



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**TAMIRIS VESCOVI CASOTTO**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICOS E  
ENZIMÁTICOS PARA PROCESSAMENTO DE BIOMASSA DE MICROALGAS**

**VITÓRIA**

**2022**

TAMIRIS VESCOVI CASOTTO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICOS E  
ENZIMÁTICOS PARA PROCESSAMENTO DE BIOMASSA DE MICROALGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, na área de concentração Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini.

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Larissa Bernardino Moro.

VITÓRIA

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

C341a Casotto, Tamiris Vescovi, 1990-  
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICOS E ENZIMÁTICOS PARA PROCESSAMENTO DE BIOMASSA DE MICROALGAS / Tamiris Vescovi Casotto. - 2022.  
118 f. : il.

Orientador: Sérgio Túlio Alves Cassini.  
Coorientadora: Larissa Bernardino Moro.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. algas. 2. hidrólise. 3. enzimas. I. Cassini, Sérgio Túlio Alves. II. Moro, Larissa Bernardino. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. IV. Título.

CDU: 628

---

**TAMIRIS VESCOVI CASOTTO**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICOS E  
ENZIMÁTICOS PARA PROCESSAMENTO DE BIOMASSA DE MICROALGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de concentração Saneamento.

Aprovado em 24 de agosto de 2022.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina de Pinho Keller**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

---

**Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

A todos que buscam a verdade por meio da ciência.

À minha família e amigos, pelo apoio emocional.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à professora coorientadora Larissa por me apoiar durante todo desenvolvimento da pesquisa, à Ana por me ajudar nas trocas de ideias e no trabalho braçal, ao professor Jairo por gentilmente ceder o espaço de seu laboratório e ao professor Sérgio Túlio por idealizar e viabilizar essa pesquisa.

## RESUMO

Os custos envolvidos em processos produtivos à base de microalgas são substancialmente altos, devido à falta de tecnologias apropriadas para se ter acesso às suas frações de proteínas, carboidratos e lipídios, uma vez que a parede celular e a membrana constituem uma barreira à liberação desses compostos intracelulares. Assim, é preciso aprimorar e elevar a eficiência da etapa do rompimento celular, já que esse é um pré-tratamento fundamental para as etapas posteriores de processamento da biomassa. Logo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar pré-tratamentos físicos e enzimáticos no rompimento da parede celular de microalgas. A moagem manual, ultrassom, micro-ondas e a hidrólise enzimática foram os tratamentos testados de forma simples e combinada entre si. Foram utilizadas no pré-tratamento biológico enzimas comerciais como controle positivo e enzimas produzidas em laboratório pelo processo de fermentação em estado sólido (FES), onde foram gerados, separadamente, um extrato bruto de celulase com uma atividade de 0,03 U/ml pelo fungo C1 (gênero e espécie não identificados), e um extrato bruto de pectinases com uma atividade de 1,74 U/ml, produzido pelo fungo *Aspergillus niger* (MAR). A hidrólise enzimática da biomassa de *Chlorella vulgaris* se deu utilizando uma mistura com os dois tipos enzimáticos e, pelo menos, um método físico de rompimento celular. As maiores eficiências atingidas variaram de 32,94 a 40,1%, em um período de 1 a 2h. Os resultados apontaram a hidrólise enzimática e o ultrassom como métodos de pré-tratamento promissores e demonstraram que a combinação de pré-tratamentos físicos e biológicos, potencializa o rompimento celular e facilita a exploração de produtos provenientes da biomassa microalgácea.

Palavras-chave: microalga; pré-tratamento; *Chlorella vulgaris*; hidrólise enzimática; rompimento celular.

## ABSTRACT

The costs involved in production processes based on microalgae are substantially high, due to the lack of appropriate technologies to have access to their fractions of proteins, carbohydrates and lipids, since the cell wall and membrane constitute a barrier to the release of these compounds. intracellular. Thus, it is necessary to improve and increase the efficiency of the cell disruption step, since this is a fundamental pre-treatment for the later stages of biomass processing. Therefore, the objective of the present work was to evaluate physical and enzymatic pre-treatments in the disruption of the cell wall of microalgae. Manual grinding, ultrasound, microwave and enzymatic hydrolysis were the treatments tested in a simple and combined way. Commercial enzymes were used in the biological pretreatment as a positive control and enzymes produced in the laboratory by the solid-state fermentation (SSF) process, where a crude cellulase extract with an activity of 0.03 U/ml by the C1 fungus (genus and species unidentified), and a crude extract of pectinases with an activity of 1.74 U/ml, produced by the fungus *Aspergillus niger* (MAR). The enzymatic hydrolysis of the *Chlorella vulgaris* biomass was carried out using a mixture of the two enzymatic types and, at least, one physical method of cell disruption. The highest efficiencies achieved ranged from 32.94 to 40.1% over a period of 1 to 2 hours. The results pointed to enzymatic hydrolysis and ultrasound as promising pre-treatment methods and demonstrated that the combination of physical and biological pre-treatments potentiates cell disruption and facilitates the exploration of products from microalgaeous biomass.

Keywords: microalgae; pre-treatment; *Chlorella vulgaris*; enzymatic hydrolysis; cell disruption.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura da parede celular da <i>Chlorella</i> sp.....  | 24 |
| Figura 2 - Morfologia da superfície das microalgas antes e depois do pré-tratamento com micro-ondas.....                      | 31 |
| Figura 3 - Fluxograma metodológico.....   | 44 |
| Figura 4 - Registro das atividades enzimáticas diárias dos extratos brutos produzidos por meio da FES.....                    | 56 |
| Figura 5 - Atividades enzimáticas máximas produzidas na FES.....  | 57 |
| Figura 6 - Crescimento da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo do tempo em termos de ST.....                        | 60 |
| Figura 7 - Eficiências dos pré-tratamentos físicos.....   | 61 |
| Figura 8 - Monitoramento da hidrólise realizada pelas enzimas produzidas na FES combinada com os pré-tratamentos físicos..... | 63 |
| Figura 9 - Monitoramento da hidrólise realizada pelas enzimas comerciais combinada com os pré-tratamentos físicos.....        | 64 |
| Figura 10 - Maiores eficiências atingidas nos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas da FES.....                   | 65 |
| Figura 11 - Maiores eficiências atingidas nos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas comerciais.....               | 66 |
| Figura 12 - Eficiências de todos os pré-tratamentos físicos que foram combinados com hidrólise enzimática.....                | 67 |
| Figura 13 - Eficiências de todos os pré-tratamentos testados.....   | 68 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1 - Pré-tratamentos: modo de ação, vantagens e limitações.....         | 37 |
| Quadro 2 - Pré-tratamentos testados para rompimento da biomassa microalgácea. | 53 |
| Quadro 3 - Identificação dos fungos por gênero e espécie. ....                | 55 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição dos meios mínimos seletivos.....  | 46 |
| Tabela 2 - Composição do meio sintético.....  | 47 |
| Tabela 3 - Média e desvio padrão dos Índices Enzimáticos.....                                       | 54 |
| Tabela 4 - Produção de celulases .....  | 57 |
| Tabela 5 - Produção de pectinases .....   | 59 |
| Tabela 6 - Pré-tratamentos físicos aplicados na microalga <i>Chlorella</i> sp .....                 | 62 |
| Tabela 7 - Pré-tratamentos com hidrólise enzimática aplicados na microalga <i>Chlorella</i> sp..... | 71 |

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

BDA - Ágar Batata Dextrose

CMC - Carboximetilcelulose

CPID - Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento

DBO - Demanda biológica de oxigênio

DNS - Ácido dinitrosalicílico

EC - Enzima comercial

EF - Enzima de FES

FES - Fermentação em estado sólido

FNE - Fungo não esporulante

FSeq - Fermentação sequencial

FSm - Fermentação submersa

IE - Índice enzimático

Labsan - Laboratório de Saneamento

Lacar - Laboratório de caracterização física, química e microbiológica

MO - Moagem manual

MW - Micro-ondas

ST - Sólidos totais

ST - Sólidos totais

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

US - Ultrassom

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Sulfato de amônio

°C - Graus Celsius

μmol - Micromol

μmol.ml<sup>-1</sup> - Micromol por mililitro

AE - Atividade enzimática (U/ml)

C - Concentração do açúcar redutor medido

Ca<sup>2+</sup> - Íon cálcio

cm - Centímetros

CMCase - Atividade endoglucanase

CT - Carboidratos totais

D - Diluição

EPT - Eficiência do pré-tratamento

ET - Energia total

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - Sulfato ferroso heptahidratado

FPase- Atividade do papel de filtro

g - Grama

g - Unidade de gravidade

g ST/L - Grama de sólidos totais por litro

g.L<sup>-1</sup> - Grama por litro

GHz - Gigahertz

GL - Glicose livre na biomassa

GPT - Glicose gerada após o pré-tratamento

h - Hora

H.- Radical hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

Hz - Hertz

J.Kg-1 - Joule por quilograma

K - Kelvin

KCl - Cloreto de potássio

Kg.L-1 - Quilograma por litro

kHz - Kiloherztz

L - Litro

M - Molar

m<sup>3</sup> - Metro cúbico

mg.L-1 - Miligrama por litro

MgSO<sub>4</sub> - Sulfato de magnésio

MHz - Megahertz

min - Minuto

MJ kg<sup>-1</sup> - Megajoule por quilograma

ml - Mililitro

mm - Milimetro

MPa - Megapascal

N° - Número

NaCl - Cloreto de sódio

NaNO<sub>3</sub> - Nitrato de sódio

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Dihidrogenofosfato de amônio

O<sub>2</sub> - Oxigênio molecular

OH<sup>-</sup> - Radical hidroxila

P - Potência

p/p - Peso/peso

PG - Poligalacturonases

PGL - Poligalacturonato liase

pH - Potencial hidrogeniônico

PMG - Polimetilgalacturonases

PMGE - Polimetilgalacturonato esterase

PMGL - Polimetilgalacturonato liase

PPase - A-Protopectinase tipo A

PPase - B-Protopectinase tipo B

rpm – Rotação por minuto

s - Segundo

t - Tempo

T - Tempo de reação

U - Unidade de atividade enzimática

U/ml - Unidade de atividade enzimática por mililitro

Ug- 1 - Unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial

V - Volume

v/v - Volume/volume

Ve - Volume da enzima (ml)

Vt - Volume total de reação

W - Watt

W/cm<sup>2</sup> - Watt por centímetro quadrado

W/cm<sup>3</sup> - Watt por centímetro cúbico

W/ml - Watt por mililitro

ZnSO<sub>4</sub> - Sulfato de zinco

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>16</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>20</b> |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL.....  | 20        |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 20        |
| <b>3</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>21</b> |
| 3.1          | MICROALGAS.....  | 21        |
| <b>3.1.1</b> | <b>Parede Celular</b> .....  | <b>23</b> |
| 3.2          | PRÉ-TRATAMENTOS DA BIOMASSA MICROALGÁCEA.....  | 25        |
| <b>3.2.1</b> | <b>Ultrassom</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>3.2.2</b> | <b>Micro-ondas</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>3.2.3</b> | <b>Hidrólise enzimática</b> .....  | <b>32</b> |
| 3.3          | PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....                                   | 41        |
| <b>4</b>     | <b>METODOLOGIA</b> .....   | <b>44</b> |
| 4.1          | COLETA E ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....                              | 45        |
| 4.2          | AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLACA.....  | 46        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Atividade celulolítica</b> .....  | <b>46</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Atividade pectinolítica</b> .....   | <b>47</b> |
| 4.3          | IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS .....   | 47        |
| 4.4          | PRODUÇÃO, SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS ..... | 47        |
| <b>4.4.1</b> | <b>Produção dos extratos enzimáticos brutos</b> .....  | <b>47</b> |
| <b>4.4.2</b> | <b>Extração e determinação das atividades enzimáticas</b> .....                                    | <b>48</b> |
| 4.5          | ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DO ROMPIMENTO DE PAREDE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA.....                        | 49        |
| <b>4.5.1</b> | <b>Produção e caracterização da biomassa microalgácea</b> .....                                    | <b>49</b> |
| <b>4.5.2</b> | <b>Pré-tratamentos físicos</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>4.5.3</b> | <b>Hidrólise enzimática</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>4.5.4</b> | <b>Análise estatística</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>54</b> |
| 5.1          | ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....                                       | 54        |
| 5.2          | AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLACA.....  | 54        |
| 5.3          | IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS .....   | 55        |
| 5.4          | PRODUÇÃO, SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS EXTRATOS BRUTOS.....              | 55        |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.5   | ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DO ROMPIMENTO DE PAREDE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA .....   | 59  |
| 5.5.1 | Produção e caracterização da biomassa microalgácea .....   | 59  |
| 5.5.2 | Pré-tratamentos físicos .....  | 60  |
| 5.5.3 | Hidrólise enzimática da biomassa .....   | 63  |
| 6     | CONCLUSÃO .....  | 74  |
|       | REFERÊNCIAS .....  | 76  |
|       | APÊNDICE A - Aplicação dos testes da ANOVA e Tukey para a seleção dos IE's mais significativos de cada grupo de fungos Celulolíticos e Pectinolíticos .....                                      | 92  |
|       | APÊNDICE B - Testes da ANOVA e Tukey para identificar em qual período de tempo foi obtida a maior e mais significativa das atividades enzimáticas medidas para cada ensaio de FES .....          | 93  |
|       | APÊNDICE C - Testes da ANOVA e Tukey para identificar qual fungo Celulolítico e Pectinolítico apresentaram atividade enzimática máxima .....   | 95  |
|       | APÊNDICE D - Testes da ANOVA e Tukey para identificar qual pré-tratamento físico obteve maior eficiência .....   | 96  |
|       | APÊNDICE E - Testes da ANOVA e Tukey para identificar em que tempo foi atingida a maior e mais significativa eficiência para cada pré-tratamento combinado que utilizou enzimas da FES .....     | 97  |
|       | APÊNDICE F - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência entre todos os pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas da FES .....                      | 101 |
|       | APÊNDICE G - Testes da ANOVA e Tukey para identificar em que tempo foi atingida a maior e mais significativa eficiência para cada pré-tratamento combinado que utilizou enzimas comerciais ..... | 102 |
|       | APÊNDICE H - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência entre todos os pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas comerciais .....                  | 106 |
|       | APÊNDICE I - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência para todos os pré-tratamentos que utilizaram hidrólise enzimática .....                            | 107 |
|       | APÊNDICE J - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência para todos os pré-tratamentos testados no estudo .....   | 109 |

## 1 INTRODUÇÃO

Além dos biocombustíveis de 3ª geração como o bioetanol, biodiesel, biohidrogênio e biometano, que têm despertado interesse em todo o mundo (KUMAR *et al.*, 2017), as microalgas são capazes de produzir compostos como carotenóides, ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, polissacarídeos, ficobiliproteínas, e várias outras energias bioativas. Esses compostos biorrenováveis, de alto valor comercial e nutricional são conhecidos como coprodutos (REHMANJI *et al.*, 2021).

Hipotetizou-se que a viabilidade comercial da produção de biocombustíveis só pode ser possível se estes constituintes da biomassa microalgácea forem explorados simultaneamente aos coprodutos (PENG *et al.*, 2018; SAHNI *et al.*, 2019). No entanto, os custos envolvidos em processos produtivos à base de microalgas são substancialmente altos, devido à falta de tecnologias apropriadas para se ter acesso às suas frações de proteínas, carboidratos e lipídios. Assim, é preciso aprimorar e elevar a eficiência da etapa do rompimento celular, que é um pré-tratamento para as etapas posteriores de processo da biomassa, visto que a parede celular e a membrana constituem uma barreira à liberação dos compostos intracelulares (GÜNERKEN *et al.*, 2015). A seleção dos pré-tratamentos mais adequados, gira em torno das características biológicas das microalgas e das suas paredes celulares (KIM *et al.*, 2014a).

De modo geral, a parede celular de microalgas é composta por polissacarídeos como celulose, pectina, ágar e alginato, cujo conteúdo se difere conforme a espécie (CHEN *et al.*, 2013). Há muitas variedades de pré-tratamentos que podem ser utilizadas para alcançar o rompimento celular, tais como métodos químicos, físicos e biológicos.

Os métodos mecânicos são técnicas alternativas para romper células através da aplicação de forças na forma de cisalhamento sólido e líquido (fresagem de esferas, homogeneizador de alta velocidade e homogeneizador de alta pressão), na forma de transferência de energia (ultrassom, micro-ondas e laser), como calor (termólise e autoclavagem) ou como corrente (campo elétrico pulsado) (RAHMAN; HOSANO; HOSANO, 2022). Para selecionar o método mais adequado para a ruptura das células

de microalgas, é importante considerar os seguintes fatores: a natureza de biomoléculas, a escalabilidade, a energia de entrada, a composição da parede celular e a concentração de biomassa (RAHMAN; HOSANO; HOSANO, 2022). Esses pré-tratamentos em sua maioria, não alteram a composição da biomassa, mas aumentam a área da superfície do substrato, e permitem que seus biocomponentes solúveis apresentem uma melhor bioacessibilidade e biodisponibilidade, o que proporciona benefícios econômicos para indústrias (CÓRDOVA *et al.*, 2018; ROBERTSON *et al.*, 2017).

A redução de tamanho é muito utilizada na degradação da biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol, onde o aumento da área específica proporciona uma melhor hidrólise da hemicelulose e da celulose em açúcares simples (GIMÉNEZ *et al.*, 2017). Considerando que as microalgas apresentam hemicelulose em sua parede celular, um pré-tratamento físico aplicado junto à hidrólise biológica pode ajudar a reduzir os custos da etapa de pré-tratamento na geração de biocombustíveis e dos coprodutos (YUN *et al.*, 2014), além disso, a combinação de diferentes operações industriais é uma prática comum na redução de custos operacionais de diversos processos (BARRAGÁN-TRINIDAD; CARRILLO-REYES; BUITRÓN, 2017; SHAH *et al.*, 2015).

Os pré-tratamentos biológicos são métodos de ruptura celular que proporcionam a degradação da biomassa microalgácea a partir da adição externa de enzimas purificadas, aplicação de coquetéis enzimáticos (MAHDY *et al.*, 2014), ou até mesmo pela adição direta de bactérias ou fungos vivos às células de microalgas (BEN YAHMED *et al.*, 2017). Nesse último, os microrganismos podem produzir enzimas hidrolíticas ao utilizarem a biomassa como fonte de carbono e energia e, dessa forma, proporcionarem a quebra de diversas substâncias como proteínas, lipídios e carboidratos (SKORY; FREER; BOTHAST, 1997).

Esses métodos enzimáticos são mais específicos e podem ocorrer em condições brandas de temperatura e pressão (FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2016), o que favorece a preservação da conformação original de componentes provenientes das células (POSTMA *et al.*, 2017). Proteínas solúveis, por exemplo, são sensíveis à

elevada temperatura e pH, e devem permanecer intactas, pois terão alto valor agregado devido à preservação de suas propriedades funcionais, como propriedades emulsificantes e espumantes (SCHWENZFEIER; WIERENGA; GRUPPEN, 2011).

Sob um ponto de vista econômico, a hidrólise enzimática é considerada comercialmente inviável devido ao alto custo das enzimas (ADITIYA *et al.*, 2016). O mercado mundial de enzimas industriais é altamente concentrado, uma vez que 75% é compartilhado pelas empresas: Novozymes (que detém aproximadamente 50%), juntamente com a DuPont e DSM (PALOHEIMO *et al.*, 2016), portanto, o desenvolvimento de novas tecnologias para produzir enzimas e aprimorar sua capacidade catalítica é uma ação estratégica de mercado (MENDES; IBRAIM PIRES ATALA; THOMÉO, 2017).

O valor econômico das celulasas não é padronizado, pois uma variedade de índices é usada para indicar a atividade enzimática. De acordo com Klein-Marcuschamer *et al.* (2012), a falta de correspondência entre esses índices comerciais representa uma desvantagem para que se faça uma sólida análise técnica econômica a respeito dos usos das celulasas. Essa análise é também corroborada por Liu, Zhang e Bao (2016), os quais afirmaram que é inviável uma comparação entre as enzimas celulolíticas dos atuais fornecedores do mercado, devido à estimativa de custos depender de outros fatores como a dosagem de enzimas, o rendimento da produção e a negociação entre fornecedores e consumidores. Os autores propuseram a produção local de enzimas como uma alternativa para impulsionar economicamente indústrias lignocelulósicas, para que a geração de etanol, por exemplo, seja viável, o que poderia levar a uma redução do custo de celulasas de 30 para 70%.

Há dois tipos de processos convencionais para a produção de enzimas microbianas: a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm) (LIU *et al.*, 2020). Cerca de 90% de todas as enzimas industriais são produzidas pela FSm, utilizando, em sua maioria, microrganismos geneticamente modificados (SINGHANIA *et al.*, 2015). No entanto, alguns pesquisadores afirmam que as celulasas produzidas por FES apresentam atividade semelhante às enzimas produzidas por FSm, incluindo as que estão presentes em preparações comerciais (MORETTI *et al.*, 2012).

