

SÍNTESE DE CELULASES POR *Aspergillus* sp. FSDE16 E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

Amanda Letícia de Carvalho Cardoso ¹

Felipe Augusto Santos ¹

Sharline Florentino de Melo Santos ²

RESUMO

Os materiais lignocelulósicos vêm sendo objeto de estudo como fonte renovável de energia. O bagaço de cana-de-açúcar é um dos resíduos agroindustriais disponíveis em maior quantidade. As celulases hidrolisam a celulose presente na biomassa lignocelulósica à açúcares fermentescíveis para produção de etanol de segunda geração. O pré-tratamento desta biomassa facilita a hidrólise enzimática. O objetivo deste trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado quimicamente utilizando enzimas produzidas pelo fungo FSDE16 no cultivo em estado sólido. Foi realizado o cultivo com 60% de farelo de trigo com 40% de bagaço de cana, enriquecido com sulfato de amônio 1% (m/m_{H2O}), concentração de inóculo de 10⁶ esporos/g, durante 5 dias à 33°C. Em seguida, foi realizado o estudo da melhor temperatura de secagem do fermentado: 50, 60, 70, 80 e 90°C. Após, foi realizado o pré-tratamento do bagaço de cana com NaOH 3% (m/v) na razão 1:20 sólido/líquido à 121°C por 90 minutos. Então, foi realizada a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado, razão 1:20 sólido/líquido, à 50°C, pH 4,8, 150 rpm, o fermentado sólido como carga enzimática, variando a proporção pré-tratado/fermentado em 1:1, 1:2 e 2:1. O melhor resultado de atividade enzimática foi para a temperatura de secagem de 60°C, com um valor de 1,81 FPU/g. Para a desativação do microrganismo o melhor resultado da temperatura foi 90°C. Para a hidrólise enzimática, nos três casos o comportamento da curva de concentração de ART foi semelhante, obtendo-se o pico máximo em 8 horas com um valor de aproximadamente 5,0 g/L.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, Hidrólise enzimática, Cultivo em estado sólido.

INTRODUÇÃO

Muitos pesquisadores através de grandes esforços vêm desenvolvendo métodos a fim de encontrar rotas tecnológicas para reutilização de resíduos agroindustriais através da conversão destes em produtos de interesse (GASPAROTTO et al., 2014). Dentre estes resíduos destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar por estar disponível em grande quantidade nas usinas sucroalcooleiras (CATELAN e PINOTTI, 2019). Os resíduos agroindustriais são basicamente compostos lignocelulósicos, sendo constituídos majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina (FREIRE et al., 2014).

¹ Mestranda do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, amanda_leticia03@hotmail.com;

¹ Mestrando do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, felipe1830@gmail.com;

² Professor orientador: Doutora, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, sharlinefm@hotmail.com. (83) 3322.3222

O etanol de segunda geração ou bioetanol, surgiu como uma alternativa de fonte renovável em substituição aos combustíveis fósseis, pois enquanto o etanol de primeira geração provém de compostos amiláceos ou sacarose da cana-de-açúcar, o bioetanol pode ser gerado através de açúcares fermentescíveis presentes nestes resíduos agroindustriais. Para que isto aconteça, o material precisa passar pelo processo de hidrólise para que ocorra a quebra da celulose em açúcares fermentescíveis, como a glicose (SALOMÃO, 2017).

Em geral, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta sendo necessário submeter esta biomassa a pré-tratamentos físicos e químicos antes da sua hidrólise para produção do etanol. Esta etapa é responsável pela remoção da lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, de maneira a tornar a celulose susceptível à hidrólise (RABELO, 2010).

A hidrólise enzimática é a rota biológica mais utilizada para hidrolisar a celulose à glicose. É uma reação heterogênea, catalisada por enzimas, possui alta especificidade, gera menos inibidores do que a hidrólise ácida, além de gerar produtos menos degradantes ao meio ambiente (NUNES et al., 2013). As celulasas são enzimas eficientes na degradação da celulose, sendo as mais comuns neste tipo de processo. Estas enzimas podem ser produzidas por diversos microrganismos, mas os fungos apresentam maiores rendimentos para a produção de celulasas (CATELAN e PINOTTI, 2019).

