

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
CELULASES DO FUNGO *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* NA
HIDRÓLISE DE TECIDO DE ALGODÃO”**

Lucas Gomes Rodrigues*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de MESTRE
EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA

Orientador(a): Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Lucas Gomes Rodrigues, realizada em 28/08/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero (UFCAT)

Profa. Dra. Ariele Cristina Moreira (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza pela orientação, paciência, carinho e acolhimento.

À Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz e a mestranda Isabelly Bertochi Veroneze, do Departamento de Química da UFSCar, pela colaboração.

À Profa. Dra. Richele Priscila Severino pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pelas discussões, dicas e conselhos.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE), Bruna, Larissa, Kátia e Kelli por compartilharem seus ensinamentos, vivências e principalmente risadas e bons momentos que levarei para sempre comigo.

Aos meus amigos Ana Luiza, Eduarda, Gabriella, Ludmilla e Tammara por estarem comigo nos bons e maus momentos.

À minha mãe, Sandra, e à minha avó, Maria José, por sempre terem me apoiado e me incentivado a correr atrás dos meus sonhos.

À minha prima, Tabata, pelo apoio, conselhos e vivências compartilhadas.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar, pelo conhecimento transmitido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar, as secretárias da pós-graduação (Ariane, Cristina e Luciani) e aos funcionários do departamento de química.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a conclusão desta dissertação.

LISTA DE ABREVIATURAS

Avicelase	Atividade enzimática que utiliza celulose microcristalina (Avicel®) como substrato
BDA	Ágar Batata Dextrose (Amido de batata + Glucose + Ágar)
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade enzimática que utiliza a carboximetilcelulose como substrato
DEAE	Dietiletanoamina, do inglês <i>Diethyletanolamine</i>
DNS	Ácido dinitrosalísílico
DSC	Calometria exploratória diferencial, do inglês <i>differential scanning calorimetry</i>
EB	Extrato bruto
EC	Comissão de enzimas, do inglês <i>Enzyme comission</i>
EE	Extrato enzimático
ϵ	Coefficiente de absortividade molar
FPase	Atividade enzimática que utiliza papel de filtro como substrato
FPLC	Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas, do inglês <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
kDa	Quilodalton
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Massa Molecular
mM	Micro Molar
nm	Nanômetros
pNPBG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo
pNPBGase	Atividade enzimática que utiliza o <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato
PPM	Porcentagem de perda de massa
PTF	Tecido com pré-tratamento físico

PTQ	Tecido com pré-tratamento químico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SPT	Tecido sem pré-tratamento
UI	Unidade de atividade enzimática
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Diferenças entre celulose e hemicelulose.....	3
TABELA 2. Composição química de fibras de algodão.....	9
TABELA 3. Configuração dos experimentos do planejamento fatorial, visando a triagem de variáveis significativas.....	28
TABELA 4. Configuração dos 8 experimentos realizados para a triagem das variáveis importantes na liberação de açúcares redutores na hidrólise de tecido 100% algodão, em escala codificada.....	29
TABELA 5. Configuração dos 8 experimentos realizados para a triagem das variáveis importantes na liberação de açúcares redutores na hidrólise de tecido 100% algodão, em escala real.....	29
TABELA 6. Massa molecular estimada das enzimas eluídas nos picos 1, 2 e 3 da cromatografia de exclusão molecular.....	38
TABELA 7. Resumo das propriedades das enzimas estudadas.....	42
TABELA 8. Sequências de nucleotídeos anotadas como de endoglucanases de <i>L. theobromae</i> no banco de dados NCBI.....	44
TABELA 9. Sequências de nucleotídeos anotadas como de exoglucanases de <i>L. theobromae</i> no banco de dados NCBI.....	45
TABELA 10. Sequências de nucleotídeos anotadas como de β -glucosidases de <i>L. theobromae</i> no banco de dados NCBI.....	46
TABELA 11. Análise da perda de massa do tecido de algodão após hidrólise enzimática	53
TABELA 12. Relação entre os níveis codificados e reais utilizados para a variável 1 ([Enzima])	58
TABELA 13. Relação entre os níveis codificados e reais utilizados para a variável 3 (Tempo)	58
TABELA 14. Relação entre os níveis codificados e reais utilizados para a variável 3 (Temperatura)	59
TABELA 15. Configuração dos experimentos realizados com compostos centrais e axiais, visando a maior liberação de açúcares redutores.....	59

TABELA 16. Matriz X com 16 linhas (experimentos) e 10 colunas (coeficientes) (16:10)	60
TABELA 17. Configuração da matriz X após a retirada dos coeficientes b1, b2, b3, b22, b12, b13, b23.....	62
TABELA 18. Quantidade de açúcares redutores liberados após a hidrólise enzimática de tecido 100% algodão nos dois tipos de pré-tratamento avaliados.....	65
TABELA 19. Perda de massa dos tecidos após hidrólise enzimática, com e sem pré-tratamento.....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da parede celular de plantas.....	1
FIGURA 2. Monômeros presentes do heteropolissacarídeo que constitui a hemicelulose de plantas.....	2
FIGURA 3. Estrutura dos álcoois precursores da lignina.....	3
FIGURA 4. Estrutura química da lignina.....	4
FIGURA 5. Estrutura química da celulose.....	5
FIGURA 6. Polimorfismo da estrutura da celulose.....	6
FIGURA 7. Configuração relativa da célula unitária para celulose.....	7
FIGURA 8. Padrões de ligação de hidrogênio da celulose α e β	8
FIGURA 9. Representação esquemática da estrutura cristalina e amorfa da celulose.....	9
FIGURA 10. Morfologia da fibra de algodão	10
FIGURA 11. Representação esquemática do mecanismo de ação de celulases.....	12
FIGURA 12. Mecanismos de reação de celulases.....	13
FIGURA 13. Fungo <i>L. theobromae</i> cultivado em meio BDA.....	16
FIGURA 14. Representação da hidrólise enzimática do pNPBG por β -glucosidase.....	22
FIGURA 15. Análise da atividade enzimática do extrato bruto de <i>L. theobromae</i> frente ao papel de filtro como substrato, durante 30 dias.....	32
FIGURA 16. Análise do extrato bruto em SDS-PAGE 12% das enzimas secretadas para o meio extracelular pelo fungo <i>L. theobromae</i>	33
FIGURA 17. Zimogramas utilizando (a) CMC, (b) pNPBG e (c) Avicel [®] como substratos.....	34
FIGURA 18. Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular do Extrato Enzimático obtida de <i>L. theobromae</i>	35
FIGURA 19. Análise em SDS-PAGE das amostras eluídas nos picos 2 e 3 da coluna de exclusão molecular.....	36
FIGURA 20. Cromatograma obtido da coluna de troca aniônica DEAE Sepharose FF.....	37
FIGURA 21. Análise por SDS-PAGE da exoglucanase eluída da coluna DEAE Sepharose FF.....	38

FIGURA 22. Avaliação da influência do (A) pH e (B) temperatura na atividade da β -glucosidase do fungo <i>L. theobromae</i>	39
FIGURA 23. Avaliação da influência do (A) pH e (B) temperatura na atividade da endoglucanase do fungo <i>L. theobromae</i>	40
FIGURA 24. Avaliação da influência do (a) pH (b) temperatura na atividade exoglucanase do fungo <i>L. theobromae</i>	41
FIGURA 25. Atividade do Extrato Enzimático após 48h de armazenamento em diferentes condições.....	48
FIGURA 26. Atividade do Extrato Enzimático armazenado por 30 dias a -20°C em glicerol 20%	48
FIGURA 27. Avaliação da influência do pH na atividade FPase do Extrato Enzimático	49
FIGURA 28. Avaliação da influência da temperatura na atividade FPase do Extrato Enzimático	50
FIGURA 29. Curva DSC do tecido de algodão.....	52
FIGURA 30. Curva TG e derivada primeira da curva TG para o tecido de algodão. Análise feita em atmosfera de nitrogênio e taxa de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$	53
FIGURA 31. Espectro de FTIR do tecido de algodão.....	54
FIGURA 32. Análise dos efeitos das variáveis do planejamento fatorial fracionário (n=5)	55
FIGURA 33. Análise da probabilidade dos efeitos das variáveis obtido no planejamento fatorial fracionário (n=5)	56
FIGURA 34. Análise da termoestabilidade do Extrato Enzimático em função do pH para a atividade FPase	57
FIGURA 35. Análise dos coeficientes de regressão obtidos pelo modelo calculado	61
FIGURA 36. Visualização dos coeficientes do modelo recalculado	63
FIGURA 37. Superfície de resposta relacionando as variáveis [Enzima] e temperatura com o modelo proposto.....	64

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CELULASES DO FUNGO *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* NA HIDRÓLISE DE TECIDO DE ALGODÃO. A indústria têxtil gera milhões de toneladas de resíduos que são descartados e levam cerca de 20 anos para serem degradados na natureza. A hidrólise enzimática dos tecidos tem se mostrado uma boa alternativa para reciclagem desses resíduos, mas geralmente são utilizados coquetéis enzimáticos comerciais que possuem elevado custo. O presente trabalho teve como proposta identificar, purificar, caracterizar sob o ponto de vista bioquímico e de especificidade, celulases produzidas pelo fungo *L. theobromae*, além de avaliar a viabilidade do uso das enzimas na hidrólise de tecido 100% algodão. Para isso, o fungo foi cultivado a 28 °C durante 30 dias em meio líquido na presença de carboximetilcelulose e seu crescimento foi acompanhado através de ensaios de atividade frente à papel de filtro como substrato usando o método de DNS para medida de açúcares redutores. A atividade para celulases totais no 10º dia de crescimento da cultura é em média 5,89 UI mL⁻¹. Decorrido o tempo, o extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio seguido de cromatografia de exclusão molecular e de troca iônica. Assim, foi possível purificar três celulases com atividades para endoglucanase (0,15 UI mL⁻¹), exoglucanase (3,11 UI mL⁻¹) e β-glucosidase (0,02 UI mL⁻¹) que possuem melhor atividade em pH e temperatura de 10 e 60 °C; 11 e 80 °C; 5 e 45 °C, respectivamente. Esta é a primeira descrição de uma exoglucanase do fungo *L. theobromae*. As melhores condições de hidrólise do tecido foram determinadas através de análise fatorial dos parâmetros [Enzima], [tecido], pH, temperatura e tempo de reação, tendo sido avaliados também os efeitos de pré-tratamentos químico e físico. A maior concentração de açúcares redutores obtida foi na hidrólise de tecido sem pré-tratamento (aproximadamente 7 mg/150 mg de tecido), enquanto que a maior perda de massa pós-hidrólise foi obtida com o pré-tratamento físico (19,72%). Uma das hipóteses para estes resultados é que oligômeros solúveis de celulose tenham sido liberados durante a hidrólise. Comparadas à literatura, as enzimas celulolíticas do fungo *L. theobromae* apresentam atividades adequadas para serem usadas no processo de hidrólise de tecido 100% algodão.

Palavras-chave: *Lasiodiplodia theobromae*, celulases, endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, hidrólise, tecido de algodão.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF CELLULASES FROM THE FUNGUS *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* IN THE HYDROLYSIS OF COTTON TISSUE. The textile industry generates millions of tons of waste that are discarded and take about 20 years to be degraded in nature. The enzymatic hydrolysis of tissues has been shown to be a good alternative for recycling these residues, but commercial enzymatic cocktails, which are expensive, are generally used. This work aimed to identify, purify, characterize from the biochemical and specificity point of view, cellulases produced by the fungus *L. theobromae*, in addition to evaluating the viability of using enzymes in the hydrolysis of 100% cotton fabric. For this, the fungus was cultivated at 28 °C for 30 days in liquid medium in the presence of carboxymethylcellulose and its growth was monitored through activity assays against filter paper as substrate using the DNS method for measuring reducing sugars. Activity for total cellulases on the 10th day of culture growth averages 5.89 IU mL⁻¹. After the time, the crude extract was subjected to precipitation with ammonium sulfate followed by molecular exclusion and ion exchange chromatography. Thus, it was possible to purify three cellulases with activities for endoglucanase (0.15 IU mL⁻¹), exoglucanase (3.11 IU mL⁻¹) and β-glucosidase (0.02 IU mL⁻¹) that have better activity at pH and temperature of 10 and 60 °C; 11 and 80 °C; 5 and 45 °C, respectively. This is the first description of an exoglucanase from the fungus *L. theobromae*. The best conditions for tissue hydrolysis were determined through factorial analysis of the parameters [Enzyme], [tissue], pH, temperature and reaction time, and the effects of chemical and physical pre-treatments were also evaluated. The highest concentration of reducing sugars obtained was in tissue hydrolysis without pre-treatment (approximately 7 mg/150 mg of tissue), while the highest post-hydrolysis mass loss was obtained with physical pre-treatment (19.72%). One hypothesis for these results is that soluble cellulose oligomers were released during hydrolysis. Compared to the literature, the cellulolytic enzymes of the fungus *L. theobromae* present adequate activities to be used in the hydrolysis process of 100% cotton fabric.

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae*, cellulases, endoglucanase, exoglucanase, β-glucosidase, hydrolysis, cotton fabric.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Constituintes da parede celular vegetal	1
1.2. Celulases	11
1.3. Fungos como produtores de enzimas celulolíticas	14
1.4. Reciclagem de tecido.....	16
2. Objetivos	18
3. Metodologia.....	19
3.1. Material Biológico.....	19
3.2. Cultivo do fungo em meio indutor de celulases.....	19
3.3. Isolamento e purificação das enzimas	20
3.4. Caracterização das enzimas.....	21
3.4.1. Atividade enzimática	21
3.4.1.1. Método do <i>p</i> -nitrofenol para a determinação de atividade β -glucosidase	22
3.4.1.2. Determinação de celulases totais - FPase.....	23
3.4.1.3. Determinação de atividade Endoglucanase – (CMCase)	23
3.4.1.4. Determinação de atividade Exoglucanase – (Avicelase)	24
3.4.1.5. Determinação de atividade β -glucosidase – (pNPBGase).....	24
3.4.2 Ensaio de Zimografia	25
3.4.3. Avaliação da atividade enzimática em função do pH e temperatura.....	26
3.5. Estudos da hidrólise de tecido de algodão pelas enzimas.....	26
3.5.1. Avaliação da atividade enzimática do EE em função do pH e temperatura	26
3.5.2. Caracterização do tecido	27
3.5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	27
3.5.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	27
3.5.5. Análise termogravimétrica (TGA).....	28
3.5.6. Planejamento fatorial fracionário (n=5)	28
4. Resultados e discussões.....	31
4.1. Avaliação da produção de celulases pelo fungo <i>L. theobromae</i>	31
4.2. Purificação das celulases produzidas pelo fungo <i>L. theobromae</i>	34

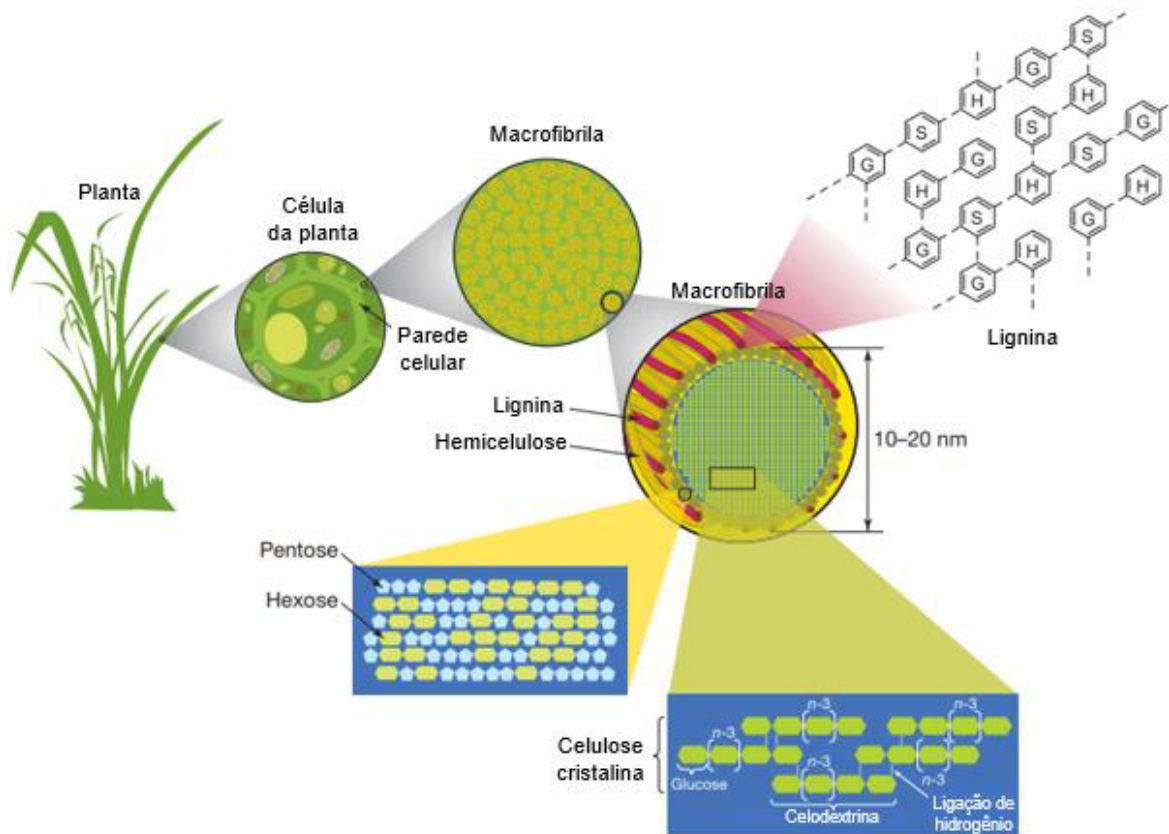
4.3. Caracterização do Extrato enzimático (EE)	47
4.4. Hidrólise de tecido de algodão	50
4.4.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	51
4.4.2. Análise termogravimétrica (TGA).....	52
4.4.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	53
4.4.4. Planejamento fatorial fracionário (n=5) para determinação das variáveis mais significativas para a hidrólise do tecido pelo EE	55
4.4.5. Planejamento fatorial	58
4.4.6. Otimização do método – v6: pré-tratamentos	64
5. Conclusões e perspectivas futuras	69
6. Referências Bibliográficas.....	70

1. Introdução

1.1. Constituintes da parede celular vegetal

A parede celular vegetal é composta por hemicelulose (25-30%), lignina (15-30%) e celulose (35-50%), possuindo também outros componentes em pequenas concentrações como sais minerais e extratos (Figura 1) (BRETHAUER; STUDER, 2015; ESPRO et al., 2017)

FIGURA 1. Estrutura da parede celular de plantas.



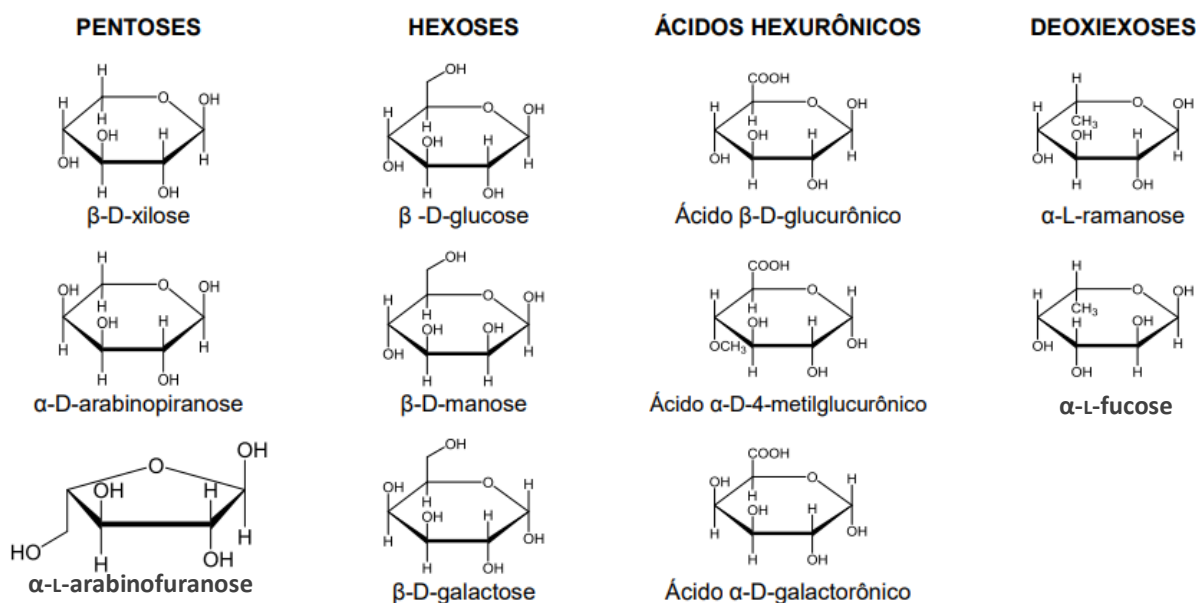
Fonte: adaptado de RUBIN, 2008.

A **hemicelulose** (Figura 2) é um heteropolissacarídeo de 200 a 400 unidades de pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxiexoses, tais como xilose, arabinose, manose, glicose, galactose, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico (BRETHAUER; STUDER, 2015). Devido à grande variedade de estruturas, ligações inter

e intramoleculares e ramificações, bem como a presença de diferentes unidades monoméricas, a estrutura da hemicelulose possui caráter complexo gerando diferentes conformações estruturais (KOOTSTRA et al., 2009).

A função majoritária da hemicelulose é estabilizar a parede celular através de ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina. Em menor escala, também é utilizada como mecanismo de retenção de água em sementes como fonte de energia extracelular (WYMAN et al., 2005).

FIGURA 2. Monômeros presentes do heteropolissacarídeo que constitui a hemicelulose de plantas.



Fonte: adaptado de CORDEIRO, 2016.

Apesar de a hemicelulose ser um polímero de unidades glicosídicas, similar à celulose, esta não apresenta regiões cristalinas. Devido a isso, é mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. A Tabela 1 sumariza as principais diferenças entre a celulose e hemicelulose.

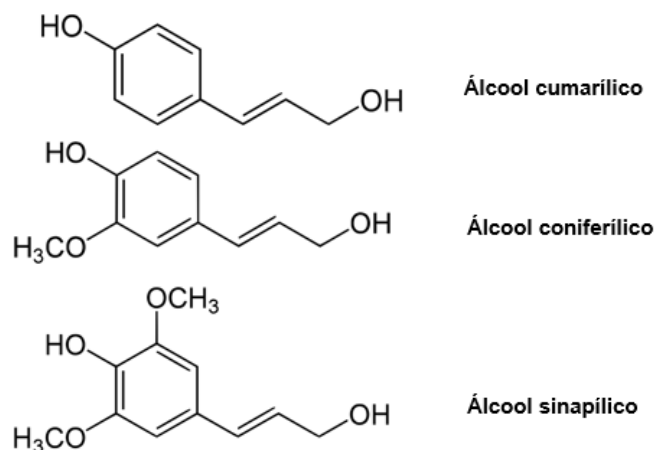
TABELA 1. Diferenças entre celulose e hemicelulose

CELULOSE	HEMICELULOSE
Unidades de glucose unidas entre si	Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si
Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glucose)	Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões cristalinas e amorfas	Apresenta somente regiões amorfas
Sofre hidrólise lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	Sofre hidrólise rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
Insolúvel em álcalis	Solúvel em álcalis

Fonte: adaptado de CORDEIRO, 2016.

