, com o objetivo de maximizar a liberação de glicose, foi realizada em um biorreator de bancada (TEC-BIO-FLEX-III). Para este ensaio, a mistura reacional foi preparada em maior escala, utilizando 100 mL de biomassa úmida (previamente tratada pelo método de autoclavagem), 120 mL de tampão citrato 0,1 M (pH 4,8) e 200 mL do extrato enzimático bruto obtido a partir do SMS. O biorreator foi operado por 12 dias a 50 °C com agitação constante de 80 rpm.

Para todos os ensaios, amostras foram coletadas em intervalos de 3 em 3 dias para monitorar o progresso da hidrólise. A concentração de açúcares redutores liberados foi quantificada, em triplicata, pelo método do ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração foi determinada utilizando uma curva-padrão de glicose.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MANUTENÇÃO DO FUNGO

O cultivo do fungo filamentoso *Trichoderma asperellum* foi realizado em placas de Petri com meio PDA, incubadas a 28 °C por 7 dias. Após este período, as colônias desenvolveram uma morfologia visualmente característica. Macroscopicamente, exibiam textura algodonosa e felpuda, elevação acentuada e superfície rugosa (Jesus, 2020). As bordas mostraram-se irregulares e a coloração geral variava entre o branco e o verde, com maior densidade de conídios no centro da colônia (FIGURA 5A).

A análise microscópica revelou um sistema de conidióforos de aparência piramidal, com ramos regularmente ramificados e fiálides retas e ligeiramente alargadas, que se apresentavam de forma solitária ou em verticilos (FIGURA 5B). Os conídios, por sua vez, tinham formato globoso a subgloboso e apresentavam discreta ornamentação de superfície, consistentes com as características do gênero (PANDIAN et al., 2016) (FIGURA 5C).

FIGURA 5 - ASPECTO MORFOLÓGICAS DA COLÔNIA DE *Trichoderma asperellum*



FONTE: O autor (2025).

LEGENDA: **A)** Aspecto macroscópico da colônia em meio PDA após 7 dias de cultivo; **B)** Detalhe microscópico mostrando o sistema de conidióforos e as fiálides; **C)** Conídios de formato globoso a subgloboso.

4.2 MANUTENÇÃO DA MICROALGA

O cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. foi realizado em um meio de cultura alternativo de baixo custo, formulado com água de torneira previamente decolorada e enriquecido com um substrato comercial à base de Nitrogênio, Fósforo e Potássio (NPK). O sistema foi mantido em temperatura ambiente, sob iluminação constante (fotoperíodo 24h/0h) e com aeração contínua fornecida por uma bomba de aquário. A avaliação periódica da cultura foi realizada por meio de microscopia óptica para verificar a morfologia celular.

A análise microscópica, apresentada na FIGURA 6, confirma o crescimento saudável da cultura mesmo no meio alternativo proposto. É possível observar a predominância de colônias (cenóbios) dispersas, uma característica típica do gênero *Scenedesmus*. Pertencente ao grupo das algas verdes (*Chlorophyta*), esta microalga se organiza em agrupamentos formados por células de morfologia predominantemente fusiformes (em forma de fuso) e elipsoidais, que se mantêm unidas lateralmente (Bazan, 2024).

FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DO CULTIVO DA MICROALGA *SCENEDESMUS SP*



FONTE: O autor (2025).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A viabilidade de resíduos agroindustriais como matéria-prima em processos de biorrefinaria está diretamente ligada à sua composição química, que determina o rendimento teórico e a eficiência da conversão em produtos de maior valor agregado, como os açúcares fermentescíveis. A TABELA 5 detalha a caracterização química dos quatro substratos investigados neste estudo: SMS, palha de milho, sabugo de milho e palha de trigo. A análise revela perfis distintos e levanta pontos cruciais para a discussão sobre o potencial de sacarificação.

Os resíduos lignocelulósicos provenientes das culturas de milho e trigo apresentaram elevados teores de lignina, na faixa de 38,5% a 39,5%. Este resultado, por si só, já indica uma alta recalcitrância do material, uma vez que a lignina atua como uma barreira física e química, limitando o acesso de enzimas, como a celulase, aos polissacarídeos estruturais (Himmel et al., 2007). Contudo, o ponto mais notável na caracterização destes três resíduos foi o teor de celulose excepcionalmente baixo, medido entre 6,9% e 7,1%. Estes valores divergem significativamente dos dados tipicamente reportados na literatura para biomassas similares. Por exemplo, trabalhos de referência como o de Kim e Dale (2004) descrevem a composição da palha de milho com teores de celulose na faixa de 35-40% e lignina entre 15-20%. De forma análoga, a palha de trigo é frequentemente caracterizada com 33-38% de celulose e 17-22% de lignina (Saha et al., 2005). A composição da biomassa pode variar significativamente em função de fatores como clima, tipo de solo e cultivares utilizados. Essa variação pode levar a diferentes proporções de seus componentes, como celulose e lignina. Independentemente da causa específica dessa composição observada, a baixa disponibilidade de celulose se torna o principal fator limitante para a etapa de produção de celulases neste estudo.

Em contraste, o SMS, tecnicamente conhecido como bloco de composto pós cultivo (SMS), apresentou um perfil químico distinto, com o maior teor de celulose entre os materiais testados (11,5%) e o menor teor de lignina (36,7%). Essa composição é consistente com a literatura, que descreve o SMS como um material lignocelulósico que já sofreu uma degradação biológica seletiva.

Durante o cultivo do cogumelo, o fungo consome preferencialmente a celulose e a hemicelulose como fonte de energia, o que resulta na redução desses componentes e na concentração relativa da lignina, que é mais resistente à degradação fúngica (Phan e Sabaratnam, 2012).

Diante deste quadro composicional, as implicações para a etapa de sacarificação enzimática com celulase são diretas e claras. O rendimento da conversão de biomassa em açúcares simples é primariamente dependente de dois fatores: a acessibilidade ao polissacarídeo (impactada pela lignina) e, fundamentalmente, a quantidade de substrato disponível (o teor de celulose).

Para a palha de milho, sabugo e palha de trigo, mesmo que um pré-tratamento ideal removesse toda a lignina, o baixo teor de celulose ($\approx 7\%$) limitaria o rendimento teórico de glicose a um patamar muito baixo, tornando o processo economicamente inviável com o uso exclusivo de celulases. Por outro lado, o SMS, ao apresentar quase o dobro de celulose, desponta como o substrato mais promissor entre os quatro analisados para a produção de açúcares fermentescíveis via hidrólise celulolítica.

TABELA 5 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Componente	Bloco de composto pós-cultivo Cogumelo	Palha de Milho	Sabugo de Milho	Palha de Trigo
Umidade (%)	10,4	7,9	7,9	7,9
Proteína Bruta (PB) (%)	2,2	3,1	3,1	5,2
Hemicelulose (HEM) (%)	7,9	31,8	33,9	22,6
Lignina (LIG) (%)	36,7	39,5	38,5	39,3
Celulose (CEL) (%)	11,5	7,1	6,9	7,1
Extrato Etéreo (EE) (%)	0,4	0,2	0,4	0,5

FONTE: O autor (2025).