Uma das formas de se obter estas enzimas a baixo custo é através do cultivo em estado sólido (CES). O CES trata-se do crescimento de microrganismos em substratos sólidos na ausência de água livre, sendo de maior vantagem que a fermentação submersa devido à capacidade de simular o habitat natural de fungos (RODRÍGUES-ZÚÑIGA et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimicamente com solução de NaOH 3% (m/v) utilizando enzimas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. FSDE16 por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo e bagaço de cana *in natura* como substratos.

METODOLOGIA

Produção de celulasas: Foi utilizado o fungo *Aspergillus* sp. FSDE 16. Este fungo foi isolado do solo de descanso da Usina Japungu Agroindustrial, localizada no município de Santa Rita, estado da Paraíba. O mesmo foi previamente selecionado como produtor de celulasas pela

medida do halo de degradação em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono (CARVALHO-GONÇALVES, 2017).

Para o inóculo, foi feito o repique dos fungos em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar). Este procedimento foi realizado em uma câmara de segurança biológica. Antes do repique, foram esterilizados o meio BDA e placas de Petri em autoclave à 120°C por 15 min. Foi feito o repique do microrganismo e as placas foram incubadas durante 7 dias à 33°C.

Após o crescimento, foi feita a suspensão dos esporos em água destilada esterilizada. Para obtenção do volume de suspensão com a concentração de 10^6 esporos/g, primeiramente foi feita a contagem de esporos em câmara de Neubauer no microscópio eletrônico, obtida pela Equação 1. Posteriormente o volume de inóculo foi obtido pela Equação 2.

$$\text{Concentração (esporo/mL)} = \Sigma * 5.10^4 * \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Onde:

Σ : número de esporos na câmara de Neubauer (quatro extremidades e o centro)

$$\text{Volume (inóculo)} = \frac{\text{concentração (esporo/grama)} * \text{massa do meio (g)}}{\text{concentração (esporo/mL)}} \quad (2)$$

O fungo foi cultivado em meio contendo 60% de farelo de trigo com 40% de bagaço de cana como substratos. Antes de iniciar o cultivo, foi feito o ajuste da umidade do meio para 70% utilizando solução de sulfato de amônia 1% (m/m_{H2O}). A quantidade de água foi obtida através da Equação 3.

$$m_{H_2O} = \text{massa do resíduo} * \frac{\text{umidade desejada} - \text{umidade do resíduo}}{1 - \text{umidade desejada}} \quad (3)$$

Foram pesados 60 gramas do farelo de trigo umedecido e 40 gramas de bagaço de cana umedecido, em seguida foram colocados em erlenmeyer de 1000 mL, o procedimento foi repetido preenchendo-se mais três erlenmeyers. Os erlenmeyers foram fechados e colocados em autoclave durante 15 minutos à 121°C para esterilização do meio. Em seguida, foi feita a inoculação com o volume de inóculo calculado anteriormente, o meio foi bem homogeneizado e os erlenmeyers foram incubados durante 5 dias sob à temperatura de 33°C. Após o período

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

de incubação, todo o substrato fermentado foi armazenado sob refrigeração para posteriores análises de atividade enzimática e desenvolvimento da hidrólise do bagaço de cana com as enzimas obtidas neste cultivo.

Determinação da atividade enzimática: Para a análise de celulase total (FPase), foi obtido o extrato enzimático utilizando-se como solvente água destilada na proporção de 20 mL/g de fermentado. Adicionou-se a água em aproximadamente 1 grama de amostra, a mistura foi homogeneizada e aguardou-se 30 minutos. Após, foi feita a filtração da mistura com papel de filtro, e posteriormente iniciou-se a análise de atividade.