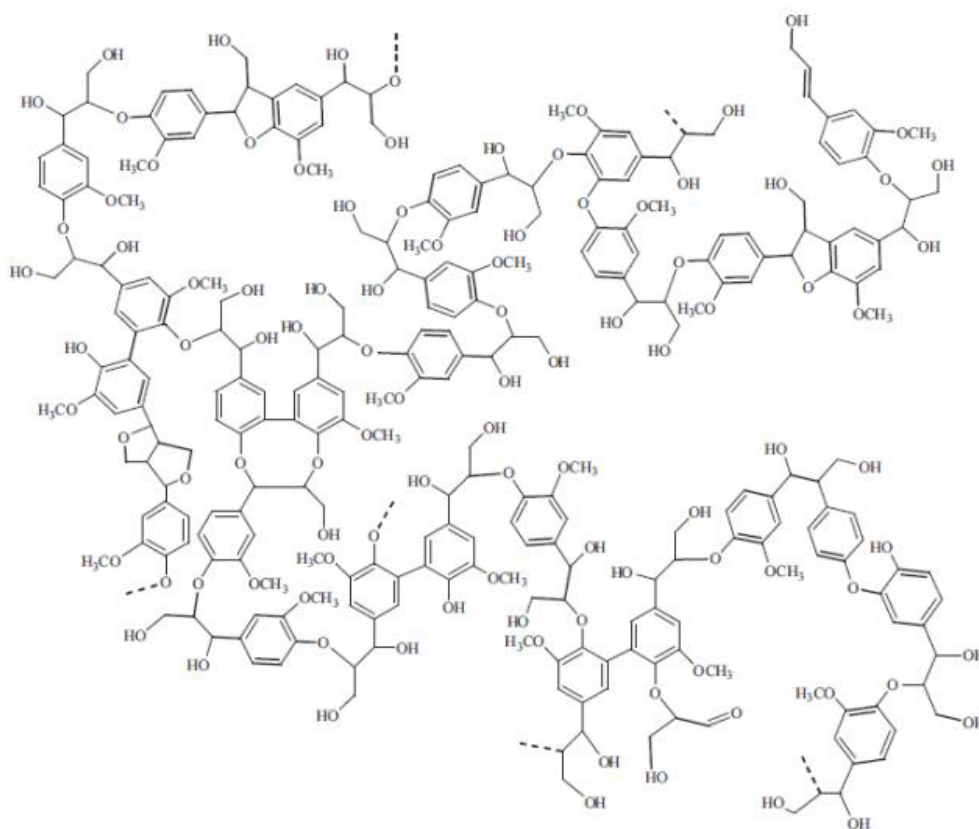
A **lignina** é um polímero de caráter aromático e renovável mais abundante do planeta. Diferentemente da celulose e hemicelulose, é composta por polímeros biossintetizados a partir de derivados de fenilpropanóides (monolignóis), com substituintes metoxila no anel aromático, sendo formada a partir da junção de vários ácidos e álcoois fenilpropílicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) (Figura 3) (CAPARRÓS JIMÉNEZ, 2009).

FIGURA 3. Estrutura dos álcoois precursores da lignina.



Essas estruturas são unidas por ligações do tipo éter que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esse arranjo faz com que a lignina possua uma elevada massa molecular (Figura 4) (CAPARRÓS JIMÉNEZ, 2009). Sendo incorporada como ultimo componente na parede celular vegetal, a lignina atua entre a celulose e hemicelulose, dando certa rigidez e fortalecimento para a parede celular. Além disso, devido à sua natureza recalcitrante em relação a biodegradação, fornece proteção contra infecções por microrganismos, bem como o transporte de água, nutrientes e metabólitos, impermeabilidade (SÁNCHEZ, 2009; STICKLEN, 2008).

FIGURA 4. Estrutura química da lignina.

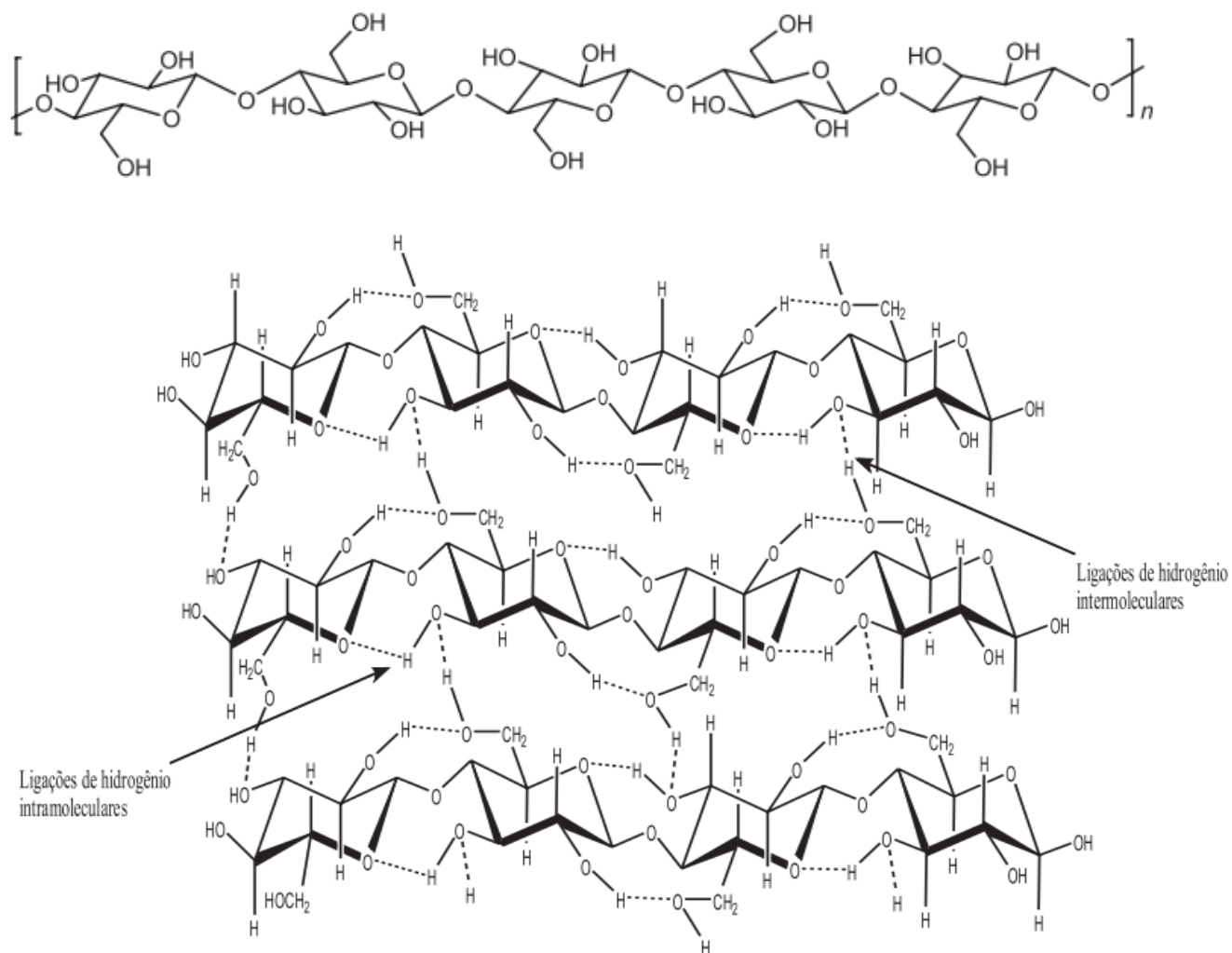


Fonte: EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009.

A **celulose** é o principal componente da estrutura da parede celular de vegetais (35-50%), sendo considerado um dos polímeros de maior abundância no planeta (VERA et al., 2022). Estruturalmente, a celulose é definida como um polímero linear de unidades de D-glucose com ligações β (1 \rightarrow 4), podendo atingir de 10.000 a 15.000

unidades (Figura 5). A estrutura da celulose plana e linear e é mantida por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. O arranjo dessas subunidades forma fibras que possuem de 5 a 12 nm de diâmetro e são rotacionadas em 180° em relação as subunidades de glucose (PIRIBAUER; BARTL; IPSMILLER, 2021).

FIGURA 5. Estrutura química da celulose.

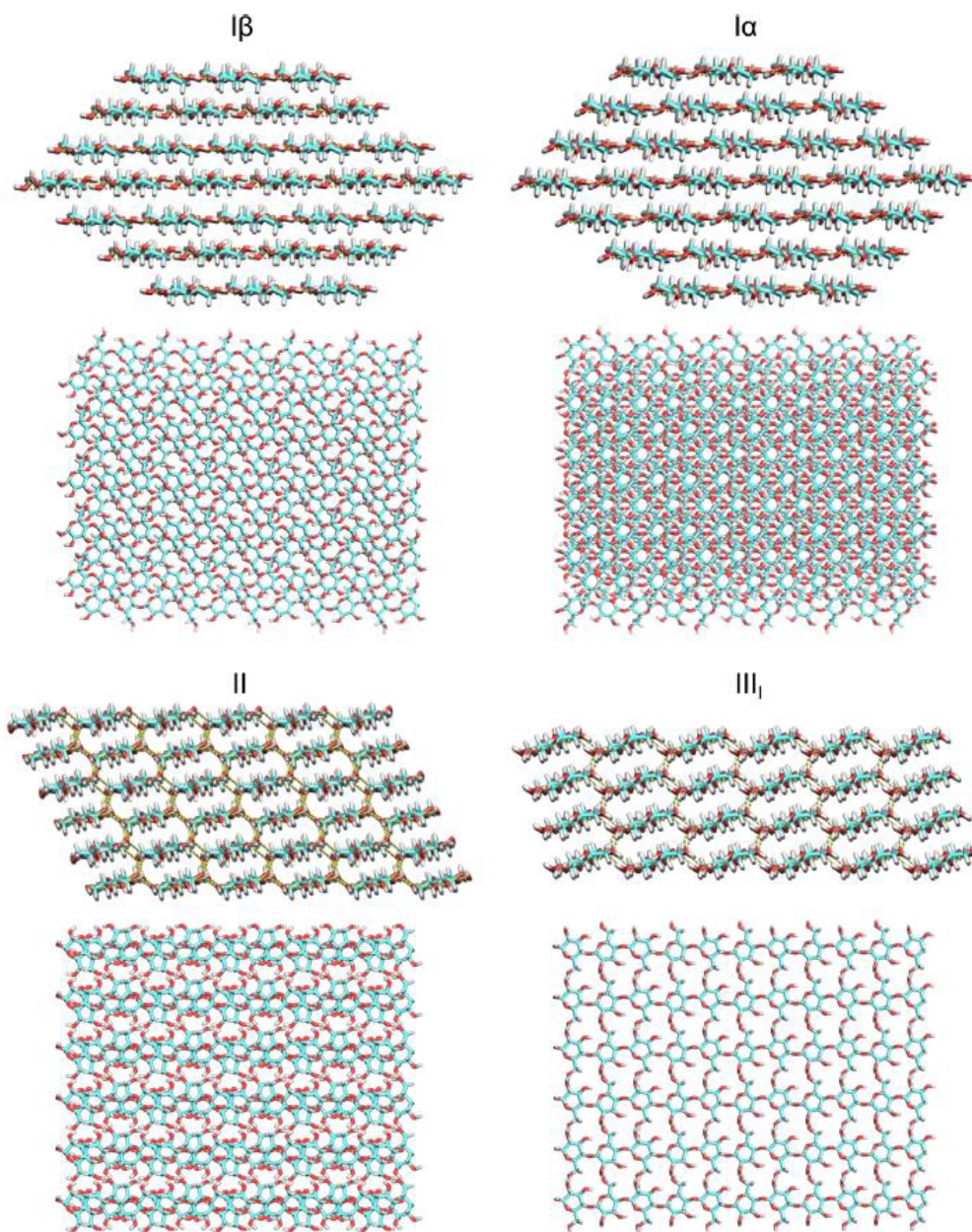


Fonte: SANTOS et al., 2012

As cadeias lineares de glucose formam uma estrutura cristalina com alto nível de organização estrutural além de regiões amorfas em diferentes proporções, levando a formação de quatro formas de organização estrutural da celulose, denominadas I α , I β , II e III (Figura 6). Esses arranjos ocorrem devido as fortes ligações

de hidrogênio intra- e intermoleculares entre os monômeros de glucose, construindo uma rede que contribui diretamente na estrutura cristalina do polímero de celulose, dando caráter hidrofóbico à mesma (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

FIGURA 6. Polimorfismo da estrutura da celulose.

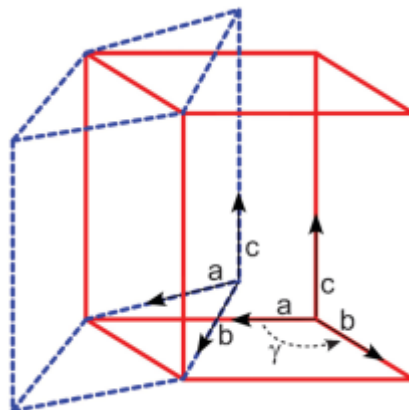


Fonte: PAYNE et al., 2015.

Geralmente, em sistemas naturais tais como células vegetais, a celulose ocorre na forma I, que é caracterizada pela formação de cadeias paralelas. Dentro da

classificação I existem as formas $I\alpha$ e $I\beta$. A forma $I\alpha$ é encontrada em algas e bactérias e possui uma estrutura cristalina triclinica. A forma $I\beta$ é encontrada em plantas e possui estrutura cristalina monoclinica (Figura 7), sendo essa mais estável (MOON et al., 2011).

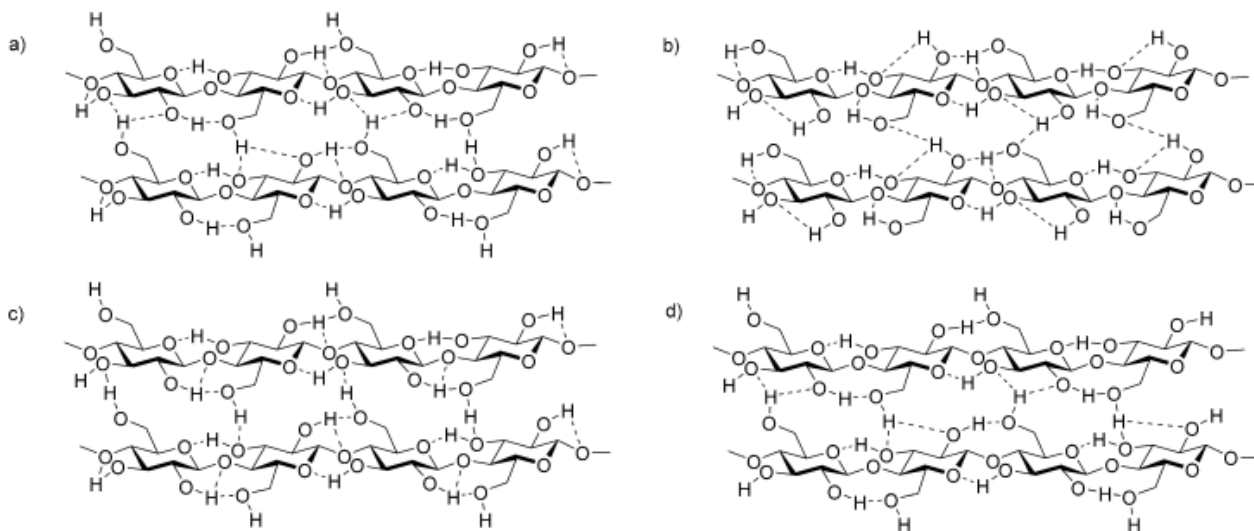
FIGURA 7. Configuração relativa da célula unitária para celulose. $I\alpha$: triclinica, linha tracejada; $I\beta$: monoclinica, linha sólida.



Fonte: MOON et al., 2011.

A principal diferença estrutural entre elas consiste no arranjo das ligações de hidrogênio. Na forma $I\alpha$ existe uma simetria molecular ao longo do eixo do tipo $+c/4$. Já na forma $I\beta$ há uma alternância entre $+c/4$ e $-c/4$ o que faz com que apenas metade das cadeias sejam similares às da forma $I\alpha$ (MATTHEWS; HIMMEL; CROWLEY, 2012) (Figura 8).

FIGURA 8. Padrões de ligação de hidrogênio da celulose I α e I β . (a, b) redes alternativas de ligações de hidrogênio encontradas na celulose I α . (c, d) rede de ligações de hidrogênio dominante nas cadeias I β da celulose na origem da célula unitária (c) e nas cadeias I β da celulose no centro da célula unitária (d).

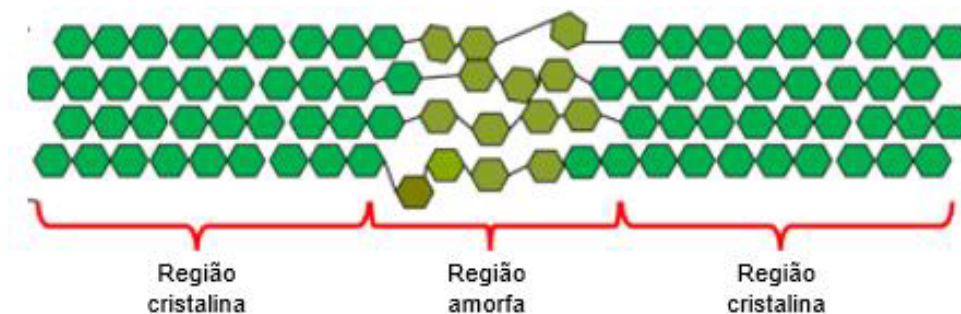


Fonte: BORNSCHEUER; BUCHHOLZ; SEIBEL, 2014.

As celuloses do tipo II e III não ocorrem de maneira natural. A celulose do tipo II é proveniente do tratamento químico da celulose I α convertendo-a em um arranjo antiparalelo que contém ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Já a celulose do tipo III é proveniente da conversão da celulose I ou II, formando camadas escalonadas com interações de ligação de hidrogênio intra e intermoleculares. Pode ser nomeada como celulose III_I e III_{II} dependendo da sua origem (PAYNE et al., 2015).

Devido a sua vasta biodisponibilidade, o uso de celulose tem grande relevância em diferentes segmentos industriais, tais como a produção de papel, embalagens, e fibras de algodão (ROJAS, 2016). Nas **fibras de algodão**, a celulose aparece em sua forma nativa, atingindo níveis próximos de 70% de cristalinidade (FRANZ; BLASCHEK, 1990)(Figura 9).

FIGURA 9. Representação esquemática da estrutura cristalina e amorfa da celulose.



Fonte: RAMÍREZ BRENES et al., 2023.

Apesar de alto nível de pureza, as fibras de algodão comercial possuem outros componentes além da celulose tais como hemicelulose, proteínas e outros (Tabela 2).

TABELA 2. Composição química de fibras de algodão.

Constituinte	Valores (%)
Celulose	82-96
Hemicelulose	2,0-6,4
Proteínas	1,0-1,9
Ceras	0,4-1,2
Derivados de pectina	0,4-1,2
Inorgânicos	0,7-1,6
Outros	0,5-8,0

Fonte: PIRIBAUER; BARTL; IPSMILLER (2021).

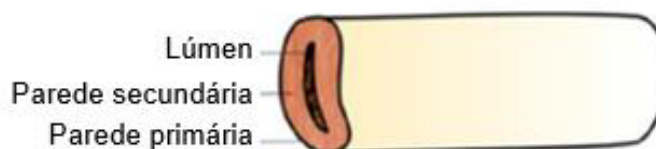
A morfologia das fibras de algodão mostra uma cavidade longitudinal no centro da fibra chamada de lúmen, que é rodeada por cadeias de celulose (Figura 10). Na camada mais externa se encontra a pectina e as ceras presentes na fibra gerando a característica a sua característica hidrofóbica. Nas paredes primária e secundária encontram-se a celulose e em menor quantidade a hemicelulose e lignina. A fibra de

algodão não apresenta simetria rotacional e apresenta contorções com cerca de 60 convoluções cm^{-1} de fibra (DOCHIA et al., 2012).

A despeito da alta organização estrutural da celulose, o material celulolítico é altamente resistente, estável e de difícil degradação. Nesse sentido, o uso de enzimas celulolíticas vem se mostrando uma ótima alternativa, uma vez que essas enzimas são capazes de hidrolisar eficientemente a celulose.

FIGURA 10. Morfologia da fibra de algodão. (a) Representação esquemática da fibra de algodão; Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal (b) e longitudinal (c) da fibra de algodão.

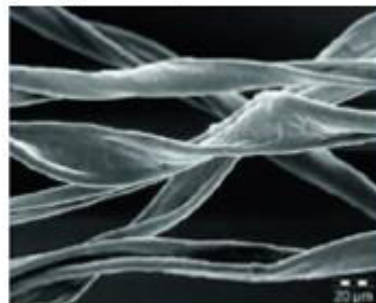
a) Estrutura da fibra de algodão



b) Seção transversal da fibra



c) Seção longitudinal



Fonte: adaptado de SHAKER; NAWAB, 2020.

1.2. Celulases

As celulases são uma classe de enzimas capazes de degradar a celulose através da hidrólise das ligações β (1 \rightarrow 4) do polissacarídeo. Estas enzimas são secretadas por bactérias e fungos de forma livre ou ligadas à superfície das células (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

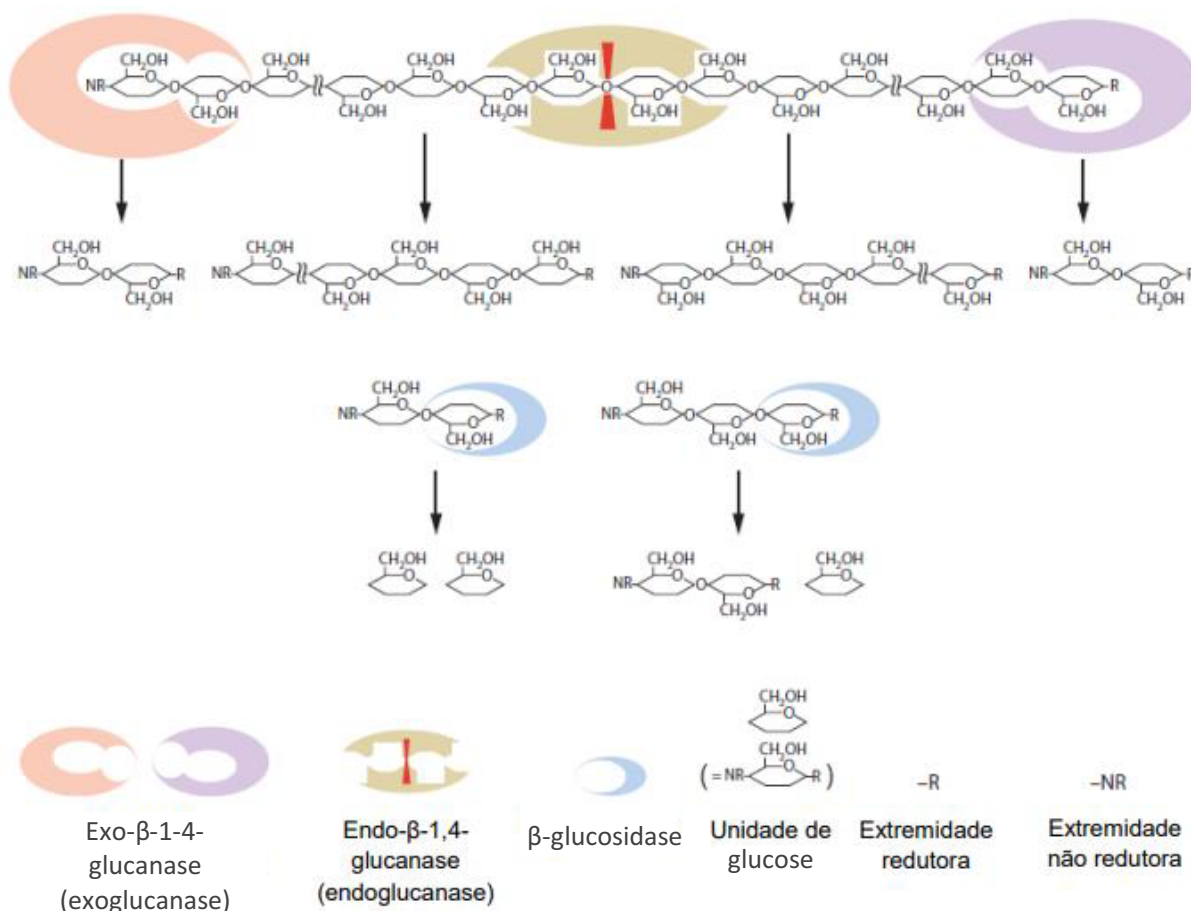
Estas enzimas pertencem à família das glucosídeo hidrolases e são classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com o código 3.2.1.x. sendo encontradas em 13 das 82 famílias das glucosídeo hidrolases, identificadas por análise de sequência (SCHÜLEIN, 2000). De acordo com o modo de atuação, as celulases estão subdivididas em β - glucosidases, endoglucanases e exoglucanases (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006) (Figura 11).