Diante do potencial impacto socioeconômico e ambiental que o uso de microalgas em diversos processos produtivos pode proporcionar, este trabalho buscou avaliar pré-tratamentos físicos e enzimáticos no rompimento de células de *Chlorella sp.* aplicados de forma simples e combinada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar pré-tratamentos físicos e enzimáticos no rompimento celular de microalgas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar fungos produtores de enzimas hidrolíticas (celulases e pectinases);
- Avaliar a produção enzimática em ensaios de Fermentação em estado sólido (FES) para sua aplicação na hidrólise da biomassa microalgácea;
- Avaliar o rompimento celular de microalgas promovido pelos pré-tratamentos físicos e enzimáticos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MICROALGAS

Apesar de não apresentar valor taxonômico, o termo microalgas é geralmente utilizado na literatura para designar microrganismos com capacidade fotossintética, presença de clorofila e outros pigmentos, além de apresentarem estrutura procariótica ou eucariótica (DERNER *et al.*, 2006). Tanto as cianobactérias, que possuem estrutura celular procariótica, como as microalgas, de estrutura celular eucariótica, são geralmente incluídas nessa categoria. A maioria das algas são consideradas fotossintetizantes (ACIÉN; SEVILLA; GRIMA, 2013) e são um dos mais importantes produtores de oxigênio (O<sub>2</sub>) (KHAN; SHIN; KIM, 2018). Podem ainda ser cultivadas em monoculturas ou em consórcios, constituídos por uma diversidade de espécies (KIM *et al.*, 2014a).

Quanto à sua composição, as microalgas assemelham-se à maioria da biomassa microbiana. Possuem uma célula com proteínas, hidrocarbonetos, lipídios simples ou em combinações. Possuem um citoplasma que contém proteínas e minerais solúveis em água, onde ficam localizadas suas organelas (HAGEN; SIEGMUND; BRAUNE, 2002). A espécie *Chlorella vulgaris*, uma das mais notáveis e documentadas, possui um teor proteico de 42 a 58% do peso da biomassa seca (KHOEYI; SEYFABADI; RAMEZANPOUR, 2012) esta porcentagem varia de acordo com as condições de crescimento. Nesses organismos, a proteína possui diversas funcionalidades. Cerca de 20% do total de proteínas estão ligadas à parede celular, mais de 50% são internas e 30% migram para dentro e para fora da célula (BERLINER, 1986).

Em condições favoráveis de crescimento, podem apresentar de 5 a 40% no teor de lipídios por peso de biomassa seca (BECKER, 1994). Os lipídeos são compostos principalmente de glicolipídios, ceras, hidrocarbonetos, fosfolipídios e pequenas quantidades de ácidos graxos livres (LEE, 2008). São sintetizados pelos cloroplastos e depositados nas membranas celulares das organelas dos cloroplastos e das mitocôndrias (STEPHENSON *et al.*, 2010).

Os carboidratos são as substâncias mais abundantes na espécie. São representados por um grupo de açúcares redutores e polissacarídeos como amido e celulose. De forma geral, localizam-se no cloroplasto e são compostos de amilose e amilopectina. O glucano  $\beta$ 1-3 é um dos polissacarídeos mais importantes presentes na *C. vulgaris*, pois proporciona vários benefícios à saúde (LORDAN; ROSS; STANTON, 2011). Essa espécie de microalga pode apresentar de 12 a 30% de carboidrato total (YUKESH KANNAH *et al.*, 2021). Em uma circunstância em que as concentrações de nitrogênio estejam limitadas, o total de carboidratos pode atingir de 40 a 70% do peso seco (RIZZA *et al.*, 2017).

Além da avaliação básica da composição da microalga quanto ao teor de proteínas, carboidratos e lipídios, três outros aspectos são essenciais para a sua utilização em processos produtivos: a taxa de crescimento celular, o conteúdo específico de moléculas de valor para cada tipo de processo e a composição de sua parede celular, que será abordada mais profundamente no tópico 3.1.1 (CARVALHO *et al.*, 2020).

Sob o conceito Nexus as microalgas se destacam, pois são um recurso biológico que oferece soluções promissoras para os problemas de vulnerabilidade decorrentes das interações dinâmicas entre os três sistemas nele compreendidos (energia, água e alimentos). Na indústria alimentícia, a *C. vulgaris* é utilizada como alimento ou suplemento alimentar, seu uso também é feito pelas indústrias de cosméticos e farmacêuticas. No saneamento, as interações simbióticas estabelecidas entre microalgas e bactérias no processo de tratamento de efluentes resultam em uma alta eficiência na remoção de carbono orgânico e inorgânico, nutrientes ricos em nitrogênio e fósforo, metais pesados, compostos recalcitrantes e patógenos, o que faz das microalgas uma alternativa de tratamento terciário (WHITTON *et al.*, 2015). São capazes de liberar oxigênio por meio da fotossíntese, que é utilizado por bactérias heterotróficas para biodegradação da matéria orgânica. Assim, não há a necessidade de aeração externa, reduzindo o consumo de energia associado aos sistemas de tratamento convencionais de águas residuais, como ocorre no lodo ativado (IYOVO; DU; CHEN, 2010). Os lipídios provenientes das microalgas são considerados uma potencial fonte para a produção de biocombustíveis como biodiesel, biohidrogênio e

bioetanol (HOM-DIAZ *et al.*, 2016), isso porque seu cultivo não requer terras aráveis, e desse modo, não compete com a agricultura (SINGH; NIGAM; MURPHY, 2011).

Muitos esforços foram feitos para reduzir o custo total da produção de biomassa de microalgas, como a redução de custos com nutrientes utilizando resíduos agrícolas e a otimização dos processos de cultivo (SHUBA; KIFLE, 2018). No entanto, ainda há questões a serem abordadas como o fato de as microalgas serem geralmente cobertas por paredes relativamente espessas que dificultam a extração de bioprodutos. Os processos a jusante para extração de bioprodutos consistem em várias etapas, entre as quais a ruptura celular tem considerável relevância (HARUN; DANQUAH, 2011).

### **3.1.1 Parede Celular**

As microalgas eucarióticas são cobertas por uma parede celular, que é uma estrutura relativamente resistente. Sua função está em promover uma proteção natural às condições ambientais adversas e, em alguns casos, ajuda na adesão entre as células (DOMOZYCH *et al.*, 2012). É geralmente considerada um complexo de troca iônica devido à presença de grupos funcionais e à sua estrutura espacial (CASTRILLÓN; CARMONA; VÉLEZ-SALAZAR, 2015). A composição, proporção e complexidade da estrutura da parede celular das microalgas dependem diretamente da filogenia, estágio de desenvolvimento, tipo de célula e estação do ano (GÜNERKEN *et al.*, 2015).

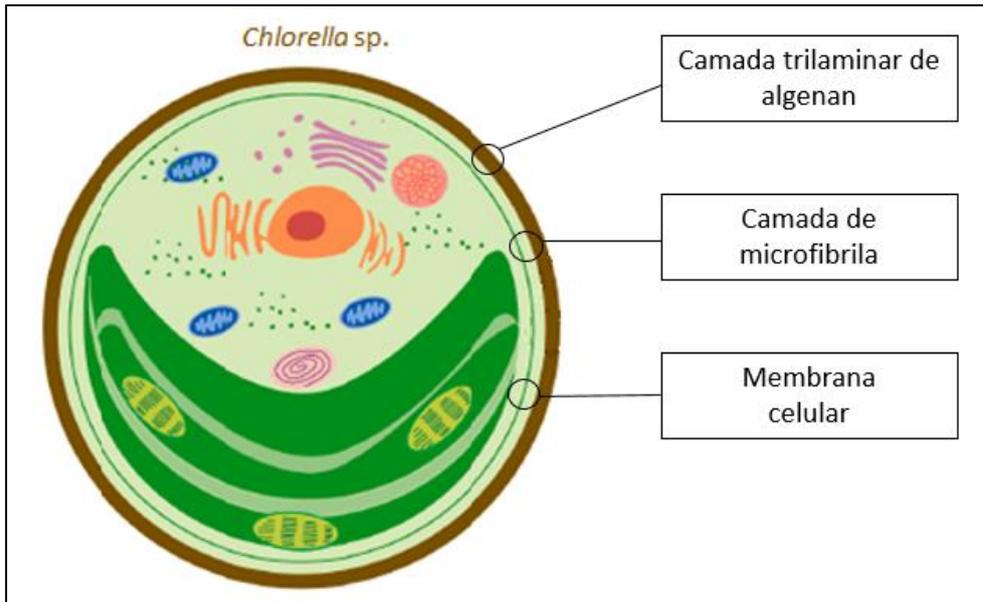
Na matriz da parede celular, além da celulose, também predominam polissacarídeos sulfatados e pectina (na forma de ácido poligalacturônico), que é infundido com substâncias inorgânicas (sílica, carbonato de cálcio e magnésio) (CASTRILLÓN; CARMONA; VÉLEZ-SALAZAR, 2015; CHEN *et al.*, 2013). A parede celular é composta por uma camada externa formada por polissacarídeos como pectina, algaenan, ágar e alginato, e por uma camada interna composta de hemicelulose, pectina, fucanos, juntamente com uma matriz de microfibrilas de glicoproteínas, celulose, arabinose, xilose, galactose e ramnose (SCHOLZ *et al.*, 2014).

A rigidez da parede celular se deve à presença da algaenan (YAMAMOTO *et al.*, 2004), também chamada de esporopolenina (VERSTEEGH; BLOKKER, 2004), que é um biopolímero semelhante à lignina, formado a partir de ácidos graxos hidroxilados e fenólicos e está presente nas paredes celulares complexas de microalgas como nas da *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). Já a matriz de microfibrilas, de acordo com Nemcová (2003), consiste em pequenas quantidades de celulose e hemicelulose, que criam uma rede consistente no contorno estrutural de parede celular.

Existem três tipos de estrutura de parede celular. O Tipo 1 consiste em duas camadas: a primeira camada, interna, é a de microfibrilas, transparente e repleta de elétrons, enquanto a segunda camada, externa, é a camada trilaminar de algaenan. O Tipo 2 consiste em duas camadas de microfibrilas sem a presença da algaenan como camada externa. O Tipo 3 consiste em uma única camada de microfibrilas (YAMADA; SAKAGUCHI, 1982).

A Figura 1 representa a estrutura da parede celular da *Chlorella* sp. Na fase inicial de crescimento, essa espécie possui uma parede formada por uma camada única e fina, chamada de camada filha. No entanto, em seu estágio maduro, sua parede possui uma estrutura de dupla ou tripla camada, chamada de parede mãe madura. Gerken, Donohoe e Knoshaug (2013) estudaram a ultraestrutura da *Chlorella vulgaris*. Eles relataram que sua parede consiste em uma única camada de microfibrilas (interior ou secundária) e uma camada trilaminar rígida de algaenan (externa ou primária).

Figura 1 - Estrutura da parede celular da *Chlorella* sp



Fonte: Adaptado de Yukesh Kannah *et al.* (2021).

A parede da *C. vulgaris* é composta, principalmente, por camadas de quitosana, celulose, hemicelulose, proteínas, lipídios e minerais. Em termos percentuais apresentam: 31% de hemicelulose, 15,4% de celulose e 27% de proteínas (NORTHCOTE; GOULDING; HORNE, 1958).

### 3.2 PRÉ-TRATAMENTOS DA BIOMASSA MICROALGÁCEA

O objetivo básico do pré-tratamento de microalgas é tornar as matérias-primas prontamente disponíveis para extração ou conversão química de compostos intracelulares, como proteínas, carboidratos, lipídios, oligossacarídeos, pigmentos etc. (VELAZQUEZ-LUCIO *et al.*, 2018). A vasta diversidade de microalgas e seus produtos derivados, leva a uma gama de pré-tratamentos possíveis, os quais podem ser classificados em duas categorias mais abrangentes: métodos mecânicos e não mecânicos (HU *et al.*, 2019), ou especificamente como métodos físicos, químicos e biológicos (ZABED *et al.*, 2019).

Os métodos físicos baseiam-se na utilização de técnicas mecânicas ou de irradiação (JĘDRZEJCZYK *et al.*, 2019). Ao romperem a estrutura da célula, despolimerizam a hemicelulose contida na parede das microalgas, reduzem a cristalinidade da celulose e aumentam a área de superfície de contato da matéria orgânica com o meio (KENDIR; UGURLU, 2018). Possuem elevado consumo de energia (GÜNERKEN *et*

*al.*, 2015) e são um dos métodos convencionais mais promissores empregados nas indústrias, pois conferem resultados convenientes na recuperação de determinados produtos em larga escala (ANANTHI *et al.*, 2021). São alguns dos exemplos desses métodos: moagem, homogeneização de alta pressão, ultrassom, congelamento/descongelamento, eletrólise e micro-ondas. O efeito físico gerado na ruptura da parede celular e na geração de produtos da biomassa pré-tratada varia conforme o tipo de microalga e parâmetros operacionais (KENDIR; UGURLU, 2018).

Já os métodos não mecânicos são baseados nas interações químicas entre as moléculas de compostos orgânicos ou inorgânicos com a membrana/parede celular, apresentando ou não transferência de energia térmica (GÜNERKEN *et al.*, 2015). Logo, a seleção desses tratamentos depende diretamente da composição da parede da microalga (LEE *et al.*, 2017). Em geral, esses métodos envolvem o rompimento celular por meio de agentes químicos, enzimas ou choque osmótico (MUTANDA *et al.*, 2011). Fazem uso de técnicas mais sutis que as mecânicas, já que, na maioria das vezes, as células são apenas perfuradas ou permeabilizadas; demandam menos energia, no entanto, utilizam produtos químicos e biológicos que possuem preços elevados; são mais difíceis de controlar e mais longos. Nesses pré-tratamentos pode ser gerado um fluxo de resíduos, além da formação de produtos secundários provenientes das reações (GÜNERKEN *et al.*, 2015).

Nos tratamentos químicos reagentes como ácidos, solventes, sais, nanopartículas e surfactantes têm sido utilizados para a ruptura da parede celular de microalgas (NAGARAJAN; CHANG; LEE, 2020). O ácido sulfúrico e o hidróxido de sódio, são o ácido e a base mais comumente utilizados. Os tratamentos ácido/alcalino também podem ser combinados com o pré-tratamento hidrotérmico para uma maior recuperação de açúcares (XIA *et al.*, 2015). Os ácidos atuam por meio da hidrólise ácida dos polímeros da parede celular, enquanto as bases saponificam os lipídios da membrana/parede celular e desintegram a estrutura da microalga. O desempenho da hidrólise ácida é favorecido por temperaturas mais altas, enquanto o tratamento alcalino é conhecido pela redução do tamanho das partículas (GÜNERKEN *et al.*, 2015).

O pré-tratamento químico é um dos métodos mais acessíveis, pois possui um baixo custo devido à fácil disponibilidade e alta estabilidade dos reagentes químicos (ADITIYA *et al.*, 2016). Embora esse processo seja relativamente mais barato e rápido do que o tratamento físico, vários componentes indesejados podem ser formados durante sua reação como, por exemplo, a formação do hidroximetilfurfural e o furfural, derivados do furano, que são gerados pela degradação de hexoses e pentoses, respectivamente, durante o tratamento ácido e inibem a reação de fermentação (DESSIE *et al.*, 2019). Logo, a neutralização do hidrolisado ácido é um passo crítico que deve ser seguido antes da etapa de fermentação (MAITY; MALLICK, 2022).

Já os pré-tratamentos biológicos fazem uso de enzimas, bactérias ou fungos (USMAN *et al.*, 2014). Esse tipo de processo envolve, principalmente, a hidrólise da parede celular e componentes intracelulares, ou a alteração da permeabilidade da parede para que os componentes nutritivos intracelulares fiquem mais acessíveis (NAGARAJAN; CHANG; LEE, 2020). É um processo de baixo consumo energético, desenvolve-se em condições suaves de operação e tem especificidade biológica (GÜNERKEN *et al.*, 2015). Além disso, a formação de inibidores durante pré-tratamentos biológicos é razoavelmente menor quando comparados aos pré-tratamentos químicos (LIU; HE; YAN, 2014; USMAN *et al.*, 2014).

Além da aplicação de forma simples, diferentes métodos de pré-tratamentos também podem ser aplicados de forma combinada. Essa técnica tem sido amplamente investigada para a extração de compostos bioativos, pois, ao explorar tecnologias complementares, melhora a eficiência de extração, reduz os custos envolvidos no processo e eleva a eficiência do pré-tratamento (KENDIR; UGURLU, 2018; UMMAT *et al.*, 2021). Por exemplo, a extração enzimática assistida por ultrassom e a assistida por micro-ondas combinam dois métodos de extração, onde, tanto o ultrassom quanto o micro-ondas, dependendo da frequência e da potência, podem aprimorar a atuação das enzimas na recuperação de compostos-alvo, por meio da ruptura parcial das células (O'DONNELL *et al.*, 2010).

Os resultados do pré-tratamento físico e biológico realizado por Gruber-Brunhumer *et al.* (2015) mostraram que o uso da moagem associada ao pré-tratamento com

enzimas para *Acutodemus obliquus* aumentou a solubilização de COD em 50%, e a produção de biogás em 64%, do que os métodos de pré-tratamento aplicados de forma simples. Estudos relacionados aos pré-tratamento combinados são relativamente limitados quando comparados com métodos de pré-tratamentos simples. Assim, a aplicabilidade da combinação de métodos de pré-tratamento deve ser extensivamente investigada para diferentes tipos de microalgas visando a redução dos custos do pré-tratamento e o aumento da produtividade de processos que fazem uso da biomassa microalgácea (KENDIR; UGURLU, 2018). Nos tópicos seguintes são destacados alguns tipos de pré-tratamentos.

### 3.2.1 Ultrassom

O pré-tratamento com ultrassom é uma das tecnologias mais aplicadas para diversos tipos de biomassa. Quando emitidas sobre as microalgas, as ondas ultrassônicas propiciam a cavitação no interior da célula e liberam o material intercelular para o meio externo. Além disso, durante o pré-tratamento, o aumento do calor e da pressão aceleram as reações químicas para a degradação da matéria orgânica (ALZATE *et al.*, 2012).

O ultrassom é uma onda sonora oscilante que requer um meio elástico para sustentá-la. Suas frequências variam de 20 kHz a 10 MHz, maior que o limite da audição humana, que se apresenta entre 16 Hz e 20 kHz. A potência, frequência e amplitude são os principais parâmetros físicos do ultrassom. A energia ultrassônica transmitida através do meio pode ser expressa das seguintes maneiras: como potência ultrassônica (W), intensidade ultrassônica ( $W/cm^2$ ) ou densidade de potência ultrassônica ( $W/cm^3$  ou  $W/ml$ ) (WANG *et al.*, 2018). A eficiência de rompimento celular pelo ultrassom é afetada principalmente pela frequência e potência acústica (KUROKAWA *et al.*, 2016). Quando aplicado sobre as microalgas, também é influenciada pela natureza de suas paredes celulares (KENDIR; UGURLU, 2018).

O ultrassom tem sido amplamente estudado para a extração de lipídios, proteínas e açúcares de microalgas. Em termos gerais, os mecanismos principais são: (I) a força de radiação e o fluxo acústico; e (II) os efeitos da cavitação (KUROKAWA *et al.*, 2016).

O primeiro fenômeno ocorre em baixas potências e é confirmado pelos bioefeitos no citoplasma da célula (MILLER, 1986). Este último fenômeno é ocasionado pela formação de microbolhas no momento em que o ultrassom é aplicado ao líquido. Conforme as microbolhas crescem até um tamanho crítico, o fenômeno da cavitação é gerado e, conseqüentemente, transmite ondas de choque que rompem as células vizinhas (GERDE *et al.*, 2012). Quando o colapso da bolha encontra a superfície sólida da parede celular, são formados microjatos devido à alta pressão e temperatura. Isso permite a penetração de solventes na célula e contribui para o seu rompimento (LUO; FANG; SMITH, 2014).

A presença de gás dissolvido e impurezas favorece o fenômeno da cavitação. Cada impureza no líquido ou na superfície do equipamento pode contribuir como um local de cavitação para a formação de novas bolhas, isso porque os gases presos nos interstícios e depressões das impurezas são liberados durante os ciclos de rarefação e constituem um novo núcleo de cavitação (VERNÈS; VIAN; CHEMAT, 2020). A temperatura e a pressão alcançada durante o colapso da bolha foi estimada em até 5.000 K e 100 MPa (WEN *et al.*, 2018). A cavitação também promove a termólise da água em radicais livres altamente reativos como H e OH (HU *et al.*, 2019).

A respeito dos fatores que influenciam a extração assistida por ultrassom, a cavitação é afetada pelas propriedades físicas do solvente (viscosidade, saturação pressão de vapor e tensão superficial). Uma alta viscosidade, por exemplo, intensifica as interações moleculares e impede a cavitação. A temperatura também pode impactar a cavitação, propiciando a alteração da pressão de vapor, da tensão superficial e da viscosidade do solvente. Além disso, quando a temperatura se aproxima do ponto de ebulição do solvente, as bolhas de cavitação são geradas com mais facilidade do que em baixas temperaturas, porém ocorre uma redução da sua capacidade de implosão. A temperatura elevada também aumenta as taxas de difusão de solvente e de transferência de massa, por esse motivo, esse fator deve ser bem controlado (WEN *et al.*, 2018). Altas frequências podem impactar negativamente a cavitação, porque quanto maior a frequência, mais curta é a fase de rarefação, o que dificulta a formação das bolhas (VERNÈS; VIAN; CHEMAT, 2020).