4.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A capacidade de diferentes resíduos agroindustriais em induzir a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo filamentoso *T. asperellum* foi avaliada ao longo de 15 dias em fermentação submersa. O GRÁFICO 1 apresenta a atividade da celulase (U/mL) obtida para cada substrato, revelando diferenças marcantes no potencial indutor de cada biomassa. Os resultados demonstram uma hierarquia clara de eficiência, na qual o SMS se destacou como o substrato mais eficaz, atingindo um pico de atividade de 0,37 U/mL no 15º dia. A palha de trigo apresentou um desempenho intermediário, com uma produção enzimática crescente que alcançou 0,30 U/mL. Por outro lado, a palha de milho e o sabugo de milho mostraram-se substratos pouco eficientes, resultando em atividades máximas de apenas 0,15 U/mL e 0,040 U/mL, respectivamente.

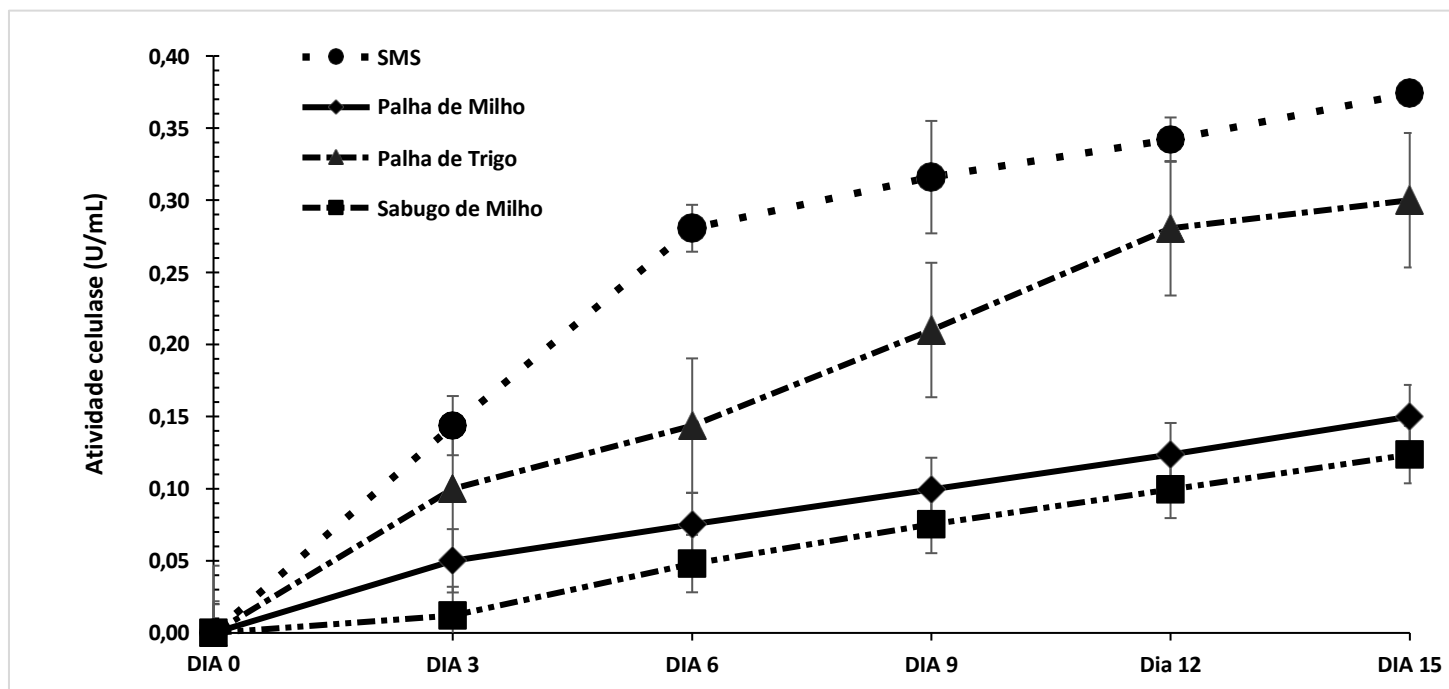
A discussão destes resultados encontra uma base sólida ao correlacioná-los diretamente com a caracterização química dos resíduos, apresentada na TABELA 5. A produção de celulases por fungos do gênero *Trichoderma* é um processo classicamente descrito como indutível, no qual a presença de celulose no meio é o principal fator que dispara a expressão dos genes responsáveis pela síntese dessas enzimas (Mandels e Reese, 1964; Gusakov, 2011). Neste contexto, o desempenho superior do SMS — tecnicamente um bloco de composto pós-cultivo (do inglês, *Spent Mushroom Substrate* - SMS) — é diretamente explicado por possuir o maior teor de celulose (11,5%) entre os substratos testados. Essa maior disponibilidade do composto indutor permitiu ao *T. asperellum* uma resposta metabólica mais robusta, resultando na maior secreção de enzimas, como explicado acima.

De forma inversa e igualmente clara, a baixa performance da palha e do sabugo de milho está em total consonância com suas características químicas. Seus baixíssimos teores de celulose ($\approx 7\%$) e elevados teores de lignina ($\approx 39\%$) criaram um cenário duplamente desfavorável. Primeiramente, a escassez do substrato indutor (celulose) limitou a sinalização para a produção enzimática. Em segundo lugar, a alta lignificação do material, um fator conhecido por causar forte recalcitrância, provavelmente impediu o acesso do fungo à pouca celulose que estava presente, resultando em uma fraca resposta indutiva (Himmel et al., 2007).

O desempenho intermediário da palha de trigo, que induziu uma produção enzimática significativamente maior que a da palha de milho, apesar de ambas possuírem teores de celulose muito similares ($\approx 7\%$), sugere a influência de outros fatores. A literatura aponta que, além da composição, a estrutura física da biomassa e a razão entre seus nutrientes, como a relação Carbono/Nitrogênio (C/N), desempenham um papel crucial no metabolismo fúngico. É possível que a palha de trigo possua uma estrutura mais porosa ou uma razão C/N mais adequada para o *T. asperellum* em comparação com a palha de milho, otimizando a assimilação de nutrientes e, conseqüentemente, a produção de enzimas (Ferreira et al., 2019). Adicionalmente, o sucesso do composto pós-cultivo (SMS) como substrato pode ser atribuído ao fato de ser um material já parcialmente degradado pelo cultivo fúngico anterior, o que pode ter tornado a celulose remanescente mais exposta e bioacessível, uma característica positiva para a produção de enzimas, como observado por Singh et al. (2019).

Em suma, os resultados confirmam que a produção de celulase por *Trichoderma asperellum* é fortemente dependente da composição e da estrutura do substrato agroindustrial. Ficou evidente que o teor de celulose bioacessível, e não apenas a quantidade total de carboidratos, é o fator determinante para a indução enzimática. O composto pós-cultivo de cogumelo (SMS) provou ser um substrato superior, enquanto a alta recalcitrância e a baixa concentração de celulose tornaram os resíduos de milho e trigo menos adequados para este fim específico sem um pré-tratamento.