As endoglucanases (1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.4) são aquelas que hidrolisam a parte amorfa interna da celulose, causando mudança rápida no grau de polimerização, diminuindo o tamanho do polímero, produzindo oligossacarídeos de até 2 unidades de glucose (celbiose) e dessa forma, gerando mais terminais redutores (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006; LYND et al., 2002).

As exoglucanases [(glucanohidrolase (GH), EC 3.2.1.74; celbiohidrolase (CBH I e II), EC 3.2.1.91)] atuam nas extremidades da região cristalina do polímero, liberando unidades de celbiose. É a classe menos estudadas das três celulases e possui mecanismo pouco elucidado. É sabido que essa classe de enzimas participa da amorfogênese da fibra, um fenômeno ainda não tão bem elucidado que consiste na ruptura física do substrato. Isso leva à desestratificação das fibras, aumentando as regiões intersticiais, aumentando as regiões cristalinas mais expostas às celulases, o que promove um aumento na taxa de hidrólise (ZHANG; LYND, 2006).

As β -glucosidases (β -glucoside glucohydrolases, EC 3.2.1.21) são as enzimas que finalizam a hidrólise da celulose. Elas são responsáveis pela hidrólise das celodextrinas e celbioses, que são produtos intermediários da hidrólise da celulose, gerando D-glucose (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006; LYND et al., 2002).

FIGURA 11. Representação esquemática do mecanismo de ação de celulases.



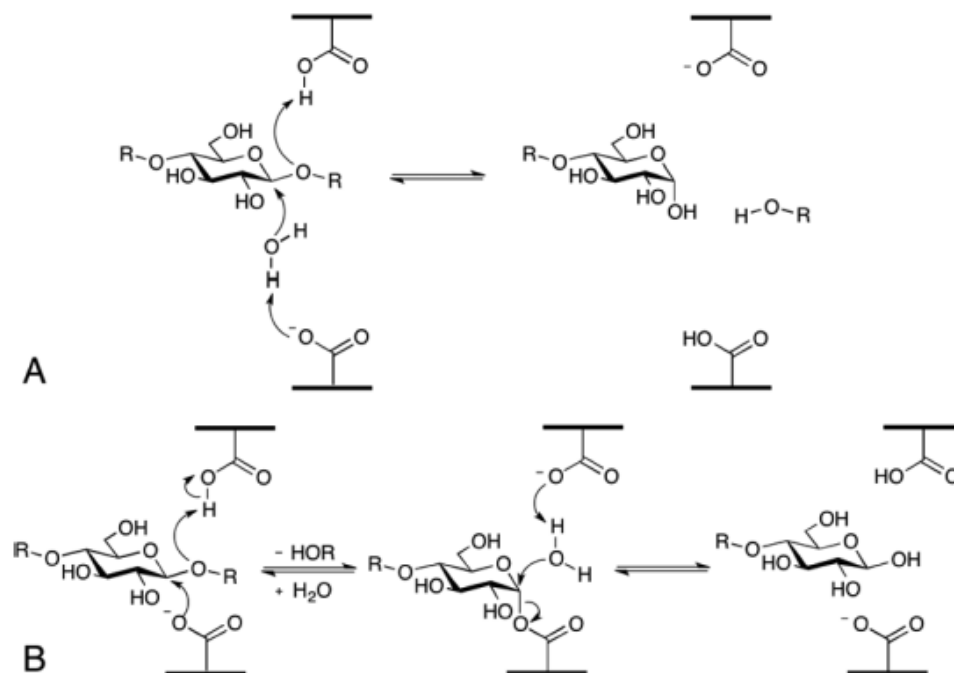
Fonte: BARBOSA, 2019.

A reação catalisada por celulases, pode ocorrer através de dois mecanismos: com e sem inversão da configuração do substrato, como proposto por Koshland em 1953 (PAYNE et al., 2015) (Figura 12). No mecanismo de inversão, uma molécula de água conduz um ataque nucleofílico no carbono anomérico do açúcar. Uma base catalítica abstrai um próton da molécula de água atacante e um ácido catalítico transfere um próton para o oxigênio glicosídico para clivar a ligação glicosídica, resultando em uma inversão da estereoquímica no carbono anomérico.

Já no mecanismo de retenção de configuração, a reação ocorre em duas etapas. Na primeira, o resíduo nucleofílico ataca o carbono anomérico simultaneamente com a transferência de prótons do resíduo ácido para o oxigênio glicosídico resultando na formação do intermediário glicosil-enzima e quebra da ligação glicosídica. Na segunda etapa, uma molécula de água entra no sítio ativo e ataca o carbono anomérico

transferindo simultaneamente um próton para a base catalítica, restaurando assim o sítio ativo da enzima (PAYNE et al., 2015).

FIGURA 12. Mecanismos de reação de celulasas. A: mecanismo de inversão da configuração do substrato, B: mecanismo de retenção.



Fonte: PAYNE et al., 2015.

Importância biotecnológica das celulasas

Nos últimos 30 anos, o uso de celulasas para a degradação de biomassa se tornou uma área de grande interesse. A partir dos anos 90, as celulasas têm sido utilizadas pela indústria têxtil, indústria do papel e celulose, indústria de detergentes, indústria de alimentos, na fermentação de cerveja e produção de vinhos, extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, produção de néctares de frutas e purês, alterações das propriedades sensoriais de frutas e vegetais, extração de azeite de oliva, aditivos na ração animal, na agricultura e também para a degradação de tecidos de algodão (BHAT, 2000; SCHÜLEIN, 2000).

Estima-se que o mercado internacional de enzimas industriais movimente cerca de U\$ 4 bilhões e o mercado externo brasileiro de biocatalizadores U\$ 200 milhões (ANDREAUS; PINTO DA SILVA BON; SANTANA FERREIRA-LEITÃO, 2014). Esse mercado se encontra em constante crescimento em decorrência do desenvolvimento de novas tecnologias e na aplicabilidade na substituição de processos químicos convencionais (ORLANDELLI et al., 2012; REINEHR et al., 2014). As celulasas são a segunda classe de enzimas industriais mais utilizadas no mundo (17,1%) ficando atrás apenas da amilase (25,4%) seguida das lipases (7,2%), sendo que o Brasil representa cerca de 60% de todo o consumo dessas enzimas na América (MONTEIRO; DO NASCIMENTO SILVA, 2009). Alguns fungos e bactérias, denominados microrganismos celulolíticos, são capazes de produzir celulasas e têm sido extensivamente estudados.

1.3. Fungos como produtores de enzimas celulolíticas

Fungos são organismos heterotróficos, eucariotos, uni ou pluricelulares incapazes de absorver material insolúvel, necessitando de material solúvel para gerar energia. Devido à falta de uma estrutura para penetrar a parede celular das plantas, estes organismos são conhecidos por produzirem uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas para acessar o interior das plantas e assim conseguir energia (FÉLIX et al., 2018).

Dentro de suas classificações, os fungos que são capazes de degradar madeira são chamados de fungos de podridão, podendo ser do tipo branca, parda ou mole. Os de podridão branca são capazes de degradar celulose, hemicelulose e lignina. Os de podridão parda, degradam intensamente a celulose e hemicelulose e fracamente a lignina. Já os de podridão mole são eficazes nessa degradação, porém, em velocidade reduzida (MARTÍNEZ et al., 2005).

Alguns fungos produzem celulasas, secretando-as para fora de sua parede celular, podendo assim utilizar a D-glucose como sua fonte de energia (WILSON, 2008). No setor industrial, principalmente a indústria de papel e celulose e as indústrias sucroalcooleiras, existe um grande interesse nesses fungos para obtenção de enzimas que sejam eficazes na biodegradação de materiais lignocelulolíticos. A biodegradação de materiais lignocelulolíticos, em geral utilizando extratos de enzimas fúngicas ou os

próprios fungos, tem se destacado como um importante processo biotecnológico para aplicações industriais. As principais aplicações são o uso de enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulolítica para obtenção de açúcares fermentáveis (AMIN et al., 2018; CARVALHO et al., 2009).

Celulases fúngicas e outras hidrolases produzidas por cepas mutantes de alta secreção e cepas geneticamente modificadas vêm sendo utilizadas em inúmeras aplicações em diversos campos da indústria. Esses estudos se iniciaram a partir das celulases do fungo *Trichoderma reesei*, (TEERI et al., 1992). Majoritariamente, as celulases fúngicas utilizadas são as de *T. reesei* e *Aspergillus niger* (NEVALAINEN; PENTTILÄ, 2004). Fungos patógenos são conhecidos por produzir grandes quantidades de enzimas celulolíticas (FÉLIX et al., 2018).

Pertencente à família Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 13) é um fungo encontrado preferencialmente em regiões tropicais e subtropicais, em aproximadamente 500 hospedeiros, sendo estes majoritariamente plantas lenhosas. Suas colônias possuem coloração negras a acinzentadas com micélio aéreo abundante que pode apresentar variações de acordo com o meio de cultura utilizado (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006).

L. theobromae está relacionado a doenças em árvores frutíferas, causando apodrecimento e morte da maior parte das espécies que infecta (KINDO et al., 2010), tendo ocorrência patógena descrita em cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), graviola (*Annona muricata* L.) mamoneira (*Ricinus communis* L.), guaranazeiro (*Paullinia cupana* L.), pinheiro (*Annona squamosa* L.), pequi (*Caryocar spp* L.), entre outras (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006; RODRIGUES, 2003). Com menor frequência, é relatado como causador de ceratite fúngica e é tradicionalmente descrito como patógeno humano (SAHA et al., 2012).

FIGURA 13. Fungo *L. theobromae* cultivado em meio BDA.



1.4. Reciclagem de tecido

A indústria têxtil é responsável pela movimentação de aproximadamente 400 bilhões de dólares no mercado internacional (MENDES JUNIOR, 2017). Nas últimas décadas, houve um aumento de 47 milhões de toneladas para 90 milhões de toneladas de produção. Em uma projeção realizada pela Ellen MacArthur Foundation, estima-se que no ano de 2050, esse número chegue aos 300 milhões de toneladas (MACARTHUR, 2017).

O aumento na produção da indústria têxtil, que pode ser avaliado como um fator positivo para a economia mundial, leva também à uma preocupação em relação ao aumento de geração de resíduos derivados desta atividade. Juntos, China, Estados Unidos e Reino Unido produzem cerca de 43 milhões de toneladas anuais de resíduos têxteis (HU et al., 2018), sendo que a maior parte desses resíduos acabam indo para os aterros (NØRUP et al., 2019), onde levam de 6 a 20 anos para se decomporem (LI et al., 2019). De acordo com a ABRAPA (Associação Brasileira de Produtores de Algodão), o Brasil está entre os 5 maiores produtores de algodão do mundo, ao lado da China, Índia, EUA e Paquistão.

Nos últimos anos houve um crescimento no interesse da reciclagem dos descartes de tecido usando técnicas mecânicas, químicas e térmicas (ZAMANI et al., 2015) e mais recentemente ainda a abordagem biológica tem sido vislumbrada, onde a

reciclagem do tecido é feita por microrganismos o que representa menor impacto ambiental devido ao menor consumo de energia no processo (LI et al., 2019).

As fibras têxteis que compõem os tecidos são definidas como naturais e não naturais (artificiais e sintéticas). As fibras naturais derivadas de vegetais, como por exemplo algodão, linho, juta e rami, são compostas de principalmente celulose (HAMBY, 1965). Muitos dos tecidos utilizados na indústria têxtil usam misturas de fibras naturais e não naturais. Um estudo recente mostrou que a reciclagem de tecidos mistos algodão-poliéster usando a abordagem de hidrólise enzimática (processo biológico) e com a recuperação final de glucose leva a uma importante economia de energia (SUBRAMANIAN et al., 2020).

Um levantamento realizado por PIRIBAUER e colaboradores (2021), mostrou que existem diferentes metodologias para lidar com o problema de descarte de tecidos (PIRIBAUER; BARTL; IPSMILLER, 2021). Além disso, a hidrólise enzimática se mostra um método ambientalmente viável, uma vez que o produto dessa hidrólise seria a glucose, que pode ser posteriormente utilizada em processos de fermentação para a produção de biocombustíveis ou até mesmo a produção de matérias primas de valor mais elevado, tais como 5-hidroximetilfurfural (WANG, 2014).

Embora existam estudos que utilizam a hidrólise enzimática como uma alternativa para a hidrólise de celulose de tecidos (PIRIBAUER; BARTL; IPSMILLER, 2021; SHOJAEI; DADASHIAN; MONTAZER, 2012), geralmente estes utilizam coquetéis enzimáticos comerciais. Uma outra possibilidade é fazer o uso de micro-organismos que possam produzir essas enzimas capazes de degradar a estrutura da celulose, componente majoritário em tecidos de algodão, possibilitando a produção de produtos químicos que possuem valor comercial agregado. Nesse cenário, a viabilidade do uso de enzimas expressas por micro-organismos podem ser uma alternativa mais sustentável e de custo inferior no processo de hidrólise enzimática de tecidos de algodão.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de celulases pelo fungo *L. theobromae*. Também foram objetivos da dissertação identificar, purificar, caracterizar as celulases e avaliar a viabilidade do uso das celulases na hidrólise de tecido 100% algodão.

Objetivos específicos

- Cultivar o fungo *L. theobromae* em meio indutor de celulases;
- Determinar a atividade FPase (celulase total) nos extratos enzimáticos obtidos;
- Verificar o extrato enzimático quanto a atividade CMCase, pNPBGase e Avicelase;
- Purificação das enzimas de interesse;
- Caracterização das enzimas purificadas
- Realizar ensaios de hidrólise enzimática de tecido 100% algodão.

3. Metodologia

3.1. Material Biológico

O fungo *L. theobromae* (CDA 1169), isolado de caule de gravioleira (*Annona muricata*), Jaiba, MG, 08/05/2017 foi adquirido da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco e mantido em água estéril de acordo com o método de (CASTELLANI, 1939) em temperatura ambiente até o uso.

A transferência da cultura do fungo para placa de Petri antes dos experimentos de indução de expressão de celulases foi feita em meio de cultura batata dextrose/ágar (BDA). As placas foram mantidas em estado estático a 28 °C durante 14 dias.

3.2. Cultivo do fungo em meio indutor de celulases

Para a indução da produção de celulases, foi utilizada a metodologia adaptada de MENDELS e WEBER (1969). Para isso, 200 mL de meio de cultura constituído de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,6 g L⁻¹, KH_2PO_4 4 g L⁻¹, CaCl_2 0,6 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g L⁻¹, peptona 1,8 g L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02 g L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g L⁻¹, carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono 7,5 g L⁻¹ foram inoculados com 8 discos (diâmetro 10 mm) retirados das extremidades do micélio da placa. Posteriormente, o erlenmeyer contendo o inóculo foi incubado no *shaker* a 28°C e 150 rpm durante 30 dias. O meio de cultura contendo as enzimas secretadas foi chamado de extrato bruto (EB). A cada 48 h foi retirada uma alíquota do EB que foi submetida a teste de atividade enzimática, descrita no item 3.4.1. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental.

3.3. Isolamento e purificação das enzimas

Precipitação com sulfato de amônio

Após o período de crescimento do fungo em meio líquido, o extrato bruto (EB) foi filtrado com papel de filtro qualitativo de porosidade 3 μm . Em seguida, foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lentamente à solução até a concentração final de 80% (m/v). Após a adição do sal, o meio foi deixado sob agitação lenta durante 30 minutos, seguidos de centrifugação a 10000 g, a 4 °C durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 na proporção de 1 mL para cada 100 mL de EB. A solução foi transferida para membrana de diálise (SnakeSkin™ Dialysis tubing 3.5K MWCO, 22 mm) e submetida a diálise com solução de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (tampão A). Foram executadas 3 trocas da solução tampão, sendo a primeira de 30 min, a segunda de 1 h e a última 2 h após o início da diálise. Após a diálise, a amostra foi chamada Extrato Enzimático (EE), e guardada a -20 °C em glicerol 20%.

Cromatografia de exclusão molecular

Uma alíquota de 1 mL de EE foi aplicada em coluna de exclusão molecular de 120 mL Superdex-75 acoplada ao sistema FPLC (*Fast protein liquid chromatography-GE Healthcare*), que foi previamente equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (tampão A), acrescido de NaCl 150 mM (tampão B). A eluição isocrática foi desenvolvida em fluxo de 0,3 mL min^{-1} . A corrida cromatográfica foi acompanhada por ensaios de atividade FPase, CMCCase, Avicelase e pNPBGase (item 3.4.1), e por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

Cromatografia de troca iônica

Frações selecionadas da coluna Superdex-75 foram reunidas e aplicadas em uma coluna de troca aniônica de 1 mL DEAE Sepharose (GE Healthcare) acoplada ao sistema FPLC. A coluna foi previamente equilibrada com tampão A. A eluição foi feita com gradiente linear de 0-100% de tampão C (tampão A acrescido de 1M NaCl) e as

frações obtidas foram analisadas quanto à atividade (FPase, CMCCase, Avicelase e pNPBGase) e por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

3.4. Caracterização das enzimas

3.4.1. Atividade enzimática

Para a determinação da atividade celulolítica total, foi utilizada a metodologia de determinação de açúcares redutores totais pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Esse método consiste na redução do DNS por açúcares redutores à ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto que possui absorvância máxima em 540 nm.

A curva padrão de glucose foi feita de acordo com a metodologia de GHOSE (1987), a partir de uma solução estoque de glucose (10 mg/mL: solução padrão). Diluições foram realizadas para o preparo dos padrões de glucose utilizando tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8:

1,0 mL de padrão + 0,5 mL de tampão = 6,7 mg/mL (3,35 mg/0,5 mL).

1,0 mL de padrão + 1,0 mL de tampão = 5,0 mg/mL (2,50 mg/0,5 mL).

1,0 mL de padrão + 2,0 mL de tampão = 3,3 mg/mL (1,65 mg/0,5 mL).

1,0 mL de padrão + 4,0 mL de tampão = 2,0 mg/mL (1,00 mg/0,5 mL).

Para cada uma das soluções diluídas de glucose padrão foi feita a reação com DNS como segue: 0,5 mL de cada um dos padrões foram adicionados a 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, incubados a 50°C durante 1 hora. Em seguida, foram adicionados 3 mL de reagente DNS, e a solução foi incubada a 100°C por 15 minutos e depois colocada em banho de gelo por 5 minutos. Por fim, adicionou-se 20 mL de água. A absorvância a 540 nm de cada uma das soluções foi utilizada para a construção de uma curva linear de padrão de glucose usando o valor absoluto de glucose (mg/0,5 mL) plotada contra A_{540} .

A atividade enzimática foi calculada segundo a equação (1) (INFORSATO; PORTO, 2016):

$$UI \text{ mL}^{-1} = \frac{C \times FD \times Vt}{0,18 \times Ve \times t} \quad [\text{Eq. 1}]$$

onde:

C= concentração de açúcar produzido (mg/mL)

FD= fator de diluição

Vt= volume total da reação (mL)

0,18= fator de conversão de mol para μmol de glucose

Ve= volume de enzima (mL)

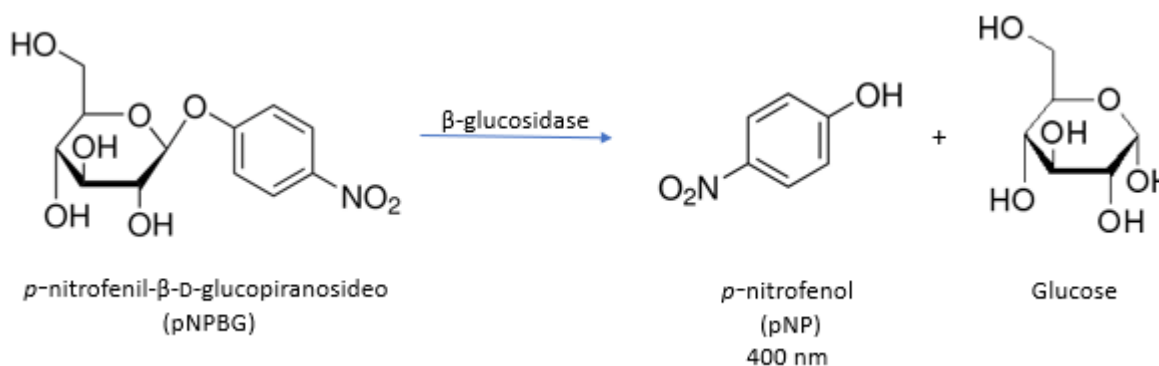
t= tempo de reação enzimática (min)

A unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto, onde a concentração da proteína foi expressa em UI mL^{-1} .

3.4.1.1. Método do *p*-nitrofenol para a determinação de atividade β -glucosidase

Para a determinação da atividade pNPBGase, utilizou-se a metodologia do *p*-nitrofenol (pNP) adaptado de STRADWICK e colaboradores (2017). O composto pNPBG é análogo à celobiose, substrato específico da enzima β -glucosidase. A hidrólise da ligação β (1 \rightarrow 4) gera glucose e pNP (Figura 14), que possui absorvância máxima em 400 nm.

FIGURA 14. Representação da hidrólise enzimática do pNPBG por β -glucosidase.



A concentração do substrato pNP liberado após a hidrólise enzimática do pNPBG foi calculada usando o coeficiente de absorvidade molar do *p*-nitrofenol de 3,57 L mol⁻¹ cm⁻¹ e empregando a equação de Lambert-Beer (Equação 2) (STRADWICK et al., 2017).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad [\text{Eq. 2}]$$

Onde A é a absorvância medida, ϵ o coeficiente de absorvidade (L mol⁻¹ cm⁻¹), c a concentração (M) e l o caminho óptico (cm).

A concentração obtida foi convertida usando a Equação 2, obtendo-se a concentração da proteína em U L⁻¹. Portanto, uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de pNP por minuto. Todas os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.1.2. Determinação de celulases totais - FPase

A avaliação da atividade celulolítica total, foi feita utilizando papel de filtro como substrato (GHOSE, 1987) pelo método do DNS (MILLER, 1959). Brevemente, uma amostra de 0,5 x 0,75 cm de papel de filtro foi adicionada à uma solução contendo 31,2 μ L de extrato bruto; 62,4 μ L de tampão citrato 50 mM pH 4,8 e encubada a 50°C durante 1 hora. Em seguida, 188 μ L de reagente DNS foram adicionados e a amostra foi levada a banho seco a 100°C por 15 minutos. Logo após, a amostra foi levada a banho de gelo e posteriormente adicionou-se 1250 μ L de água. Fez-se uma pausa de 20 minutos e então foi lida a absorvância utilizando uma curva padrão de glucose. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental.