Quando comparado a outros métodos, como o ácido e o alcalino, por exemplo, o ultrassom se torna uma alternativa eficiente (FERREIRA *et al.*, 2016), pois permite a extração de compostos bioativos sem interferir em suas propriedades biológicas (JAMBRAK *et al.*, 2010). Esse pré-tratamento tem eficiência em aumentar os grânulos de amido para absorver água e distorcer a estrutura cristalina da parede, o que ajuda na acessibilidade enzimática e na hidrólise de carboidratos (ZHENG *et al.*, 2013). Apesar dos benefícios da técnica do ultrassom incluem uma alta eficiência de rompimento, breve tempo de tratamento, toxicidade insignificante e simples manuseio, ela ainda se mostra inadequada para o rompimento de microalgas em escala industrial, dada especialmente a necessidade de controle de temperatura e alta demanda de energia (LEE *et al.*, 2017).

### **3.2.2 Micro-ondas**

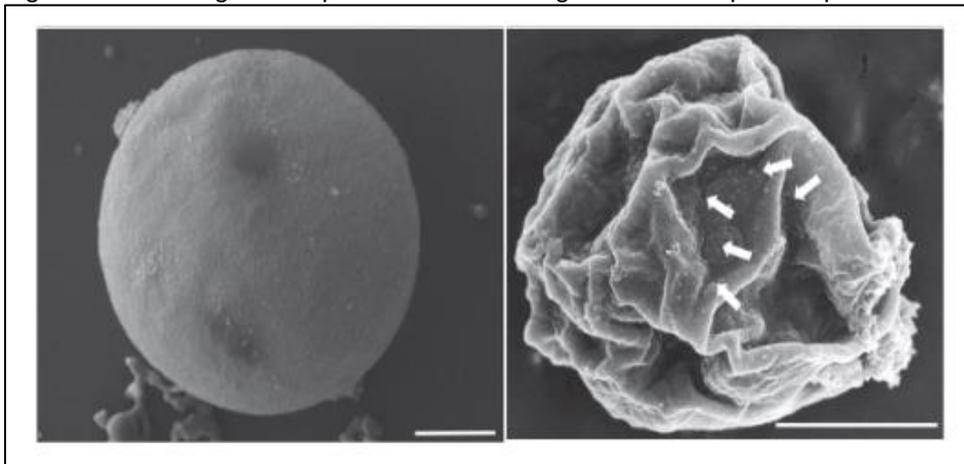
A transferência de energia de micro-ondas eletromagnéticas para a biomassa microalgal por calor e pressão é a base desse pré-tratamento. A entrada de energia e o tipo de microalga são parâmetros importantes para a viabilidade desse método, da mesma forma que ocorre no pré-tratamento com ultrassom (KENDIR; UGURLU, 2018). Micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes com uma frequência de 300 MHz a 300 GHz (POOJARY *et al.*, 2016). No entanto, apenas algumas frequências são aplicadas para usos científicos industriais e médicos, como 0,915 e 2,45 GHz (LETELLIER; BUDZINSKI, 1999). Na última década, a extração assistida por micro-ondas foi aplicada com sucesso a vários campos da química desde Ganzler e Salgo (1987), que a relataram pela primeira vez (VERNÈS; VIAN; CHEMAT, 2020).

Esse é um pré-tratamento que não inclui o contato com as células das microalgas. Durante o processo o calor pode ser gerado a partir de movimentos inter e intramoleculares quando a irradiação das micro-ondas é aplicada a um material polar dielétrico (por exemplo, a água) (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2012). Esse método engloba uma energia alternativa, que é gerada pela interação de moléculas polares de água (solventes), resultando em núcleos de calor que conduzem de forma rápida e eficaz o aumento da temperatura. Essas interações podem trazer resultados mais rápidos e

consecutivas reações com melhor seletividade e rendimento (FARR-JONES *et al.*, 1993). De modo geral, o aquecimento por micro-ondas pode ser gerado de duas formas: condução iônica e rotação dipolo (VINATORU; MASON; CALINESCU, 2017). A condução iônica refere-se à migração eletroforética de íons e elétrons induzida pela influência do campo elétrico produzido pelas micro-ondas. Este deslocamento causa o atrito entre os íons em movimento e o meio, o que leva à produção de calor (SATO *et al.*, 2004). A rotação dipolo acontece quando moléculas dipolares tentam se alinhar com o campo elétrico alternado. Essa oscilação leva a colisões entre as moléculas circundantes e, portanto, gera calor. Logo, a energia elétrica é convertida em energia cinética com calor transmitido de dentro do sistema para o fora, o oposto do que ocorre no aquecimento convencional (VERNÈS; VIAN; CHEMAT, 2020).

A transferência de calor por irradiação de micro-ondas também pode elevar a pressão de dentro da célula, por ocasionar a evaporação da umidade de seu interior. Essa mudança de pressão pode romper as membranas celulares, acelerar penetração de solvente e a liberação de compostos intracelulares (VERNÈS; VIAN; CHEMAT, 2020). A Figura 2 mostra a morfologia da superfície das microalgas antes e depois do pré-tratamento com micro-ondas.

Figura 2 - Morfologia da superfície das microalgas antes e depois do pré-tratamento com micro-ondas



Fonte: MA *et al.* (2014).

Devido a um alto natural teor de umidade, as microalgas são suscetíveis ao rompimento por micro-ondas (JACOBSEN *et al.*, 2013). Na extração assistida por micro-ondas, diversos parâmetros devem ser considerados, como a capacidade de

solubilidade do composto bioativo no solvente e a capacidade de o solvente absorver a energia das micro-ondas (DESTANDAU; THOMAS; ELFAKIR, 2013).

Dependendo da espécie da microalga submetida a esse pré-tratamento, é possível alcançar dessa forma maiores eficiências de rompimento celular que outros métodos mecânicos. No entanto, essa tecnologia é limitada apenas a compostos-alvo não voláteis e solventes polares (WANG; WELLER, 2006). Além disso, o tratamento baseado em micro-ondas pode levar à formação de ligações instáveis na estrutura da cadeia de carbono, afetando as propriedades desses compostos (LEE *et al.*, 2017).

### **3.2.3 Hidrólise enzimática**

Esse tipo de pré-tratamento biológico consiste na degradação de uma ligação química específica por meio da ação enzimática. Para se ter acesso aos produtos de interesse de microalgas, as células não necessitam de uma ruptura propriamente dita: a parede celular é porosa o suficiente para a difusão de pequenas moléculas, logo, se a membrana celular for permeada ou solubilizada, a biomassa poderá estar condicionada para a extração dos produtos intracelulares (CARVALHO *et al.*, 2017).

Graças às baixas temperaturas e condições de reação próximas a um pH neutro, os processos enzimáticos evitam a corrosão de equipamentos, situação essa que pode ocorrer durante processos termoquímicos. Por consumir menos energia, o método enzimático é considerado ambientalmente mais amigável do que os pré-tratamentos mecânicos, térmicos e opções de hidrólise catalítica química (GERKEN; DONOHOE; KNOSHAUG, 2013; HARUN; DANQUAH, 2011). Os métodos mecânicos destroem quase todas as partículas existentes na solução, enquanto os métodos químicos podem gerar danos e alterações no produto-alvo (DEMUEZ *et al.*, 2015).

Alguns dos fatores que devem ser considerados para a utilização da hidrólise enzimática são: o pH, a temperatura e a concentração de enzimas e substratos (SINGH; BISHNOI, 2012). Esses parâmetros estão correlacionados e afetam no rendimento do processo. A eficiência da hidrólise enzimática também pode ser atribuída ao tipo de pré-tratamento aplicado anteriormente à etapa de ruptura. A

escolha da enzima também é um parâmetro-chave, pois a eficácia de uma enzima se diferencia conforme a espécie da microalga a ser hidrolisada (SATI *et al.*, 2019).

Como as paredes celulares das microalgas compreendem uma variedade de biopolímeros que se distinguem em seus níveis de resistência à degradação, esse tipo de pré-tratamento pode ser feito através de um único tipo de enzima ou por um coquetel enzimático a fim de que seja produzido um efeito sinérgico entre as enzimas durante o rompimento da parede. A maioria das enzimas exploradas para esses fins são aquelas com atividade de celulase, hemicelulase, pectinase, protease e amilase (EHIMEN *et al.*, 2013), devido à facilidade de sua extração e purificação a partir de fungos (DASHTBAN MEHDI; SCHRAFT; QIN, 2009). As enzimas também podem ser usadas na forma imobilizada para aumentar sua vida útil e estabilidade, evitando a redução de suas atividades (GOMES; ZANETTE; SPIER, 2020).

As principais desvantagens do uso de enzimas em comparação com os métodos mecânicos ou químicos são o longo tempo de processo, a possível inibição do produto e o alto custo das enzimas comerciais, que limita suas aplicações (GÜNERKEN *et al.*, 2015). Embora os sistemas comerciais de enzimas tenham sido amplamente aplicados em estudos anteriores, o uso direto de fungos filamentosos é uma técnica barata e ecológica, especialmente quando são implantados como fermentação em estado sólido (FES) (BEN YAHMED *et al.*, 2017). Bactérias vivas também podem hidrolisar continuamente a biomassa por meio de seu crescimento e proliferação, todavia, as espécies de fungos e bactérias utilizadas para esse fim devem ser cuidadosamente selecionadas para serem eficazes na hidrólise de microalgas (LU *et al.*, 2013).

#### 3.2.3.1 Celulases e pectinases

Enzimas como celulases e pectinases são frequentemente utilizadas para realizar ações hidrolíticas nos componentes de paredes celulares. No entanto, isso requer um bom conhecimento da ação catalítica das enzimas selecionadas e das suas condições ideais para uso. Microrganismos representam um recurso atraente desses

biocatalisadores devido pois possuem biodiversidade, crescem rapidamente e são suscetíveis às manipulações genéticas (DE SOUZA; KAWAGUTI, 2021).

Dentre os diversos microrganismos que podem produzir celulasas, os fungos são os principais produtores *Trichoderma reesei* é a estirpe fúngica mais utilizada para a produção de celulasas. Outros fungos como *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., e *Aspergillus* spp. também são produtores dessas enzimas. Geralmente, os fungos produzem celulasas induzidos pela presença da celulose, enquanto as bactérias produzem celulase independente da presença do indutor. Além dos fungos, as celulasas são produzidas por diferentes gêneros de microrganismos como bactérias anaeróbicas no trato digestivo de ruminantes (*Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp.), bactérias aeróbias (*Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp.) e actinomicetos (*Microbispora* spp., *Thermomonospora* spp., *Streptomyces* spp.) (HANANI, 2018; NEGI, 2019; SAMPATHKUMAR *et al.*, 2019; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016; SINGHANIA *et al.*, 2017). A maioria das celulasas bacterianas atua em pH neutro e alcalino, enquanto os valores ótimos de pH para a maioria dos fungos estão entre 4 e 6 (BEN HMAD; GARGOURI, 2017; SINGHANIA *et al.*, 2017).

A quebra da molécula de celulose é iniciada pela hidrólise enzimática dos polímeros. A celulase é um sistema multienzimático composto por várias enzimas com numerosas isoenzimas, que atuam em sinergia (JAHANGEER *et al.*, 2005). O processo enzimático básico para a despolimerização da celulose ocorre pela ação de três enzimas celulolíticas: uma endo- $\beta$ -glucanase cliva aleatoriamente as ligações  $\beta$ -glicosídicas internas da cadeia de celulose; uma exo- $\beta$ -glucanase quebra as ligações  $\beta$ -glicosídicas no final da molécula de celulose e gera oligossacarídeos menores, os quais são decompostos em glicose e maltose pela ação de uma  $\beta$ -glucosidase (AL ABDALLAH; NIXON; FORTWENDEL, 2016).

As enzimas pectinolíticas podem ser obtidas de diferentes microrganismos como leveduras, bactérias, actinomicetos e principalmente por fungos filamentosos, que são considerados um de seus maiores produtores (JACOB, 2009; JAHAN *et al.*, 2017; SIEIRO *et al.*, 2012). São exemplos de fungos pectinolíticos: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizomucor* spp.,

são exemplos de bactérias pectinolíticas: *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp., e *Pseudomonas* spp. (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP *et al.*, 2001; KAVUTHODI; SEBASTIAN, 2018; PATIDAR *et al.*, 2018; RUIZ *et al.*, 2017). O fungo *Aspergillus* spp. é o gênero mais usado para a produção industrial dessas enzimas e apresenta diferenças consideráveis entre suas espécies quanto à especificidade, taxa de clivagem, pH ótimo, e temperatura para sua atividade (FAVELA-TORRES; VOLKE-SEPÚLVEDA; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2006; LANG; DÖRNENBURG, 2000; RUIZ *et al.*, 2017).

As pectinases, em função do substrato sobre o qual atuam, são classificadas principalmente em três tipos: protopectinases, esterases e despolimerases. Com base nas suas aplicações, as protopectinase são principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com a região do ácido poligalacturônico da protopectina (sítio interno) e, protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares (sítio externo) (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

A pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado) (GUMMADI; PANDA, 2003). Age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (KASHYAP *et al.*, 2001). Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas. Pode estar envolvida em mudanças das substâncias pécticas durante amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As despolimerases incluem hidrolases e liases. As hidrolases são as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases. A polimetilgalacturonase (PMG) presumivelmente hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos por clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG. As poligalacturonases (PG) hidrolisam  $\alpha$ -1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico

(MUTLU *et al.*, 1999). É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido pécico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As liases, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005) e incluem as pectina liases e as pectato liases. A pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) catalisa a b-eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) (GAINVORS *et al.*, 1994) de modo endo- ou exo-. A pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido pécico de modo endo- ou exo- por trans-eliminação e requer  $Ca^{2+}$  para atividade (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

O Quadro 1 resume o modo de ação, as vantagens e limitações de alguns pré-tratamentos mecânicos e não mecânicos.

Quadro 1 - Resumo do modo de ação, vantagens e limitações de alguns pré-tratamentos

| (continua)                        |  |  |  |  |
|-----------------------------------|--|--|--|--|
| Pré-tratamento                    | Modo de ação   | Vantagens  | Limitações   | Referências  |
| Homogeneização de alta velocidade | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cavitação hidrodinâmica</li> <li>- Forças de cisalhamento</li> </ul>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Método fácil e simples</li> <li>- Extração eficiente</li> <li>- Curta duração do tempo de contato</li> <li>- Isento de solventes</li> </ul>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta geração de calor durante operação</li> <li>- Alto a médio consumo de energia</li> </ul>  | (ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018)   |
| Homogeneização sob alta pressão   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tensão mecânica</li> <li>- Efeito da cavitação</li> <li>- Forças de cisalhamento</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não utiliza solventes</li> <li>- Método fácil e simples</li> <li>- Extração eficiente</li> <li>- Curta duração do tempo de contato</li> </ul>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto custo de manutenção</li> <li>- Menos eficiente com micróbios filamentosos</li> <li>- Alto a médio consumo de energia</li> <li>- Não pode extrair a maioria dos lipídios</li> <li>- Baixa eficiência com células rígidas</li> </ul> | (ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018)   |
| Fresagem de esferas               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Compactação mecânica</li> <li>- Forças de cisalhamento</li> </ul>                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pode ser dimensionado até alguns m<sup>3</sup></li> <li>- Não utiliza solventes</li> <li>- Adequado para amostras com alto teor de umidade</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Susceptível à degradação lipídica</li> <li>- É necessário um processo adicional para renovação dos produtos indesejáveis</li> <li>- Alto a médio consumo de energia</li> </ul>  | (ALHATTAB; KERMANSHAHI-POUR; BROOKS, 2019; BYREDDY <i>et al.</i> , 2016; ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018) |

Quadro 2 - Resumo do modo de ação, vantagens e limitações de alguns pré-tratamentos

| (continuação)  |  |  |   |   |
|----------------|--|--|---|---|
| Pré-tratamento | Modo de ação   | Vantagens  | Limitações  | Referências   |
| Ultrassom      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- O efeito da cavitação</li> <li>- A transmissão acústica e tensão de cisalhamento líquido</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixo tempo de extração</li> <li>- Menos requisitos de solvente</li> <li>- Maior penetração do solvente no compartimento celular</li> <li>- Alta liberação de lipídios</li> <li>- Ambientalmente amigável</li> <li>- Médio a baixo consumo de energia</li> </ul>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Energia intensiva</li> <li>- Dificuldades no processo de expansão</li> <li>- O custo operacional pode ser proibitivo</li> </ul>  | (ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018)  |
| Micro-ondas    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura</li> <li>- Aumento de energia molecular</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Simples e rápido</li> <li>- É escalável</li> <li>- A necessidade de energia pode variar de 90 a 540 MJ kg<sup>-1</sup></li> <li>- Tempo de extração reduzido</li> <li>- Ambientalmente amigável</li> <li>- Uso reduzido de solvente</li> <li>- Melhor rendimento de extração</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Altas temperaturas podem resultar em oxidação lipídica</li> <li>- Eficiência imprevisível (especialmente para substâncias não polares e solventes voláteis)</li> <li>- Fácil processo de expansão;</li> <li>- Formação de resíduo sólido indesejável filtração/centrifugação necessárias para sua remoção</li> <li>- Maior investimento de capital e custo operacional</li> <li>- Alto a médio consumo de energia</li> </ul> | (ALHATTAB; KERMANSHAHI-POUR; BROOKS, 2019; GÜNERKEN <i>et al.</i> , 2015; ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018) |

Quadro 3 - Resumo do modo de ação, vantagens e limitações de alguns pré-tratamentos

(continuação)

| Pré-tratamento          | Modo de ação   | Vantagens   | Limitações  | Referências   |
|-------------------------|--|---|---|---|
| Tratamentos químicos    | - Proteína, celulose ou/e pectina da célula microalgal são degradado por diferentes agentes químicos (ácidos, bases, detergentes, solventes, antibióticos, etc.) | - Baixo consumo de energia  | - A seletividade, adequação e a eficiência desses compostos dependem da composição da parede celular do microrganismo<br>- A qualidade do produto é altamente afetada pela oxidação ou contaminação do agente hidrolítico | (BHARTE; DESAI, 2018; HARUN; DANQUAH, 2011; MIDDELBERG, 1995; ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018) |
| Tratamentos enzimáticos | - As enzimas hidrolisam o ligações químicas por ligação a moléculas específicas na célula parede   | - Alta especificidade<br>- Usado para rendimentos mais altos de extrações<br>- Não tóxico<br>- Baixo consumo de energia | - Maior custo de capital<br>- Aplicação limitada devido ao alto custo das enzimas<br>- Exigência de tempo mais longo<br>- Condições estéreis<br>- A seleção de enzimas e suas combinações devem ser adequadas             | (ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018)  |
| Autoclave               | - Alto estresse térmico  | - Extração eficiente e alto rendimento lipídico<br>- Diminui a degradação do produto desejado                           | - Alto consumo de energia<br>- Demorado<br>- Não escalável  | (LEE <i>et al.</i> , 2010; ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018)                                    |

Quadro 4 - Resumo do modo de ação, vantagens e limitações de alguns pré-tratamentos

(conclusão)

| Pré-tratamento         | Modo de ação  | Vantagens   | Limitações  | Referências  |
|------------------------|---|---|---|--|
| Explosão de vapor      | - Queda de pressão repentina  | - Acessibilidade da recuperação lipídica sem liberação de substâncias perigosas<br>- Custo relativamente baixo<br>- Maior rendimento<br>- Exigência a curto prazo | - A eficiência depende da espécies<br><br>- Mais pesquisas são necessárias  | (ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018)   |
| Campo elétrico pulsado | - Fenômenos de eletroporação<br>- Permeabilização e formação de poros na membrana celular | - Sem uso de produtos químicos<br>- Sem formação de detritos celulares<br>- Relativamente simples<br>- Ambientalmente amigável                                    | - Dependência da composição do meio<br>- Sensibilidade à condutividade média<br>- Alto a médio consumo de energia | (BHARTE; DESAI, 2018; ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2018; PATEL; MIKES; MATSAKAS, 2018; SATI <i>et al.</i> , 2019) |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

### 3.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Há dois tipos de processos convencionais para a produção de enzimas microbianas: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm) (LIU *et al.*, 2020). A FSm é definida como uma fermentação em meio líquido, que contém nutrientes solúveis, ou como fermentação na presença de excesso de água. É a principal maneira de produção de enzimas devido ao fácil controle de parâmetros e boa base tecnológica para escalar a nível industrial (SINGHANIA *et al.*, 2010). Enquanto a FSm é o método mais conhecido na literatura científica e patentes, a FES ocupa um espaço ainda muito pequeno, porém, emergente (BANAT *et al.*, 2021).

A FES é definida como a fermentação sem ou quase sem água livre (SINGHANIA *et al.*, 2010). O aspecto mais importante a considerar ao desenvolver essa tecnologia de fermentação é a escolha dos microorganismos e dos substratos. Fungos são amplamente empregados para FES porque precisam de menos energia para esterilização do substrato e são menos suscetíveis à contaminação bacteriana (VERDUZCO-OLIVA; GUTIERREZ-URIBE, 2020). É considerada particularmente vantajosa para fungos filamentosos, uma vez que o meio sólido simula seu habitat natural (SARKAR *et al.*, 2012). Dessa forma esses fungos são capazes de sintetizarem grandes quantidades de enzimas e outros metabólitos. Em relação à capacidade de produção de enzimas celulolíticas destacam-se as linhagens dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (SELIM *et al.*, 2018). Apesar de microrganismos termofílicos possuírem enzimas mais resistentes à desnaturação e proteólise (KUMAR *et al.*, 2010) sua atividade enzimática é geralmente baixa quando comparada à de fungos mesofílicos (PAL; SONI, 2020).