GRÁFICO 1 – ATIVIDADE CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *Trichoderma asperellum*.
UTILIZANDO DIFERENTES RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

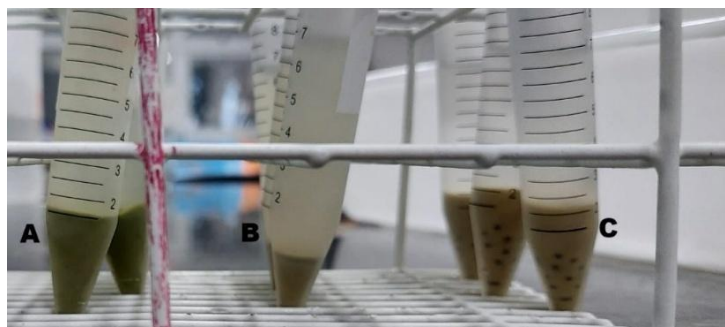


FONTE: O Autor (2025).

4.5 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE GLICOSE APÓS PRÉ-TRATAMENTOS

A etapa de pré-tratamento é um gargalo crítico na produção de biocombustíveis a partir de microalgas, pois visa romper a resistente parede celular para liberar os carboidratos intracelulares. Neste estudo, foram avaliados seis métodos de pré-tratamento — três químicos (HCl, NaOH, H₂SO₄) e três físicos (mecânico/maceração, autoclave e sonificador) — para maximizar a liberação de glicose da biomassa de *Scenedesmus* sp. A eficácia de cada método, avaliada pela concentração de glicose liberada (GRÁFICO 2) e pela análise visual do material (FIGURA 7), foi o critério utilizado para selecionar a melhor abordagem para a etapa de sacarificação subsequente.

FIGURA 7 - ASPECTO VISUAL DA BIOMASSA MICROALGAL EM TUBOS FALCON APÓS A APLICAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO FÍSICOS



FONTE: O Autor (2025).

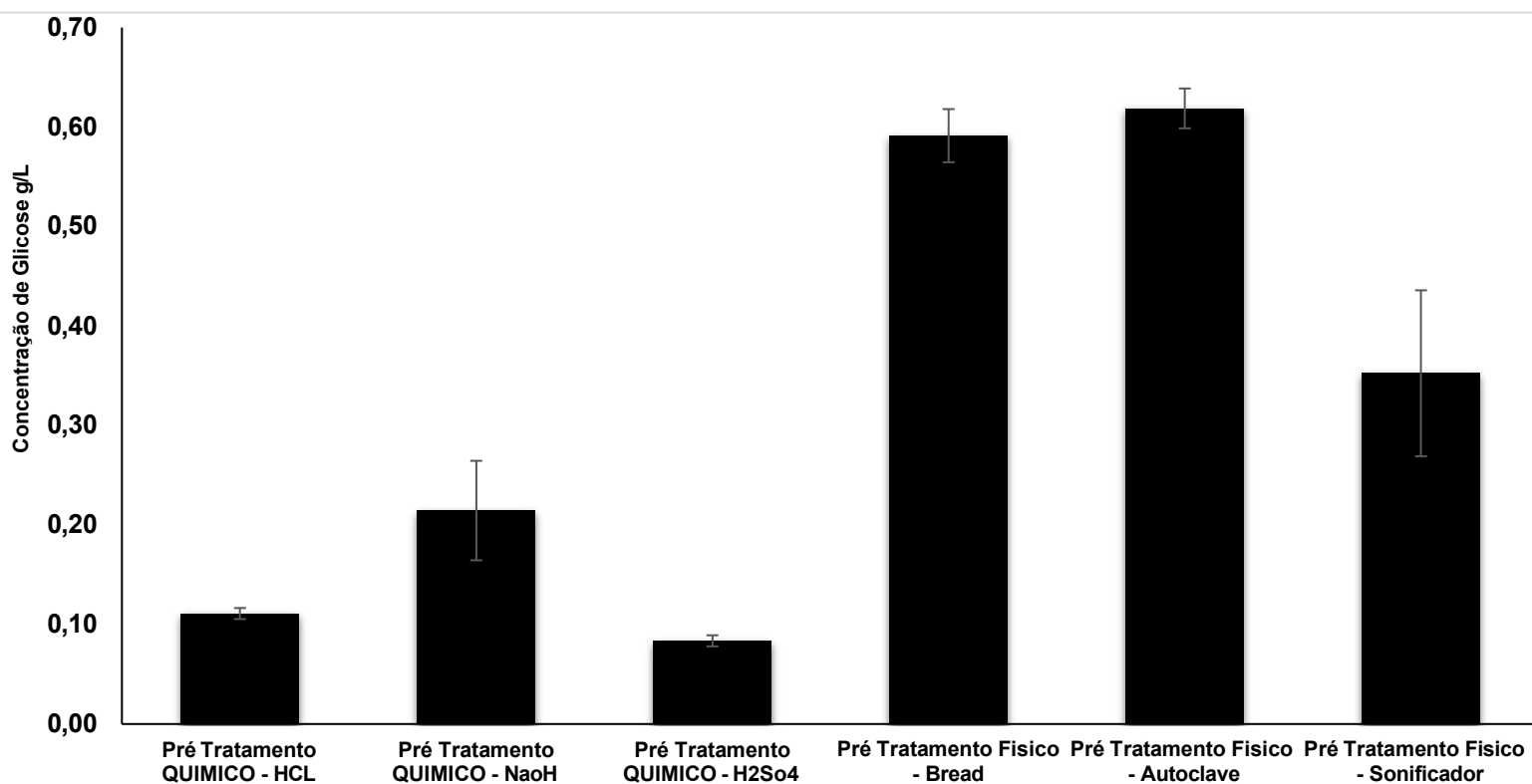
LEGENDA: **A)** Biomassa após Autoclavagem; **B)** Biomassa após Sonificador; **C)** Biomassa após *Bread*

Diferentemente da biomassa lignocelulósica, a principal barreira em microalgas como a *Scenedesmus* não é a lignina, mas sim uma complexa parede celular composta por polissacarídeos como celulose, hemicelulose e glicoproteínas (Scholz et al., 2014). O objetivo do pré-tratamento, portanto, é a lise celular. Os resultados demonstram que os métodos físicos que empregam energia térmica e mecânica foram os mais eficientes. O pré-tratamento em autoclave se destacou como o método superior, gerando a maior concentração de glicose ($\approx 0,62$ g/L). Este sucesso é atribuído à ação hidrotérmica, onde a combinação de alta temperatura e pressão do vapor hidrolisa os polissacarídeos da parede e causa o rompimento celular por choque térmico e osmótico, garantindo uma liberação extensiva do conteúdo citoplasmático (Carr et al., 2017). O método mecânico ("*Bread*") também se mostrou promissor ($\approx 0,59$ g/L), indicando que a disrupção por força de cisalhamento é uma estratégia eficaz para o rompimento desta biomassa.