3.4.1.3. Determinação de atividade Endoglucanase – (CMCase)

A determinação de atividade específica para endoglucanase foi realizada utilizando-se CMC como substrato (GHOSE, 1987), também pelo método do DNS (MILLER, 1959). A solução reacional continha 31,25 μ L de extrato enzimático e 31,25 μ L

de substrato CMC 0,03125% que foi preparado em tampão citrato 50 mM pH 4,8, e foi incubada a 50°C durante 30 minutos. Em seguida, 187,5 µL de reagente DNS foram adicionados e a amostra foi levada a banho seco a 100°C por 5 minutos. Logo após, a amostra foi resfriada a 4°C e posteriormente adicionou-se 1250 µL de água. Por fim, foi lida a absorbância utilizando uma curva padrão de glucose para a determinação de concentração de açúcar redutor liberado na reação.

3.4.1.4. Determinação de atividade Exoglucanase – (Avicelase)

A determinação de atividade específica para exoglucanase foi realizada utilizando-se celulose microcristalina (Avicel®) (adaptado de MUKHERJEE; KARMAKAR; RAY, 2011) e a detecção da atividade foi feita pelo método do DNS (MILLER, 1959). A solução reacional continha 31,25 µL de extrato enzimático e 31,25 µL de substrato Avicel® 10 mM que foi preparado em água MilliQ, e foi incubada a 50°C durante 15 minutos. Em seguida, 187,5 µL de reagente DNS foram adicionados e a amostra foi levada a banho seco a 100°C por 15 minutos. Logo após a amostra foi resfriada a 4°C e posteriormente adicionou-se 1250 µL de água. Por fim foi lida a absorbância utilizando uma curva padrão de glucose.

3.4.1.5. Determinação de atividade β-glucosidase – (pNPBGase)

A determinação de atividade específica para a β-glucosidase foi feita utilizando-se o reagente *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (pNPBG), adotando a metodologia de determinação de *p*-nitrofenol adaptada de HERR (1979). A solução reacional continha 25 µL de extrato enzimático, 225 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 250 µL de substrato pNPBG 2 mM, que foi preparado com o tampão acetato, e foi incubada a 37°C por 10 minutos. Em seguida, 500 µL de Na₂CO₃ 1M foram adicionados para interromper a reação. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 400 nm.

3.4.2 Ensaio de Zimografia

Com o intuito de detectar as bandas de proteínas correspondentes às celulases, a técnica de zimografia foi utilizada. Para detecção das enzimas por zimografia, foram preparados géis de bis/acrilamida 12% (m/v), conforme a metodologia adaptada de LAEMMLI (1970). Contudo, algumas modificações foram realizadas para que após a eletroforese, a atividade das proteínas pudesse ser recuperada. As modificações realizadas foram:

- Foi utilizado apenas 10% da quantidade de SDS, tanto para o gel de corrida quanto para o gel de empilhamento. Para o gel de corrida, a metodologia original usa 45 µL de SDS 10% (m/v) e o gel de empilhamento 20 µL. Sendo assim, foram utilizados 4,5 e 2 µL de SDS nos géis de zimografia;
- Adição do substrato específico das enzimas à receita do gel [CMC 0,1% (m/v), pNPBG 2 mM, Avicel© 0,3% (m/v)];
- As amostras foram acrescidas de tampão de amostra desnaturante [tampão Tris-HCl 1M, pH 6,8 1,2% (v/v), β-mercaptoetanol 1% (m/v), SDS 0,4% (m/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,02% (m/v)] na proporção 15:1 (amostra: tampão) e aplicadas diretamente no gel, excluindo a etapa de aquecimento durante 5 min a 100 °C;

A corrida de eletroforese foi realizada a temperatura ambiente, sendo aplicada uma voltagem de 80 V até as amostras passarem pelo gel de empilhamento e entrarem no gel de resolução, aumentando a voltagem para 120 V no restante da corrida (GONÇALVES; STEINER, 1996).

Após o término da corrida de eletroforese foi realizado o procedimento de renaturação das proteínas descrito por PETERSON; GRINYER; NEVALAINEN (2011) e MIHAJLOVSKI e colaboradores (2015). Para isso, os géis foram lavados com solução de Triton X-100 1% para total remoção do SDS e posteriormente com água MilliQ, sendo realizadas três trocas a cada 10 minutos. Em seguida, os géis foram incubados de acordo com o seu substrato. Ao gel de CMC foi utilizado tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 durante 1 hora a temperatura ambiente. Ao gel de pNPBG, tampão acetato de sódio 50

mM pH 5,0 a 37 °C durante 1 hora. Ao gel de Avicel[®], tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 durante 1 hora a 80°C.

Para a detecção da atividade CMC_{Case} e Avicelase, foram utilizados 50 mL de uma solução de Vermelho Congo 1% (m/v) sob agitação durante 15 minutos, descartada e acrescida de solução de NaCl 1M para descorar durante 10 minutos. A detecção da atividade pNPBGase foi feita utilizando uma placa de UV no fotodocumentador, pois o *p*-nitrofenol produzido na reação é detectado a 400 nm (STRADWICK et al., 2017).

3.4.3. Avaliação da atividade enzimática em função do pH e temperatura

Para as três enzimas purificadas, o valor de pH ótimo foi determinado seguindo os métodos descritos no item 3.4.1 utilizando-se tampão citrato-fosfato (tampão McIlvaine) para a faixa de 3,0 a 8,0, tampão de glicina 100 mM para a faixa de 9,0 a 10,0 e tampão fosfato de sódio 100 mM para pH 11,0. As reações foram realizadas em triplicada (n=3).

A determinação da temperatura ótima foi realizada posteriormente nos respectivos pH ótimos das enzimas. A reação enzimática (descrita no item 3.4.1) foi realizada variando-se a temperatura de 28°C a 70°C. As reações foram realizadas em triplicada (n=3).

3.5. Estudos da hidrólise de tecido de algodão pelas enzimas

Para este estudo, a amostra utilizada foi o extrato enzimático (EE, amostra após precipitação com sulfato de amônio, ressuspensa em tampão e dialisada).

3.5.1. Avaliação da atividade enzimática do EE em função do pH e temperatura

Similarmente à determinação das enzimas purificadas descrito no item 3.4.1 do presente trabalho, foi realizado teste de atividade FPase no extrato enzimático. Os

ensaios foram realizados em diferentes valores de pH utilizando-se tampão citrato-fosfato (tampão McIlvaine) para a faixa de 3,0 a 8,0, tampão de glicina 100 mM para a faixa de 9,0 a 10,0 e tampão fosfato de sódio 100 mM para pH 11,0. As reações foram realizadas em triplicada (n=3).

A determinação da temperatura ótima foi realizada posteriormente nos respectivos pH ótimos das enzimas. A reação enzimática (descrita no 3.4.1) foi realizada variando-se a temperatura de 28°C a 70°C. As reações foram realizadas em triplicata (n=3).

Para avaliar a atividade das enzimas na hidrólise de tecido de algodão, o tecido (Peripan©) foi previamente lavado com solução de extran 1% (v/v) a 100°C durante 10 min, enxaguado com água MilliQ e ressubmetido a água MilliQ a 100°C durante 10 min. Após esse processo, o tecido foi seco em estufa a 75°C durante 2 dias. O tecido lavado e seco foi triturado em moinho de facas.

3.5.2. Caracterização do tecido

Inicialmente, o tecido utilizado foi caracterizado através das técnicas de DSC, FTIR e TGA visando a caracterização química e térmica o substrato da hidrólise, em colaboração com a Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz e da mestranda Isabelly Bertochi Veroneze do Departamento de Química da UFSCar.

3.5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para a análise de calorimetria exploratória diferencial, utilizou-se o equipamento da marca NETZSCH, modelo Maia 203 F3. Foram utilizados 5,4 mg de amostra com uma rampa de aquecimento que variou de 20 a 390 °C em atmosfera de nitrogênio com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

3.5.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foi realizada em equipamento da marca Thermo Scientific, linha Nicolet 6700. Os

espectros foram obtidos em números de onda com gama espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} e 64 *scans*. Essa análise teve como principal objetivo verificar as estruturas moleculares e as cadeias químicas dos constituintes presentes no tecido.

3.5.5. Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do tecido de algodão foi avaliada pela variação da massa em função da temperatura sendo realizada em equipamento da marca NETZSCH, modelo Tarsus 209 F3. Para isso, utilizou-se aproximadamente 5 mg de tecido. Foi utilizada atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL min^{-1} numa taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, partindo de 30 $^{\circ}\text{C}$ até 600 $^{\circ}\text{C}$.

3.5.6. Planejamento fatorial fracionário (n=5)

Devido ao elevado número de variáveis envolvidas na hidrólise do tecido, fez-se o uso de um planejamento fatorial a as variáveis estudadas foram: concentração da enzima (EE), concentração do substrato (tecido), pH, temperatura, tempo de reação, e também os pré-tratamento químico com NaOH e pré-tratamento físico com a autoclave.

Os experimentos foram feitos em tubos Falcon de 15 mL que foram vedados com filme de parafina plástica (Parafilm M[®]). A mistura reacional continha o volume total de 5 mL. Nessa triagem foram analisados os efeitos individuais de cada uma das variáveis, de acordo com as condições descritas na Tabela 3.

TABELA 3. Configuração dos experimentos do planejamento fatorial, visando a triagem de variáveis significativas.

	Variáveis	Mínimo	Máximo
		(-1)	(+1)
V1	[Enzima] (U/g de substrato)	2	7
V2	[Substrato] (mg/mL)	5	30
V3	Tempo (h)	12	120
V4	pH	4	8
V5	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	70
V6	Pré-tratamento	NaOH	Autoclave

Optou-se por analisar os pré-tratamentos (V6) após determinação da condição ótima obtida pelo planejamento fatorial. Com isso, os experimentos foram definidos a partir da geratriz (n=5) (Tabela 4 e 5) e a resposta, feita em triplicata (n=3), foi dada em U mL⁻¹. Esses dados geraram um gráfico de contrastes de cada uma das variáveis, sendo selecionados apenas os mais significativos para que essas variáveis fossem levadas para o planejamento fatorial completo.

TABELA 4. Configuração dos 8 experimentos realizados para a triagem das variáveis importantes na liberação de açúcares redutores na hidrólise de tecido 100% algodão, em escala codificada.

	1	2	3	4 = 12	5 = 123
Experimento	[Enzima]	[Substrato]	Tempo	pH	Temperatura
1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1
5	-1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1
8	1	1	1	1	1

TABELA 5. Configuração dos 8 experimentos realizados para a triagem das variáveis importantes na liberação de açúcares redutores na hidrólise de tecido 100% algodão, em escala real.

	1	2	3	4 = 12	5 = 123
Experimento	[Enzima]	[Substrato]	Tempo	pH	Temp.
1	2	5	12	8	30
2	7	5	12	4	70
3	2	30	12	4	70
4	7	30	12	8	30
5	2	5	120	8	70
6	7	5	120	4	30
7	2	30	120	4	30

8	7	30	120	8	70
---	---	----	-----	---	----

O planejamento fatorial completo foi realizado de maneira similar, com adição dos pontos centrais e axiais. Com esses dados, foi gerada uma superfície de resposta que foi utilizada nos experimentos de validação do método.

4. Resultados e discussões

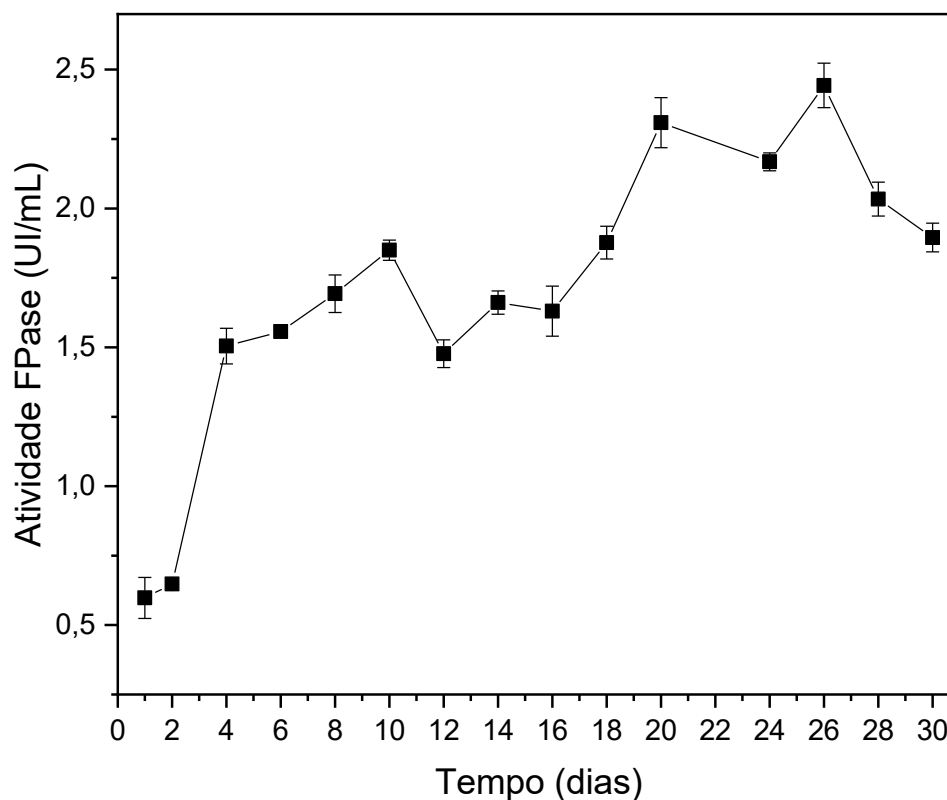
4.1. Avaliação da produção de celulases pelo fungo *L. theobromae*

O fungo filamentoso *L. theobromae* é um patógeno de plantas frutíferas como mangueira, cajueiro, videira e cacauzeiro entre diversas outras importantes plantações. A sua infecção leva à podridão e à morte, e a ocorrência deste fungo tem um forte impacto na economia das comunidades que têm essas agriculturas como fonte de renda. O fungo também tem sido associado a cancrios em eucaliptos e *Acácia mangium*, onde as perdas de produtividade de madeira podem chegar a 63% (BORGES, 2014).

A capacidade de *L. theobromae* infectar as plantas deve estar associada à sua capacidade de produzir enzimas que degradam a parede celular das mesmas. Um estudo descrito na literatura com diferentes cepas de *L. theobromae* mostrou, através de experimentos em placa de ágar e zimografia, a produção de celulases, lacases, xilanases, pectinases e pectina liase (FÉLIX et al., 2018).

No presente trabalho, com o objetivo de avaliar as possíveis celulases produzidas pelo fungo *L. theobromae*, este foi cultivado durante 30 dias e a atividade para celulase total (atividade FPase) foi avaliada através de ensaios enzimáticos do meio de cultura a cada 48 h frente à papel de filtro como substrato. Os resultados, mostrados na Figura 15, indicam o máximo de atividade no 26^o dia de crescimento da cultura. Também é possível observar máximos de atividade no 10^o e 20^o dias. Para dar continuidade aos estudos de isolamento das enzimas, optou-se para definir o décimo dia de cultivo do fungo como o período para concluir este experimento e utilizar o meio de cultura para isolar as enzimas.

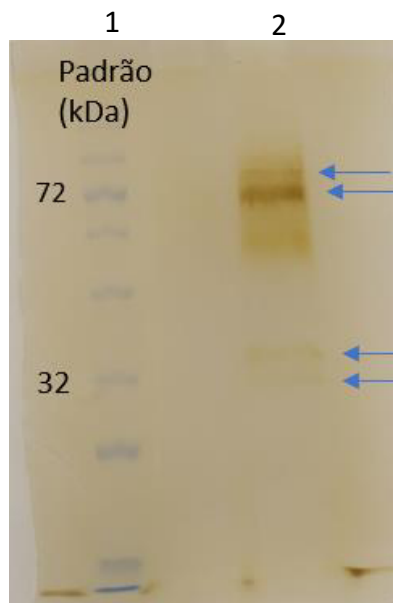
FIGURA 15. Análise da atividade enzimática do extrato bruto de *L. theobromae* frente ao papel de filtro como substrato, durante 30 dias.



Definido que os próximos experimentos seriam feitos com a cultura após 10 dias de incubação, o meio de cultura foi filtrado utilizando papel de filtro e submetido a uma primeira etapa de purificação, que também funcionou para concentrar a amostra, que foi precipitado com 80% de sulfato de amônio. O precipitado proteico obtido foi ressuspenso em tampão, dialisado contra tampão e denominado Extrato Enzimático (EE). Esta amostra apresentou 6 UI mL^{-1} medida frente a papel de filtro como substrato (atividade de celulase total).

O EE foi analisado por SDS-PAGE sendo possível observar bandas de proteínas com massa molecular entre 32 e um pouco acima de 72 kDa (Figura 16).

FIGURA 16. Análise do extrato bruto em SDS-PAGE 12% das enzimas secretadas para o meio extracelular pelo fungo *L. theobromae*. 1: padrão de massa molecular; 2: amostra do extrato bruto.



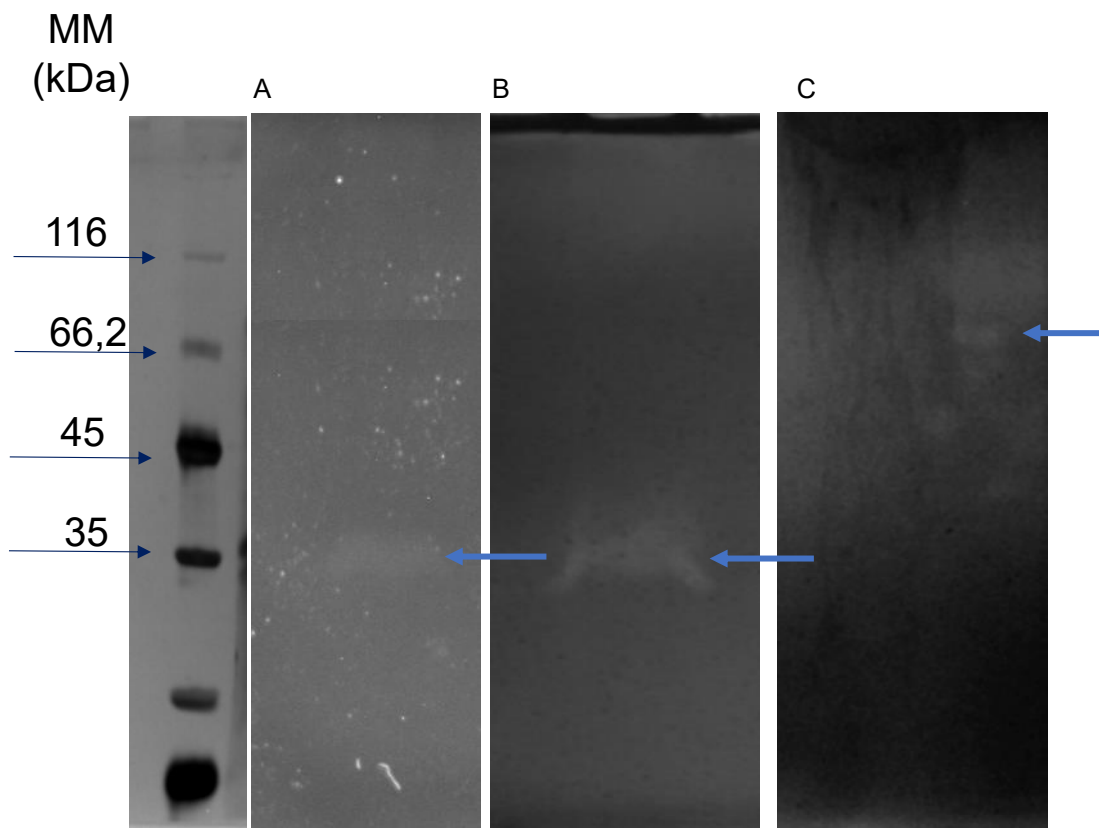
Para identificar quais proteínas estariam sendo expressas e secretadas para o meio externo pelo fungo, utilizou-se análise por zimografia, usando substratos específicos para atividade CMCase, pNPBGase e Avicelase.

No experimento utilizando CMC como substrato (Figura 17, A) foi observado um sítio de atividade em torno da região de 35 kDa. De maneira similar, utilizando o pNPBG (Figura 17, B) também foi observado um sítio de atividade na mesma região. Dessa forma, não foi possível distinguir a atividade CMCCase da pNPBGase. Porém, foi possível determinar que a endoglucanase e a β -glucosidase tinham tamanhos próximos em torno de 35 kDa.

No zimograma utilizando Avicel® como substrato (Figura 17, C) foi possível observar um sítio de atividade na região de 66 kDa, que aparece distorcido devido a não solubilidade do substrato, fazendo com que as bandas ficassem distorcidas.

A partir desses experimentos foi possível identificar quais eram as bandas de interesse e estimar a massa molecular de cada uma das enzimas endoglucanase e a β -glucosidase em aproximadamente 35 kDa e exoglucanase com 66 kDa.

FIGURA 17. Zimogramas utilizando (A) CMC, (B) pNPBG e (C) Avicel[®] como substratos. MM, padrão de massa molecular; Amostra: Extrato Enzimático.



4.2. Purificação das celulasas produzidas pelo fungo *L. theobromae*

Determinadas as bandas referentes às celulasas de interesse, o EE foi submetido a uma outra etapa de purificação, em uma coluna de exclusão molecular Superdex-70 acoplada ao sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography- GE Healthcare*). Antes de se iniciar a purificação, 1 mL do EE foi descongelado em banho de gelo e centrifugado a 10000 g, a 4°C durante 5 minutos.

O cromatograma obtido mostra um clássico cromatograma de proteínas, com diversos picos que possivelmente correspondem a diferentes proteínas, Figura 18. A corrida cromatográfica foi acompanhada por SDS-PAGE e ensaios de atividade com os três diferentes substratos, para identificar as enzimas. De acordo com o gel de eletroforese, Figura 19, as proteínas referentes aos picos 2 e 3 apresentam massa

molecular aproximada de 35 kDa. Através dos ensaios enzimáticos foi possível identificar a proteína eluída no pico 2 como tendo atividade endoglucanase e a eluída no pico 3 com atividade β -glucosidase (Tabela 6).

Com a ferramenta do software do fotodocumentador foi possível estimar a massa molecular de ambas as enzimas, tendo a endoglucanase 36,14 kDa e a β -glucosidase 33,40 kDa. Esse resultado se mostra de acordo com (FÉLIX et al., 2018) que identificou uma endoglucanase de *L. theobromae* com massa molecular aproximada de 37 kDa.

Em um levantamento bibliográfico feito por WILLIS e colaboradores (2010) acerca das endoglucanases produzidas por diferentes microrganismos foi observado que, em média, seus tamanhos variam de 29 a 80 kDa. Neste mesmo trabalho, para as β -glucosidases observou-se tamanhos que variam de 27 a 106 kDa (WILLIS; OPPERT; JURAT-FUENTES, 2010).

FIGURA 18. Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular do Extrato Enzimático obtida de *L. theobromae*. Eluição isocrática com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; fluxo: 0,5 mL min⁻¹; amostra: 1 mL de EE.