As leveduras e algumas espécies de bactérias (por exemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Lactobacillus* sp.) são consideradas uma segunda melhor alternativa devido sua capacidade de florescer em ambientes com baixa atividade aquática (VERDUZCO-OLIVA; GUTIERREZ-URIBE, 2020). *Streptomyces* sp. e outros Actinomicetos também podem ser empregados na FES por causa de sua resistência a condições extremas e capacidade de colonizar abundantemente resíduos sólidos

(SOCCOL *et al.*, 2017). A produtividade enzimática da FES, pode ser quantificada por meio de ensaios de determinação de atividades enzimáticas, como a atividade do papel de filtro (FPase), endoglucanase (CMCase), xilanase, entre outras, que geralmente são expressas em unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial ( $Ug^{-1}$ ) (BEHERA; RAY, 2016).

O aumento na demanda por grande quantidade de metabólitos secundários biologicamente ativos (como antibióticos, toxinas bacterianas, drogas imunológicas e alcalóides), proteínas unicelulares, enzimas, produtos químicos industriais, biocombustíveis, alimentos, fenólicos, rações e produtos farmacêuticos (PANDEY, 2001; THOMAS; LARROCHE; PANDEYM, 2013) fez da tecnologia FES um método de produção alternativo à fermentação submersa (SmF) (ARORA; RANI; GHOSH, 2018). Isso porque essa técnica apresenta menor consumo de energia, menor demanda de esterilização (MANAN; WEBB, 2017) e seu custo se torna eficaz devido à alta produtividade volumétrica (SINGHANIA *et al.*, 2010). A FES também oferece uma abordagem ecológica vantajosa como a prevenção da poluição ambiental ao utilizar resíduos agrícolas como meio (FANG *et al.*, 2020), visto que, a maior parte desses resíduos não é tratada ou reutilizada. Em suas destinações incorretas geralmente são queimados, despejados ou descartados em aterros não planejados. Os substratos comumente usados na FES são grãos de cereais (arroz, trigo, cevada e milho), sementes de leguminosas, trigo farelo, materiais lignocelulósicos como canudos, serragem ou aparas de madeira, e uma vasta gama de matérias provenientes de plantas e animais (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018). Outras aplicações da FES incluem: pigmentos, produção de compostos fenólicos, compostagem, biobranqueamento, etc. (SOCCOL *et al.*, 2017). Remanescentes da FES (que têm um grau de biodegradabilidade) podem ser utilizados para compostagem, digestão anaeróbica ou para produzir biogás (VERDUZCO-OLIVA; GUTIERREZ-URIBE, 2020).

Apesar dos avanços, o principal entrave na industrialização do processo de FES é a falta de biorreatores eficientes e facilmente escaláveis. Isso provavelmente se deve à combinação de três fatores: projetos de biorreator ineficientes; falta de modelos matemáticos que descrevam os fenômenos de transporte e cinética em níveis micro

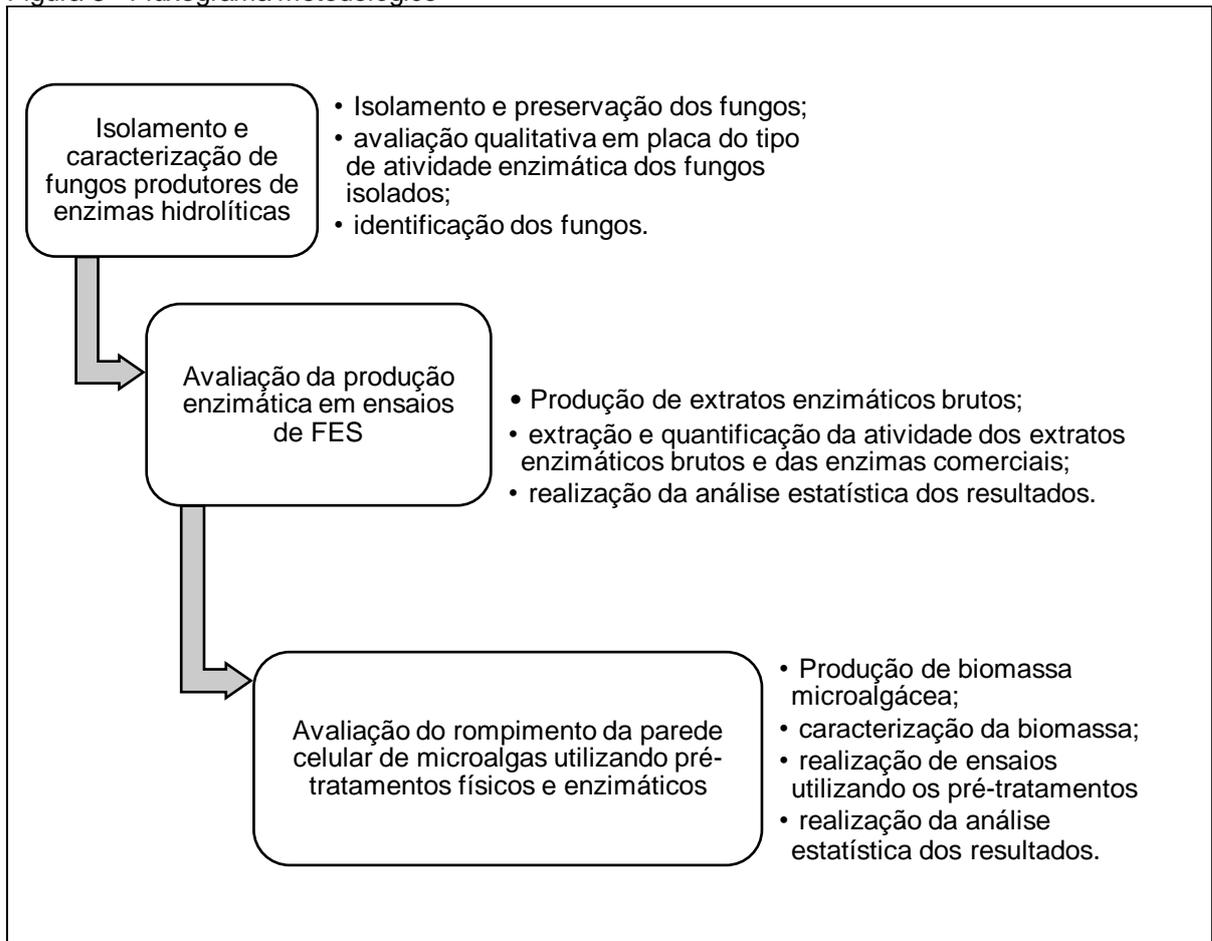
e macroscópicos e a falta de monitoramento de processos online e estratégias em geral que forneçam um maior controle (ARORA; RANI; GHOSH, 2018).

Alternativamente, a fermentação sequencial (FSeq), foi desenvolvida na tentativa de unir as vantagens de ambos processos de cultivo convencionais supracitados. Consiste em um pré-cultivo no estado sólido seguido de um cultivo submerso, tendo se mostrado uma boa modalidade de produção de enzimas celulolíticas tanto em aspectos qualitativos como quantitativos (FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017).

## 4 METODOLOGIA

Na Figura 3 é apresentado um fluxograma metodológico com as principais etapas dessa pesquisa.

Figura 3 - Fluxograma metodológico



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

#### 4.1 COLETA E ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Foram selecionados fungos produtores de pectinases e celulases devido à natureza da composição da parede celular da microalga *Chlorella* sp. utilizada nesse estudo. Para a seleção dos fungos produtores de pectinases, foi realizada uma triagem em placa com meio mínimo seletivo enriquecido com pectina cítrica. As amostras de fungos foram obtidas de quatro formas distintas: 1) a partir da coleção de fungos do Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento (CPID), localizado no município de Cariacica, na Região Metropolitana da Grande Vitória, Espírito Santo; 2) a partir da casca de maracujá em processo de decomposição (BIZ *et al.*, 2016) e 3) *Chlorella* sp. também em processo de decomposição e 4) a partir de porções de serrapilheira coletadas no entorno do CPID, que apresentava aspectos de degradação.

As porções de solo foram utilizadas como inóculo e misturadas com casca de maracujá, utilizada como indutora para produção de pectinases, em garrafas pets de 5 L. As garrafas foram armazenadas por um período de 5 dias em câmara DBO a 25°C (BERNARDI *et al.*, 2018). Os fungos produtores de celulases também foram isolados a partir de porções de serrapilheira coletadas no entorno do CPID. Assim, essas porções foram utilizadas como inóculo e misturadas com carboximetilcelulose (CMC), utilizada como indutora para produção de celulases (VÁZQUEZ-MONTOYA *et al.*, 2020), em garrafas pets de 5 L, as quais também foram armazenadas por um período de 5 dias em câmara DBO a 25°C (BERNARDI *et al.*, 2018).

Após a observação da formação das colônias foi realizado o método de isolamento direto adaptado de Menezes e Assis (2004), que consiste na transferência de esporos presentes no meio contaminado para placas de Petri contendo meio mínimo seletivo, sendo posteriormente incubados em câmara DBO por 48 h a 25°C. A composição dos meios mínimos seletivos foi adaptada de (PONTECORVO *et al.*, 1953) apresentada na Tabela 1. Para cada cultura foram realizados 3 repiques das colônias de fungos que se desenvolveram. Os isolados foram preservados conforme o método adaptado de Castellani (1967).

Tabela 1 - Composição dos meios mínimos seletivos

| <b>Componente</b>                              | <b>Quantidade por litro</b> |
|--|-----------------------------|
| NaNO <sub>3</sub>                              | 0,24 g                      |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2,97 g                      |
| MgSO <sub>4</sub>                              | 0,52 g                      |
| KCl  | 0,52 g                      |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O           | 0,01 g                      |
| ZnSO <sub>4</sub>                              | 0,01 g                      |
| Ágar   | 15 g                        |
| Água   | 1000 ml                     |
| Pectina cítrica/carboximetilcelulose (CMC)*    | 10 g                        |

Fonte: Adaptado de Pontecorvo *et al.* (1953).

Nota: \*este componente foi adicionado conforme a atividade que se desejou estimular.

## 4.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLACA

### 4.2.1 Atividade celulolítica

Os isolados foram cultivados previamente em meio BDA de 3 a 5 dias a 28°C. Discos de 0,8 cm de diâmetro foram inseridos como inóculos no centro de placas de Petri em meio sintético (

Tabela 2) apresentando a carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. Após 5 dias de incubação, as placas foram inundadas com uma solução corante vermelho congo ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) em tampão Tris HCl  $0,1 \text{ M}$ , pH  $8,0$ . Decorridos 15 minutos a solução foi descartada e as placas foram lavadas com  $5 \text{ ml}$  de solução de NaCl  $1 \text{ M}$ . Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com uma régua para o cálculo do índice enzimático (IE) (adaptado de BHADRECHA *et al.*, 2020). O IE indica a capacidade de o microrganismo produzir enzimas extracelulares. O IE foi medido pela razão entre o diâmetro médio da zona da degradação enzimática formada ao redor da colônia, visualizada através do corante e o diâmetro médio do crescimento da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Tabela 2 - Composição do meio sintético

| <b>Componentes</b>                                | <b>Concentração</b> | <b>Unidades</b>    |
|---|---------------------|--------------------|
| NaNO <sub>3</sub>                                 | 3,0                 | g.L <sup>-1</sup>  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 1,0                 | g.L <sup>-1</sup>  |
| MgSO <sub>4</sub>                                 | 0,5                 | g.L <sup>-1</sup>  |
| KCl   | 0,5                 | g.L <sup>-1</sup>  |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O              | 10,0                | mg.L <sup>-1</sup> |
| Fonte de carbono indutora da atividade enzimática | 10,0                | g.L <sup>-1</sup>  |
| Ágar  | 20,0                | g.L <sup>-1</sup>  |

Fonte: Nogueira e Cavalcanti (1996).

#### 4.2.2 Atividade pectinolítica

Os isolados foram cultivados previamente em meio BDA de 3 a 5 dias a 28°C. Discos de 0,8 cm de diâmetro foram inseridos como inóculos no centro de placas de Petri em meio sintético (

Tabela 2) apresentando a pectina cítrica como única fonte de carbono. Após 5 dias de incubação, as placas foram inundadas com uma solução de iodo a 1%. Decorridos 15 minutos a solução foi descartada. A zona clara formada ao redor da colônia do fungo indicou a reação entre a enzima secretada pelos fungos e o substrato. O diâmetro da zona clara em torno da colônia foi medido com uma régua para o cálculo do IE (adaptado de RAYMOND *et al.*, 2020).

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

A identificação dos isolados fúngicos foi realizada com base em exames macroscópicos das colônias (cor, forma e textura) e pela visualização das estruturas reprodutivas a partir da técnica de microcultivo (WATANABE, 2002). A identificação taxonômica foi feita com o auxílio de chaves de identificação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2009). Após a identificação, cada isolado recebeu um código, composto por letras e números.

### 4.4 PRODUÇÃO, SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS

#### 4.4.1 Produção dos extratos enzimáticos brutos

A partir dos testes de atividade em placa descritos nos tópicos 4.2.1 e 4.2.2, os fungos que apresentaram a formação de halo de degradação enzimática foram selecionados para produção de enzimas por meio do processo de fermentação em estado sólido (FES).

Os meios fermentativos foram preparados conforme metodologia adaptada de Curti (2019), em Erlenmeyers de 500 ml, compostos por 150 g de meio sólido, constituído por 120 g de areia e 30 g de vermiculita, 60% de umidade na capacidade de campo e 5% de seus respectivos indutores (carboximetilcelulose e pectina cítrica). Em cada frasco foram inoculados 8 discos de micélio com diâmetro de 0,8 cm, misturados junto ao meio suporte. As fermentações se deram em três repetições, a uma temperatura

de 30°C, armazenadas durante 4 dias em uma Câmara DBO e foram submetidas às análises diárias de quantificação de atividade enzimática.

#### 4.4.2 Extração e determinação das atividades enzimáticas

A extração das enzimas se deu conforme metodologia adaptada de Rodrigues *et al.*(2020). O meio contido nos frascos Erlenmeyers foram homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro e, na sequência, amostras de 5 g foram retiradas e inseridas em Erlenmeyers de 250 ml. Em cada frasco foram adicionados 20 ml de tampão acetato de sódio (0,2 M, pH 4,5) (adaptado de BIZ *et al.*, 2016; DHILLON *et al.*, 2012a). A mistura foi submetida à agitação por um período de 30 minutos, a 150 rpm e a 30°C. Após essa etapa, os sólidos grosseiros foram separados da fase líquida pela filtração em tecido, utilizando pressão manual. Os extratos brutos foram centrifugados a 10.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C e armazenados a - 16°C até a análise.

A atividade celulolítica (CMCase) do extrato filtrado foi baseada na quantidade de glicose produzida pela degradação da carboximetilcelulose, durante um período de 10 minutos de ação enzimática a 50°C, em tampão de citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8). Nessas mesmas condições, a atividade pectinolítica do extrato enzimático bruto filtrado foi quantificada, porém baseada na produção de ácido D-galacturônico a partir da degradação da pectina cítrica.

O método do ácido dinitrosalicílico (DNS) foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática (GHOSE, 1987; MILLER, 1959). A atividade foi calculada conforme a Equação **Erro! Fonte de referência não encontrada.:**

$$AE = \frac{D \times C \times V_t}{t \times V_e} \quad (1)$$

Onde,

D = diluição (quando for necessária)

C = concentração do açúcar redutor medido ( $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$V_t$  = volume total de reação (ml)

T = tempo de reação (min)

$V_e$  = volume da enzima (ml)

AE = atividade enzimática (U/ml)

Uma unidade (U) de atividade da celulase correspondeu à liberação de 1  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação, enquanto uma unidade (U) de atividade da pectinase correspondeu à liberação de 1 mol de açúcar redutor (ácido D-galacturônico) por minuto (BIZ *et al.*, 2016).

## 4.5 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DO ROMPIMENTO DE PAREDE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA

### 4.5.1 Produção e caracterização da biomassa microalgácea

Os experimentos foram realizados a partir da biomassa de *Chlorella* sp., produzida nas dependências do Laboratório de caracterização física, química e microbiológica (Lacar), situado no CPID. Para a produção da biomassa de *Chlorella* sp. foram utilizados 4 biorreatores cilíndricos de acrílico transparente, cada um com um volume útil de 18 L e 3 reatores de vidro em bancada, cada um com 4,5 L de volume útil. Os reatores constituíram um sistema fechado de cultivo, sendo, desse modo, mais controláveis e menos suscetíveis à contaminação. Os cultivos foram sujeitos à temperatura ambiente, luminosidade solar indireta, fotoperíodo natural e foi submetido a aeração, o que promoveu sua agitação constante. O meio BG-11 (ANDERSEN, 2005) autoclavado, foi utilizado como fonte de nutrientes.

O inóculo para os fotobiorreatores foram produzidos em bancada utilizando-se culturas de *Chlorella* sp. L06, proveniente de efluente anaeróbio, cedida pelo Laboratório de Saneamento (Labsan) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). A transferência do inóculo para os fotobiorreatores se deu na fase exponencial de crescimento em uma proporção de 10% (volume do inóculo/volume da cultura).

O tanino foi utilizado na etapa de recuperação da biomassa numa concentração de 0,1 g.L<sup>-1</sup> (FRANCISCO, 2016) após cada ciclo de cultivo. Na etapa seguinte à decantação, a biomassa foi centrifugada a 6.000 g por 15 minutos a 25°C. Ao longo

do cultivo toda biomassa foi acumulada em um recipiente de polipropileno e estocada na geladeira. Ao final do período de cultivo, a biomassa acumulada de microalgas foi homogeneizada e diluída a um teor de sólidos de 6% (p/p) para ser utilizada nas etapas posteriores.

A biomassa também foi submetida à análise de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e estocada no ultracongelador em formas de gelo e tubos de polipropileno, em porções de aproximadamente 7 ml até serem utilizadas nos ensaios de pré-tratamentos.

#### 4.5.2 Pré-tratamentos físicos

Para o rompimento da parede celular foram utilizados como pré-tratamentos físicos: moagem manual com areia, micro-ondas e ultrassom. Todos os pré-tratamentos físicos foram testados isoladamente e de forma combinada entre si.

A areia utilizada no processo de moagem manual foi retirada da praia de Camburi, localizada na cidade de Vitória- ES, sua faixa granulométrica variou entre 0,2 e 2 mm e sua composição era de 96% de quartzo, conforme a análise granulométrica realizada. Antes dos testes, a areia foi lavada duas vezes, com água corrente e, posteriormente, com água destilada, peneirada duas vezes para retirada de sólidos grosseiros e submetida à secagem em estufa durante 24 h. A porção da biomassa foi colocada no almofariz juntamente com 2,5 g da areia e moída manualmente com o auxílio de um pistilo até seu completo descongelamento (adaptado de UNTERLANDER; CHAMPAGNE; PLAXTON, 2017).

Para o pré-tratamento com micro-ondas, um volume de aproximadamente 7 ml de biomassa foi colocado no interior do micro-ondas em tubo de polipropileno durante 15 s, sob uma potência de 1.000 W (adaptado de ROKICKA *et al.*, 2020).

As condições de testes com ultrassom foram realizadas conforme descrito por Heo *et al.* (2017), para isso, a potência e o volume de ensaio foram recalculados conforme a Equação **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

$$ET = \frac{P \times t}{V \times ST} \quad (2)$$

Onde,

ET = Energia total (J.Kg<sup>-1</sup>)

P = Potência (W)

t = Tempo (s)

V = Volume (l)

ST = Sólidos totais (Kg.L<sup>-1</sup>)

Foi aplicada sobre o sistema uma taxa de energia de 15,75 MJ.Kg, em um volume útil de 7 ml em um tubo de polipropileno, a uma potência de 90W, por um período de, aproximadamente 1 minuto de tratamento.

A eficiência dos pré-tratamentos físicos foi calculada a partir do monitoramento da glicose solubilizada no meio, quantificada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (GHOSE.T.K, 1987; MILLER, 1959), conforme a Equação **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

$$EPT = \frac{(GPT - GL) \times 100}{CT} \quad (3)$$

Onde,

EPT (%) = Eficiência do pré-tratamento

GPT (g/l) = Glicose gerada após o pré-tratamento

GL (g/l) = Glicose livre na biomassa

CT (g/l) = Carboidratos totais

#### 4.5.3 Hidrólise enzimática

Os ensaios hidrolíticos com a biomassa de microalgas foram realizados com dois coquetéis enzimáticos distintos: o primeiro, proveniente da mistura de 2 tipos enzimáticos produzidos partir do processo de Fermentação em Estado Sólido (FES) pelos isolados fúngicos, conforme descrito no item 4.4, o segundo, proveniente da

mistura de dois tipos de enzimas comerciais (controle positivo) com celulases de *Aspergillus* sp. e pectinases de *Aspergillus aculeatus*, adquiridas da Sigma. As enzimas comerciais foram diluídas em 10 vezes para possuírem um nível de atividade enzimática semelhante às enzimas produzidas na FES, dessa forma foram utilizadas como controle positivo do experimento. A dosagem das misturas enzimáticas foi de 20% (v/v) (10% de enzimas celulolíticas e 10% de enzimas pectinolíticas). A hidrólise enzimática foi testada de forma combinada com os pré-tratamentos físicos.

Todos os testes de hidrólise enzimática se deram dentro dos seguintes critérios: concentração de microalgas a 6% de sólidos totais, pH de 4,5, a uma temperatura de 50°C, sob agitação constante de 150 rpm. A eficiência do rompimento celular promovido pela hidrólise enzimática também foi calculada conforme a Equação **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Durante as 5 primeiras horas foram retiradas para análise alíquotas de hora em hora, após esse período, as alíquotas eram retiradas a cada 24 h até o decaimento das concentrações de glicose.