Foi seguida a metodologia proposta por GHOSE (1987) com adaptações. Preparou-se tiras de papel de filtro, cortadas nas medidas de 1cm x 6 cm. Em tubos de ensaio, foram colocadas as tiras de papel enroladas em forma espiral, em seguida adicionou-se 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8. Posteriormente, foram adicionados aos tubos 0,5 mL do sobrenadante do extrato enzimático, agitou-se levemente em vortex, e os mesmos foram incubados em banho-maria à 50°C durante 60 minutos para ocorrer a reação. Após esse tempo, a estante com os tubos foi colocada em banho de gelo.

Preparou-se o branco das amostras. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1,0 mL de tampão citrato de sódio e em seguida adicionou-se 0,5 mL do sobrenadante do extrato enzimático, a mistura foi homogeneizada em vortex. Preparou-se também o branco do espectrofotômetro, adicionando-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio e 0,5 mL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) em um tubo de ensaio.

Em seguida, transferiu-se 0,5 mL da mistura reacional para tubos contendo 0,5 mL de DNS, a mistura foi homogeneizada em vortex. O mesmo procedimento foi feito para o branco das amostras. Em seguida incubou-se em banho-maria à 100°C durante 5 minutos, e logo depois a estante com os tubos foi colocada em banho de gelo. Após isso, adicionou-se 6,5 mL de água destilada em todos os tubos para diluição, e foi realizada a leitura no espectrofotômetro em absorvância 540 nm. Para determinação da concentração de açúcares redutores foi construída uma curva padrão (MILLER, 1959; GHOSE, 1986). O valor da atividade enzimática pode ser calculado através da Equação 4.

$$FPase = \frac{(A-B) \times f \times d \times 1,5 \times R}{(0,18 \times 60 \times 0,5)} \quad (4)$$

Onde:

FPase = quantidade de celulase total (U/g);

A = absorvância da amostra;

B = absorvância do branco da amostra;

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

d = diluição da amostra;

1,5 = volume total do meio de reação (mL);

0,18 = fator de conversão de miligramas para μmol de glicose;

60 = tempo de reação (min);

0,5 = volume da enzima no meio de reação (mL);

R = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

Avaliação da secagem do fermentado e manutenção da atividade enzimática: Foram avaliadas temperaturas de secagem do fermentado de 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C, nas quais as enzimas pudessem permanecer ativas, porém o microrganismo fosse inativado. Em placas de Petri pesou-se cerca de 5 g do fermentado, em seguida colocou-se em estufa sob a temperatura a ser analisada. Após 20 h, foi retirado da estufa uma amostra de aproximadamente 0,5 g para avaliar se o microrganismo permanecia ativo, e em seguida todo o resto foi armazenado sob refrigeração para posterior análise da atividade enzimática.

Para avaliar se o microrganismo estava desativado foi feito o plaqueamento em placas de Petri contendo meio BDA, utilizando-se a diluição com água destilada da amostra do fermentado seco na razão de 1:10 sólido/líquido, então utilizou-se 1 mL dessa diluição para realizar o plaqueamento. Em seguida, as placas foram incubadas à 30°C durante 5 dias para verificar se havia crescimento. Após verificar a melhor temperatura, todo o fermentado foi seco em estufa e armazenado sob refrigeração para posteriormente ser utilizado em hidrólise.

Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar: Foram pesados 60 gramas de bagaço de cana, e de acordo com a razão sólido/líquido de 1:20 colocou-se em erlenmeyer contendo 1200mL de solução de NaOH 3% (m/v) e fechados. Posteriormente, foram colocados em autoclave na temperatura de 120°C durante 90 minutos. Após isso, os erlenmeyers foram retirados e resfriou-se em água. Em seguida, foi feita a lavagem do bagaço de cana em água corrente utilizando filtro de pano até atingir pH em torno de 6, e então o bagaço foi seco em estufa sob temperatura de 60°C. Após 24 horas, retirou-se da estufa e o bagaço de cana-de-açúcar foi triturado em liquidificador doméstico e armazenado em recipiente fechado sob temperatura ambiente.