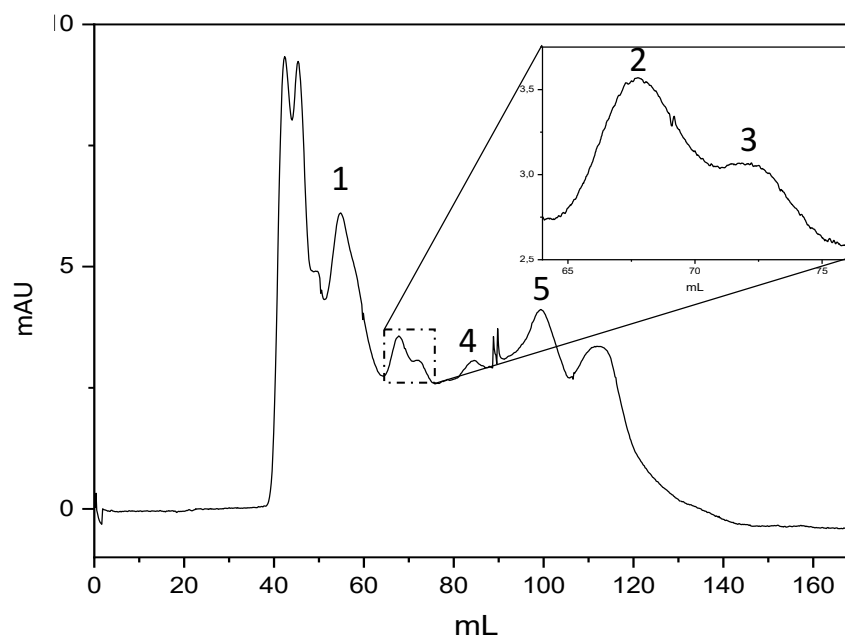
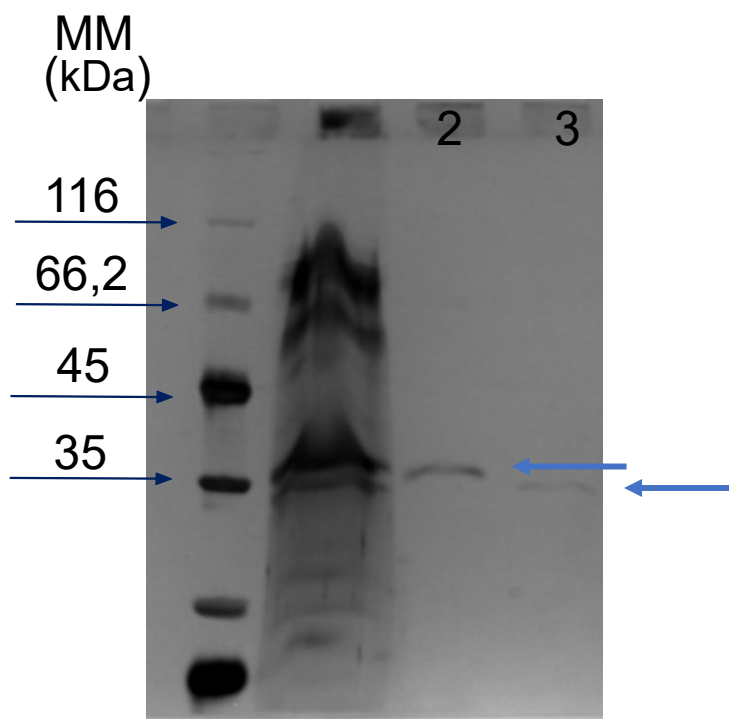


FIGURA 19. Análise em SDS-PAGE das amostras eluídas nos picos 2 e 3 da coluna de exclusão molecular. MM, padrão de massa molecular; poço 1, Extrato Enzimático aplicado na coluna; poço 2, amostra do pico 2 e poço 3, amostra do pico 3 do cromatograma.



As frações eluídas no pico 1 do cromatograma (Figura 18) apresentaram atividade Avicelase. No entanto, a amostra apresentava mais de uma banda no gel de eletroforese (dados não mostrados), e assim, as frações eluídas no pico 1 foram reunidas e aplicadas em uma coluna de troca aniônica, QFF. Após diversas tentativas de separação das proteínas, optou-se por utilizar uma outra coluna de troca aniônica, uma DEAE Sepharose FF, e após otimização de gradiente salino obteve-se finalmente um cromatograma com boa separação (Figura 20). A cromatografia foi acompanhada por ensaio frente à Avicel e as frações do pico indicado na Figura 20 com o símbolo * apresentou atividade. Análise por SDS-PAGE (Figura 21) desta fração mostrou uma banda de aproximadamente 78,5 kDa, e, portanto, foi possível purificar uma exoglucanase. A tabela 6 mostra as massas moleculares das enzimas isoladas.

FIGURA 20. Cromatograma obtido da coluna de troca aniônica DEAE Sepharose FF. (*) banda cromatográfica que apresentou atividade Avicelase. Tampão A: fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; Tampão B: fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 acrescido de 1M de NaCl; fluxo: 1 mL min⁻¹.

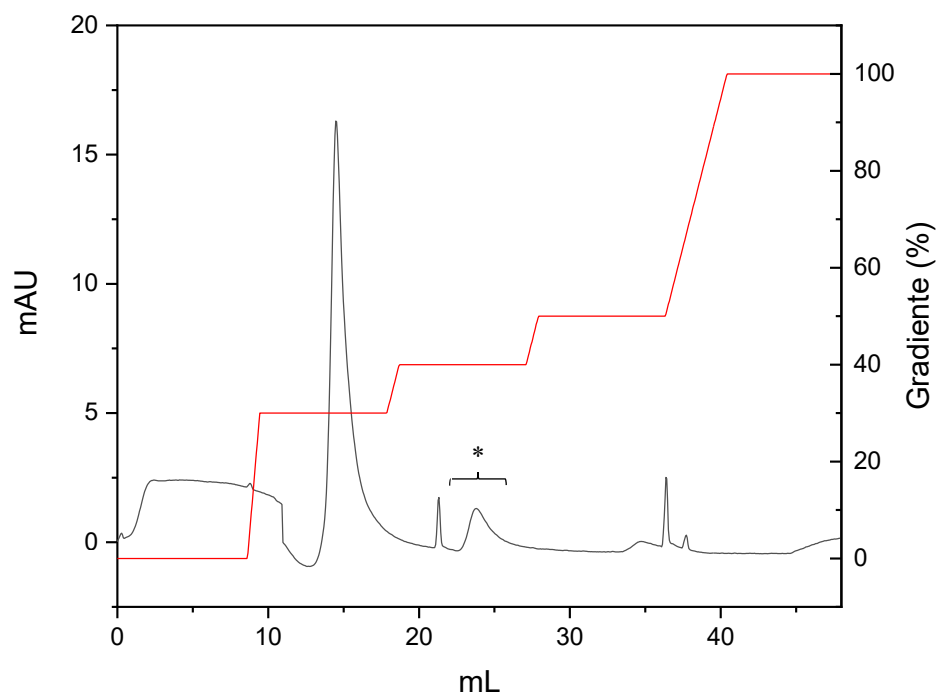


FIGURA 21. Análise por SDS-PAGE da exoglucanase eluída da coluna DEAE Sepharose FF. MM, padrão de peso molecular; poço 1, amostra da banda cromatográfica (*) com atividade Avicelase.

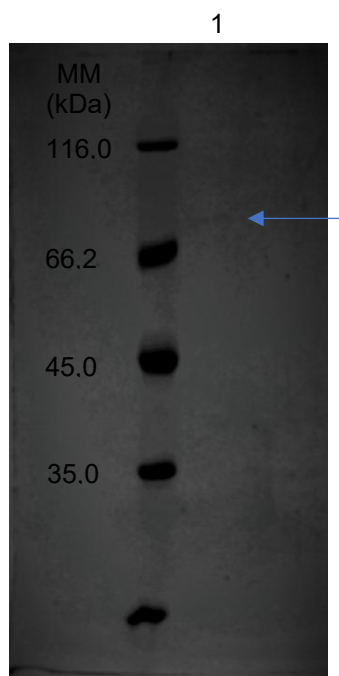


TABELA 6. Massa molecular estimada das enzimas eluídas nos picos 1, 2 e 3 da cromatografia de exclusão molecular.

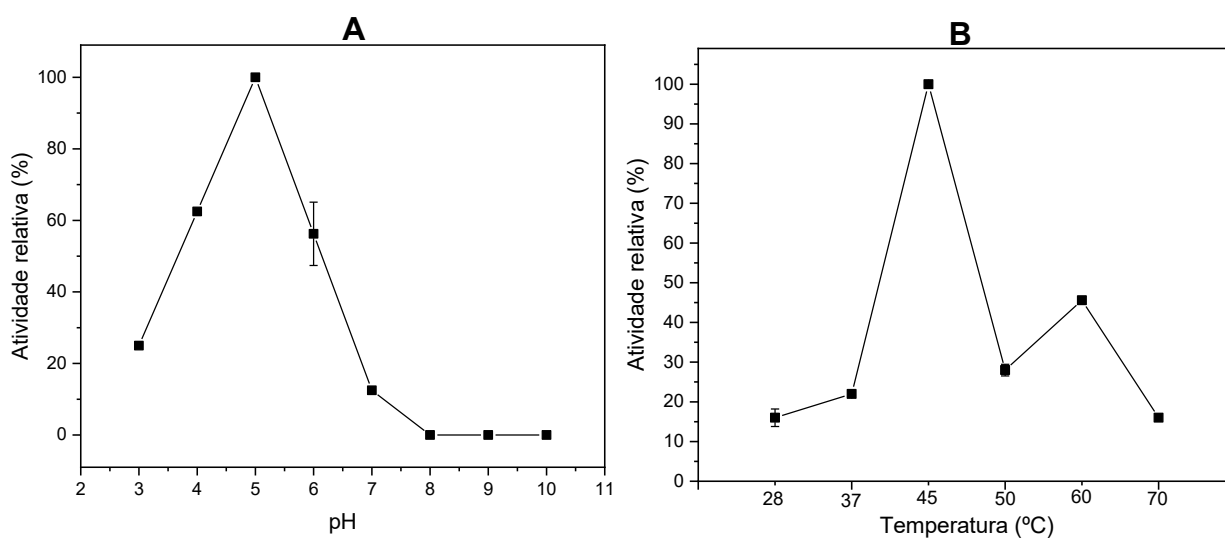
Enzima	Fração eluída da Superdex-75 (pico)	Massa molecular (kDa)
Exoglucanase	1	78,5
Endoglucanase	2	36,1
β -glucosidase	3	33,4

4.3. Caracterização bioquímica das celulases produzidas pelo fungo *L. theobromae*

A caracterização bioquímica das celulases purificadas foi feita avaliando-se a influência do pH e da temperatura nas suas atividades. Para a análise de pH variou-se o pH no intervalo de 3,0 e 11,0 utilizando os substratos específicos (CMC, pNPBG e Avicel®). Esse intervalo de pH foi definido levando em consideração os dados presentes na literatura de endoglucanases que possuem melhor atividade em pHs alcalinos (CHAUDHARY; PRASANNA; BHATNAGAR, 2013). Para a análise do efeito da temperatura, selecionou-se o melhor pH e variou-se a temperatura de incubação da reação.

As melhores condições de pH e temperatura para a β -glucosidase de *L. theobromae* foi pH 5,0 e 45 °C (Figura 22). Esse dado está de acordo com UMEZURIKE (1977), que determinou que a melhor atividade ocorria entre pH 4 e 5.

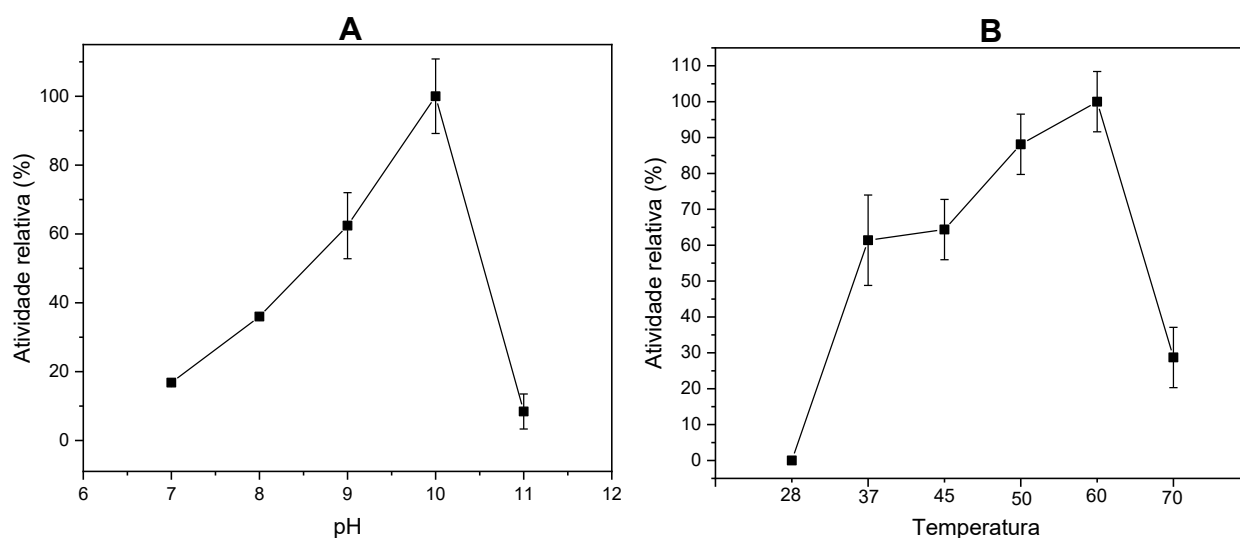
FIGURA 22. Avaliação da influência do (A) pH e (B) temperatura na atividade da β -glucosidase do fungo *L. theobromae*.



A endoglucanase de *L. theobromae* possui a melhor atividade em pH 10,0 e 60 °C (Figura 23). De acordo com dados da literatura endoglucanases apresentam um amplo intervalo de pH ótimos que variam de 5,0 a 10,0 (CHAUDHARY; PRASANNA; BHATNAGAR, 2013). Já para a análise da influência da temperatura na atividade

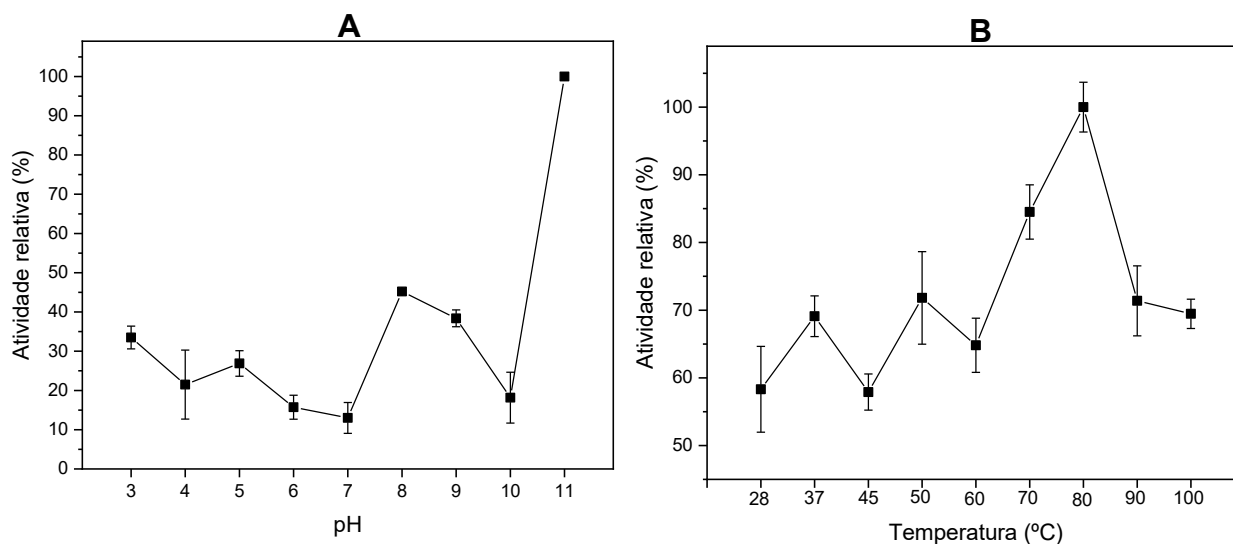
enzimática de endoglucanases, a literatura descreve enzimas com temperaturas ótimas entre 50 a 75 °C. A endoglucanase purificada neste trabalho pode ser classificada com termofílica, pois tem uma máxima atividade a 60 °C. Essa característica é interessante quando se objetiva uma aplicação biotecnológica, onde processos podem ocorrer a altas temperaturas.

FIGURA 23. Avaliação da influência do (A) pH e (B) temperatura na atividade da endoglucanase do fungo *L. theobromae*.



A exoglucanase de *L. theobromae* purificada apresenta a melhor atividade a pH 11,0 e 80 °C, Figura 24. Ao contrário de endoglucanases e β -glucosidases, que são bem descritas na literatura para uma gama de microrganismos, exoglucanases são pouco estudadas.

FIGURA 24. Avaliação da influência do (a) pH (b) temperatura na atividade exoglucanase do fungo *L. theobromae*.



A atividade de cada uma das enzimas estudadas foi avaliada nas melhores condições de pH e temperatura, sendo possível determinar a atividade em Unidades das mesmas. Na Tabela 7, encontra-se um resumo das características das enzimas.

As enzimas endo- e exoglucanases apresentam melhor atividade em temperaturas elevadas, 60 e 80°C, respectivamente, o que lhes confere uma boa aplicabilidade em processos que ocorrem a altas temperaturas, como por exemplo na indústria de detergentes onde as celulases são utilizadas para a desfibrilação dos tecidos e para isso precisam estar ativas nas condições severas que são realizadas as lavagens (SHIMONAKA et al., 2006; WANG et al., 2005). Outro processo industrial que requer enzimas estáveis nessas condições é o de destinação nas células de flotação na indústria de reciclagem de papel (SINGH et al., 2009).

A β -glucosidase estudada aqui neste trabalho é uma enzima que responde negativamente à temperaturas mais elevadas, atuando melhor a 45 °C. Geralmente, essa classe de enzima é classificada como mesofílica por apresentar melhores atividades entre 30 e 65°C, porém, inativada em temperaturas próximas de 55 a 70° (KETUDAT CAIRNS; ESEN, 2010).

As enzimas estudadas no presente trabalho, exoglucanase, endoglucanase e β -glucosidase, apresentaram atividade específica nas melhores condições de pH e temperatura igual a 3,11; 0,15 e 0,02 UI mL⁻¹, respectivamente (Tabela 7). Como citado anteriormente, o EE apresenta 6 UI mL⁻¹ para atividade celulase totais.

Segundo a literatura, fungos do gênero *Penicillium* são os melhores produtores de celulases sendo que algumas espécies apresentam atividade de celulase totais de 55 UI mL⁻¹ (VAISHNAV et al., 2018). Estudos com quatro fungos dos gêneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp mostraram atividade para celulases totais entre 0,4 e 14 UI mL⁻¹ e para a atividade β -glucosidase de 0,006 a 0,014 UI mL⁻¹ (LAKSHMI; NARASIMHA, 2012). Outro trabalho mostra atividades de celulases expressas pelo fungo *P. glabrum* endofítico de *Espeletia spp.*: endoglucanase de 1,87 UI mL⁻¹, exoglucanase 0,87 UI mL⁻¹ e β -glucosidase de 0,06 UI mL⁻¹ (CABEZAS et al., 2012). Em outro levantamento de atividade endoglucanase de diferentes fungos, investigaram atividades de 0,06 a 0,193 UI mL⁻¹ (JAHANGEER et al., 2005).

As celulases do fungo *L. theobromae* isoladas neste trabalho assim como o EE exibem atividades razoáveis quando comparadas às descritas na literatura, e para β -glucosidase esta apresenta atividade superior à maioria das descritas. Otimização das condições de produção das enzimas pelo fungo (como por exemplo crescimento em diferentes temperaturas) podem levar à expressão de celulases com maior atividade, uma vez que diversas celulases têm sido anotadas no genoma deste microrganismo (como será descrito a seguir).

TABELA 7. Resumo das propriedades das enzimas estudadas.

Enzima	Massa molecular (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Atividade (UI mL ⁻¹)
Exoglucanase	78,5	11,0	80	3,11
Endoglucanase	36,1	10,0	60	0,15
β -glucosidase	33,4	5,0	45	0,02

Recentemente, o genoma do fungo *L. theobromae* foi publicado (MENG et al., 2022), possibilitando a busca por sequências de celulases no banco de dados.

Existem 8 sequências de nucleotídeos anotadas como relacionadas à endoglucanases de *L. theobromae*, que resultam em sequências proteicas preditas de tamanhos que variam de 8 a 83 kDa (Tabela 8). Dentre as sequências preditas, as que apresentam massa molecular mais próxima da endoglucanase isolada no presente trabalho (36,1 kDa) são a XP_035373278.1 (39 kDa) e XP_035364029.1 (49 kDa).

Duas sequências foram anotadas como exoglucanases, Tabela 9, que apresentam tamanho que variam de 30 a 105 kDa. Duas sequências (XP_035363953.1 e XP_035362766.1) têm massa molecular entre 80 e 85 kDa, as mais próximas da enzima isolada neste trabalho, que apresenta 78 kDa como analisado em SDS-PAGE. Em comparação às outras duas enzimas, a classe exoglucanase é a classe de enzimas menos estudadas.

A Tabela 10 mostra as 16 sequências anotadas como β -glucosidases de *L. theobromae*, cujas massas moleculares variam de 47 a 96 kDa. Em 1975, um trabalho mostrou que uma β -glucosidases de *L. theobromae*, anteriormente referido como *B. theobromae*, possui estrutura octamérica, tendo uma lenta dissociação descrita como $(8n) \leftrightarrow 2(4n) \leftrightarrow 4(2n) \leftrightarrow 8(n)$ onde cada monômero possui tamanho aproximado de 40 kDa (UMEZURIKE, 1975). A β -glucosidase caracterizada no presente trabalho possui tamanho aproximado de 33,40 kDa, conforme análise em SDS-PAGE. Através da cromatografia em coluna de exclusão molecular (Superdex-75), observou-se que a β -glucosidase elui após a endoglucanase, citada anteriormente. Assim, esses resultados sugerem que a β -glucosidase purificada e caracterizada neste presente trabalho é monomérica.

Uma análise de alinhamento das sequências de cada classe de enzimas foi feita (resultados não mostrados), tendo sido possível determinar a identidade sequencial das enzimas (tabelas 8-10). Os resultados chamam a atenção pela baixa identidade entre as sequências de cada classe. Entre as sequências de endoglucanases, a maior identidade foi de aproximadamente 26%, para endoglucanases duas sequências compartilham 52% de identidade e o restante tem muito baixa identidade. Para β -glucosidases duas sequências apresentam 58% e as demais compartilham também baixa identidade.

TABELA 8. Sequências de nucleotídeos anotadas como de endoglucanases de *L. theobromae* no banco de dados NCBI.
nan: sem identidade sequencial.

Identificador	Identidade (%)										Massa Molecular Teórica da endoglucanase (kDa)
	100	25,99	15,3	18,23	17,95	12,5	16,67	18,05	83,4		
XP_035364731.1	100	25,99	15,3	18,23	17,95	12,5	16,67	18,05	83,4		
XP_035367626.1	25,99	100	-nan	21,48	4,35	-nan	-nan	16,48	28,1		
XP_035364798.1	15,3	-nan	100	25,41	16,11	8,06	14,62	17,02	27,6		
XP_035364029.1	18,23	21,48	25,41	100	13,87	11,48	15,67	19,92	49,4		
XP_035362583.1	17,95	4,35	16,11	13,87	100	31,58	24,65	18,54	23,5		
XP_035375353.1	12,5	-nan	8,06	11,48	31,58	100	9,84	16,67	8,7		
XP_035375240.1	16,67	-nan	14,62	15,67	24,65	9,84	100	24,09	18,4		
XP_035373278.1	18,05	16,48	17,02	19,92	18,54	16,67	24,09	100	39,0		

TABELA 9. Sequências de nucleotídeos anotadas como de exoglucanases de *L. theobromae* no banco de dados NCBI.