Ao todo, foram realizados 21 ensaios de pré-tratamento em 3 repetições, tanto com os tratamentos físicos, quanto com os tratamentos enzimáticos, totalizando 63 unidades experimentais analisadas. O Quadro 5 apresenta todas as combinações de pré-tratamentos realizadas nos experimentos.

Quadro 5 - Pré-tratamentos testados para rompimento da biomassa microalgácea

| <b>Pré-tratamentos</b>              |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>Físicos</b>                      | Moagem (MO)  |
|                                     | Ultrassom (US)   |
|                                     | Micro-ondas (MW)   |
|                                     | Moagem + Ultrassom (MO+US)   |
|                                     | Moagem + Micro-ondas (MO+MW)   |
|                                     | Moagem + Ultrassom + Micro-ondas (MO+US+MW)                                    |
|                                     | Ultrassom + Micro-ondas (US+MW)  |
| <b>Físicos + enzimas FES</b>        | Moagem + Mistura de enzimas FES (MO+EF)  |
|                                     | Ultrassom + Mistura de enzimas FES (US+EF)                                     |
|                                     | Micro-ondas + Mistura de enzimas FES (MW+EF)                                   |
|                                     | Moagem + Ultrassom + Mistura de enzimas FES (MO+US+EF)                         |
|                                     | Ultrassom + Micro-ondas + Mistura de enzimas FES (US+MW+EF)                    |
|                                     | Moagem + Ultrassom + Micro-ondas + Mistura de enzimas FES (MO+US+MW+EF)        |
|                                     | Moagem + Micro-ondas + Mistura de enzimas FES (MO+MW+EF)                       |
| <b>Físicos + enzimas comerciais</b> | Moagem + Mistura de enzimas comerciais (MO+EC)                                 |
|                                     | Ultrassom + Mistura de enzimas comerciais (US+EC)                              |
|                                     | Micro-ondas + Mistura de enzimas comerciais (MW+EC)                            |
|                                     | Moagem + Ultrassom + Mistura de enzimas comerciais (MO+US+EC)                  |
|                                     | Ultrassom + Micro-ondas + Mistura de enzimas comerciais (US+MW+EC)             |
|                                     | Moagem + Ultrassom + Micro-ondas + Mistura de enzimas comerciais (MO+US+MW+EC) |
|                                     | Moagem + Micro-ondas + Mistura de enzimas comerciais (MO+MW+EC)                |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

#### 4.5.4 Análise estatística

Os resultados de todas as etapas foram gerados a partir da média de três repetições e avaliados pelo teste da ANOVA, para verificar se há diferença significativa entre os dados (se  $p < 0,05$ ) e pelo Teste de Tukey, para identificar quais resultados diferiram, com o auxílio do software estatístico RStudio, versão 4.0.2.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

A partir da etapa de triagem em placa com meio mínimo seletivo, foram selecionados ao todo 14 fungos, compostos por 10 fungos pectinolíticos nomeados pelos códigos: AR1, AR4, AR7, AR17, AR80, F10, MPE (provenientes da coleção de fungos do CPID), MAR (isolado da casca de maracujá em decomposição), P5 (isolado das porções de serrapilheira coletadas no entorno do CPID) e MAL (isolado da biomassa de *Chlorella* sp. em decomposição) e 4 fungos celulolíticos nomeados pelos códigos: C1, C2, C4 e C5 (isolado das porções de serrapilheira coletadas no entorno do CPID).

### 5.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLACA

Na etapa de avaliação qualitativa em placa, foram calculados os Índices Enzimáticos (IE) a partir da medida do diâmetro das colônias e dos halos produzidos, os quais são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos Índices Enzimáticos

|                | Fungo isolado | IE médio | Desvio Padrão |
|----------------|---------------|----------|---------------|
| Pectinolíticos | AR7           | 0,98     | 0,03          |
|                | AR17          | 4,85     | 0,38          |
|                | AR1           | 1,16     | 0,04          |
|                | AR4           | 1,22     | 0,02          |
|                | MAL           | 0,69     | 0,01          |
|                | F10           | 5,14     | 0,42          |
|                | MAR           | 6,88     | 0,01          |
|                | MPE           | 0,39     | 0,07          |
|                | P5            | 0,34     | 0,01          |
|                | AR80          | 1,06     | 0,24          |
| Celulolíticos  | C1            | 2,04     | 0,81          |
|                | C2            | 0,31     | 0,01          |
|                | C4            | 0,39     | 0,07          |
|                | C5            | 0,23     | 0,02          |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os fungos MAL e MAR apresentaram IE's distintos dos demais fungos pectinolíticos. Já o fungo C1 foi o único que apresentou um IE distinto dos demais fungos

celulolíticos. Sob esse critério, foram selecionados dois fungos de cada grupo: MAL, MAR, C1 e C5 para realização das etapas experimentais posteriores, sendo os fungos MAR e C1 os que produziram maiores atividade enzimáticas. O fungo C5 foi escolhido aleatoriamente, visto que não houve diferença significativa entre ele e os demais fungos C2 e C4 (tabelas no Apêndice A). Todas as tabelas da ANOVA e do teste Tukey estão nos apêndices deste trabalho.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Os fungos da etapa de avaliação quanti-qualitativa em placa foram identificados por gênero e espécie, como apresentado no Quadro 6.

Quadro 6 - Identificação dos fungos por gênero e espécie

|                | <b>Código</b>            | <b>Gênero/Espécie</b>    |
|----------------|--------------------------|--------------------------|
| Celulolíticos  | C1                       | FNE <sup>1</sup>         |
|                | C2                       | FNE <sup>1</sup>         |
|                | C4                       | FNE <sup>1</sup>         |
|                | C5                       | <i>Trichoderma</i> sp.   |
| Pectinolíticos | AR4                      | <i>Penicillium</i> sp.   |
|                | P5                       | <i>Aspergillus</i> sp.   |
|                | AR7                      | <i>Aspergillus niger</i> |
|                | AR80                     | FNE <sup>1</sup>         |
|                | MPE                      | FNE <sup>1</sup>         |
|                | MAL                      | <i>Fusarium</i> sp.      |
|                | F10                      | <i>Aspergillus</i> sp.   |
|                | AR17                     | FNE <sup>1</sup>         |
|                | AR1                      | FNE <sup>1</sup>         |
| MAR            | <i>Aspergillus niger</i> |                          |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nota: <sup>1</sup>FNE: fungo não esporulante.

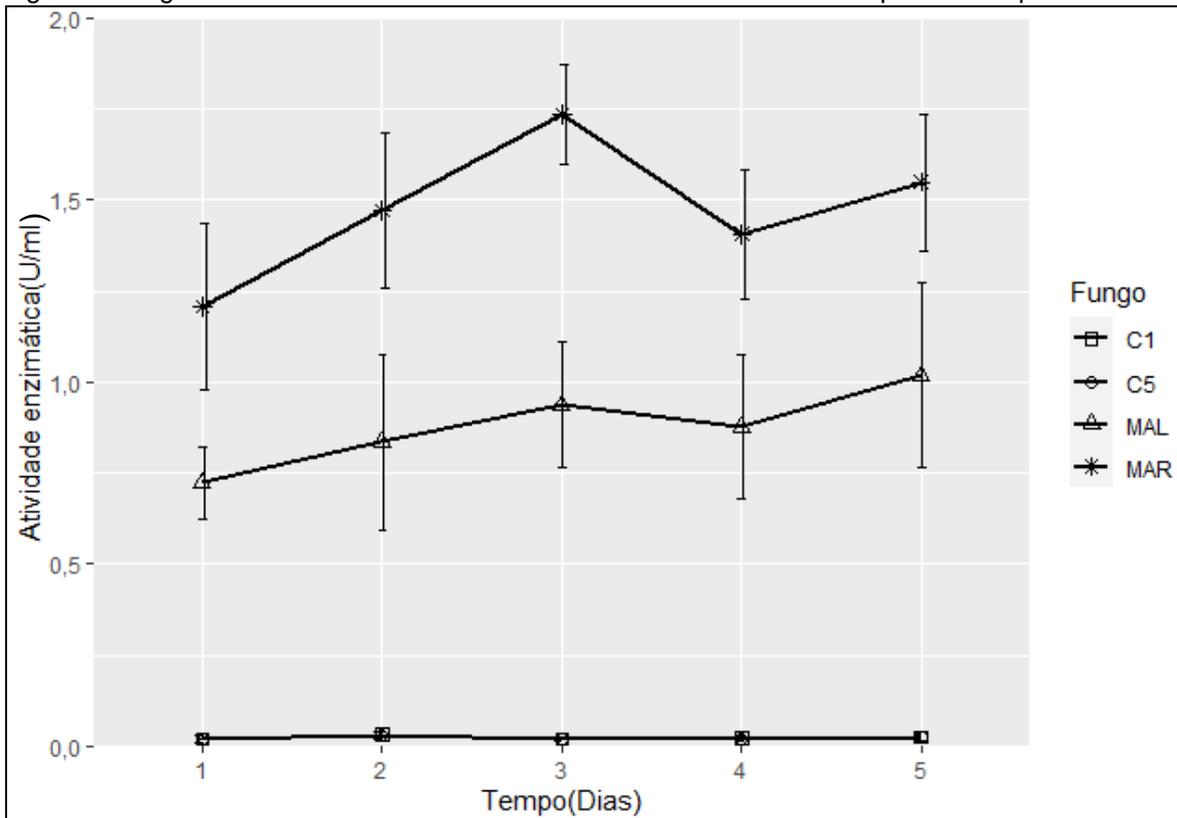
### 5.4 PRODUÇÃO, SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS EXTRATOS BRUTOS

Os quatro fungos selecionados na etapa de avaliação qualitativa da atividade enzimática em placa foram utilizados na produção dos extratos brutos enzimáticos por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES). Ao todo, foram realizados 4 ensaios

de FES distintos, cada um deles com os seguintes inóculos: MAL, MAR (para produção de pectinases), C1, C5 (para a produção de celulases).

Na Figura 4, são apresentados os valores das atividades enzimáticas dos extratos brutos medidos diariamente.

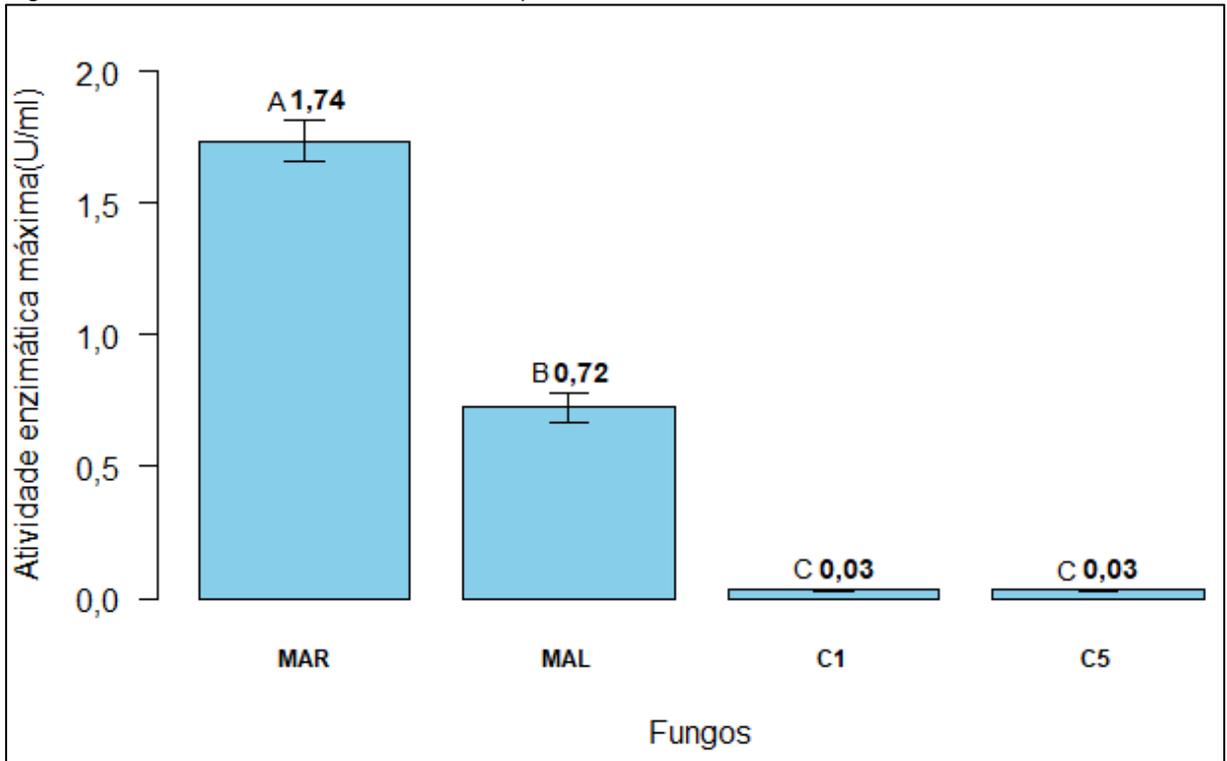
Figura 4 - Registro das atividades enzimáticas diárias dos extratos brutos produzidos por meio da FES



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nota-se na Figura 4 que os extratos brutos gerados na FES, que utilizou como inóculo o fungo MAR, apresentaram os maiores registros de atividade enzimática em todos os tempos observados. Já os fungos C1 e C5 não tiveram diferenças significativas entre suas atividades celulolíticas, além de registrarem os menores valores observados (tabelas no Apêndice B e C). A Figura 5 destaca as atividades máximas registradas de cada fungo.

Figura 5 - Atividades enzimáticas máximas produzidas na FES



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

As Tabelas Tabela 4 e

Tabela 5 apresentam alguns valores de pesquisas que realizaram a própria produção enzimática de celulases e pectinases.

Tabela 4 - Produção de celulases

| Referência                             | Microrganismo | Gênero/espécie   | Atividade Celulases (CMCase) U/ml | Método de produção enzimática |
|--|---------------|--|-----------------------------------|-------------------------------|
| Este trabalho                          | Fungo         | C1 <sup>1</sup>  | 0,03                              | FES                           |
| (BADER <i>et al.</i> , 2020)           | Fungo         | <i>Trichoderma harzianum</i> 78  | 0,019                             | FSm                           |
| (EVELYN <i>et al.</i> , 2020)          | Fungo         | <i>Eupenicillium Javanicum</i>   | 0,261                             | FES                           |
| (ALVES <i>et al.</i> , 2021)           | Fungo         | <i>Aspergillus niger</i>   | 0,32                              | FES                           |
| (SILVA <i>et al.</i> , 2018)           | Fungo         | <i>Trichoderma reesei</i> QM9414   | 3,14                              | FES                           |
| (QUIROZ ARITA; PEEBLES; BRADLEY, 2015) | Fungo         | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MK-157 e <i>Candida tropicalis</i> MK-118 <sup>2</sup> | 9,81                              | FES                           |
| (MAEDA <i>et al.</i> , 2013)           | Fungo         | <i>Penicillium funiculosum</i>   | 10,252                            | FES                           |
| (VISHWAKARMA; MALIK, 2022)             | Fungo         | <i>Trichoderma reesei</i>  | 10,98                             | FES                           |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nota: <sup>1</sup> Fungo não-esporulante, gênero/espécie não identificado.

É possível observar diferenças significativas entre os valores das atividades enzimáticas apresentados nas Tabelas Tabela 4

Tabela 5, isso porque o processo da produção enzimática pode variar de acordo com diversos fatores como o tipo de fermentação, a natureza e a concentração do microrganismo inoculado, o substrato utilizado, temperatura, pH, umidade, aeração e tempo, conforme Sath, Duhan e Duhan (2018). A atividade celulolítica produzida na FES pelo fungo C1 foi de 0,03 U/ml, valor este maior que o encontrado por Bader *et al.* (2020), que utilizou como indutor o extrato de triticales no processo de FSm para a produção enzimática do fungo *Trichoderma harzianum* 78, incubado a 20°C por um período de 5 dias, sem luminosidade.

O ensaio de FES realizado por Vishwakarma e Malik (2022), obteve o maior valor de atividade celulolítica dentre os demais levantados na Tabelas Tabela 4, utilizou como inóculo o fungo *Trichoderma reesei*, já apontado por Selim *et al.* (2018) como um microrganismo que possui alta capacidade de produção de celulases, farelo de trigo como substrato e incubação a 30°C por 5 dias.

Elevados valores de atividade de celulases também foram encontrados por Quiroz Arita, Peebles e Bradley (2015), que utilizaram no processo de FES uma cocultura com os fungos *Saccharomyces cerevisiae* MK-157 e *Candida tropicalis* MK-118<sup>2</sup>, com uma atividade de 9,81 U/ml e por Maeda *et al.* (2013) que utilizou o fungo *Penicillium funiculosum*, com uma atividade de 10,252 U/ml.

Tabela 5 - Produção de pectinases

| Referência                          | Microrganismo | Gênero/espécie                       | Atividade Pectinases (U/ml) | Método de produção enzimática |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Este trabalho                       | Fungo         | <i>Aspergillus niger</i> (MAR)       | 1,74                        | FES                           |
| (ABD EL-RAHIM <i>et al.</i> , 2020) | Fungo         | <i>Fusarium culmorum</i>             | 0,833                       | FSm                           |
| (BADER <i>et al.</i> , 2020)        | Fungo         | <i>Trichoderma harzianum</i> 78      | 0,9                         | FSm                           |
| (ABD EL-RAHIM <i>et al.</i> , 2020) | Fungo         | <i>Aspergillus pulverulentus</i> F23 | 2                           | FSm                           |
| (AGGARWAL; DUTTA; SHEIKH, 2020)     | Fungo         | <i>Candida</i>                       | 7,7                         | FES                           |
| (AGGARWAL; DUTTA; SHEIKH, 2020)     | Fungo         | <i>Candida</i>                       | 24                          | FES                           |
| (SANDRI <i>et al.</i> , 2013)       | Fungo         | <i>Aspergillus niger</i> T0005007-2  | 74                          | FES                           |
| (BEZAWADA; RAJU, 2018)              | Fungo         | <i>Aspergillus niger</i> NCIM        | 179,36                      | FES                           |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

É possível observar na

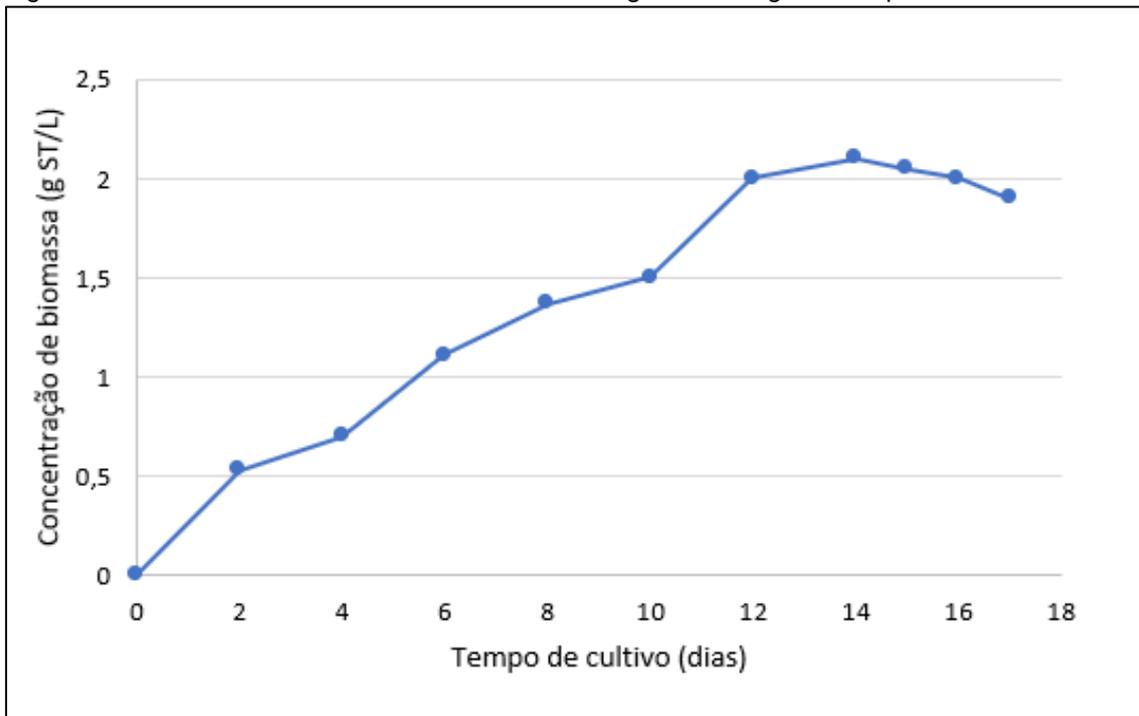
Tabela 5 que a atividade pectinolítica produzida na FES pelo fungo *Aspergillus niger* (MAR) foi de 1,74 U/ml, valor este semelhante ao encontrado por Abd El-Rahim *et al.* (2020), que utilizou como inóculo o fungo *Aspergillus pulverulentus* F23, incubado por 120h a 30°C em uma FSm. A atividade do fungo MAR foi maior que a encontrada nos estudos de Bader *et al.* e Abd El-Rahim *et al.* (2020), que fizeram uso da FSm como método de produção enzimática.