O desempenho dos métodos químicos e do sonificador requer uma análise mais detalhada. O pré-tratamento alcalino (NaOH) apresentou uma eficácia moderada ($\approx 0,22$ g/L), superior aos ácidos. Sua ação em microalgas está associada à saponificação de lipídios da membrana celular e à hidrólise de proteínas e polissacarídeos da parede, enfraquecendo a estrutura e induzindo a lise (Chen et al., 2013). Em contrapartida, os tratamentos ácidos (HCl e H₂SO₄) foram os menos eficazes. Na ausência de lignina, a ação do ácido em alta temperatura pode ter levado diretamente à degradação da glicose liberada, convertendo-a em compostos inibidores como o hidroximetilfurfural (HMF), o que explica a baixa concentração final de açúcar detectada.

O desempenho intermediário do sonificador ($\approx 0,35$ g/L), embora seja um método conhecido para lise celular por cavitação, pode ser explicado pela observação visual da biomassa pós-tratamento. Conforme visto na Figura 6, o tratamento por sonicação parece ter resultado em uma perda de material ou em uma degradação tão intensa que alterou a consistência da amostra. É provável que a energia aplicada tenha sido excessiva, não apenas promovendo a ruptura das células, mas também tornando a amostra difícil de homogeneizar. Essa agitação intensa pode ter dificultado a coleta de uma alíquota representativa para a análise, o que, por sua vez, pode ter subestimado o resultado final. Esta observação destaca que a otimização da intensidade e do tempo é crucial para o sucesso do pré-tratamento por ultrassom (Adam et al., 2016).

GRÁFICO 2 - CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (g/L) LIBERADA DA BIOMASSA DE *SCENEDESMUS SP.* APÓS A APLICAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E FÍSICO



FONTE: O Autor (2025).

A análise de variância (ANOVA) confirmou que houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos pré-tratamentos avaliados ($p < 0,05$). O teste de Tukey revelou que o tratamento em autoclave foi significativamente superior a todos os outros grupos, incluindo o controle sem tratamento ($p < 0,001$) e os demais métodos físicos ($p < 0,05$), consolidando-o como a abordagem mais eficaz. Tanto a ruptura mecânica (Beads) quanto a sonicação também foram significativamente mais eficientes que o controle ($p < 0,01$). Contudo, não foi observada diferença estatística significativa entre os métodos de sonicação e ruptura mecânica ($p > 0,05$), indicando que ambos possuem um potencial de lise celular similar sob as condições testadas (Anexo 1).

Em conclusão, para a biomassa de *Scenedesmus* sp., a autoclavagem provou ser o método de pré-tratamento mais robusto e eficiente para maximizar a liberação de glicose, superando métodos mecânicos e químicos. Por essa razão, este método foi o escolhido para preparar a biomassa para os ensaios de sacarificação em biorreator, detalhados na seção 4.6.

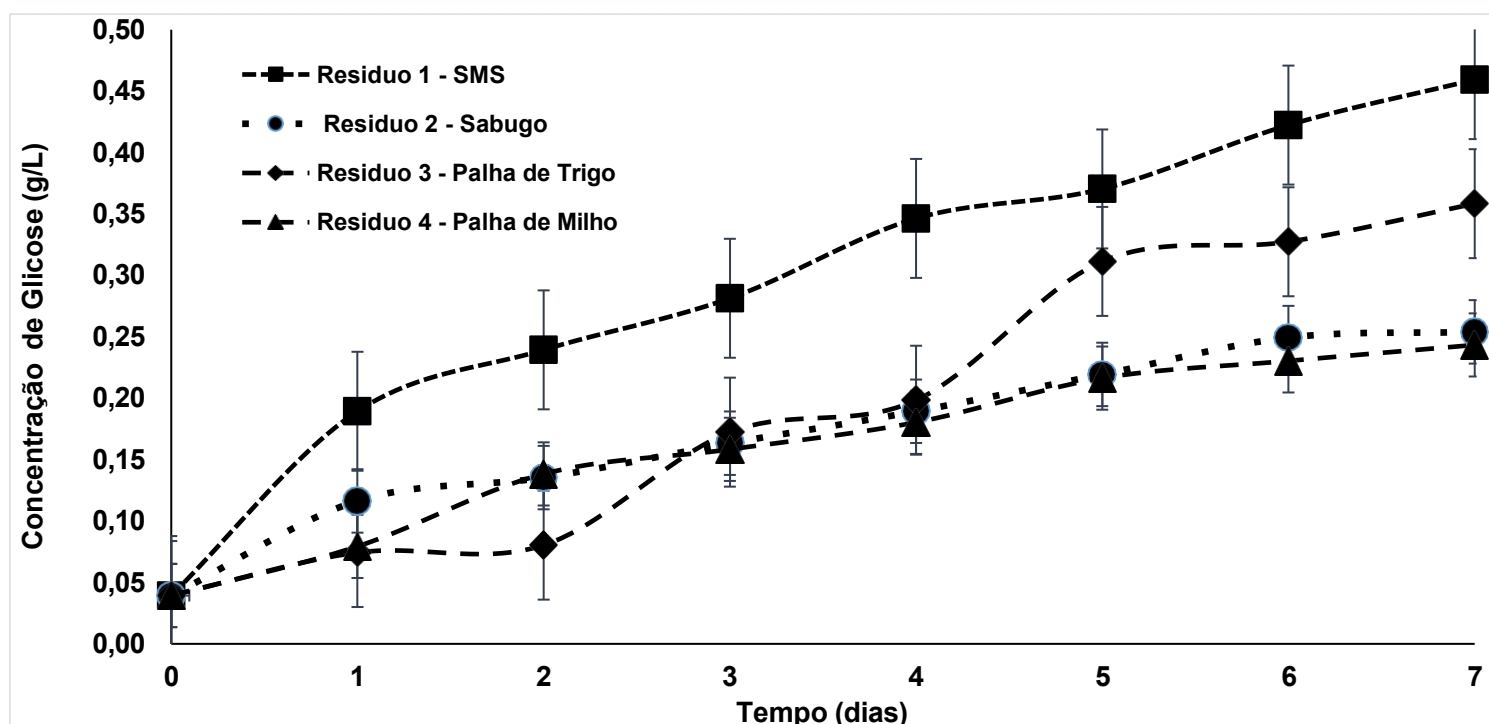
4.6 SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A etapa de sacarificação representa o ponto de convergência deste estudo, onde a biomassa microalgal e as enzimas produzidas são utilizadas para gerar açúcares fermentescíveis, o precursor fundamental para a produção de etanol. Os experimentos foram conduzidos em três fases: (1) uma hidrólise da biomassa *in natura* para avaliar a atividade basal de cada extrato enzimático; (2) uma hidrólise da biomassa pré-tratada para quantificar o impacto dos melhores métodos de rompimento celular; e (3) uma hidrólise otimizada em biorreator, combinando as melhores condições identificadas.

O primeiro ensaio (GRÁFICO 3) avaliou a capacidade de cada extrato enzimático em hidrolisar sua própria biomassa de origem, sem qualquer pré-tratamento. Os resultados demonstram que o extrato enzimático produzido com SMS foi o mais eficaz, liberando 0,46 g/L de glicose em 7 dias. Este desempenho superior está em consonância com os resultados da seção anterior (4.4), que identificaram este mesmo extrato como o de maior atividade celulolítica.