Identificador	Identidade (%)				Massa Molecular Teórica da exoglucanase (kDa)
	100	19,15	17,15	17,25	
XP_035365721.1	100	19,15	17,15	17,25	105,9
XP_035375495.1	19,15	100	20,68	20,83	30,7
XP_035363953.1	17,15	20,68	100	52,5	85,7
XP_035362766.1	17,25	20,83	52,5	100	82,6

TABELA 10. Sequências de nucleotídeos anotadas como de β -glucosidases de *L. theobromae* no banco de dados NCBI.

Identificador	Identidade (%)																			Massa Molecular Teórica da β -glucosidase (kDa)
	100	15,5	13,7	26,1	23,9	23,9	23,4	21,5	23,4	24,6	24,8	24,6	24,6	23,4	24,0	23,8	22,4	69,3		
XP_035374177.1	100	15,5	13,7	26,1	23,9	23,9	23,4	21,5	23,4	24,6	24,8	24,6	24,6	23,4	24,0	23,8	22,4	69,3		
XP_035374140.1	15,5	100	13,8	18,3	19,2	18,8	16,3	16,5	18,2	17,4	16,5	17,4	17,4	20,1	18,3	19,4	18,8	62,6		
XP_035367006.1	13,7	13,8	100	15,0	15,1	15,3	14,9	19,8	19,8	19,1	18,7	18,7	17,8	17,2	15,8	17,5	64,4			
XP_035374142.1	26,1	18,3	15,0	100	42,7	42,2	27,0	27,3	30,6	29,4	31,7	31,2	22,5	29,9	32,4	33,5	90,8			
XP_035367126.1	23,9	19,2	15,1	42,7	100	46,8	26,9	25,9	29,9	29,5	31,0	30,6	24,9	30,2	31,8	32,1	96,7			
XP_035375382.1	23,9	18,8	15,3	42,2	46,8	100	30,2	30,3	30,0	32,3	32,7	33,0	25,2	33,5	34,7	34,4	90,0			
XP_035367559.1	23,4	16,3	14,9	27,0	26,9	30,2	100	55,2	38,6	42,5	39,7	36,0	29,9	40,2	39,6	39,0	81,8			
XP_035364102.1	21,5	16,5	19,8	27,3	25,9	30,3	55,2	100	40,1	43,1	39,3	38,7	28,3	40,8	38,9	43,2	83,8			
XP_035368046.1	23,4	18,2	19,8	30,6	29,9	30,0	38,6	40,1	100	51,3	44,7	43,9	37,0	43,5	46,3	43,7	85,6			
XP_035364237.1	24,6	17,4	19,1	29,4	29,5	32,3	42,5	43,1	51,3	100	45,9	45,6	32,3	41,1	48,1	45,1	84,7			
XP_035367945.1	24,8	16,5	18,7	31,7	31,0	32,7	39,7	39,3	44,7	45,9	100	64,7	35,0	45,8	47,0	47,0	88,4			
XP_035368515.1	24,6	17,4	18,7	31,2	30,6	33,0	36,0	38,7	43,9	45,6	64,7	100	33,4	44,5	45,5	45,4	104,7			
XP_035374546.1	23,4	20,1	17,8	22,5	24,9	25,2	29,9	28,3	37,0	32,3	35,0	33,4	100	58,0	43,7	39,0	47,2			
XP_035370475.1	24,0	18,3	17,2	29,9	30,2	33,5	40,2	40,8	43,5	41,1	45,8	44,5	58,0	100	54,7	50,8	85,3			
XP_035366964.1	23,8	19,4	15,8	32,4	31,8	34,7	39,6	38,9	46,3	48,1	47,0	45,5	43,7	54,7	100	56,9	86,9			
XP_035372766.1	22,4	18,8	17,5	33,5	32,1	34,4	39,0	43,2	43,7	45,1	47,0	45,4	39,0	50,8	56,9	100	85,5			

4.3. Caracterização do Extrato enzimático (EE)

A amostra utilizada nos ensaios de hidrólise do tecido é o que chamamos anteriormente de Extrato Enzimático (EE): o sobrenadante do meio de cultura submetido à precipitação com sulfato de amônio, ressuspendido em tampão e dialisado para retirada do sulfato de amônio (item 4.1). A decisão de usar o EE para estes ensaios é privilegiar uma amostra que não precisa de etapas suplementares de purificação, que sempre aumentam os custos do processo.

Métodos de armazenamento do EE

Para a determinação da melhor maneira de armazenamento do EE de forma que a perda de atividade seja a mínima, foram testados diferentes métodos. Para isso, o EE foi submetido a 3 tratamentos, sendo eles: EE armazenado a 4°C, a -20°C e a -20°C com adição de 20% de glicerol. Após um período de 48 horas, as amostras de EE foram testadas para atividade FPase (Figura 25) e os resultados mostram que o EE mantém a atividade quando armazenado a -20°C com adição de 20% de glicerol. Amostras de EE armazenadas a 4 °C e -20 °C sem adição de glicerol mantiveram 83,5% e 66% da atividade, respectivamente. Sendo assim, optou-se por sempre armazenar o EE a -20°C acrescido de 20% de glicerol (v/v). Esta amostra foi avaliada após 30 dias e mostrou manter a atividade (Figura 26).

FIGURA 25. Atividade do Extrato Enzimático após 48h de armazenamento em diferentes condições. Azul: amostra fresca; Vermelho: -20°C com 20% de glicerol; Verde: 4°C ; Roxo: 20°C .

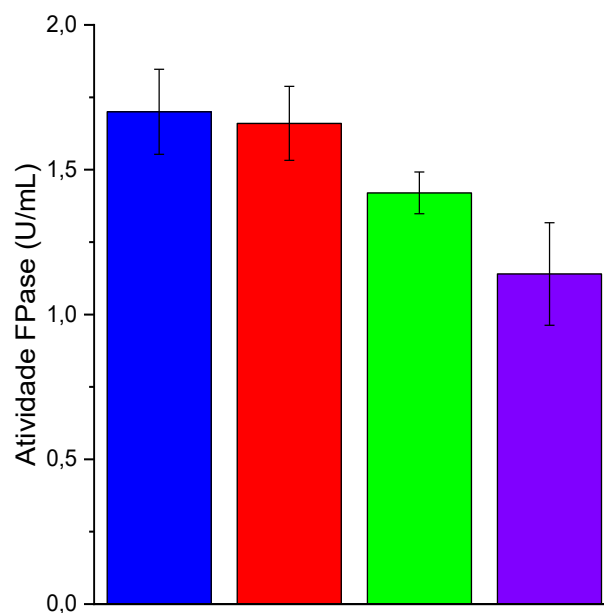
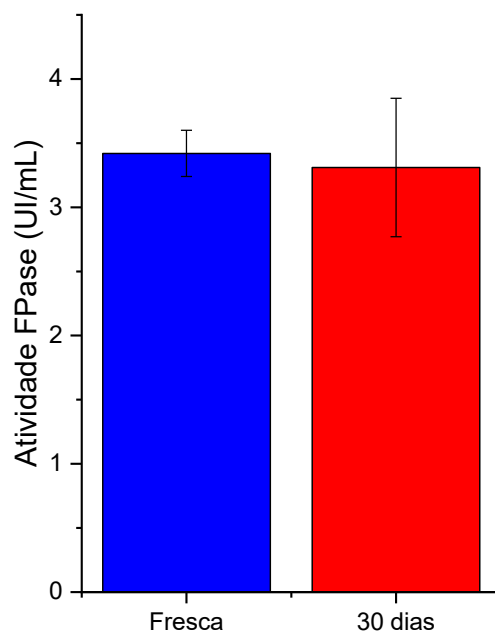


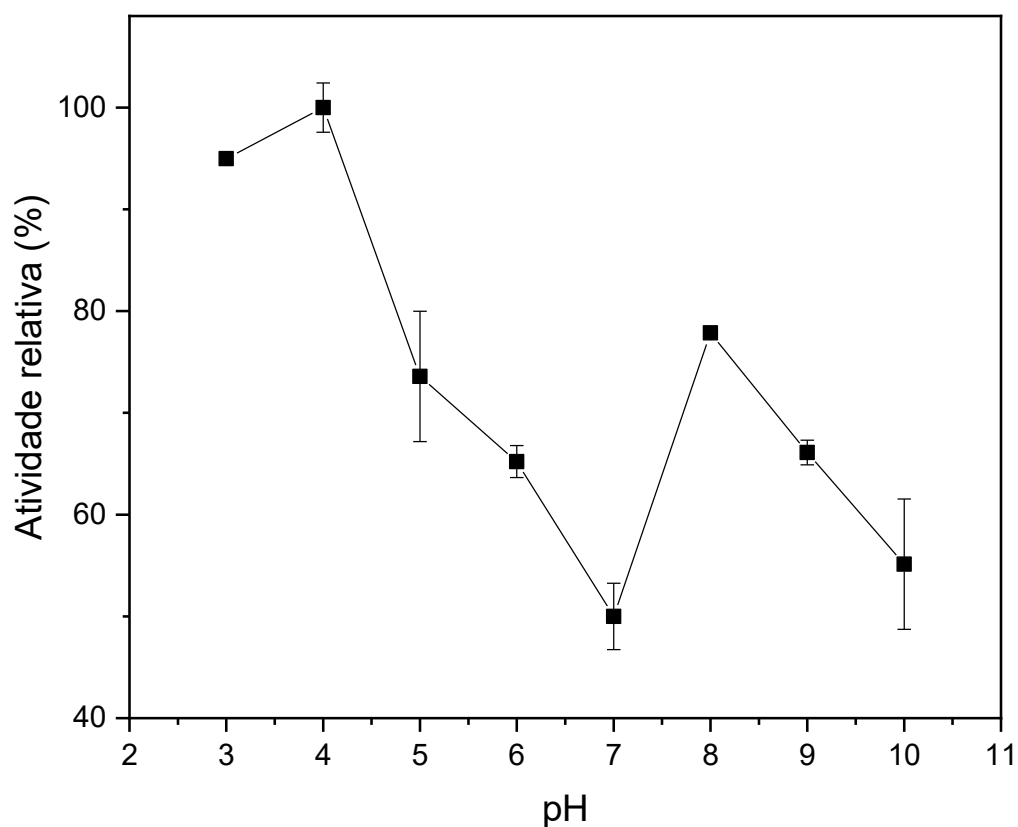
FIGURA 26. Atividade do Extrato Enzimático armazenado por 30 dias a -20°C em glicerol 20%



Análise das melhores condições de pH e temperatura para atividade do EE

Em virtude do uso do EE nos ensaios de hidrólise, foi realizada a caracterização da amostra em função do pH e da temperatura, frente a papel de filtro como substrato, ou seja, avaliando-se a atividade de celulases totais. Similarmente a caracterização feita para as enzimas purificadas, descritas em itens anteriores, variou-se o pH de 3,0 a 11,0. O melhor pH para a atividade do EE é 4, mas em pH 8,0 também há um aumento de atividade (Figura 27). Uma vez que o EE foi constituído pelas três celulases e estas apresentam pHs ótimos distintos (pHs ótimos da endoglucanase e exoglucanase são 10,0 e 11,0 respectivamente e da beta-glucosidase é 5,0), o sinergismo entre elas pode ser melhor a pH 4 e 8.

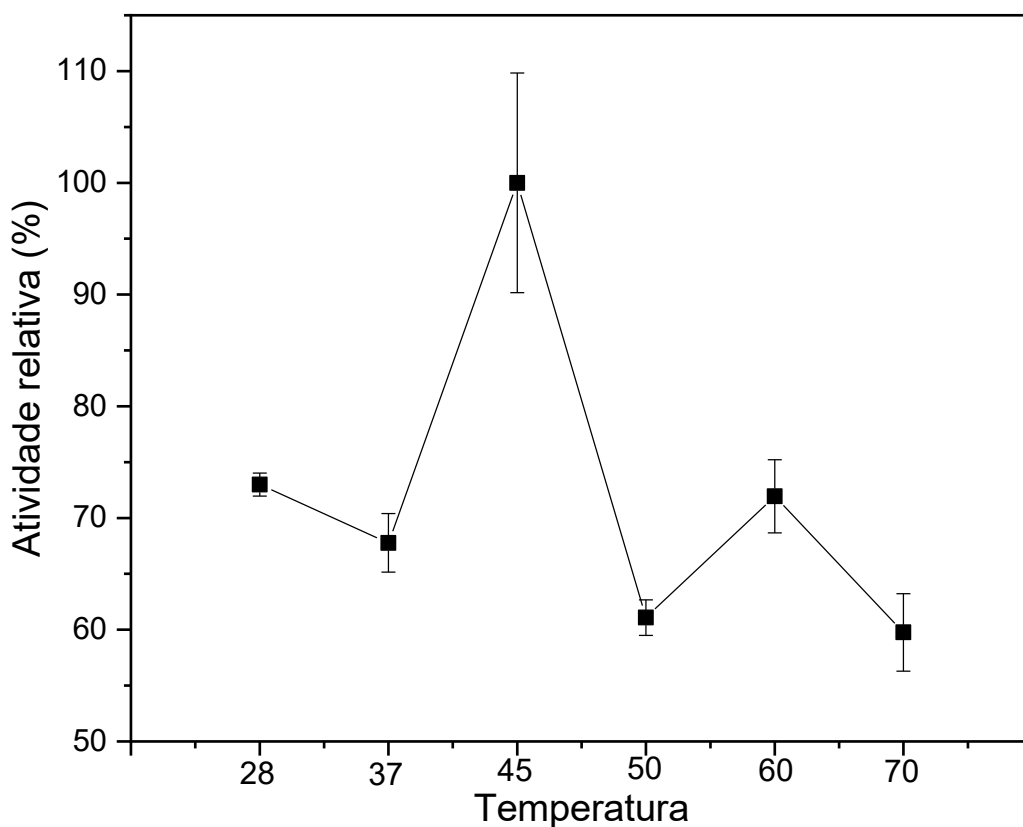
FIGURA 27. Avaliação da influência do pH na atividade FPase do Extrato Enzimático.



Para a análise da temperatura na atividade do EE, similarmente à discussão anterior, verificou-se que para o EE a temperatura de maior atividade foi em 45°C sendo que a 60°C há aumento da atividade, porém inferior à 45 °C (Figura 28). Devido a influência de enzimas com comportamentos divergentes, optou-se por considerar a melhor temperatura que abrangesse a melhor atividade das enzimas individuais, sendo as temperaturas de 45 e 60 °C.

Com essas análises foi possível definir o intervalo de interesse para serem analisados nos planejamentos fatoriais subsequentes: pH de 4 a 8 e de 30 a 70 °C.

FIGURA 28. Avaliação da influência da temperatura na atividade FPase do Extrato Enzimático.



4.4. Hidrólise de tecido de algodão

O estabelecimento de um protocolo para os ensaios de hidrólise enzimática de tecido 100% algodão (Peripan®) foi determinado com o auxílio de um planejamento fatorial. Os dados presentes na literatura para esse tipo de ensaios geralmente utilizam

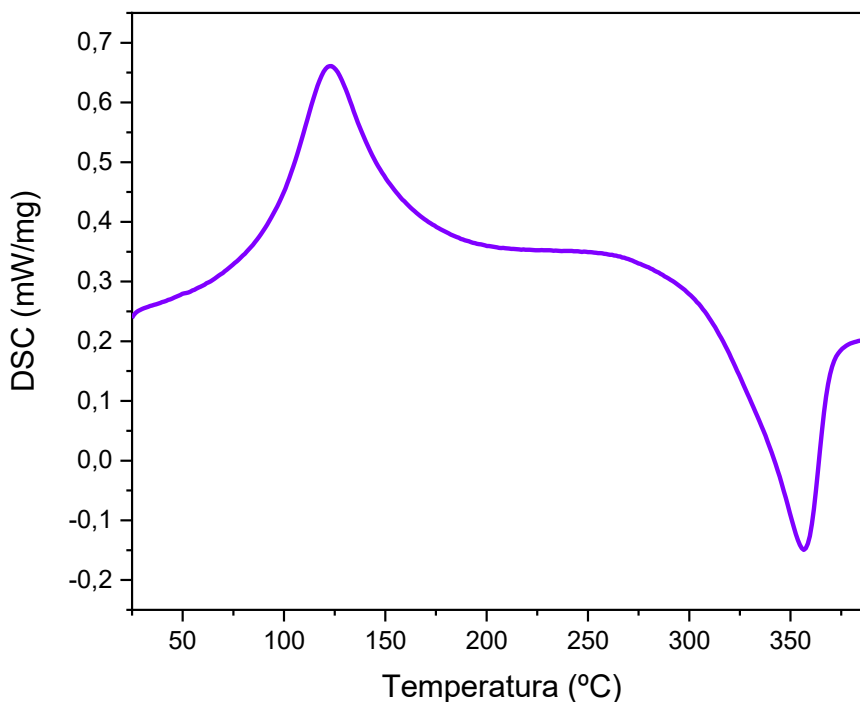
de coquetéis enzimáticos comerciais e estes possuem uma concentração alta de celulases, geralmente endoglucanases e β -glucosidases. Devido a isso, precisou-se estabelecer um protocolo para verificar a viabilidade do uso de celulases nativas nesse tipo de estudo.

Inicialmente, foi feita uma caracterização estrutural do tecido através das técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

4.4.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para verificar como o tecido em estudo se comporta perante a elevação da temperatura, foi realizada a análise por DSC (Figura 29). É possível observar dois eventos térmicos. O primeiro evento térmico corresponde a perda de água presente no tecido, uma vez que o algodão é um material higroscópico (HEARLE; MORTON, 2008). O segundo evento térmico ocorre em 350 °C sendo um evento de decomposição endotérmica característico da celulose (ZANATTA et al., 2012). Nenhum outro evento térmico foi observado no *range* de temperatura testado, fato esse que corrobora com a premissa de que o tecido é composto exclusivamente de algodão.

FIGURA 29. Curva DSC do tecido de algodão. Análise feita em atmosfera de nitrogênio e taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.



4.4.2. Análise termogravimétrica (TGA)

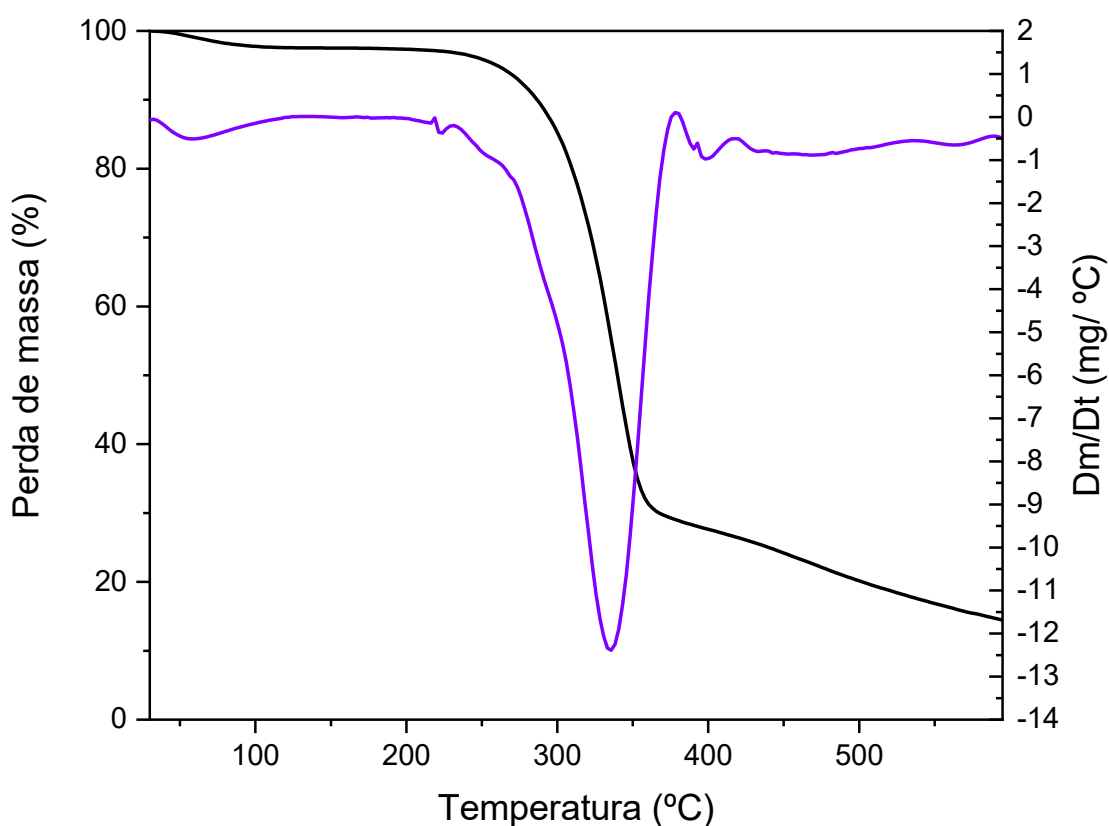
A análise das curvas de termogravimetria (Tabela 11) (Figura 30) indicam um evento térmico de perda de massa de baixa intensidade de $3,99 \pm 0,86$ observada antes de 100°C , que está relacionado à perda de água relativa da umidade presente na amostra, apesar de terem sido secas em estufa.

Após 300°C é possível verificar duas perdas de massa. Para as análises termogravimétricas de compostos lignocelulósicos, em atmosfera inerte, esperam-se 3 fases bem definidas. A primeira fase consiste na liberação da umidade na forma de vapor, podendo ocorrer até 250°C . Na segunda fase, ocorre a perda de massa pela decomposição dos carboidratos presentes na estrutura da celulose e hemicelulose, na faixa de 250 a 400°C . Acima de 400°C ocorre a perda associada a degradação da lignina até a estabilização de massa. Ainda é possível que haja a perda de coprodutos que são gerados nas fases anteriores, porém, não é possível distingui-los por acontecerem na faixa de 200 a 400°C , sendo ocluídos pelos demais eventos (BROWNE, 1958; CARVALHO et al., 2021; MATOS et al., 2000; RAMBO et al., 2015).

TABELA 11. Análise da perda de massa do tecido de algodão após hidrólise enzimática.

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	
Faixa de temperatura (°C)	0-100	230-380	> 380	Resíduo
Perda de massa (%)	3,99 ± 0,86	67,33 ± 1,15	12,48 ± 2,67	16,21 ± 2,39

FIGURA 30. Curva TG e derivada primeira da curva TG para o tecido de algodão. Análise feita em atmosfera de nitrogênio e taxa de 10°C min⁻¹.