## 5.5 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DO ROMPIMENTO DE PAREDE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA

### 5.5.1 Produção e caracterização da biomassa microalgácea

Cada ciclo de crescimento, tanto nos fotobiorreatores de bancada quanto nos de acrílico, teve uma duração média de 12 dias. O parâmetro sólidos totais (ST), que foi utilizado para o monitoramento do crescimento da biomassa de *Chlorella* sp. L06, apontou uma concentração máxima de 2,0 g.L<sup>-1</sup> no final da fase exponencial e início da fase plateau, como pode ser observado na Figura 6 abaixo.

Figura 6 - Crescimento da biomassa de *Chlorella vulgaris* ao longo do tempo em termos de ST



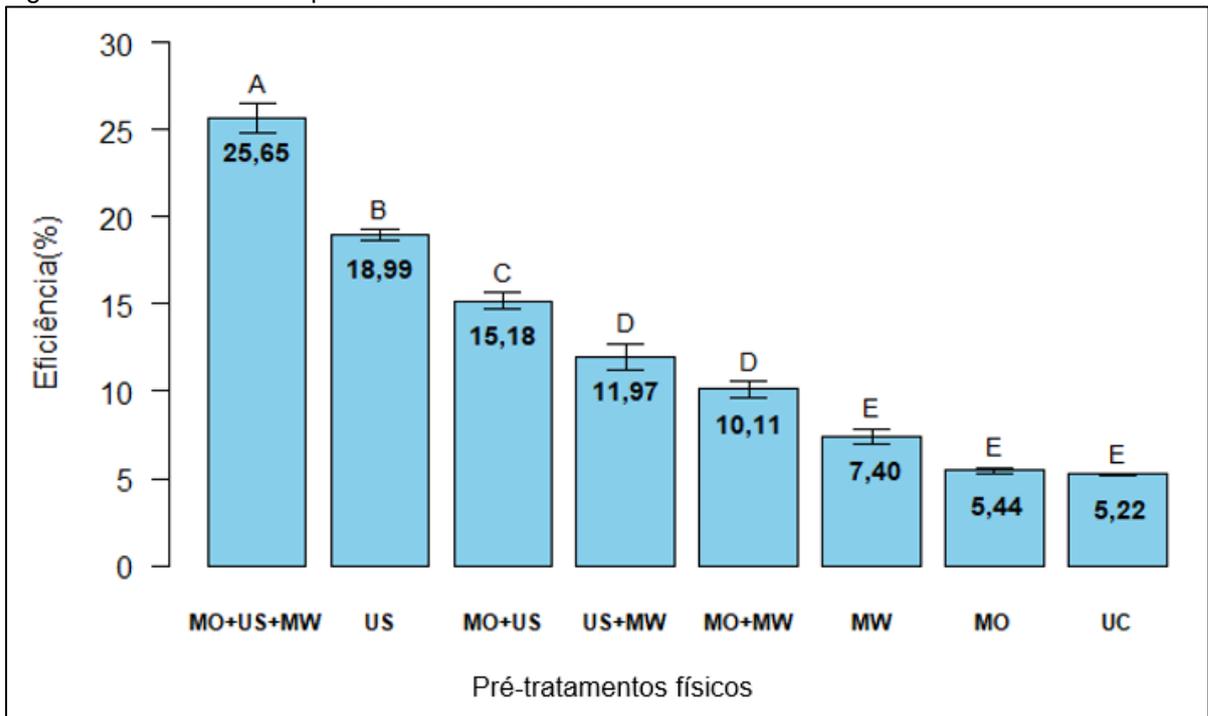
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Foram produzidos ao todo, aproximadamente, 1.045,0 g de biomassa microalgácea. Toda biomassa gerada, apresentou um teor de 5,3% de carboidratos totais, em termo de glicose, abaixo da faixa de 12 a 30% apontada por Yukesh Kannah *et al.* (2021). Kim *et al.* (2014b), também encontrou para a *C. vulgaris*, um valor semelhante de 5,9%, já Puglisi *et al.* (2018) identificou um teor entre 11 e 17%, enquanto Alavijeh *et al.* (2020) e Kassim *et al.* (2018), encontraram valores de 35 e 38%, respectivamente.

### 5.5.2 Pré-tratamentos físicos

A Figura 7 mostra a eficiência alcançada em cada experimento físico aplicado de forma simples e combinada. Todos os resultados apresentados são provenientes da média de três repetições.

Figura 7 - Eficiências dos pré-tratamentos físicos



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observa-se na Figura 7 que os tratamentos que receberam a mesma letra não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Dessa forma, nota-se que o tratamento MO+US+MW promoveu o maior rompimento celular com uma eficiência de 25,65% (tabelas no Apêndice D).

Já os pré-tratamentos testados individualmente (MW, MO e UC) apresentaram baixa eficiência quando comparados aos pré-tratamentos físicos combinados, exceto pelo pré-tratamento US, que gerou a segunda maior eficiência (18,99%) dentre os testes realizados. É possível observar na

Tabela 6 que o pré-tratamento com ultrassom nesta pesquisa atingiu um nível de eficiência na recuperação de coproduto maior do que os alcançados por Yu *et al.* (2015), Safi *et al.* (2015), Lorente, Farriol e Salvadó (2015), Zheng *et al.* (2011) e Safi *et al.* (2014), que fizeram uso dessa mesma tecnologia sobre a biomassa de *Chlorella* sp. Além das eficiências registradas por Yu *et al.* (2015), Rakesh *et al.* (2015), Zheng *et al.* (2011) e Cheng *et al.* (2013), que utilizaram o micro-ondas como método de rompimento.

Tabela 6 - Pré-tratamentos físicos aplicados na microalga *Chlorella* sp

| Pré-tratamento físico           | Eficiência (%) | Produto analisado      | Microalga                      | Referência                        |
|---------------------------------|----------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Moagem                          | 5,44           | Glicose                | <i>Chlorella vulgaris</i> L06  | Este trabalho                     |
| Micro-ondas                     | 7,40           | Glicose                | <i>Chlorella vulgaris</i> L06  | Este trabalho                     |
| Ultrassom                       | 18,99          | Glicose                | <i>Chlorella vulgaris</i> L06  | Este trabalho                     |
| Moagem, ultrassom e micro-ondas | 25,65          | Glicose                | <i>Chlorella vulgaris</i> L06  | Este trabalho                     |
|                                 | 4,4            | Lipídeos               | <i>Chlorella sorokiniana</i>   | (YU <i>et al.</i> , 2015)         |
|                                 | 9              | Proteína               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (SAFI <i>et al.</i> , 2015)       |
|                                 | 14,1           | Lipídeos               | <i>Chlorella sorokiniana</i>   | (LORENTE; FARRIOL; SALVADÓ, 2015) |
|                                 | 15             | Lipídeos               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (ZHENG <i>et al.</i> , 2011)      |
| Ultrassom                       | 18,1           | Proteína               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (SAFI <i>et al.</i> , 2014)       |
|                                 | 35,28          | Lipídeos               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (ROKICKA <i>et al.</i> , 2020)    |
|                                 | 50,88          | Nº de células rompidas | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (SHANKAR <i>et al.</i> , 2017)    |
|                                 | 69,56          | Lipídeos               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (HEO <i>et al.</i> , 2017)        |
|                                 | 80             | Lipídeos               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (PROMMUAK <i>et al.</i> , 2012)   |
|                                 | 0,9            | Lipídeos               | <i>Chlorella sorokiniana</i>   | (YU <i>et al.</i> , 2015)         |
|                                 | 15             | Lipídeos               | <i>Chlorella sorokiniana</i>   | (RAKESH <i>et al.</i> , 2015)     |
|                                 | 18             | Lipídeos               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (ZHENG <i>et al.</i> , 2011)      |
| Micro-ondas                     | 18,7           | Lipídeos               | <i>Chlorella</i> PY-ZU1        | (CHENG <i>et al.</i> , 2013)      |
|                                 | 41,31          | Lipídeos               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (ROKICKA <i>et al.</i> , 2020)    |
|                                 | 49             | Lipídeos               | <i>Scenedesmus quadricauda</i> | (ONUMAEGBU <i>et al.</i> , 2019)  |
|                                 | 74,75          | Nº de células rompidas | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (SHANKAR <i>et al.</i> , 2017)    |
|                                 | 82,87          | Lipídeos               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (HEO <i>et al.</i> , 2017)        |
| Moagem                          | 9              | Proteína               | <i>Chlorella vulgaris</i>      | (SAFI <i>et al.</i> , 2014)       |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

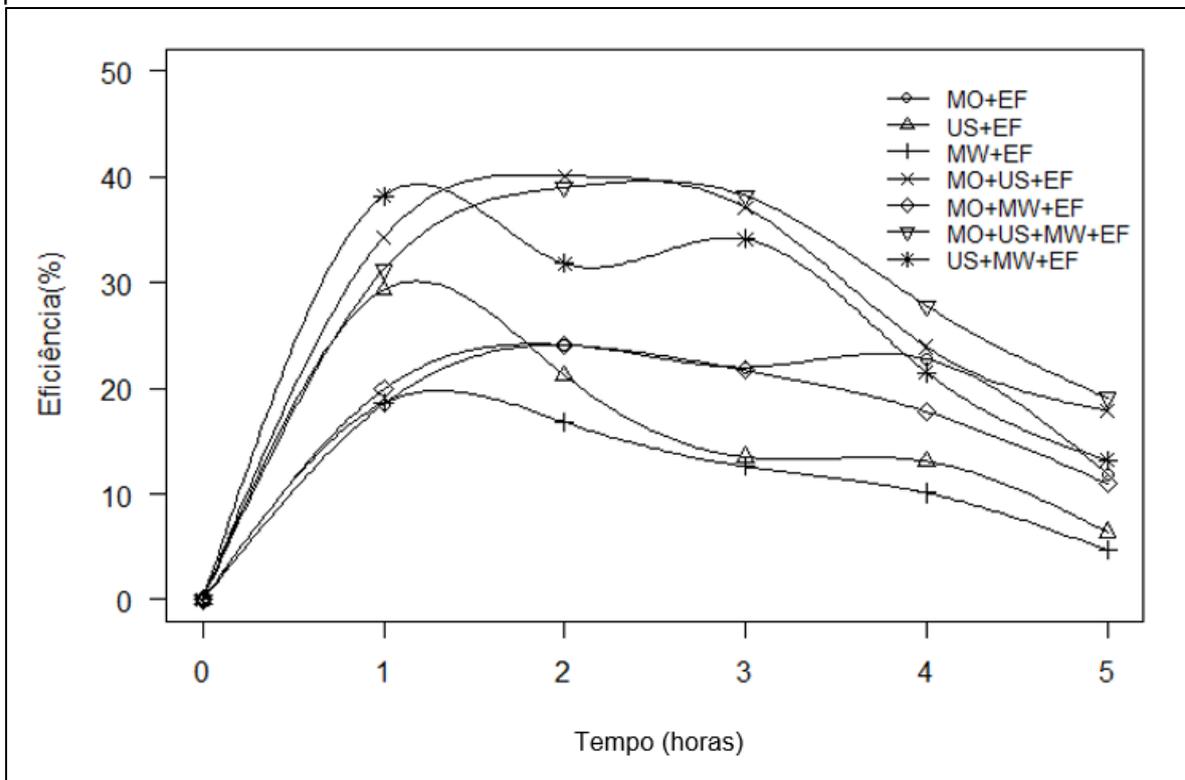
Observando a

Tabela 6, é possível constatar que o nível de eficiência atingido por diferentes técnicas de pré-tratamento sobre uma mesma espécie de microalga, depende das condições experimentais determinadas. Prommuak *et al.* (2012), por exemplo, obteve 80% de eficiência no rompimento da *Chlorella vulgaris* utilizando o ultrassom, enquanto Heo *et al.* (2017) obteve 82,87%, fazendo uso do micro-ondas.

### 5.5.3 Hidrólise enzimática da biomassa

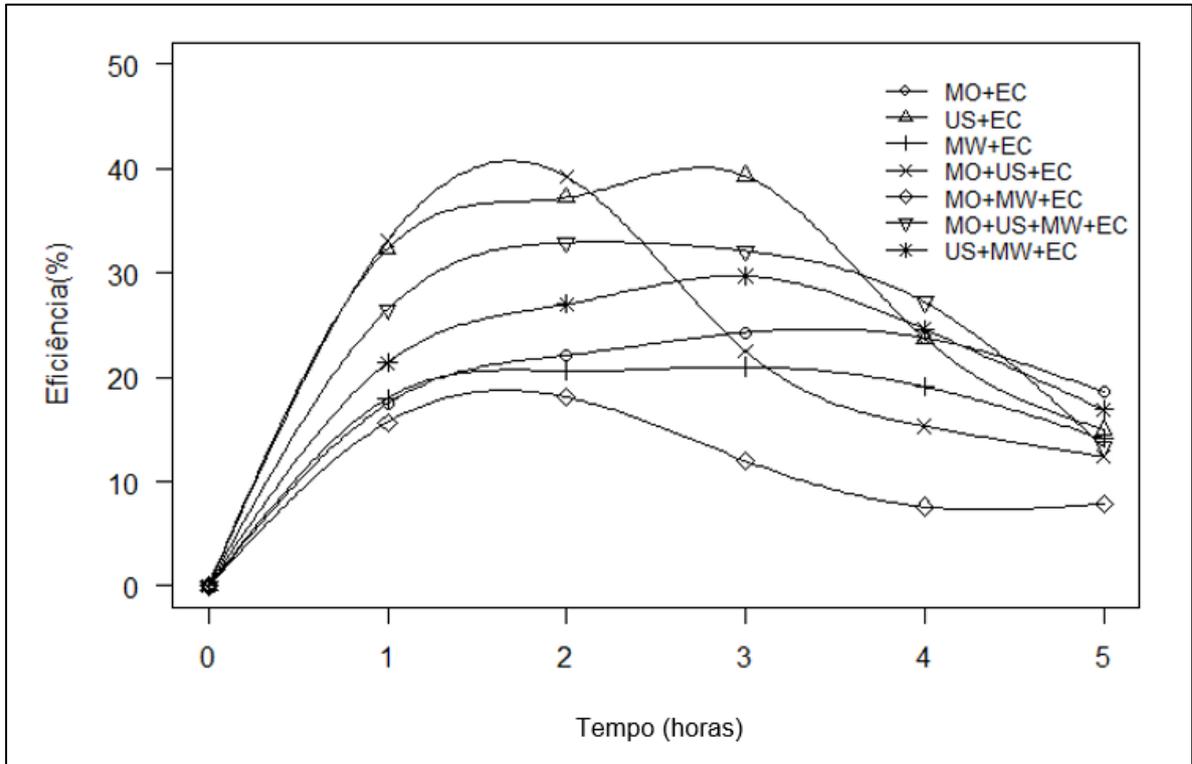
As Figuras 8 e 9 apresentam uma visão geral das eficiências das hidrólises monitoradas ao longo do tempo utilizando as enzimas produzidas pela FES e as enzimas comerciais, respectivamente, combinadas aos pré-tratamentos físicos.

Figura 8 - Monitoramento da hidrólise realizada pelas enzimas produzidas na FES combinada com os pré-tratamentos físicos



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 9 - Monitoramento da hidrólise realizada pelas enzimas comerciais combinada com os pré-tratamentos físicos

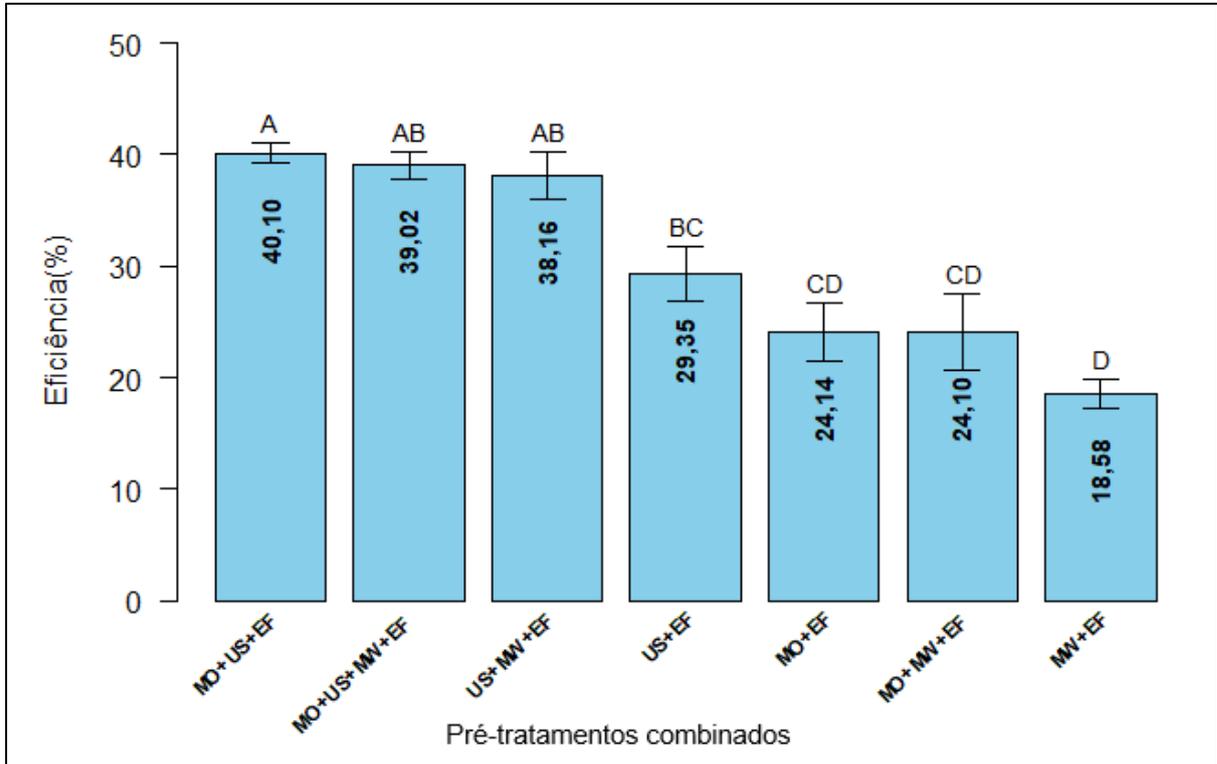


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

É possível observar nas Figuras **Figura 8** **Erro! Fonte de referência não encontrada.** um decaimento da eficiência ao longo do tempo, isso porque, provavelmente, houve consumo da glicose liberada no meio por parte de microrganismos presentes no meio de reação, conforme (ROUCHES *et al.*, 2016).

As eficiências dos tratamentos são apresentadas na Figura 10, para os testes de rompimento celular que utilizaram enzimas produzidas pela FES (tabelas no Apêndice E e F), e na Figura 11 (tabelas no Apêndice G e H), para os que utilizaram enzimas comerciais.

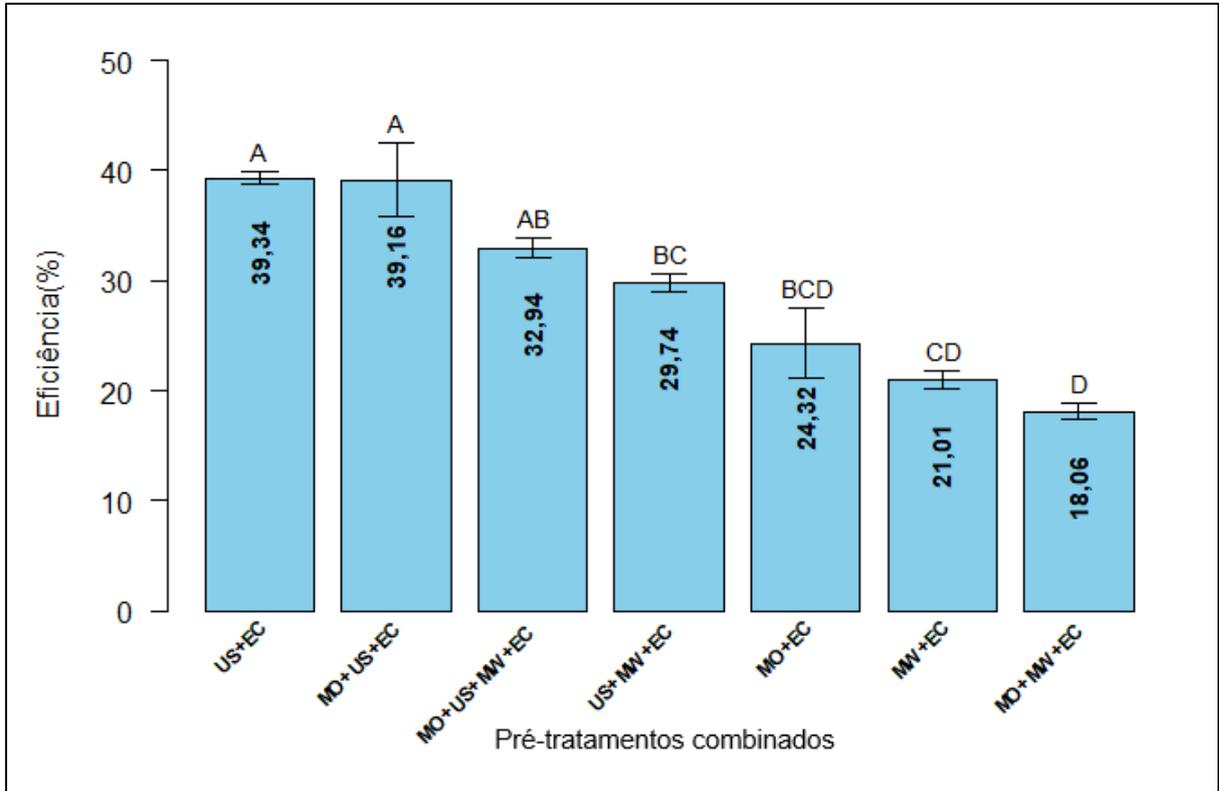
Figura 10 - Maiores eficiências atingidas nos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas da FES



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observa-se na Figura 10, que os pré-tratamentos MO+US+EF (40,10%), MO+US+MW+EF (39,00%), ambos após 2h de hidrólise e US+MW+EF (38,17%), após 1h de hidrólise, dentre os testes que utilizaram enzimas provenientes da FES, foram os que apresentaram as maiores eficiências alcançadas. As menores eficiências foram dos pré-tratamentos MO+EF (24,13%), MO+MW+EF (24,10%) e MW+EF (18,57%).