Isso sugere que a biomassa do composto pós-cultivo de cogumelo (SMS) não só foi o melhor indutor para a produção de enzimas pelo *Trichoderma asperellum*, como também se apresentou como o substrato mais facilmente degradável, provavelmente devido à sua maior concentração de celulose (11,5%) e menor recalcitrância estrutural, conforme discutido na caracterização (TABELA 5).

GRÁFICO 3 - CINÉTICA DA SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA *IN NATURA* (SEM PRÉ-TRATAMENTO) UTILIZANDO OS DIFERENTES EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS PRODUZIDOS

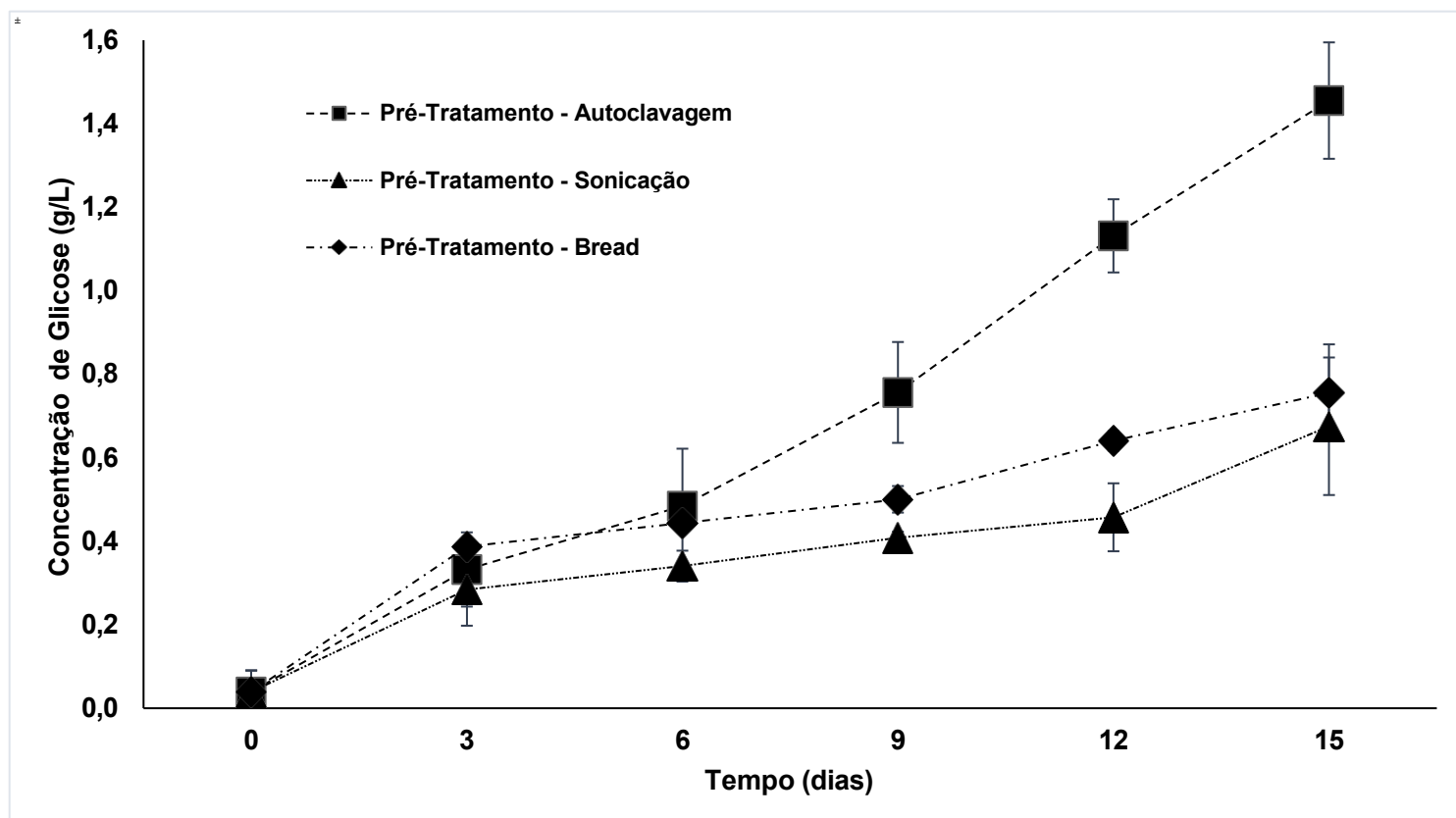


FONTE: O Autor (2025).

Com base nestes achados, o extrato enzimático do cogumelo foi selecionado para a segunda fase do estudo, onde seu potencial foi testado sobre a biomassa microalgal após os três melhores pré-tratamentos físicos. Os resultados (GRÁFICO 4) evidenciam de forma inequívoca a importância crítica da etapa de pré-tratamento. A autoclavagem, o método mais eficaz na liberação inicial de glicose (Seção 4.5), também resultou no maior rendimento de sacarificação, alcançando uma concentração de glicose de 1,45 g/L em 15 dias. Este valor é mais de três vezes superior ao obtido sem pré-tratamento (0,46 g/L), confirmando que a desestruturação da parede celular por via hidrotérmica é fundamental para expor os polissacarídeos internos à ação das celulases (Carr et al., 2017).

Os pré-tratamentos mecânico (*Bread*) e por sonicação também aumentaram significativamente o rendimento em comparação ao controle, atingindo 0,75 g/L e 0,67 g/L, respectivamente, mas a superioridade da autoclavagem validou sua escolha para a etapa final.