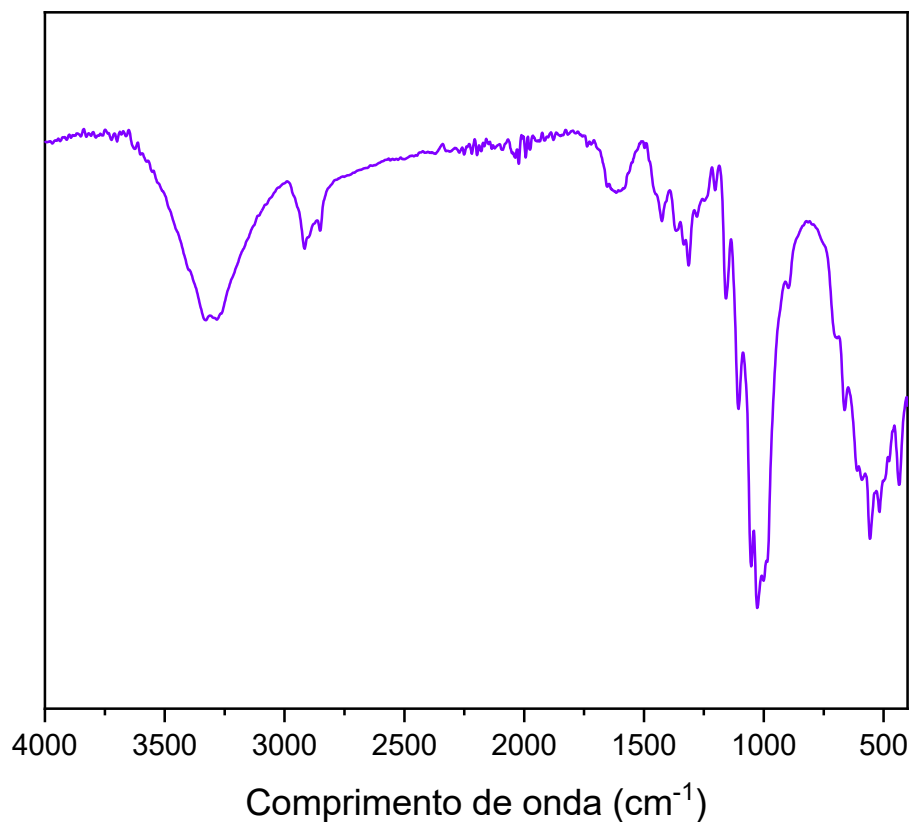
4.4.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para complementar a caracterização da composição do tecido, também foi realizada a análise por FTIR (Figura 31). A partir do gráfico apresentado é possível verificar na região de 1000 cm⁻¹ os picos de absorção do grupo éter (C-O-C) presentes

na estrutura da celulose e hemicelulose. Na região de 1200-1300 cm^{-1} é possível observar um pico de absorção característico do grupo acetil presente na estrutura da hemicelulose (ALBINANTE; PACHECO; VISCONTE, 2013). Na região de 1600 cm^{-1} observa-se um pico referente a carbonila, em 1500 cm^{-1} picos referentes a anéis aromáticos e em 2000 cm^{-1} referentes a banda de combinação harmônica de anéis aromáticos, característicos da lignina (TSERKI et al., 2005). Por fim, na região de 3200 cm^{-1} têm-se um pico referente aos grupos hidroxilas.

Com essa análise foi possível verificar que, apesar de o tecido ser comercializado como sendo 100% algodão, existe a presença de hemicelulose e lignina nas fibras. Contudo, a intensidade dessas absorções características indica que estes estão em menor quantidade.

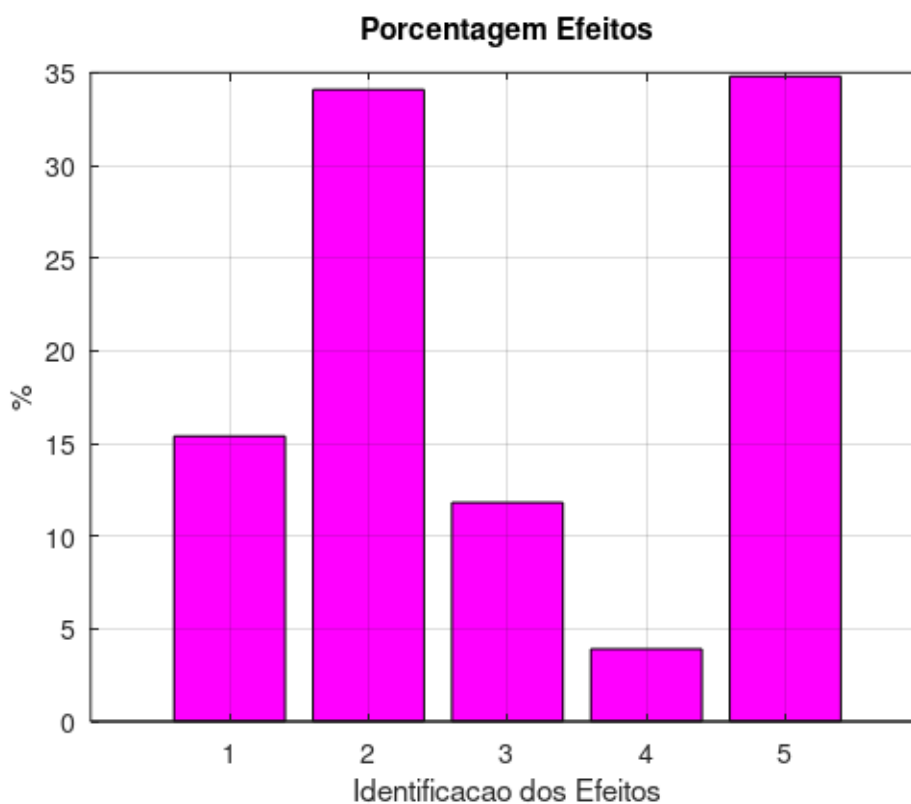
FIGURA 31. Espectro de FTIR do tecido de algodão.



4.4.4. Planejamento fatorial fracionário (n=5) para determinação das variáveis mais significativas para a hidrólise do tecido pelo EE

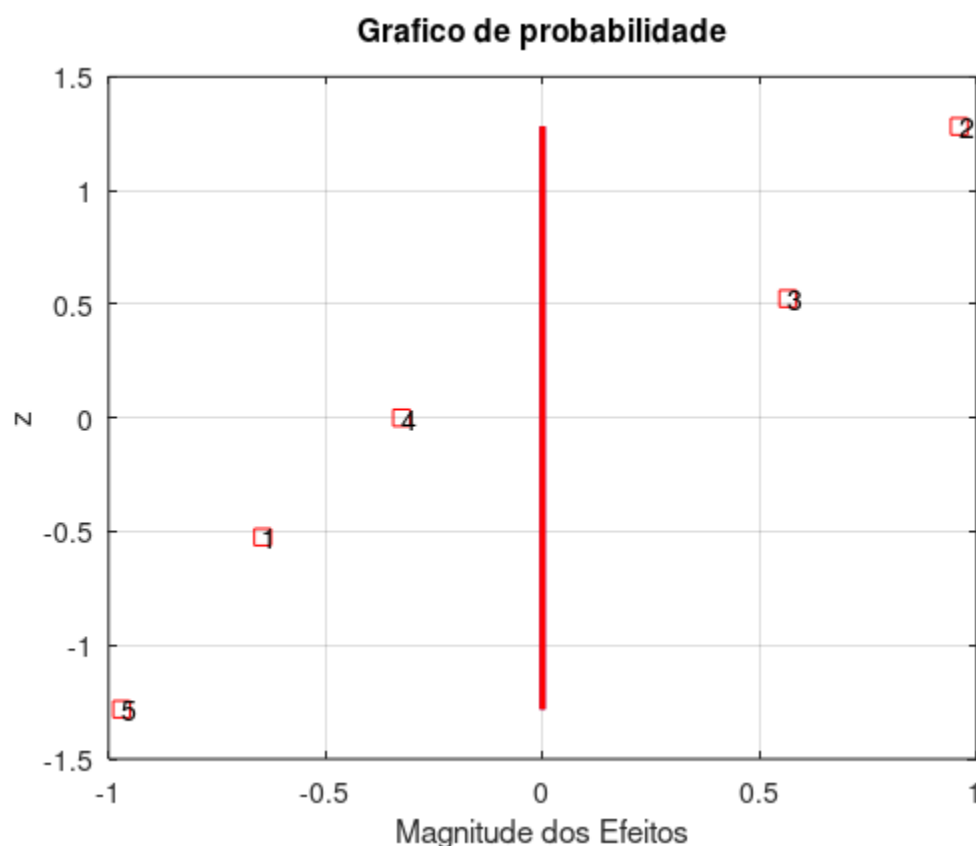
Devido ao grande número de variáveis que podem interferir na hidrólise enzimática de tecido, um estudo fatorial foi planejado. Assim, as reações enzimáticas usando o EE e o tecido como substrato foram desenvolvidos, nas condições escolhidas. Inicialmente foi feito um planejamento fatorial fracionário para que fossem selecionadas apenas as variáveis de maior impacto nos ensaios de hidrólise, que foram [Enzima], [Substrato], tempo de reação, pH e temperatura (1, 2, 3 e 5, respectivamente). Após as reações, leitura de absorbância e cálculo das atividades do EE, estes dados foram analisados (Figura 32), verificando-se que os efeitos das variáveis [Substrato] e tempo de reação eram os mais significativos.

FIGURA 32. Análise dos efeitos das variáveis do planejamento fatorial fracionário (n=5). 1: [Enzima], 2: [Substrato], 3: Temperatura, 4: pH, 5: Tempo



O gráfico de probabilidade (Figura 33) também aponta que a variável 2 ([Substrato]) possui melhor impacto quando está no nível alto +1, isto é, quando trabalhada com a maior concentração de substrato. Essa constatação implica que quanto mais substrato for colocado, maior seria a quantidade de açúcares redutores liberados. Em função disso, optou-se por fixar a quantidade de substrato usada nos ensaios de hidrólise posteriores no nível alto +1 (30 mg/ mL). Com isso, uma variável já foi eliminada, a [substrato].

FIGURA 33. Análise da probabilidade dos efeitos das variáveis obtido no planejamento fatorial fracionário (n=5). 1: [Enzima], 2: [Substrato], 3: Temperatura, 4: pH, 5: Tempo

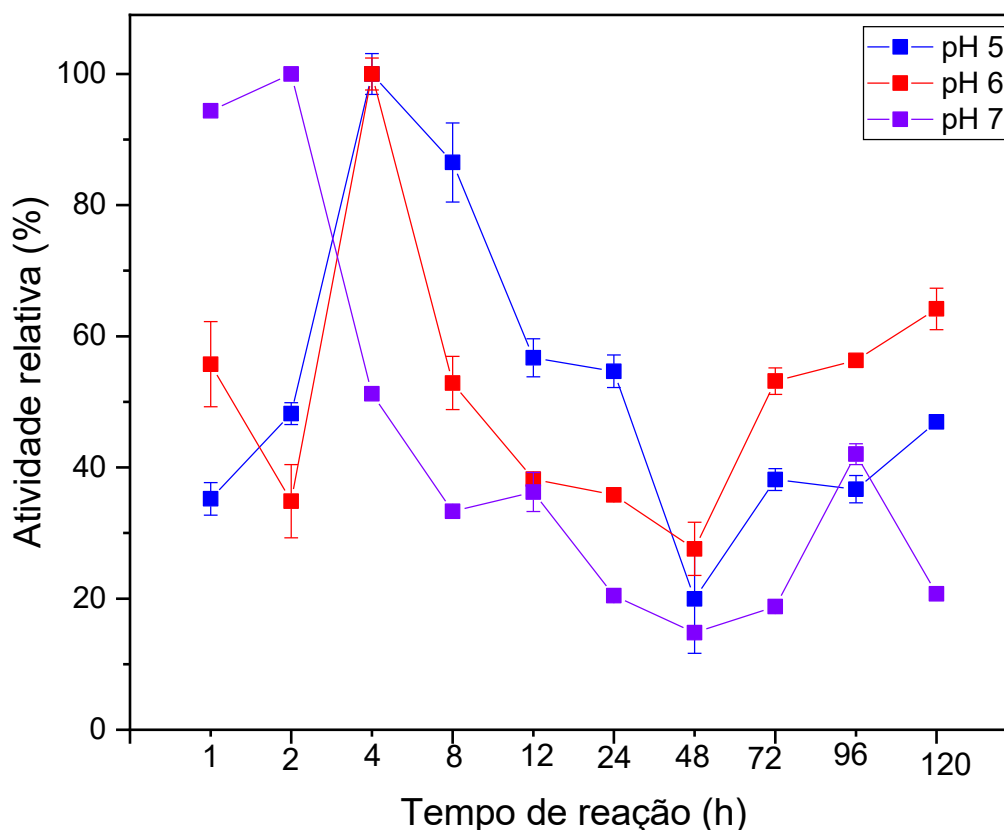


Em sequência, verificou-se que o efeito da variável 4 (pH) era insignificante quando comparado aos demais efeitos. Isso pode ser devido a discordância das melhores condições das enzimas, visto que a endoglucanase possui melhor atividade em pH alcalino e a β -glucosidase em pH ácido. Contudo, mesmo que o pH para os ensaios

de hidrólise de tecido não fosse tão relevante quanto as demais variáveis essa variável ainda é relevante para a atividade enzimática.

Como forma de definir o melhor pH univariavelmente para que essa variável fosse retirada do planejamento fatorial, foi realizado um teste de termoestabilidade do EE em pH 5,0; 6,0 e 7,0 durante um período de 120 horas (Figura 34). Partindo desse resultado, optou-se por trabalhar em pH 6,0 uma vez que nesse pH a atividade enzimática se mantém mais alta por mais tempo.

FIGURA 34. Análise da termoestabilidade do Extrato Enzimático em função do pH para a atividade FPase.



Concluídos os ensaios de termoestabilidade, a variável 2 ([Substrato]) e 4 (pH) foram excluídas do planejamento fatorial, restando ainda três variáveis que foram levadas em consideração para montar um planejamento fatorial completo (n=3).

4.4.5. Planejamento fatorial

Definidas as variáveis, montou-se a geratriz dos experimentos do planejamento fatorial (n=3) com pontos centrais e pontos axiais (Tabela 12, 13 e 14). Esses experimentos foram realizados com 30 mg/ mL de tecido em pH 6,0.

TABELA 12. Relação entre os níveis codificados e reais utilizados para a variável 1 ([Enzima]).

[Enzima] (UI/ mg de substrato)	
Escala codificada	Escala Real
1,68	7,0
1	6,0
0	4,5
-1	3,0
-1,68	2,0

TABELA 13. Relação entre os níveis codificados e reais utilizados para a variável 2 (Tempo).

Tempo (h)	
Escala codificada	Escala real
1,68	120,5
1	97,0
0	62,5
-1	28,0
-1,68	4,5

TABELA 14. Relação entre os níveis codificados e reais utilizados para a variável 3 (Temperatura).

Temperatura (°C)	
Escala codificada	Escala real
1,68	64,5
1	57,0
0	46,0
-1	35,0
-1,68	27,5

TABELA 15. Configuração dos experimentos realizados com compostos centrais e axiais, visando a maior liberação de açúcares redutores.

	[Enzima]	Tempo	Temp.	v1	v2	v3	Resposta	
	1	3	28	35	-1	-1	-1	0,431
	2	6	28	35	1	-1	-1	0,321
	3	3	97	35	-1	1	-1	0,362
	4	6	97	35	1	1	-1	0,862
	5	3	28	57	-1	-1	1	0,321
	6	6	28	57	1	-1	1	0,400
	7	3	97	57	-1	1	1	0,390
	8	6	97	57	1	1	1	0,421
PC	9	4,5	62,5	46	0	0	0	0,587
	10	4,5	62,5	46	0	0	0	0,686
	11	4,5	62,5	46	0	0	0	0,534
	12	4,5	62,5	46	0	0	0	0,719
	13	4,5	62,5	46	0	0	0	0,753
PA	14	2	62,5	46	-1,68	0	0	0,035
	15	7	62,5	46	1,68	0	0	0,043
	16	4,5	4,5	46	0	-1,68	0	0,287
	17	4,5	120,5	46	0	1,68	0	0,654
	18	4,5	62,5	27,5	0	0	-1,68	0,066
	19	4,5	62,5	64,5	0	0	1,68	0,090

Com os dados obtidos com esses experimentos foi possível calcular um modelo empírico com 10 coeficientes: b_0 (constante ou intercepto), três coeficientes lineares (b_1 , b_2 e b_3), três coeficientes quadráticos (b_{11} , b_{22} e b_{33}) e três coeficiente de interação de segunda ordem (b_{12} , b_{13} e b_{23}).

TABELA 16. Matriz X com 16 linhas (experimentos) e 10 colunas (coeficientes) (16:10).

b0	b1	b2	b3	b11	b22	b33	b12	b13	b23
1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1
1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1
1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1
1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	-1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0	0
1	1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0	0
1	0	-1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0
1	0	1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0
1	0	0	-1,68	0	0	2,8224	0	0	0
1	0	0	1,68	0	0	2,8224	0	0	0

Calculando o modelo, verificou-se que apenas o coeficiente b0, b11 e b33 eram significativos ao nível de confiança 95% (a barra de erro não contempla o zero) (Figura 35). Isso indica que, para esses experimentos, o tempo de reação não era tão significativo quanto a v1 e v3 ([Enzima] e temperatura). Dessa forma, os coeficientes insignificantes foram eliminados (Tabela 17) e o modelo recalculado.

FIGURA 35. Análise dos coeficientes de regressão obtidos pelo modelo calculado.

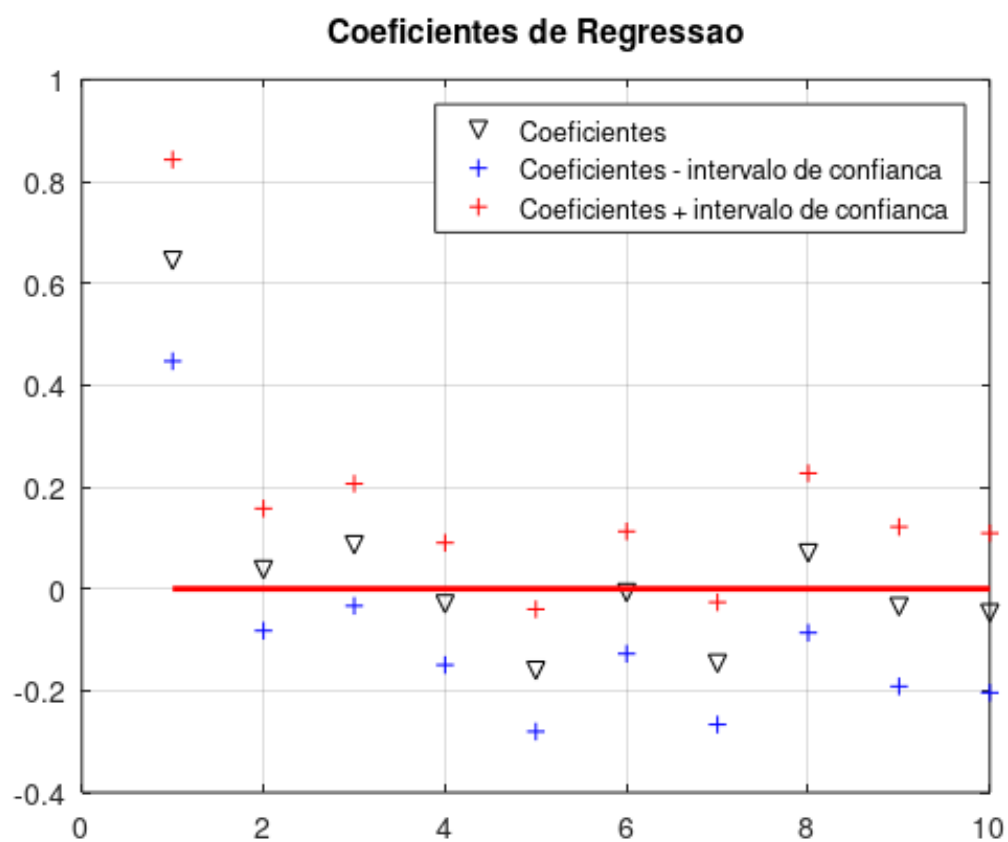
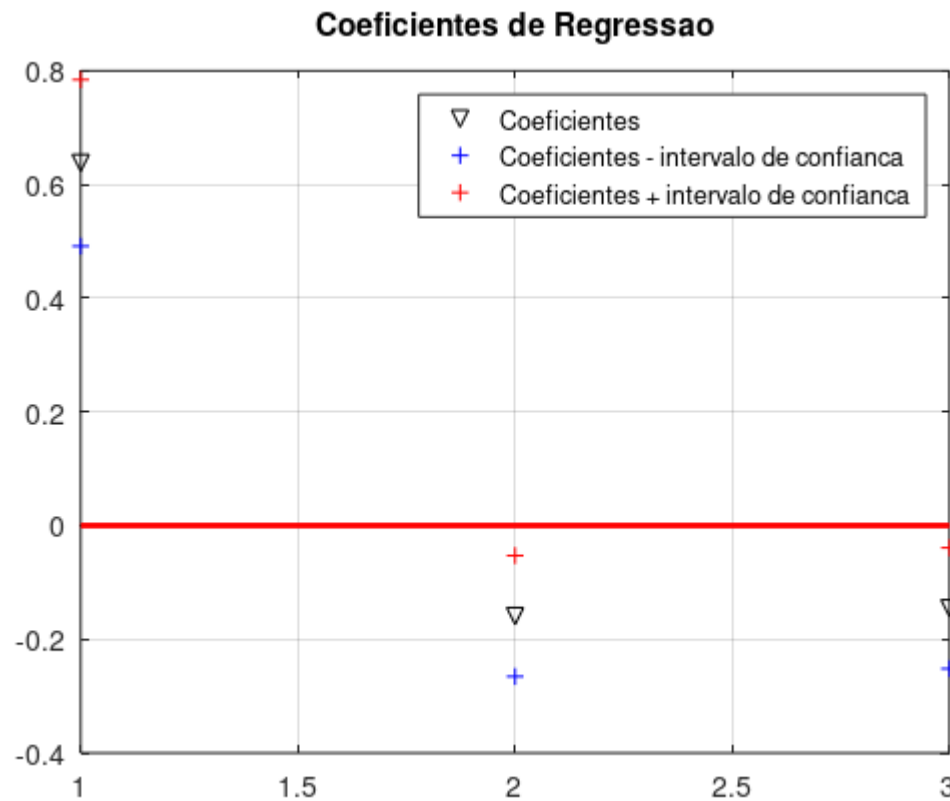


TABELA 17. Configuração da matriz X após a retirada dos coeficientes b1, b2, b3, b22, b12, b13, b23.

b0	b11	b33
1	2,8224	0
1	2,8224	0
1	1	1
1	1	1
1	1	1
1	1	1
1	1	1
1	1	1
1	1	1
1	1	1
1	1	1
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	2,8224
1	0	2,8224

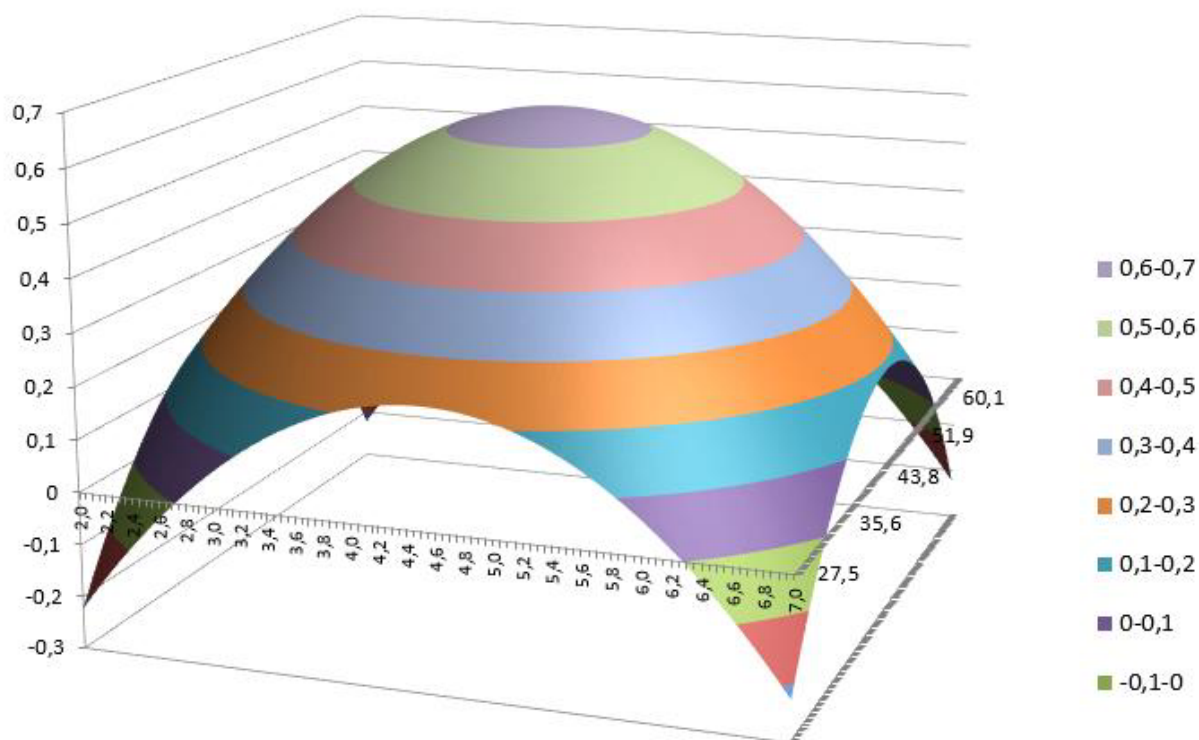
Desta vez, nenhum coeficiente foi insignificante (Figura 36) e outros parâmetros devem ser avaliados para melhor qualificação do modelo proposto.