Figura 11 - Maiores eficiências atingidas nos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas comerciais

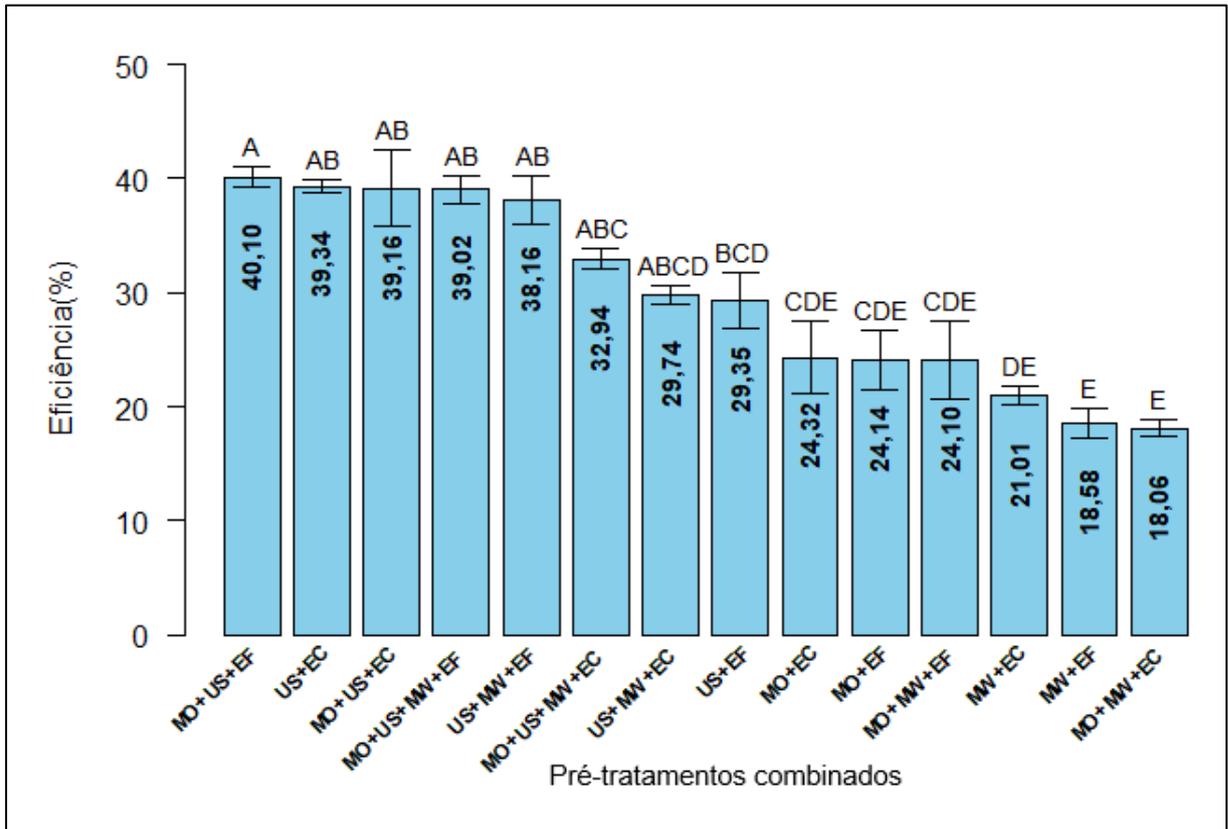


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observa-se na Figura 11, que os pré-tratamentos US+EC (39,33%), após 2 h de hidrólise, MO+US+EC (39,17%) e MO+US+MW+EC (32,97%), ambos após 1 h de hidrólise, dentre os testes que utilizaram enzimas comerciais, foram os que apresentaram as maiores eficiências alcançadas. As menores eficiências foram dos pré-tratamentos MO+MW+EC (18,07%), MW+EC (21,03%) e MO+EC (24,33%).

A Figura 12 apresenta a comparação de todos os pré-tratamentos que utilizaram a hidrólise enzimática com as enzimas produzidas pela FES e com as enzimas comerciais.

Figura 12 - Eficiências de todos os pré-tratamentos físicos que foram combinados com hidrólise enzimática



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

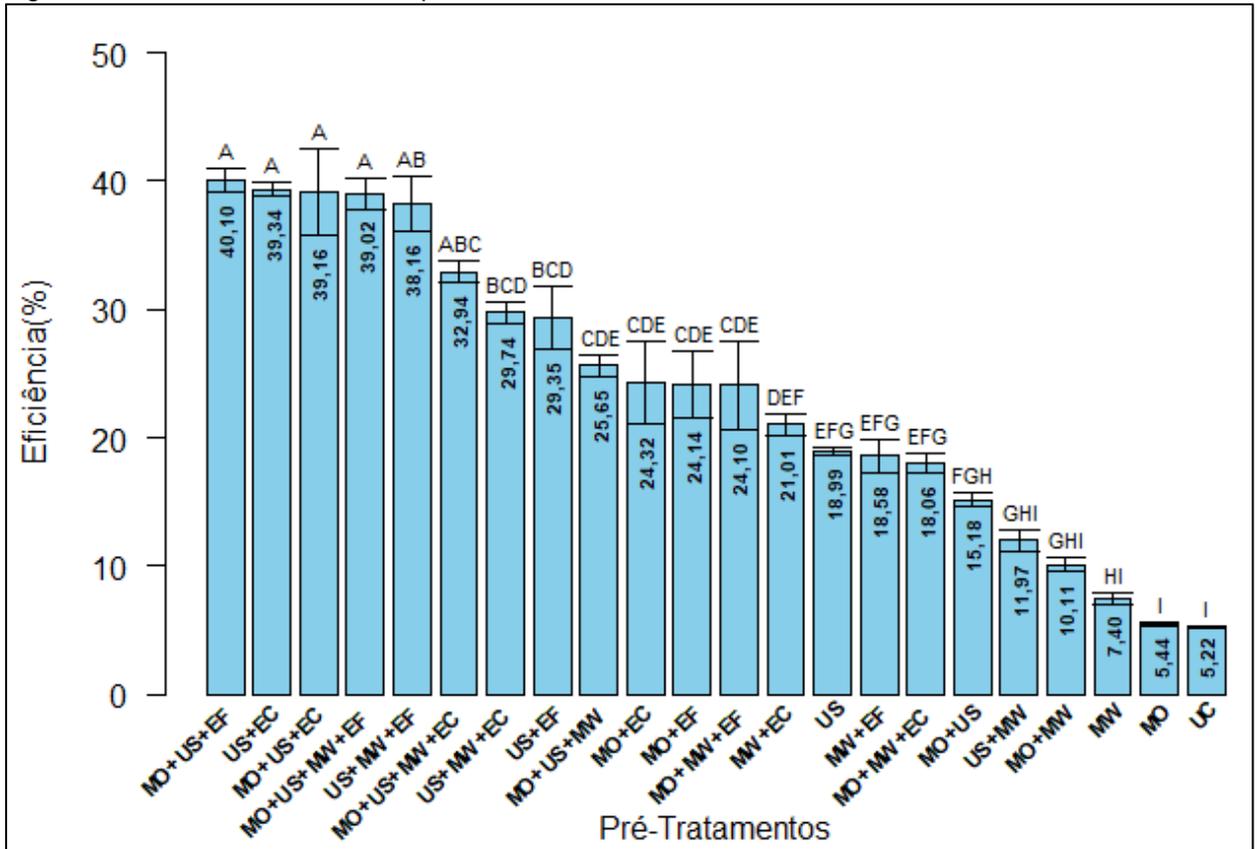
Quando comparados todos os pré-tratamentos que utilizaram a hidrólise enzimática (tabelas no Apêndice I), nota-se que as maiores eficiências ocorreram onde há a presença do ultrassom como tratamento físico, exceto pelo pré-tratamento US+EF (29,33%). Salvo essa exceção, ao observar as maiores eficiências, considerando a paridade dos tratamentos realizados tanto com enzimas comerciais como com as enzimas da FES, o desempenho desses dois grupos foi muito próximo.

Conforme apontado por O'Donnell *et al.*(2010) e Zheng *et al.* (2013) as ações enzimáticas que foram assistidas conjuntamente pelo ultrassom e pelo micro-ondas foram aprimoradas, levando as eficiências desses pré-tratamentos combinados às primeiras posições do ranqueamento. Esses resultados estão de acordo com Kendir e Ugurlu (2018) e indicam que os métodos físicos aumentaram a área da superfície

de contato da matéria orgânica com o meio e, conseqüentemente, favoreceram a hidrólise enzimática.

A Figura 13 apresenta as eficiências de todos os pré-tratamentos testados no estudo.

Figura 13 - Eficiências de todos os pré-tratamentos testados



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observa-se na Figura 13 que todos os pré-tratamentos que receberam a classificação A ou B atribuída pelo Teste de Tukey, apresentaram o ultrassom como tratamento físico e a hidrólise enzimática como tratamento biológico. Além disso, todos os tratamentos testados individualmente registraram as menores eficiências, exceto o que utilizou somente o ultrassom, que apresentou uma eficiência maior que os pré-tratamentos combinados MO+US, US+MW e MO+MW.

O sucesso dos pré-tratamentos aplicados está fortemente relacionado às características específicas da espécie da parede celular e à ativação enzimática. Por

exemplo, a parede da microalga *Scenedesmus quadricauda* é composta de três camadas: uma camada externa rígida de pectina e uma camada celulósica interna separada por uma fina camada média. Reshma e Arumugam (2017) avaliaram que o tratamento enzimático aplicado após uma suave sonicação favoreceu a separação do cenóbio das células de *Scenedesmus quadricauda* e promoveu uma melhor acessibilidade da enzima à parede da célula quando comparado ao tratamento enzimático isolado (CÓRDOVA *et al.*, 2018).

Dentre todos os pré-tratamentos testados, as maiores eficiências atingidas foram: MO+US+EF (40,1%), US+EC (39,33%), MO+US+EC (39,17%), MO+US+MW+EF (39,00%), US+MW+EF (38,17%) e MO+US+MW+EC (32,97%). Tanto as enzimas comerciais quanto as enzimas produzidas pela FES em laboratório contribuíram de forma semelhante na eficiência do rompimento celular. As tabelas dos testes da ANOVA e Tukey são apresentadas no Apêndice J.

A Tabela 7 apresenta estudos que utilizaram na biomassa de *Chlorella* sp. pré-tratamentos enzimáticos aplicados de forma individual ou combinada a tratamentos físicos. A eficiência de 40,1% alcançada nesta pesquisa em um período de 2h, com o pré-tratamento combinado com moagem, ultrassom e hidrólise enzimática aproxima-se aos resultados encontrados por Bobde *et al.* (2019), que atingiu uma eficiência de 38,59%, combinando a homogeneização de alta velocidade, com micro-ondas, ultrassom e a hidrólise enzimática. Kim *et al.* (2014b) também obteve uma eficiência de 47,8%, ao utilizar a tecnologia do ultrassom combinada à hidrólise enzimática, após um período de 72h. Ho *et al.* (2013) atingiu 90,4% de eficiência fazendo uso do ultrassom juntamente com a hidrólise enzimática. Apesar de não serem citadas as grandezas de volume e potência, provavelmente a exposição da biomassa (a uma concentração de 40 g L<sup>-1</sup>) ao ultrassom por um período de 10 minutos favoreceu a obtenção dessa elevada eficiência. Além disso, uma análise mais específica sobre a composição dos carboidratos da *C. vulgaris* foi realizada nessa pesquisa. O autor constatou que 62% dos carboidratos totais eram amido, logo, o uso de amilases também foi um fator determinante para esse resultado.

A biomassa de *Chlorella vulgaris* apresentou certa resistência ao processo de rompimento celular, quando comparada a microalgas de outros gêneros/espécies que foram submetidos a pré-tratamentos físicos e biológicos semelhantes aos aplicados nesta pesquisa. Silva (2018) atingiu uma eficiência de 91% na recuperação de açúcares redutores da microalga *Scenedesmus Obliquus*, aplicando de forma combinada o ultrassom e uma mistura de enzimas comerciais composta por celulases, amiloglucosidases e pectinases, produzidas pela Novozymes e adquiridas pela Sigma-Aldrich.

Tabela 7 - Pré-tratamentos com hidrólise enzimática aplicados na microalga *Chlorella* sp

(continua)

| Microalga                     | Pré-tratamento  | Eficiência (%) | Tempo (horas) | Enzima   | Procedência da enzima                | Produto analisado | Referência    |
|-------------------------------|---|----------------|---------------|--|--------------------------------------|-------------------|---------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> L06 | Moagem, ultrassom e hidrólise enzimática              | 40,1           | 2             | Mistura enzimática de pectinases de <i>Aspergillus niger</i> e celulases | Produção própria                     | Glicose           | Este trabalho |
| <i>Chlorella vulgaris</i> L06 | Ultrassom e hidrólise enzimática                      | 39,34          | 2             | Mistura enzimática de pectinases de <i>Aspergillus niger</i> e celulases | Comercial adquirida da Sigma-Aldrich | Glicose           | Este trabalho |
| <i>Chlorella vulgaris</i> L06 | Moagem, ultrassom e hidrólise enzimática              | 39,16          | 1             | Mistura enzimática de pectinases de <i>Aspergillus niger</i> e celulases | Comercial adquirida da Sigma-Aldrich | Glicose           | Este trabalho |
| <i>Chlorella vulgaris</i> L06 | Moagem, ultrassom, micro-ondas e hidrólise enzimática | 39,02          | 2             | Mistura enzimática de pectinases de <i>Aspergillus niger</i> e celulases | Produção própria                     | Glicose           | Este trabalho |
| <i>Chlorella vulgaris</i> L06 | Ultrassom, micro-ondas e                              | 38,16          | 1             | Mistura enzimática   | Produção própria                     | Glicose           | Este trabalho |

|                               |   |       |    |  |                                      |         |                                 |
|-------------------------------|---|-------|----|--|--------------------------------------|---------|---------------------------------|
|                               | hidrólise enzimática                                  |       |    | de pectinases de <i>Aspergillus niger</i> e celulases                    |                                      |         |                                 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> L06 | Moagem, ultrassom, micro-ondas e hidrólise enzimática | 32,94 | 1  | Mistura enzimática de pectinases de <i>Aspergillus niger</i> e celulases | Comercial adquirida da Sigma–Aldrich | Glicose | Este trabalho                   |
| <i>Chlorella vulgaris</i> L06 | Ultrassom, micro-ondas e hidrólise enzimática         | 29,74 | 2  | Mistura enzimática de pectinases de <i>Aspergillus niger</i> e celulases | Comercial adquirida da Sigma–Aldrich | Glicose | Este trabalho                   |
| <i>Chlorella vulgaris</i>     | Ultrassom e hidrólise enzimática                      | 90,4  | 24 | Mistura enzimática de celulases e amilases                               | Produção própria                     | Glicose | (HO <i>et al.</i> , 2013)       |
| <i>Chlorella</i> sp.          | Hidrólise enzimática                                  | 80,01 | 5  | Aplicação sequencial de alfa-amilase seguida de glucoamilas e            | Comercial adquirida da Novozyme      | Glicose | (MEGAWATI <i>et al.</i> , 2022) |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>  | Hidrólise enzimática utilizando biomassa fresca       | 76,30 | 6  | Extrato enzimático de <i>Aspergillus fischeri</i>                        | Produção própria                     | Glicose | (BHUSHAN <i>et al.</i> , 2021)  |

Tabela 7 - Pré-tratamentos com hidrólise enzimática aplicados na microalga *Chlorella* sp

(conclusão)

| Microalga                 | Pré-tratamento   | Eficiência (%) | Tempo (horas) | Enzima   | Procedência da enzima                        | Produto analisado | Referência                      |
|---------------------------|--|----------------|---------------|--|--|-------------------|---------------------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Secagem e hidrólise enzimática   | 57             | 70            | Extrato enzimático de <i>Doratomyces nanus</i>       | Produção própria                             | Glicose           | (MONJED; ROBSON; PITTMAN, 2020) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Hidrólise enzimática   | 55             | 24            | Mistura enzimática de celulases e amilases           | -  | Glicose           | (MONCADA <i>et al.</i> , 2013)  |
| <i>Chlorella</i> sp.      | Secagem e hidrólise enzimática   | 54,45          | 24            | Mistura enzimática de celulase, xilanase e pectinase | Comercial adquirida da Aladdin Biotechnology | Lipídeos          | (ZHANG <i>et al.</i> , 2018)    |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Ultrassom e hidrólise enzimática   | 47,8           | 72            | Pectinase  | Comercial adquirida da Novozyme              | Glicose           | (KIM <i>et al.</i> , 2014b)     |
| <i>Chlorella</i> sp.      | Homogeneização de alta velocidade, micro-ondas, ultrassom e hidrólise enzimática | 38,59          | -             | Mistura enzimática de celulase e pectinase           | Comercial adquirida da Sigma-Aldrich         | Lipídeos          | (BOBDE <i>et al.</i> , 2019)    |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

## 6 CONCLUSÃO

Os fungos isolados e selecionados a partir da etapa de avaliação dos Índices Enzimáticos (IE) produziram celulases e pectinases pelo processo de Fermentação em Estado Sólido (FES), dentro das condições estabelecidas. O fungo *Aspergillus niger* (MAR) foi, dentre os 14 isolados, o que apresentou o maior índice enzimático (6,88) e a maior atividade enzimática (pectinolítica) registrada durante o processo de FES, com 1,74 U/ml.

A combinação de pré-tratamentos físicos e enzimáticos potencializou a eficiência do rompimento celular e contribuiu para a recuperação de glicose a partir da biomassa de microalgas. A hidrólise enzimática foi realizada por meio de uma mistura de celulases, produzidas pelo isolado C1, com uma atividade celulolítica de 0,03 U/ml e pectinases, produzidas pelo isolado MAR (*Aspergillus niger*), com uma atividade pectinolítica de 1,74 U/ml. As maiores eficiências atingidas que variaram entre 32,94 a 40,1% tiveram a presença tanto do ultrassom, como método físico de tratamento, como da hidrólise enzimática, como método biológico e levaram um período de 1 ou 2 h para atingirem esses resultados, o que demonstra o potencial desses dois métodos de pré-tratamento.

Ainda não há um procedimento padrão para o pré-tratamento de microalgas. Futuras pesquisas poderiam avaliar o desempenho da combinação desses mesmos ou de outros pré-tratamentos físicos e biológicos sob diferentes condições experimentais para a microalga *Chlorella vulgaris*. Ainda são escassos os estudos que utilizaram pré-tratamentos combinados para essa espécie de microalga, que apresentou uma alta resistência aos métodos testados, quando comparada a diferentes gêneros de microalgas explorados em outros estudos de rompimento célula que fizeram uso desses mesmos métodos.

Também é interessante a realização de pesquisas que considerem o balanço energético e econômico envolvido nos processos de pré-tratamento, visto que esse é um forte gargalo para escalonar essa etapa de produção a nível industrial. Outra etapa que pode ser avaliada são as condições ótimas para a ação das enzimas

selecionadas. Além disso, os perfis metabólicos das microalgas podem ser modificados conforme estresses abióticos, como, por exemplo, a elevação de seus níveis de lipídeos e carboidrato devido à restrição de nitrogênio durante seu cultivo que, juntamente com os demais aspectos supracitados, ilustra a natureza multifatorial envolvida na exploração desse poderoso recurso natural.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-RAHIM, W. M. *et al.* Highly efficient fungal pectinase and laccase producers among isolates from flax retting liquor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, n. 101570, p. 1-9, 2020.
- ACIÉN, F. G.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Photobioreactors for the production of microalgae. Reviews in **Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, p. 131-150, 2013.
- ADITIYA, H. B. *et al.* Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.
- AGGARWAL, R.; DUTTA, T.; SHEIKH, J. Extraction of pectinase from *Candida* isolated from textile mill effluent and its application in bio-scouring of cotton. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, n. 100291, p. 2020.
- AL ABDALLAH, Q.; NIXON, B. T.; FORTWENDEL, J. R. The enzymatic conversion of major algal and cyanobacterial carbohydrates to bioethanol. **Frontiers in Energy Research**, v. 4, n. n. 36, p. 1–15, 2016.
- ALAVIJEH, R. S. *et al.* Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. **Bioresource Technology**, v. 309, n. 123321, p. 1-9, 2020.
- ALHATTAB, M.; KERMANSHAHI-POUR, A.; BROOKS, M. S. L. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 61–88, 2019.
- ALVES, T. P. *et al.* Multi-enzymatic recovery of fungal cellulases (*Aspergillus niger*) through solid-state fermentation of sugarcane bagasse. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 100, n. 8, p. 1930-1940, 2021.
- ALZATE, M. E. *et al.* Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 488–494, 2012.
- ANANTHI, V. *et al.* Impact of abiotic factors on biodiesel production by microalgae. **Fuel**, v. 284, n. 118962, p. 1-11, 2021.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2005. 592 p.
- ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, n. January, p. 16–34, 2018.
- BADER, A. N. *et al.* Efficient saccharification of microalgal biomass by *Trichoderma harzianum* enzymes for the production of ethanol. **Algal Research**, v. 48, n. 101926., p. 1-9, 2020.