Hidrólise enzimática: Foram pesados 3,0 gramas de sólido de acordo com cada proporção de bagaço pré-tratado e fermentado seco, que foram: 1:1 pré-tratado/fermentado, 2:1 pré-tratado/fermentado e 1:2 pré-tratado/fermentado. Em seguida, considerando a razão sólido/líquido de 1:20, foram colocados em erlenmeyers contendo 60 mL de solução tampão citrato de sódio 50mM em pH 4,8. Após, foram colocados em incubadora shaker com velocidade de rotação de 150 rpm durante 48 horas sob a temperatura de 50°C. Foram retiradas amostras nos tempos de 0h, 1/2h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h e 48h para análise de açúcares redutores totais.

Análise de Açúcares Redutores Totais (ART): Para esta análise, colocou-se em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL do sobrenadante da amostra com 0,5 mL de DNS, realizado em duplicata, e agitou-se em vortex. Foi preparado também o branco do espectrofotômetro, adicionando-se 0,5 mL de água destilada com 0,5 mL de DNS.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria à 100°C durante 5 minutos. Após esse tempo, a bandeja com os tubos foi colocada em banho com água gelada. Posteriormente, adicionou-se 4 mL de água destilada para diluição, e foi realizada a leitura no espectrofotômetro em absorvância 540 nm. Para determinação da concentração de açúcares redutores totais foi construída uma curva padrão (MILLER, 1959). O valor da concentração pode ser determinado a partir da Equação 5.

$$\text{Conc.} = A \times d \times 4 \times f \quad (5)$$

Onde:

Conc. = concentração de açúcares redutores totais (mg/mL);

A = absorvância da amostra;

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

d = diluição da amostra;

4 = diluição da inversão da sacarose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Aspergillus* sp. FSDE16 apresentou bom crescimento em meio contendo farelo de trigo com bagaço de cana. Também apresentou bom valor quanto à síntese de celulases, foi

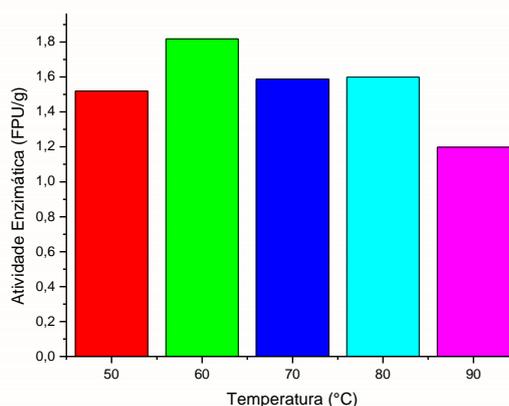
obtido um valor de atividade enzimática de FPase de 1,5039 FPU/g em 120 horas de cultivo, e em termos de produtividade 0,30 FPU/g.dia.

Nos estudos de ALMEIDA (2012), realizou-se a produção de enzimas através do cultivo do fungo *T. reesei* RUT-30 em meio sólido sendo 25% de bagaço de cana e 75% de farelo de trigo, umidade de 70%, temperatura de incubação de 28°C, foi obtido um valor de atividade de 1,342 FPU/g em 7 dias de cultivo, este valor pode ser considerado próximo com o do presente trabalho, porém em termos de produtividade obteve-se 0,19 FPU/g.dia, enquanto que o valor do presente trabalho é maior.

DARONCH et al. (2015) realizou cultivo em estado sólido do *Penicillium* sp. utilizando casca de soja como substrato, umidade de 70%, concentração de inóculo de 10^5 esporos/g, temperatura de incubação de 30°C e obteve seu melhor resultado de atividade enzimática de 1,185 FPU/g com 7 dias de cultivo, este valor é um pouco inferior ao valor obtido no presente trabalho.

Para a secagem do fermentado, os resultados de atividade enzimática de FPase estão na Figura 1, onde é possível se observar o seu comportamento.

Figura 1. Comportamento da atividade FPase em diferentes temperaturas de secagem do fermentado



Observando a Figura 1, percebe-se que a melhor temperatura de secagem em relação à manutenção da atividade enzimática foi 60°C, a partir de 70°C nota-se que a atividade começa a cair tendo o seu menor valor à 90°C. Porém, mesmo com a secagem a 90°C foi possível manter 66% da atividade de FPase. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que existem condições ótimas de temperatura para a atividade das enzimas.