FIGURA 36. Visualização dos coeficientes do modelo recalculado.



Com o modelo proposto, foi possível visualizar a superfície de resposta gerada. A Figura 37 mostra a superfície gerada na qual é possível verificar que há uma região de máximo sinal analítico.

FIGURA 37. Superfície de resposta relacionando as variáveis [Enzima] e temperatura com o modelo proposto.



Analisando a superfície de resposta, é possível observar que a região de ótimo para as variáveis 1 e 3 ([Enzima] e temperatura) é, em escala codificada, igual a 0 a 0 (ponto central), respectivamente.

No caso da variável 2, como seu efeito não foi tão significativo quanto as demais variáveis, optou-se por mantê-lo no nível 0 (62,5h). Devido a isso, como foram feitas 5 réplicas desse experimento nessas condições (0,0,0), optou-se por pular a etapa de validação, visto que, em média, os cinco experimentos do ponto central caíram na região de melhor resposta ($0,6557 \pm 0,09$).

4.4.6. Otimização do método – v6: pré-tratamentos

Pré-tratamentos químicos e/ou físicos de tecidos são descritos na literatura, como forma de melhorar a acessibilidade da hidrólise enzimática (FRIGON; MEHTA;

GUIOT, 2012; KIM et al., 2003). Neste trabalho, decidimos avaliar dois tipos de pré-tratamento: físico, com uso de autoclave (altas temperatura e pressão) e químico, com uso de NaOH.

No pré-tratamento físico (PTF) o tecido foi levado a autoclave a 120°C a pressão de 1 atm por um período de 15 minutos (FRIGON; MEHTA; GUIOT, 2012). Após esse período, o tecido foi seco na estufa a 60°C durante 24h.

No pré-tratamento químico (PTQ) o tecido foi submetido a uma solução 175 mM de NaOH durante 1 hora. Após esse período, o tecido foi então lavado com água MilliQ até que o pH da solução aquosa resultante da filtração fosse de 7,0 (KIM et al., 2003). Após esse período, similarmente ao pré-tratamento físico, o tecido foi seco na estufa a 60°C durante 24h.

Realizados os pré-tratamentos, os tecidos sem pré-tratamento (SPT) e com pré-tratamento físico e químico foram submetidos a hidrólise de acordo com a melhor condição obtida pelo planejamento fatorial, isto é, na condição, em escala codificada [0,0,0] e em escala real [concentração do EE foi 4,5 UI mL⁻¹; tempo da reação de 62,5 h; 46°C].

A Tabela 18 mostra a quantidade de açúcares redutores medidos após as reações de hidrólise de 0,15 g de tecido, obtidos nesse experimento.

TABELA 18. Quantidade de açúcares redutores liberados após a hidrólise enzimática de tecido 100% algodão nos dois tipos de pré-tratamento avaliados.

	Quantidade de açúcares redutores medidos (mg)
Sem pré-tratamento (SPT)	6,94 ± 0,06
Pré-tratamento físico (PTF)	4,03 ± 0,14
Pré-tratamento químico (PTQ)	5,06 ± 0,13

É possível observar que a hidrólise do tecido que foi submetido aos pré-tratamentos liberou menor conteúdo de açúcares redutores, quando comparados com a hidrólise do tecido que não sofreu pré-tratamentos. A princípio, estes resultados não foram os esperados, pois um tratamento que possibilitasse a 'abertura' ou flexibilização

das fibras do tecido poderiam facilitar a interação das enzimas com a celulose, levando à uma melhor hidrólise. Assim, para tentar entender melhor o significado destes resultados, foi feita uma análise de perda de massa dos tecidos após a hidrólise.

A porcentagem de perda de massa das amostras foi medida pelo peso do tecido antes e após o ensaio de hidrólise. Para isso, após a hidrólise enzimática, o meio reacional foi filtrado em papel de filtro e em seguida lavado com água MilliQ. Em seguida, o papel de filtro, que foi previamente pesado, foi levado à estufa até que secasse completamente. A porcentagem de perda de massa (PPM) foi definida da seguinte maneira:

$$PPM (\%) = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100$$

Onde, A_1 e A_2 correspondem a massa do tecido inicial e a massa do tecido seco após a hidrólise enzimática, respectivamente. Dessa maneira, as PPMs desses experimentos foram calculadas (Tabela 19). Usando os pré-tratamentos antes da hidrólise do tecido houve maior perda de massa do que não fazendo estes procedimentos, sendo o PTF mais eficiente do que o PTQ para perda de massa.

TABELA 19. Perda de massa dos tecidos após hidrólise enzimática, com e sem pré-tratamento.

Amostra	PPM (%)
Sem pré-tratamento (SPT)	16,27 ± 0,6
Pré-tratamento físico (PTF)	19,72 ± 1,2
Pré-tratamento químico (PTQ)	17,89 ± 1,0

Os resultados obtidos mostram que, apesar de os pré-tratamentos não terem ajudado a liberar mais açúcares redutores quando comparados ao tecido que não passou por nenhum tipo de pré-tratamento (Tabela 18), os pré-tratamentos físico e químico contribuíram para uma maior perda de massa. Este fato, não esperado a princípio, pode ser justificado pela liberação de oligômeros solúveis de celulose pelos pré-tratamentos, conforme descrito na literatura (GRITSCH et al., 2023). No pré-

tratamento com NaOH (PTQ) estes oligômeros foram descartados na etapa de lavagem do tecido feita antes da hidrólise enzimática e, assim, não contribuíram na concentração de açúcares redutores medidos. No tratamento com autoclave (PTF), o tecido não foi lavado após o processo, mas uma diminuição na liberação de açúcares redutores medido pode ser devido ao fato destes oligômeros terem alta massa molecular e pouca extremidade redutora, que é medida no método de análise da atividade.

Um fator a ser considerado, também, é que apesar de o tecido ser comercializado como sendo 100% algodão, outros compostos além da celulose fazem parte da constituição do mesmo (Tabela 2). A análise por TGA e FTIR mostram que existem outros componentes minoritários nas fibras de algodão, tais como hemicelulose e lignina. Como o extrato enzimático (EE) usado nos experimentos não continha somente três proteínas, conforme avaliado por SDS-PAGE, outras proteínas em quantidades minoritárias estavam presentes. Assim, foi realizado um teste qualitativo de determinação de oxidases totais utilizando o substrato ABTS para verificar a presença de lacases no EE, seguindo metodologia da literatura (DIONIZIO, 2018). Lacases são uma classe de enzimas fenoloxidasas (EC 1.10.3.2) que fazem parte da superfamília das multicobre oxidases, que hidrolisam lignina da parede celular vegetal. O teste foi positivo para detecção de lacases no EE o que pode sugerir que os pré-tratamentos podem ter auxiliado na exposição da lignina à ação das lacases presentes no EE, levando à uma perda de massa de material sólido.

Segundo CARMONA e colaboradores (2014), ao realizar um tratamento com solução de NaOH ocorrem modificações na estrutura da fibra, removendo as suas impurezas. A cristalinidade é elevada, reduzindo o tamanho do diâmetro das fibras devido ao ataque preferencial aos componentes amorfos como a lignina e hemicelulose, que são materiais solúveis, contribuindo para a maior perda de massa (CARMONA; MACEDO; ROSA, 2014). Esta pode ser a explicação para uma maior perda de massa do tecido que foi pré-tratado com solução de NaOH neste trabalho.

A eficácia do pré-tratamento com NaOH foi testada por PIRIBAUER e colaboradores, onde os autores verificaram que a melhor condição foi com altas concentrações de NaOH (5 M), sendo que com 1 M de NaOH à temperatura ambiente houve perda de massa do tecido de 33% (PIRIBAUER; BARTL; IPSMILLER, 2021). No presente trabalho, foram utilizadas condições brandas (0,175 M de NaOH e temperatura

ambiente) tendo sido observada perda de aproximadamente 18 % da massa do tecido, após pré-tratamento e hidrólise (Tabela 19). Consideramos que o resultado obtido aqui foi bom, uma vez que na literatura foi utilizado um coquetel enzimático comercial notadamente com alta atividade celulolítica. Assim, abre-se possibilidades para otimização das condições do pré-tratamento químico com aumento de eficiência de hidrólise com as celulasas do fungo *L. theobromae*.

Similarmente ao PTQ, para o PTF WANG e colaboradores (2016) verificaram que altas pressões podem contribuir para a maior remoção de impurezas como a hemicelulose e a lignina que estavam presentes nas fibras do tecido (WANG et al., 2016). Este mesmo trabalho sugere que para o melhor pré-tratamento para se aumentar a quantidade de açúcares redutores após a hidrólise enzimática é utilizando pré-tratamento alcalino assistido de altas pressões (NaOH + autoclave). No presente trabalho, o PTF foi o pré-tratamento mais eficaz quando se refere a perda de massa (19,72%). Talvez uma combinação dos métodos de PTQ e PTF possa levar à um melhor resultado na hidrólise do tecido.

Outras técnicas também poderiam levar ao melhor conhecimento do processo de hidrólise, como por exemplo MEV, com a análise do tecido após os tratamento e hidrólise, e HPLC, com a análise dos produtos de hidrólise.

A hidrólise enzimática de fibras de tecido tem se mostrado promissora na substituição da hidrólise ácida, onde são usadas soluções de ácidos fortes (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HCl, HBr) em concentrações elevadas (> 60%), condições essas que são bastante agressivas para o meio ambiente (ALMASHHADANI et al., 2022).

Diante desse contexto, o uso de celulasas nativas expressas pelo fungo *L. theobromae* mostrou ser um processo viável, de baixo custo e eficaz na hidrólise de tecidos de algodão. No entanto, otimizações na metodologia de pré-tratamentos e hidrólise precisam ser ajustadas para maior eficiência do processo.

5. Conclusões e perspectivas futuras

A partir do extrato bruto do meio de cultivo do fungo *L. theobromae* foi possível purificar três enzimas extracelulares, com atividade CMCase, Avicelase e pNPBGase (endoglucanase, exoglucanases e β -glucosidase, respectivamente).

As três enzimas foram caracterizadas sob o ponto de vista bioquímico tendo suas massas molares estimadas e tiveram determinadas as melhores condições de pH e temperaturas para suas atividades. A caracterização de uma exoglucanase mostrou-se promissor para o conhecimento da área, uma vez que são poucos os estudos descrevendo este tipo de enzima na literatura.

Os ensaios de hidrólise de tecido 100% de algodão com o extrato enzimático e nas melhores condições (conforme avaliado por estudo fatorial das variáveis envolvidas na reação) mostrou que as enzimas do extrato enzimático foram efetivas em hidrolisar a celulose do tecido. Os experimentos mostraram, também, que pré-tratamentos químico e físico do tecido, nas condições testadas, contribuíram para o aumento da perda de massa do tecido e, portanto, da degradação do mesmo. A otimização das condições de hidrólise (incluindo pré-tratamentos físicos e químicos), pode resultar em um bom processo de hidrólise de tecido de algodão e, quem sabe, produzir açúcar que possa ser fermentado por leveduras produzindo bioetanol.

6. Referências Bibliográficas

- ALBINANTE, S. R.; PACHECO, É. B. A. V.; VISCONTE, L. L. Y. Revisão dos tratamentos químicos da fibra natural para mistura com poliolefinas. **Química nova**, v. 36, p. 114–122, 2013.
- ALMASHHADANI, A. Q. et al. Nanocrystalline cellulose isolation via acid hydrolysis from non-woody biomass: Importance of hydrolysis parameters. **Carbohydrate Polymers**, v. 286, p. 119285, 2022.
- AMIN, R. et al. Immobilization of laccase on modified Fe₃O₄@ SiO₂@ Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 106–113, 2018.
- ANDREAUS, J.; PINTO DA SILVA BON, E.; SANTANA FERREIRA-LEITÃO, V. Enzyme technology in Brazil—A need and a challenge. **Biocatalysis and biotransformation** Taylor & Francis, v. 32, n. 1, p. 1-1, 2014.
- BARBOSA, K. L. Produção, Caracterização e Purificação de Celulase de Bactérias do Trato Intestinal de *Diatraea saccharalis*. Alagoas, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia - Universidade Federal de Alagoas, 2019. Tese de doutorado, 115 p.
- BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 355–383, 2000.
- BORGES, R. C. F. Etiologia do Cancro da Teca e Caracterização Patogênica e Molecular de *Lasiodiplodia theobromae*. Brasília, Programa de Pós Graduação em Fitopatologia - Universidade Federa de Brasília, 2014. Dissertação de mestrado, 98 p.
- BORNSCHEUER, U.; BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Enzymatic degradation of (ligno) cellulose. **Angewandte chemie international edition**, v. 53, n. 41, p. 10876–10893, 2014.
- BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals - A review. **Chimia**, v. 69, n. 10, p. 572–581, 2015.
- BROWNE, F. L. Theories of the combustion of wood and its control. n. 2136, p. 9-18, 1958.
- CABEZAS, L. et al. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. **Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1009–1013, 2012.
- CAPARRÓS JIMÉNEZ, S. **Fraccionamiento integral de vegetales no alimentarios para la obtención de pasta celulósica y subproductos memoria para optar al grado de doctor**. Huelva, Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química - Universidad de Huelva, 2009. Tesis doctorales, 127 p.

CARMONA, V. N.; MACEDO, J. R. N.; ROSA, D. S. Avaliação do efeito do tratamento alcalino em fibras de algodão (XIV SLAP, XII CIP). Porto de Galinhas – PE, 2014.

CARVALHO, N. R. DE et al. Caracterização física e química da biomassa usada como combustível sólido em uma caldeira. **Química Nova**, v. 44, p. 35–40, 2021.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química nova**, v. 32, p. 2191–2195, 2009.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225–226, 1939.

CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R.; BHATNAGAR, A. K. Influence of phosphorus and pH on the fungicidal potential of *Anabaena* strains. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 201–213, 2013.

CORDEIRO, M. DE A. Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (*Euterpe oleraceae* mart) para a produção de etanol. 2016.

DIONIZIO, B. S. Isolamento e caracterização de enzimas ligninolíticas expressas pelos fungos *Chaetomium cupreum* URM 5066 e *Mucor racemosus* CBMAI 847. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – USCar, 2018. Dissertação de mestrado, 103 p.

DOCHIA, M. et al. Cotton fibres. Em: **Handbook of natural fibres**. Woodhead Publishing, 2012. p. 11-23.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulping chemistry and technology**. Berlin, New York: De Gruyter, v. 2, p. 461-474, 2009.

ESPRO, C. et al. Upgrading lignocellulosic biomasses: Hydrogenolysis of platform derived molecules promoted by heterogeneous Pd-Fe catalysts. **Catalysts**, v. 7, n. 3, p. 78, 2017.

FÉLIX, C. et al. *Lasiodiplodia theobromae* as a producer of biotechnologically relevant enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 29, 2018.

FRANZ, G.; BLASCHEK, W. Cellulose. Em: **Methods in plant biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 1990. v. 2, p. 291–322.

FRIGON, J.-C.; MEHTA, P.; GUIOT, S. R. Impact of mechanical, chemical and enzymatic pre-treatments on the methane yield from the anaerobic digestion of switchgrass. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 1–11, 2012.

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

GONÇALVES, M. L. F. C.; STEINER, W. Detection of laccase activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing conditions. **Biotechnology techniques**, v. 10, n. 9, p. 667–668, 1996.

GRITSCH, S. M. et al. Closing the cycle: Enzymatic recovery of high purity glucose and polyester from textile blends. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 188, p. 106701, 2023.

HEARLE, J. W. S.; MORTON, W. E. **Physical properties of textile fibres**. 4^a Edição. New York: Woodhead publishing limited, 2008.

HERR, D. Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in submerged culture on different substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, n. 8, p. 1361–1371, 1979.

HU, Y. et al. Valorisation of textile waste by fungal solid state fermentation: An example of circular waste-based biorefinery. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 129, p. 27–35, 1 fev. 2018.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A. Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 9, p. 4044-4098, 2006.

INFORSATO, F. J.; PORTO, A. L. M. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, p. 444–465, 2016.

JAHANGEER, S. et al. Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 739-748, 2005.

JAYASEKARA, S.; RATNAYAKE, R. Microbial cellulases: an overview and applications. **Cellulose**, v. 22, p. 92, 2019.

KETUDAT CAIRNS, J. R.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 3389–3405, 2010.

KIM, J. et al. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 3, p. 271–275, 2003.

KINDO, A. J. et al. Maxillary sinusitis caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 167–169, 2010.

KOOTSTRA, A. M. J. et al. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAKSHMI, A. S.; NARASIMHA, G. Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil. **Annals of Forest Research**, v. 55, p. 85–92, 2012.

LI, X. et al. Recovery of glucose and polyester from textile waste by enzymatic hydrolysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 3763–3772, 2019.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MACARTHUR, E. Foundation a new textiles economy: Redesigning Fashion's Future. **London**, v. 25, n. 08, p. 2021, 2017.

MARTÍNEZ, Á. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignina, v. 8, p. 195-204, 2005.

MATOS, J. DO R. et al. Ilustração da influência da razão de aquecimento nos resultados de termogravimetria. **Química Nova**, v. 23, p. 113–115, 2000.

MATTHEWS, J. F.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M. F. Conversion of cellulose I α to I β via a high temperature intermediate (I-HT) and other cellulose phase transformations. **Cellulose**, v. 19, p. 297–306, 2012.

MENDELS, M.; WEBER, J. The product of cellulose in cellulase and their application. **Adv. Chem. Ser**, v. 95, p. 39–443, 1969.

MENDES JUNIOR, B. DE O. Setor têxtil. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 2, n.16, 2017.

MENG, J. et al. High-quality genome sequence resource of *Lasiodiplodia theobromae* JMB122, a fungal pathogen causing peach gummosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 35, n. 10, p. 938–940, 2022.

MIHAJLOVSKI, K. R. et al. Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 426–434, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONTEIRO, V. N.; DO NASCIMENTO SILVA, R. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941–3994, 2011.

- MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Production of extra cellular exoglucanase by *Rhizopus oryzae* from submerged fermentation of agro wastes. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 69-75 2011.
- NEVALAINEN, K. M. H.; PENTTILÄ, M. E. Molecular biology of cellulolytic fungi. Em: **Genetics and biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 369-390.
- NØRUP, N. et al. Quantity and quality of clothing and household textiles in the Danish household waste. **Waste Management**, v. 87, p. 454–463, 2019.
- ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109 2012.
- PAYNE, C. M. et al. **Fungal Cellulases**. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.
- PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 572–578, 2006.
- PETERSON, R.; GRINYER, J.; NEVALAINEN, H. Extracellular hydrolase profiles of fungi isolated from koala faeces invite biotechnological interest. **Mycological Progress**, v. 10, n. 2, p. 207–218, 2011.
- PIRIBAUER, B.; BARTL, A.; IPSMILLER, W. Enzymatic textile recycling – best practices and outlook. **Waste Management and Research**, v. 39, n. 10, p. 1277–1290, 2021.
- RAMBO, M. K. D. et al. Estudo de análise termogravimétrica de diferentes biomassas lignocelulósicas utilizando a análise por componentes principais. **Ciência e natureza**, v. 37, n. 3, p. 862–868, 2015.
- RAMÍREZ BRENES, R. G. et al. Endo-exoglucanase synergism for cellulose nanofibril production assessment and characterization. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 948-964, 2023.
- REINEHR, C. O. et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. **Química Nova**, v. 37, p. 454–460, 2014.
- RODRIGUES, R. Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira. **Dissertação de Mestrado, Instituto Agrônomo de Campinas**, 2003.
- ROJAS, O. J. **Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials**. Vol 271. Dordrecht: Springer, 2016.

RUBIN, E. M. **Genomics of cellulosic biofuels**. *Nature*, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

SAHA, S. et al. *Lasiodiplodia theobromae* keratitis: a case report and review of literature. *Mycopathologia*, v. 174, n. 4, p. 335–339, 2012.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

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

SCHÜLEIN, M. Protein engineering of cellulases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1543, n. 2, p. 239–252, 2000.

SHAKER, K.; NAWAB, Y. Fibers for protective textiles. *Fibers for Technical Textiles*, p. 65–91, 2020.

SHIMONAKA, A. et al. Specific characteristics of family 45 endoglucanases from Mucorales in the use of textiles and laundry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, n. 4, p. 1013–1016, 2006.

SHOJAEI, K. M.; DADASHIAN, F.; MONTAZER, M. Recycling of cellulosic fibers by enzymatic process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. 3, p. 744–752, 2012.

SINGH, R. et al. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, n. 1, p. 28–35, 2009.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: Towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*, v. 9, n. 6, p. 433-443, 2008.

STRADWICK, L. et al. Development and application of assay for determining β -glucosidase activity in human saliva. *Flavour*, v. 6, p. 1–8, 2017.

SUBRAMANIAN, K. et al. Environmental life cycle assessment of textile bio-recycling—valorizing cotton-polyester textile waste to pet fiber and glucose syrup. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 161, p. 104989, 2020.

TEERI, T. T. et al. Domain function in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases. *Journal of Biotechnology*, v. 24, n. 2, p. 169–176, 1992.

TSERKI, V. et al. A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres. *Composites Part A: applied science and manufacturing*, v. 36, n. 8, p. 1110–1118, 2005.

UMEZURIKE, G. M. The subunit structure of β -glucosidase from *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Biochemical Journal**, v. 145, n. 2, p. 361–368, 1975.

UMEZURIKE, G. M. The active site of β -glucosidase from *Botryodiplodia theobromae*. Effects of pH and dioxan on enzyme-catalysed reactions. **Biochemical Journal**, v. 167, n. 3, p. 831–833, 1977.

VAISHNAV, N. et al. Penicillium: the next emerging champion for cellulase production. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 131–140, 2018.

VERA, R. E. et al. Transforming textile wastes into biobased building blocks via enzymatic hydrolysis: A review of key challenges and opportunities. **Cleaner and Circular Bioeconomy**, v. 3, p. 100026, dez. 2022.

WANG, M. et al. Bioethanol production from cotton stalk: a comparative study of various pretreatments. **Fuel**, v. 184, p. 527–532, 2016.

WANG, T. et al. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. **Biomolecular engineering**, v. 22, n. 1–3, p. 89–94, 2005.

WANG, T. Catalytic conversion of glucose to 5-hydroxymethylfurfural as a potential biorenewable platform chemical. 2014.

WILLIS, J. D.; OPPERT, C.; JURAT-FUENTES, J. L. Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. **Insect Science**, v. 17, n. 3, p. 184–198, 2010.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 289–297, 2008.

WYMAN, C. E. et al. Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. **Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility**, v. 1, p. 1023–1062, 2005.

ZAMANI, B. et al. A carbon footprint of textile recycling: A case study in Sweden. **Journal of Industrial Ecology**, v. 19, n. 4, p. 676–687, 2015.

ZANATTA, E. R. et al. Estudo cinético de decomposição térmica da celulose. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v. 1, n. 5, p. 30–34, 2012.

ZHANG, Y. P.; LYND, L. R. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 888–898, 2006.