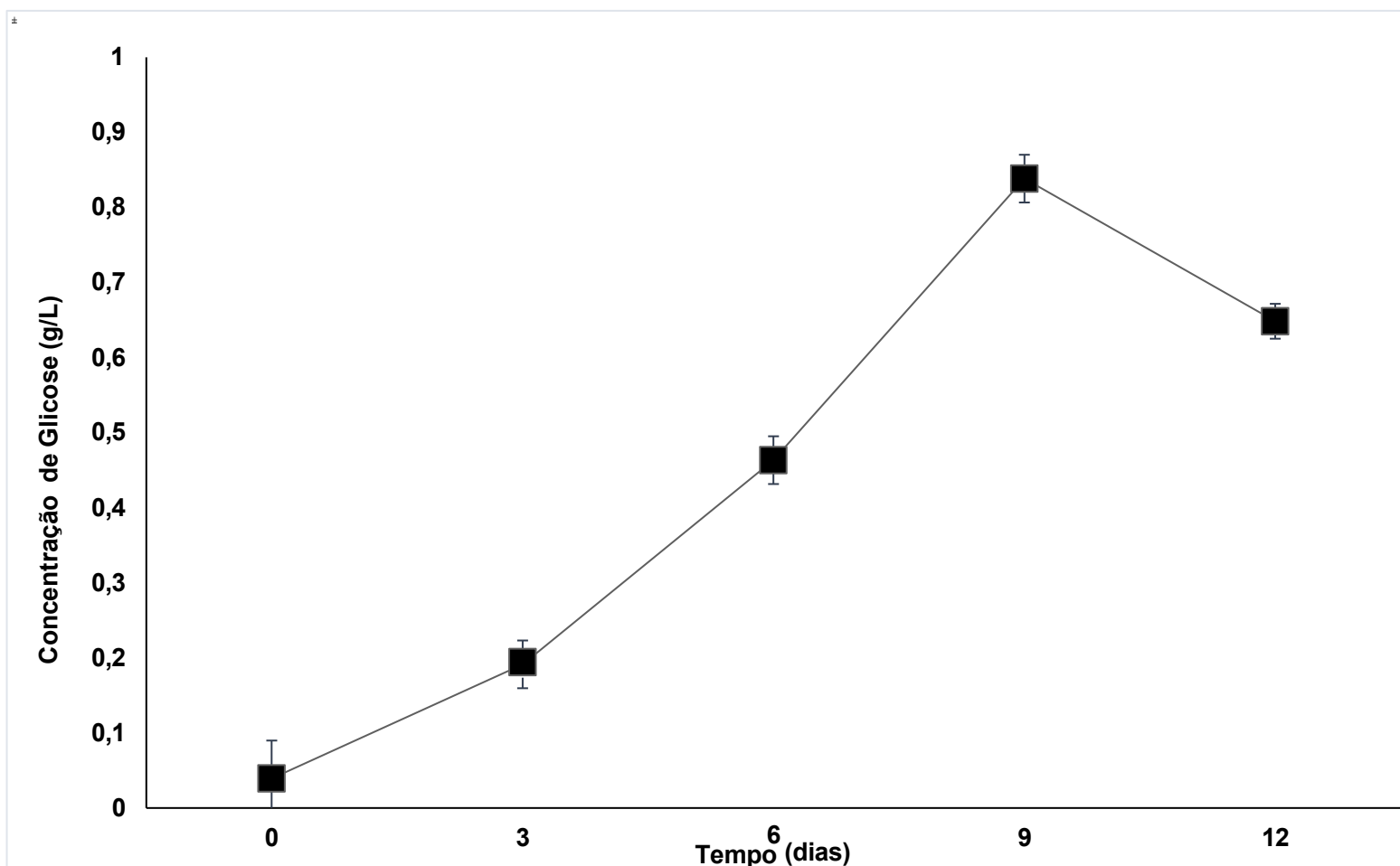
GRÁFICO 4 -EFEITO DE DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICOS NA SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL, UTILIZANDO O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE MAIOR ATIVIDADE



FONTE: O Autor (2025).

A fase final do estudo consistiu em uma sacarificação otimizada em biorreator, utilizando a combinação mais promissora: biomassa pré-tratada em autoclave e o extrato enzimático de cogumelo, com o dobro da carga de biomassa para potencializar a concentração de açúcares. Conforme o GRÁFICO 5, o processo ocorreu com sucesso nos primeiros 9 dias, atingindo um pico de concentração de glicose de 0,84 g/L. Contudo, uma queda abrupta para 0,65 g/L foi observada no 12º dia. Esta inversão na tendência ocorreu por uma contaminação microbiana no biorreator. Provavelmente, um fungo contaminante de crescimento rápido se desenvolveu no meio, consumindo a glicose que estava sendo liberada como sua fonte de carbono, o que levou à interrupção do experimento.

GRÁFICO 5 -PERFIL TEMPORAL DA SACARIFICAÇÃO OTIMIZADA DA BIOMASSA MICROALGAL EM BIORREATOR, UTILIZANDO O MELHOR PRÉ-TRATAMENTO E O MELHOR EXTRATO ENZIMÁTICO



FONTE: O Autor (2025).

Diante da contaminação e da consequente depleção de açúcares, as etapas subsequentes planejadas, como a fermentação alcoólica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, não foram realizadas. O baixo pico de concentração de glicose obtido (0,84 g/L), mesmo antes da queda, já se apresentava como um desafio para a fermentação eficiente. A literatura indica que, para uma produção de etanol economicamente viável e com alto rendimento, são necessárias concentrações iniciais de glicose substancialmente maiores, geralmente acima de 20 g/L, para superar o estresse osmótico da levedura e garantir uma produtividade satisfatória (Lin et al., 2012).

Com concentrações abaixo deste patamar, o rendimento de etanol seria insignificante. Apesar do contratempo na etapa final, os resultados globais do estudo são positivos e demonstram uma prova de conceito clara: a biomassa da microalga *Scenedesmus* sp., quando submetida a um pré-tratamento adequado (autoclavagem) e hidrolisada por um extrato enzimático bruto eficaz (produzido em SMS), pode sim ser convertida em açúcares fermentescíveis. A otimização futura da carga de biomassa e o controle rigoroso da assepsia no biorreator são os próximos passos para alcançar concentrações de glicose compatíveis com a produção de bioetanol em escala.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho se propôs a investigar uma rota biotecnológica integrada, avaliando o potencial de diferentes resíduos agroindustriais para a produção de enzimas celulolíticas e, subsequentemente, aplicando o extrato enzimático mais eficaz na sacarificação da biomassa da microalga *Scenedesmus* sp., visando a geração de açúcares fermentescíveis para a futura produção de bioetanol. Os resultados obtidos permitiram alcançar conclusões claras sobre a viabilidade e os desafios de cada etapa do processo, validando a prova de conceito da rota proposta, ainda que com gargalos tecnológicos evidentes

O estudo demonstrou de forma inequívoca que a composição do substrato é o fator determinante para a produção de celulasas pelo fungo *Trichoderma asperellum*. O composto pós-cultivo de cogumelo (SMS) se destacou como um substrato superior, induzindo a maior atividade enzimática. Esta observação correlacionou-se diretamente com sua caracterização química, que revelou o maior teor de celulose (11,5%) entre os resíduos, confirmando que a disponibilidade do indutor é mais crítica que a quantidade total de carboidratos. Em contrapartida, os resíduos de milho e trigo, apesar da abundância, mostraram-se substratos pobres para este fim específico, devido à sua composição desfavorável, marcada pelo baixo teor de celulose ($\approx 7\%$) e alta lignificação ($\approx 39\%$)

A importância da desestruturação da biomassa microalgal foi comprovada na etapa de pré-tratamento, onde a autoclavagem foi identificada como o método mais eficaz. A aplicação deste tratamento hidrotérmico elevou a liberação de glicose em mais de 300% durante a sacarificação (de 0,46 g/L para 1,45 g/L), um resultado expressivo que confirma a parede celular da *Scenedesmus* sp. como uma barreira significativa e valida a autoclavagem como uma estratégia essencial para expor os carboidratos intracelulares à ação enzimática.

Apesar do sucesso na otimização das etapas individuais, a fase final de sacarificação em biorreator, mesmo combinando as melhores condições, foi comprometida. O pico de glicose de 0,84 g/L, seguido por uma queda abrupta, evidenciou uma contaminação microbiana que inviabilizou a continuidade do processo e a subsequente etapa de fermentação alcoólica.