SANTOS et al. (2014) em seus estudos produziram enzimas por *Rhizopus* sp. através do cultivo em estado sólido, e obtiveram um melhor resultado de estabilidade da atividade enzimática de FPase na temperatura de 60°C, acima desta temperatura a queda de atividade foi acentuada, as enzimas perderam cerca de 50% da sua atividade.

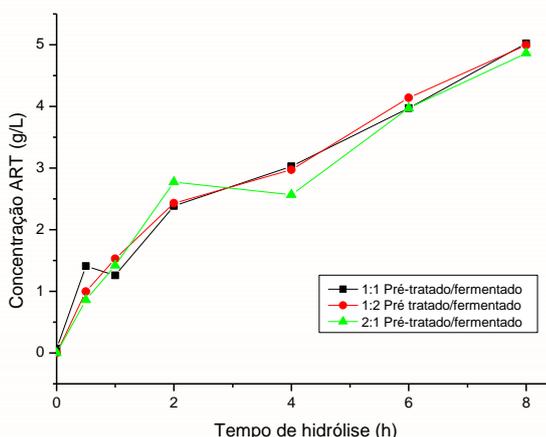
PEREIRA (2013) em seu trabalho ao analisar a temperatura ótima para atividade de FPase de enzimas secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01, verificou que o melhor valor foi à 60°C, sendo observado um declínio na atividade a partir de 70°C.

DELABONA et al. (2012) ao analisarem a influência da temperatura na atividade enzimática de FPase, utilizaram enzimas produzidas pelo fungo *A.fumigatus* P40M2 por cultivo em estado sólido, e obtiveram como melhor faixa de temperatura de 45°C a 60°C, após essa temperatura observou-se uma queda de atividade enzimática.

Em relação à avaliação da desativação do fungo *Aspergillus* sp. FSDE16 nas temperaturas de secagem do fermentado, o microrganismo apresentou crescimento nas temperaturas de 50°C à 70°C, só apresentou pouco crescimento à 80°C e nenhum crescimento à 90°C. Como visto na Figura 1, em 90°C houve considerável queda atividade enzimática, baseado nestes resultados, optou-se por usar o fermentado seco à 60°C como carga enzimática para hidrólise com o pressuposto de que em 8 horas de ensaio não haveria muito crescimento do fungo. FERREIRA et al. (2011) avaliaram a termo resistência de fungos isolados de néctares de maracujá e abacaxi e obtiveram resultados que mostraram que acima de 85°C os microrganismos foram desativados, pois alguns fungos são extremamente termo resistentes e necessitam de temperaturas altas para sua desativação microbiana.

Os resultados na Figura 2 mostram o comportamento da liberação de açúcares redutores totais na hidrólise do bagaço de cana ao longo do tempo.

Figura 2. Valores da concentração de ART durante a hidrólise



Nos três casos pode ser observado comportamento semelhante das curvas de concentração de ART. Inicialmente a concentração de açúcares redutores totais foi aumentando indicando que houve liberação destes durante a hidrólise, até atingir seu pico máximo em 8h. Para as três proporções estudadas, que foram 1:1 pré-tratado/ fermentado, 1:2 pré-tratado/fermentado e 2:1 pré-tratado/fermentado, os valores de concentração de ART obtidos foram 5,01 g/L, 4,99 g/L e 4,35 g/L, respectivamente. Observa-se que nos dois primeiros casos os valores de concentração foram muito próximos, enquanto no terceiro caso o valor obtido foi um pouco inferior, mostrando que dobrar a quantidade de pré-tratado em relação ao fermentado influencia negativamente na hidrólise.

No trabalho de RODRIGUES (2016), para o bagaço pré-tratado com hidróxido de sódio 2% (m/v) com mesma condição de agitação e temperatura próxima de 47°C, pH próximo de 5,0, carga enzimática de extrato bruto produzida pelos fungos filamentosos *A.fumigatus* e *A.niger* e concentração próxima de bagaço pré-tratado de 2,2%, o melhor resultado de hidrólise em concentração de ART foi no tempo de 12 horas com um valor de 6,30 g/L, enquanto que no presente trabalho foi de aproximadamente 5,0 g/L em 8 horas, os valores podem ser considerados próximos.

PRATTO (2015) em seus estudos realizou hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com NaOH 4% (m/v), pH 5,0, velocidade de agitação de 200 rpm, 10% sólidos (m/v), temperatura de 50°C e carga enzimática de 10 FPU/g do complexo enzimático CellicCTec2, em 8 horas de hidrólise obteve um resultado de concentração de ART de aproximadamente 17 g/L, sendo este valor cerca de três vezes maior com os resultados obtidos no presente trabalho. É importante salientar que o complexo enzimático CellicCTec são enzimas comerciais que passam por tratamento de purificação e concentração, enquanto as utilizadas neste trabalho são extratos enzimáticos brutos provenientes de um cultivo de microrganismos.

MENDES et al. (2015) realizaram hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico 1,5% (v/v) combinado com solução de NaOH 4% (m/v), pH 5,0, concentração de sólidos de 10 g/L, temperatura de 50°C, velocidade de agitação de 200 rpm durante 24 horas, 2 mL de extrato bruto produzido por *Cellulomonas* sp., e obteve-se o melhor resultado de concentração de ART 0,96 g/L em 24 horas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo FSDE16 apresentou bom crescimento em meio sólido contendo farelo de trigo com bagaço de cana sendo possível obter enzimas para realização da hidrólise. Também foi obtido através da avaliação da secagem do fermentado a melhor temperatura para desativação do microrganismo e manutenção da atividade enzimática de FPase.

Foi possível avaliar a utilização do resíduo fermentado seco como carga enzimática para hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado, bem como diferentes proporções. Para quantidades menores de fermentado o declínio de concentração ao longo do tempo na curva de ART foi menor. Também foi possível observar que através dos resultados de hidrólise observou-se que para o tempo estudado os resultados de concentração de ART foram coerentes quando comparados com os da literatura.

Como sugestões para futuros trabalhos, seria interessante estudar a temperatura de 60°C para realizar a hidrólise, bem como avaliar outras proporções de pré-tratado/fermentado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulasas e xilanases por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos.** 2012. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

CARVALHO-GONÇALVES, L. C. T. **Bioprospecção de fungos celulolíticos provenientes da agroindústria para produção de bioetanol.** 2017. 199 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

CATELAN, T. C.; PINOTTI, L. M. Avanço das pesquisas envolvendo *Aspergillus niger* e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono visando à produção de celulasas: Uma análise bibliométrica. **Revista Matéria**, v.24, n.2, 2019.

DARONCH et al. Produção de celulase por *Penicillium* sp. utilizando resíduo agroindustrial em fermentação em estado sólido. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11, 2015, Campinas. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.** Blucher Proceedings, 2014.

DELABONA et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.236-242, 2012.

FERREIRA et al. Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14, n.3, p.164-171, 2011.

FREIRE et al. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação de fungo basidiomiceto. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Blucher Proceedings, 2014.

GASPAROTTO et al. Produção de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na hidrólise enzimática de biomassa. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Blucher Proceedings, 2014.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem**, v.59, p.257-268, 1987.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. **Advances Chemical Ser**, 95, p. 391-414, 1969.

MENDES et al. Caracterização de extrato enzimático produzido por *Cellulomonas* sp. e sua aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 20, 2015, Fortaleza. **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2014.

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

NUNES et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção de etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v.14, n.22, p.113-238, 2013.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PRATTO, B. **Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: Estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística**. 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 414 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RODRIGUES, P. de O. **Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

RODRIGUES-ZÚNIGÁ et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

SANTOS et al. Produção de celulases estáveis a temperatura e pH a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Blucher Proceedings, 2014.

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