Conclui-se, portanto, que a rota tecnológica proposta é cientificamente coerente e promissora. Foi possível produzir um extrato enzimático bruto eficaz a partir de um resíduo (SMS) e utilizá-lo para hidrolisar com sucesso a biomassa de uma microalga pré-tratada. Os principais desafios para a viabilidade futura residem no aumento da concentração de açúcares e no controle de contaminações em maior escala.

REFERÊNCIAS

- ADAM, F. et al. A review on ultrasound-assisted extraction and its potential for the recovery of valuable and functional components from algae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. sup1, p. S203-S221, 2016.
- AGARWALLA, A.; KOMANDUR, J.; MOHANTY, K. Current trends in the pretreatment of microalgal biomass for efficient and enhanced bioenergy production. **Bioresource Technology**, v. 369, p. 128330, 2023.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.
- ALAM, M. A.; WANG, Z. K. Pretreatment of microalgal biomass for fermentative production of biofuels. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 649-661, 2018.
- ANDRADE, M. C. **Bioprospecção de fungos filamentosos, perfil enzimático e utilização em resíduos do processamento de café**. 2015. 131 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- ARGYROPOULOS, D. S.; MENACHEM, S. B. Lignin. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 57, p. 127-158, 1997.
- ASIS, A. et al. Identification patterns of Trichoderma strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 3285–3301, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BIOMASSA (ABIB). **Panorama da Bioeletricidade na Matriz Elétrica Brasileira: Relatório Anual 2023**. Curitiba, 2023. Disponível em: [Inserir o link da página específica]. Acesso em: 23 jun. 2025.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CONSERVAÇÃO DA ÁGUA E DO SOLO (ABC). **Boletim Técnico: Manejo da Palhada e Saúde do Solo**. 2023. Disponível em: [Inserir o link da publicação]. Acesso em: 23 jun. 2025.
- AZELEE, N.I.W. et al. Biological Treatment of Agro-Industrial Waste. In: ZAKARIA, Z.; BOOPATHY, R.; DIB, J. (Eds.). **Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches**. Springer, 2020.
- BAJAR, S.; SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Exploration of low-cost agro-industrial waste substrate for cellulase and xylanase production using *Aspergillus heteromorphus*. **Applied Water Science**, v. 10, n. 6, p. 153, 2020.
- BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomassa: biocombustibles para el sector del transporte. **Energía**, Madrid, v. 161, p. 29-34, 2001.
- BAZAN, Nelzy Neyza Vargas Ramirez de. **Microalga *Scenedesmus* sp.: produção, aplicação e análise de compostos de interesse a partir da pirólise rápida**. 2024. Tese (Doutorado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2024.

BEUTLER, A.N. et al. Soil compaction and cover with black oat on soybean grain yield in lowland under no-tillage system. **Ciência Rural**, v. 51, e20200927, 2021.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 72, p. 51-56, 1992.

BOONDAENG, A. et al. Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus* sp. **Heliyon**, v. 10, n. 5, e26601, 2024.

CARR, E. J. et al. Hydrothermal pretreatment of the microalga *Scenedesmus* for the production of volatile fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 136-143, 2017.

CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CARVALHO, D. C. et al. Caracterização e potencialidades da palha de milho para produção de biomateriais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2022.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). **Química verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF: CGEE, 2010.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). **Bioeconomia e a Indústria Química no Brasil: Desafios e Oportunidades**. Brasília, DF: CGEE, 2023.

CHEN, Y. et al. A review on the pretreatment of microalgae for high-value chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 136-149, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

COMAS GONZÁLEZ, A. A. **Las interpretaciones de los taxones, un de los problemas de la taxonomía tradicional**. Caso: *Scenedesmus sensu lato* (Sphaeropleales, Chlorophyceae). v. 6, n. 3, p. 139–150, 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, v.11 – safra 2023/24, nº8 – oitavo levantamento**. Brasília, mai. 2024.

CRISTI, E. A review of the sustainable production of biofuels using algae. **Energy, Sustainability and Society**, v. 10, n. 1, p. 28, 2020.

DEMIRBAS, A. **Biofuels from algae for transportation**. Springer Science & Business Media, 2010.

DERNER, R. B. et al. Produção de biomassa de microalgas. In: **Cultivo e utilização de microalgas**. Florianópolis: UFSC, 2006. p. 45-68.

DRUZHININA, I. S.; SHELEST, E.; KUBICEK, C. P. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 337, p. 1–9, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Manejo de Resíduos Orgânicos na Agricultura: Compostagem e Biochar - Comunicado Técnico nº 125**. Brasília, DF: Embrapa, 2023.

FACUNDES, B. C. **Fungos filamentosos produtores de holocelulases prospectados em mata de galeria do cerrado tocantinense**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Tocantins, 2014.

FARINAS, C. S. **Fermentação em estado sólido: Uma alternativa promissora para a produção de enzimas**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. 2. ed. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood and cellulosic chemistry**. New York: Wiley, 1991.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 6, p.215-242.

FERREIRA, A. D. et al. Selection of substrates and operational parameters for cellulase production by *Trichoderma* sp. isolated from the Amazon rainforest. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100258, 2019.

FOJA, N. K. et al. A review of the effect of pretreatment methods on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2024. (Online ahead of print).

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

GOMES, A. R. et al. Valorização da casca de soja através da produção de biogás e biochar: Uma revisão de literatura. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 43, n. 2, p. 261-272, 2023.

GRIS, R. D. **Produção de etanol a partir de biomassa de microalgas**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2011.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

HEGEWALD, E. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. **Algae**, v. 12, n. 3, p. 235-246, 1997.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório Anual 2023**. São Paulo: IBÁ, 2023. Disponível em: [Inserir o link do relatório]. Acesso em: 23 jun. 2025.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatório de Qualidade do Meio Ambiente 2023**. Brasília, DF: IBAMA, 2023.

JESUS, F. P. et al. Morphological and molecular characterization of *Trichoderma* spp. from soils of the Amazon region. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1365-1376, 2020.

JONKERS, W.; REP, M. The mutation of CRE1 in *Fusarium oxysporum* reverses the pathogenicity defects of the FRP1 deletion mutant. **Molecular Microbiology**, v. 74, p. 1100–1113, 2009.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial Exo-xylanases: A Mini Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 81–92, 2014.

KARUPPIAH, V. et al. Co-culture of Vel1-overexpressed *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens*: An eco-friendly strategy to hydrolyze the lignocellulose biomass in soil to enrich the soil fertility, plant growth and disease resistance. **Microbial Cell Factories**, v. 20, art. 49, 2021. DOI: 10.1186/s12934-021-01540-3.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential of bioethanol production from agricultural cropland. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 877–891, 2018.

LIN, Y. et al. Ethanol fermentation from biomass-derived sugars by *Saccharomyces cerevisiae* in a high-solids fed-batch cultivation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 43, 2012.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.

LÜRLING, M. **The smell of water: Grazer-induced colony formation in *Scenedesmus***. 1999a. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

LÜRLING, M. Grazer-induced coenobial formation in *Scenedesmus*. **Oecologia**, v. 120, p. 329-335, 1999b.

LÜRLING, M.; VAN DONK, E. Grazer-induced colony formation in *Scenedesmus*: are there costs? **Oikos**, v. 88, n. 1, p. 135-145, 2000.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, v. 79, n. 6, p. 816-826, 1960.

- MARCELLO, C. M. et al. Expression analysis of the exo- β -1, 3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 75–81, 2010.
- MARX, I. J. et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1–13, 2013.
- MENEZES, L. S. et al. Reference values and drivers of diversity for South Brazilian grassland plant communities. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 94, n. 1, e20201079, 2022.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). **Plano Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos 2023-2033**. Brasília, DF: MAPA, 2023.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Matriz energética nacional 2030**. Brasília: EPE, 2007.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E MUDANÇA DO CLIMA (MMA). **Plano Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS): Relatório de Monitoramento 2023**. Brasília, DF: MMA, 2023.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- MOOD, S. H. et al. A comprehensive review on the conventional and advanced pretreatment of lignocellulosic biomass for an enhanced biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 174, p. 113115, 2023.
- MOREIRA, L. G. B. **Fermentação: Conceitos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2018.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.
- NETO, J. M. **Bioquímica: Princípios e Fundamentos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2022.
- NGAMSIRISOMSAKUL, W. et al. Pretreatment of microalgal biomass for biofuel production. In: **Microalgae based biofuels and bioproducts**. Elsevier, 2019. p. 157-178.
- OLIVEIRA, C. **O Potencial Energético dos Resíduos do Agronegócio Brasileiro**. Portal da Bioenergia, 15 mai. 2022. Disponível em: [Inserir o link do artigo/entrevista]. Acesso em: 23 jun. 2025.
- ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista De Saúde E Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.
- PANCHAL, I. et al. A cost-effective approach for the production of lipids from *Scenedesmus* sp. by regulating nutrient regimes. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 57-64, 2015.
- PANDIAN, B. A. et al. Molecular and morphological characterization of *Trichoderma* isolates from diverse habitats of India. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 1109–1119, 2016.
- PARK, J. Y. et al. Cultivation of microalgae for biofuels in municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 313-319, 2011.
- PELLERA, F. M.; GIDARAKOS, E. Anaerobic digestion of solid agroindustrial waste in semi-continuous mode: Evaluation of mono-digestion and co-digestion systems. **Waste Management**, v. 68, p. 103-119, 2017.
- PETENUCCI, S. M. R. et al. Substituição parcial do meio de fermentação por hidrolisados ácidos do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz para produção de etanol por *Zymomonas mobilis*. In: CONGRESSO PARANAENSE DE MICROBIOLOGIA, 2., 2016, Londrina. **Anais...** Londrina: UEL, 2016.
- PHAN, C.-W.; SABARATNAM, V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 863-873, 2012.
- PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- PITARELO, A. P. et al. Composição e propriedades da celulose da palha de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 81-89, 2010.
- PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 50, n. 1, p. 1–39, 2007.
- PRIYA, B. R. et al. A review of pretreatment methods for enhanced biofuel production from microalgae. **Chemosphere**, v. 283, p. 131061, 2021.
- QIAN, Y. et al. Enhanced cellulase production in *Trichoderma reesei* via disruption of multiple protease genes identified by comparative secretomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2784, 2019.
- RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83-91, 2016.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAMOT, O. et al. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. **Current Genetics**, v. 45, p. 205–213, 2004.

RAVEN, P.H. et al. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIZWAN, M. et al. A review on selective cultivation of microalgae for enhanced lipids production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-406, 2018.

ROCHA, G. H. M. et al. Avaliação da composição química e do potencial energético da palha de trigo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2023.

RODRIGUES, L. F. **Estudo da diversidade de microalgas em reservatórios da bacia do rio Tietê**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014.

SAHA, B. C. et al. Dilute-acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, 2005.

SAMUELS, G. J.; LIECKFELDT, E.; NIRENBERG, H. I. *Trichoderma asperellum*, a new species with verrucose conidia, and redescription of *T. viride*. **Sydowia**, v. 51, p. 71–88, 1999.

SANTANA, G. S.; DURÃES, L. F. **Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos da indústria sucroalcooleira para produção de etanol de segunda geração**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. 218 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos

Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, O. C. et al. Caracterização e potencialidades da palha de trigo para produção de bioprodutos. **Revista Brasileira de Biomass**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2024.

SARROCCO, S. et al. Competition for cellulose exploitation between *Rhizoctonia solani* and two *Trichoderma* isolates in the decomposition of wheat straw. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, p. 331–338, 2009.

SCHEFFER, M. **Isolamento de fungos produtores de enzimas lignocelulósicas em depósito de resíduos de madeira de Pinus sp.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.

SCHOLZ, M. J. et al. The cell wall of *Scenedesmus* (Chlorophyceae): A promising source for biofuels and bio-based products. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1461-1473, 2014.

SENNA, S. N. **Isolamento e seleção de fungos filamentos produtores de xilanases e celulasas utilizando resíduos agroindustriais.** 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014.

SHLESER, R. A. **Ethanol production in Hawaii: processes, feedstocks, and current economic feasibility of fuel grade ethanol production in Hawaii.** Hawaii: State of Hawaii, Department of Business, Economic Development & Tourism, 1994.

SILVA, D. F. et al. Caracterização físico-química e potencialidades da palha de milho e da casca de soja para produção de bioprodutos. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 20, n. 2, p. 221-232, 2022.

SILVA, S. S. et al. Microalgae as a sustainable feedstock for the production of biofuels and value-added products: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, p. 112024, 2022. *(Ajustei para a referência correta).*

SINGH, A. et al. Bioprocessing of spent mushroom substrate for the production of value-added products: A review. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121732, 2019.

SOUZA, I. F. **Isolamento e avaliação de fungos filamentosos naturalmente ocorrentes em biomassas lignocelulósicas para a produção de enzimas holocelulolíticas.** 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, 2015.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** São Carlos: RiMa, 2001.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

US DOE. **Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol**: A joint research agenda. DOE/SC-0095. U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, 2006

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 50, n. 1, p. 50-55, 1967.

WANG, Q. et al. Characterization of cellulase secretion and Cre1-mediated carbon source repression in the potential lignocellulose degrading strain *Trichoderma asperellum* T-1. **PLoS One**, v. 10, n. 4, e01272492, 2015.

ZENG, X. et al. A new concept for microalgae-based wastewater treatment: A closed-loop system for nutrient removal and biomass production. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 386-394, 2015.

ANEXO 1 – TESTE DE TUKEY E ANOVA

Tratamento	Diferença vs Controle	Diferença vs Autoclave	Beads vs Sonificação
Autoclave	$p < 0,001$ (↑)	—	—
Beads	$p < 0,01$ (↑)	$p < 0,05$ (↓)	$p > 0,05$ ($\approx$)
Sonificação	$p < 0,01$ (↑)	$p < 0,05$ (↓)	$p > 0,05$ ($\approx$)
Legenda: ↑ = significativamente superior ↓ = significativamente inferior $\approx$ = sem diferença significativa			