- BANAT, I. M. *et al.* Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. **Bioresource Technology**, v. 320, n. 124222, p. 1-51, 2021. (Part A).
- BARRAGÁN-TRINIDAD, M.; CARRILLO-REYES, J.; BUITRÓN, G. Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 100–107, 2017.
- BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. New Zealand: Cambridge Studies in Biotechnology, 1994.
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656–669, 2016.
- BEN HMAD, I.; GARGOURI, A. Neutral and alkaline cellulases: Production, engineering, and applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 653–658, 2017.
- BEN YAHMED, N. *et al.* Enhancement of biogas production from *Ulva* sp. by using solid-state fermentation as biological pretreatment. **Algal Research**, v. 27, p. 206–214, 2017.
- BERLINER, M. D. Proteins in *Chlorella vulgaris*. **Microbios**, v. 46, p. 199–203, 1986.
- BERNARDI, A. O. *et al.* Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. **Lwt**, v. 97, n. 5, p. 25–30, 2018.
- BEZAWADA, P.; RAJU, K. J. Screening Of Pectinolytic Fungi And Optimization Of Process Parameters Using Guava Peel Powder As Substrate Under Solid State Fermentation. **International Journal of Engineering Science Invention (IJESI)**, v. 7, n. 10, p. 43–47, 2018.
- BHADRECHA, P. *et al.* *Hippophae rhamnoides* L. rhizobacteria exhibit diversified cellulase and pectinase activities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 26, n. 5, p. 1075–1085, 2020.
- BHARTE, S.; DESAI, K. Techniques for harvesting, cell disruption and lipid extraction of microalgae for biofuel production. **Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2018.
- BHUSHAN, S. *et al.* Enzymatic pretreatment of algal biomass has different optimal conditions for biogas and bioethanol routes. **Chemosphere**, v. 284, n. 131264, p.1-10, 2021.
- BIZ, A. *et al.* Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54–62, 2016.
- BOBDE, K. *et al.* Energy assessment and enhancement of the lipid yield of indigenous *Chlorella* sp. KA-24NITD using Taguchi approach. **Renewable Energy**, v. 131, p. 1226–1235, 2019.

BYREDDY, A. R. *et al.* A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. **Journal of Microbiological Methods**, v. 125, p. 28–32, 2016.

CARVALHO, J. C. *et al.* Cell Disruption and Isolation of Intracellular Products. PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Netherlands: Elsevier, 2017. 854 p. cap. 35, p. 807-822.

CARVALHO, J. C. *et al.* Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, food, and feed. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122719, 2020.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181–184, 1967.

CASTRILLÓN, L. R.; CARMONA, M. E. R.; VÉLEZ-SALAZAR, Y. **Microalgas para la industria alimenticia**. Medellín: UPB, 2013. 72 p.

CHEN, C. Y. *et al.* Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 2013.

CHENG, J. *et al.* Dynamic microstructures and fractal characterization of cell wall disruption for microwave irradiation-assisted lipid extraction from wet microalgae. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 67–72, 2013.

CÓRDOVA, O. *et al.* Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2806–2813, 2018.

CURTI, C. **Pré-tratamento de biomassa microalgácea utilizando enzimas hidrolíticas provenientes de isolados fúngicos**. 2019. Tese (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.

DASHTBAN MEHDI; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues opportunities and perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DEMUEZ, M. *et al.* Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 10, p. 1955–1966, 2015.

DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DESSIE, W. *et al.* Inhibitory effects of lignocellulose pretreatment degradation products (hydroxymethylfurfural and furfural) on succinic acid producing *Actinobacillus succinogenes*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 150, p. 107263, 2019.

DESTANDAU, E.; THOMAS, M.; ELFAKIR, C. Microwave-assisted Extraction ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. (ed.). **Natural Product Extraction: Principles and Applications**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. 450 p. cap. 4. p. 113-156.

DHILLON, G. S. *et al.* Lactoserum as a moistening medium and crude inducer for fungal cellulase and hemicellulase induction through solid-state fermentation of apple pomace. **Biomass and Bioenergy**, v. 41, p. 165–174, 2012.

DOMOZYCH, D. S. *et al.* The cell walls of green algae: A journey through evolution and diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 82, p. 1–8, 2012.

DUBOIS, M. *et al.* A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, n. 167, p. 350-356, 1956.

EHIMEN, E. A. *et al.* Influence of different pre-treatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae. **Renewable Energy**, v. 50, p. 476–480, 2013.

EVELYN *et al.* Production of Cellulase and Xylanase from *Eupenicillium Javanicum* by Solid-State Fermentation Utilizing Pineapple Crown Leaves Waste as the Substrate. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1655, n. 012113, p. 1–7, 2020.

FANG, J. *et al.* Comparison of poly- $\gamma$ -glutamic acid production between sterilized and non-sterilized solid-state fermentation using agricultural waste as substrates. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, n. 120248, p. 1-11, 2020.

FARIAS SILVA, C. E.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1833–1842, 2016.

FARR-JONES, S. *et al.* Direct Observation of the Tautomeric Forms of Histidine in  $^{15}\text{N}$  NMR Spectra at Low Temperatures. Comments on Intramolecular Hydrogen Bonding and on Tautomeric Equilibrium Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 15, p. 6813–6819, 1993.

FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 221–227, 2006.

FERREIRA, A. F. *et al.* Effect of low frequency ultrasound on microalgae solvent extraction: Analysis of products, energy consumption and emissions. **Algal Research**, v. 14, p. 9–16, 2016.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Química Nova**, v. XY, n. 00, p. 1–12, 2017.

- FRANCISCO, S. A. **Recuperação de Microalgas Cultivadas em Efluente de Tratamento Anaeróbio de Esgoto por Processo de Coagulação-Floculação**. 2016. Tese (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.
- GAINVORS, A. *et al.* Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, p. 1311–1319, 1994.
- GANZLER, K.; SALGO, A. Microwave-extraction-a new method superseding traditional Soxhlet extraction. **Z Lebensm Unters Forsch**, v.184, p. 274–276, 1987.
- GERDE, J. A. *et al.* Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175–181, 2012.
- GERKEN, H. G.; DONOHOE, B.; KNOSHAUG, E. P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. **Planta**, v. 237, n. 1, p. 239–253, 2013.
- GHOSE.T.K. Measurement of cellulase activities. **Applied Chemistry Division Commission on Biotechnology**, v. 59, n. 5, p. 695–702, 1987.
- GIMÉNEZ, J. B. *et al.* Use of rumen microorganisms to boost the anaerobic biodegradability of microalgae. **Algal Research**, v. 24, p. 309–316, 2017.
- GOMES, T. A.; ZANETTE, C. M.; SPIER, M. R. An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, n. 7, p. 1–20, 2020.
- GRUBER-BRUNHUMER, M. R. *et al.* *Acutodesmus obliquus* as a benchmark strain for evaluating methane production from microalgae: Influence of different storage and pretreatment methods on biogas yield. **Algal Research**, v. 12, p. 230–238, 2015.
- GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - A review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987–996, 2003.
- GÜNERKEN, E. *et al.* Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243–260, 2015.
- HAGEN, C.; SIEGMUND, S.; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 217–226, 2002.
- HANANI, N. Cellulases: Role in Lignocellulosic Biomass Utilization. **An Automated Irrigation System Using Arduino Microcontroller**, v. 3, p. 2–6, 2018.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1975.

- HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1079–1084, 2011.
- HEO, Y. M. *et al.* An integrative process for obtaining lipids and glucose from *Chlorella vulgaris* biomass with a single treatment of cell disruption. **Algal Research**, v. 27, p. 286–294, 2017.
- HO, S. H. *et al.* Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.
- HOM-DIAZ, A. *et al.* Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production. **Algal Research**, v. 19, p. 184–188, 2016.
- HU, Y. *et al.* A review of recent developments of pre-treatment technologies and hydrothermal liquefaction of microalgae for bio-crude oil production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 101, p. 476–492, 2019.
- IYOVO, G. D.; DU, G.; CHEN, J. Sustainable bioenergy bioprocessing: Biomethane production, digestate as biofertilizer and as supplemental feed in algae cultivation to promote algae biofuel commercialization. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 2, n. 4, p. 100–106, 2010.
- JACOB, N. Pectinolytic Enzymes. NIGAM, P. S.; PANDEY, A. (ed.). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues**. Switzerland: Springer, 2009. 461 p. cap. 2, p. 383-396.
- JACOBSEN, C. *et al.* **Food enrichment with omega-3 fatty acids**. Sawston: Woodhead Publishing, 2013.
- JAHAN, N. *et al.* Utilization of agro waste pectin for the production of industrially important polygalacturonase. **Heliyon**, v. 3, n. e00330, p. 1-13, 2017.
- 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.
- JAMBRAK, A. R. *et al.* Ultrasound effect on physical properties of corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 91–100, 2010.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.
- JĘDRZEJCZYK, M. *et al.* Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. BASILE, A.; DALENA, F. (ed.). **Second and Third Generation of Feedstocks: The Evolution of Biofuels**. Netherlands: Elsevier, 2019. 619 p. cap. 6, p. 143-196.
- KASHYAP, D. R. *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: A review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215–227, 2001.

KASSIM, M. A. *et al.* Enzymatic hydrolysis of dilute alkaline pretreated *Chlorella* sp. biomass for biosugar production and fed-batch bioethanol fermentation. **Asia - Pacific Journal of Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 1–16, 2018.

KAVUTHODI, B.; SEBASTIAN, D. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 11, n. 1, p. 18–30, 2018.

KENDIR, E.; UGURLU, A. A comprehensive review on pretreatment of microalgae for biogas production. **International Journal of Energy Research**, v. 42, n. 12, p. 3711–3731, 2018.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 36, p. 1–21, 2018.

KHOEYI, Z. A.; SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. **Aquaculture International**, v. 20, p. 41–49, 2012.

KIM, B. H. *et al.* Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1123–1132, 2014a.

KIM, K. H. *et al.* Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 47–54, 2014b.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. *et al.* The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012.

KUMAR, A. *et al.* Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371–380, 2010.

KUMAR, G. *et al.* A review of thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuels: Chemistry and processes. **Green Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 44–67, 2017.

KUROKAWA, M. *et al.* Effect of sonication frequency on the disruption of algae. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 157–162, 2016.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 491–500, 2014.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 366–375, 2000.

LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. New Zealand: Cambridge University Press, 2008.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89–101, 2012.

LEE, J. Y. *et al.* Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S75–S77, 2010.

LEE, S. Y. *et al.* Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1317–1328, 2017. (Parte 2).

LETELLIER, M.; BUDZINSKI, H. Original articles Microwave assisted extraction of organic compounds. **Analisis**, v. 27, n. 3, p. 259–271, 1999.

LIU, E. K.; HE, W. Q.; YAN, C. R. 'White revolution' to 'white pollution' - Agricultural plastic film mulch in China. **Environmental Research Letters**, v. 9, n. 9, p. 7–10, 2014.

LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 1, p. 133–140, 2016.

LIU, J. *et al.* Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 288-294, 2020.

LORDAN, S.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1056–1100, 2011.

LORENTE, E.; FARRIOL, X.; SALVADÓ, J. Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. **Fuel Processing Technology**, v. 131, p. 93–98, 2015.

LU, F. *et al.* Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 92, p. 1-11, 2013

LUO, J.; FANG, Z.; SMITH, R. L. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 41, p. 56–93, 2014.

MA, Y. A. *et al.* Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1543–1549, 2014.

MAEDA, R. N. *et al.* Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 38–44, 2013.

MAHDY, A. *et al.* Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. **Energy Conversion and Management**, v. 85, p. 551–557, 2014.

MAITY, S.; MALLICK, N. Trends and advances in sustainable bioethanol production by marine microalgae: A critical review. **Journal of Cleaner Production**, v. 345, n. 131153, 2022.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 4, n. 1, p. 511–532, 2017.

MEGAWATI *et al.* Bioethanol production from glucose obtained from enzymatic hydrolysis of *Chlorella* microalgae. **Materials Today: Proceedings**, v. 63, n. 1, p. S373-S378, 2022.

MENDES, F. B.; IBRAIM PIRES ATALA, D.; THOMÉO, J. C. Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production?. **Renewable Energy**, v. 114, p. 525–533, 2017. (Parte B).

MENEZES, M.; ASSIS, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2. ed. . Recife: Imprensa Universitária, 2004. 106 p.

MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 491–551, 1995.

MILLER, D. L. Effects of a High-Amplitude 1-MHz Standing Ultrasonic Field on the Algae Hydrodictyon. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 33, n. 2, p. 165–170, 1986.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONCADA, J. *et al.* Production of bioethanol using chlorella vulgaris cake: A technoeconomic and environmental assessment in the colombian context. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 47, p. 16786–16794, 2013.

MONJED, M. K.; ROBSON, G. D.; PITTMAN, J. K. Isolation of fungal strains for biodegradation and saccharification of microalgal biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, n. 3, p. 105547-105576, 2020.

MORETTI, M. M. S. *et al.* Selection of Thermophilic and Thermotolerant Fungi for the Production of. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062–1071, 2012.

MUTANDA, T. *et al.* Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 57–70, 2011.

MUTLU, M. *et al.* The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 3-4, p. 147–150, 1999.

- NAGARAJAN, D.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Pretreatment of microalgal biomass for efficient biohydrogen production – Recent insights and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 302, n. 122871, p. 1-14, 2020.
- NEGI, S. **Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing**. Singapore: Springer, 2019. 446 p.
- NEMCOVÁ, Y. Detection of cell wall structural polysaccharides by cellulase-gold and chitinase-gold complexes. **Czech Phycology**, v. 3, p. 31–36, 2003.
- NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n. 1, p. 7–9, 1996.
- NORTHCOTE, D. H.; GOULDING, K. J.; HORNE, R. W. The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. **The Biochemical Journal**, v. 70, n. 3, p. 391–397, 1958.
- O'DONNELL, C. P. *et al.* Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 358–367, 2010.
- OLIVEIRA RODRIGUES, P. *et al.* Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683–2693, 2020.
- ONUMAEGBU, C. *et al.* Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 93, p. 16–26, 2018.
- ONUMAEGBU, C. *et al.* Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricauda* lipid extraction using microwave pre-treatment method and response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 132, p. 1323–1331, 2019.
- PAL, N.; SONI, S. K. Development of cellulolytic thermotolerant fungal strain. KUILA A.; SHARMA, V. (ed.). **Genetic and Metabolic Engineering for Improved Biofuel Production from Lignocellulosic Biomass**. Netherlands: Elsevier, 2020. cap. 9, p. 137-142.
- PALOHEIMO *et al.* Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*. In: SCHMOLL, M.; DATTENBÖCK, C. (ed.). **Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications**. Switzerland: Springer, 2016. Parte I, p. 23-57.
- PANDEY *et al.* **Solid-state fermentation in biotechnology: Fundamentals and applications**. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001. 221 p.
- PATEL, A.; MIKES, F.; MATSAKAS, L. An overview of current pretreatment methods used to improve lipid extraction from oleaginous microorganisms. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1-22, 2018.
- PATIDAR, M. K. *et al.* Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, p. 1-24, 2018.

- PENG, K. *et al.* The Bioeconomy of Microalgal Biofuels. JACOB-LOPES, E.; ZEPKA L. Q.; QUEIROZ, M. I. (ed.). **Energy from Microalgae**. Switzerland: Springer, 2018. cap. 7, p. 157–169.
- PONTECORVO, G, ROPER, J.A., HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K.D., BUFTON, A. W. J. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141–238, 1953.
- POOJARY, M. M. *et al.* Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. **Marine Drugs**, v. 14, n. 11, p. 1–34, 2016.
- POSTMA, P. R. *et al.* Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 670–679, 2017.
- PROMMUAK, C. *et al.* Microalgal lipid extraction and evaluation of single-step biodiesel production. **Engineering Journal**, v. 16, n. 5, p. 157–166, 2012.
- PUGLISI, I. *et al.* Biostimulant activity of humic-like substances from agro-industrial waste on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. **European Journal of Phycology**, v. 53, n. 3, p. 433–442, 2018.
- QUIROZ ARITA, C. E.; PEEBLES, C.; BRADLEY, T. H. Scalability of combining microalgae-based biofuels with wastewater facilities: A review. **Algal Research**, v. 9, p. 160–169, 2015.
- RAHMAN, M. M.; HOSANO, N.; HOSANO, H. Recovering Microalgal Bioresources: A Review of Cell Disruption Methods and Extraction Technologies. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 1–31, 2022.
- RAKESH, S. *et al.* Cell disruption methods for improving lipid extraction efficiency in unicellular microalgae. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 4, p. 443-447, 2015.
- RAYMOND, F. *et al.* Antifungal potential of lemongrass essential oil as affected by plant age and Arbuscular Mycorrhizal fungi inoculation. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 9–16, 2020.
- REHMANJI, M. *et al.* Microalgal cell factories, a platform for high-value-added biorenewables to improve the economics of the biorefinery. DAS, S. DASH, H. R. (ed.). **Microbial and Natural Macromolecules: Synthesis and Application**. Netherlands: Elsevier, 2021. cap. 26, p. 689-731.
- RESHMA, R.; ARUMUGAM, M. Selective degradation of the recalcitrant cell wall of *Scenedesmus quadricauda* CASA CC202. **Planta**, v. 246, n. 4, p. 779–790, 2017.
- RIZZA, L. S. *et al.* Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140-147, 2017.
- ROBERTSON, G. P. *et al.* Cellulosic biofuel contributions to a sustainable energy future: Choices and outcomes. **Science**, v. 356, n. 6345, p. 1-9, 2017.

ROKICKA, M. *et al.* Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. **Bioenergy Research**, v. 14, p. 752-760, 2020.

ROUCHES, E. *et al.* Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179–198, 2016.

RUIZ, H. A. *et al.* Pectinolytic Enzymes. PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Netherlands: Elsevier, 2017. 854 p. cap. 3, p. 47-71.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2018.

SAFI, C. *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265–278, 2014.

SAFI, C. *et al.* Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. **Algal Research**, v. 8, p. 61–68, 2015.

SAHNI, P. *et al.* Nuances of microalgal technology in food and nutraceuticals: a review. **Nutrition and Food Science**, v. 49, n. 5, p. 866–885, 2019.

SAMPATHKUMAR, K. *et al.* An Insight into Fungal Cellulases and Their Industrial Applications. SRIVASTAVA, M. *et al.* (ed.). **Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases**. Switzerland: Springer, 2019. 209 p. cap. 2, p. 19–35.

SANDRI, I. G. *et al.* Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 469–475, 2013.

SARKAR, N. *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SATI, H. *et al.* Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 38, n. 101413, p. 1-12, 2019.

SATO, N. *et al.* Reaction kinetics of amino acid decomposition in high-temperature and high-pressure water. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 13, p. 3217–3222, 2004.

SCHOLZ, M. J. *et al.* Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 11, p. 1450–1464, 2014.

SCHWENZFEIER, A.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9121–9127, 2011.

SELIM, K. A. *et al.* Bioethanol a microbial biofuel metabolite; New insights of yeasts metabolic engineering. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 1-27, 2018.

SHAH, F. A. *et al.* Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 627–642, 2015.

SHANKAR, M. *et al.* Protic ionic liquid-assisted cell disruption and lipid extraction from fresh water *Chlorella* and *Chlorococccum* microalgae. **Algal Research**, v. 25, p. 228–236, 2017.

SHIDA, Y.; FURUKAWA, T.; OGASAWARA, W. Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 9, p. 1712–1729, 2016.

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 743–755, 2018. (Parte 1).

SIEIRO, C. *et al.* Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry. **Food Industrial Processes: Methods and Equipment**. Croatia: InTech, 2012. 418 p. cap. 11, p. 201-218.

SILVA, D. F. *et al.* Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 29–37, 2018.

SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1785–1793, 2012.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 10–16, 2011.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SINGHANIA, R. R. *et al.* An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 45–48, 2015.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Cellulases. PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Netherlands: Elsevier, 2017. cap. 4, p. 73–101.

SKORY, C. D.; FREER, S. N.; BOTHAST, R. J. Screening for ethanol-producing filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 203–206, 1997.

SOCCOL, C. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017.

SOUZA, T. S. P.; KAWAGUTI, H. Y. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 8, p. 1446–1477, 2021.

STEPHENSON, A. L. *et al.* Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. **Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 47–58, 2010.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. 894 p.

UMMAT, V. *et al.* Advances in pre-treatment techniques and green extraction technologies for bioactives from seaweeds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 110, p. 90–106, 2021.

UNTERLANDER, N.; CHAMPAGNE, P.; PLAXTON, W. C. Lyophilization pretreatment facilitates extraction of soluble proteins and active enzymes from the oil-accumulating microalga *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 25, p. 439–444, 2017.

USMAN, M. *et al.* Recovery of Starch View project Reviews on hydrothermal treatment View project Alkaline Extraction of Starch from Broken Rice of Pakistan. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 7, n. 1, p. 146–152, 2014.

VÁZQUEZ-MONTOYA, E. L. *et al.* Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, n. 1, p. 4–12, 2020.

VELAZQUEZ-LUCIO, J. *et al.* Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review. **Biofuel Research Journal**, v. 5, n. 1, p. 780–791, 2018.

VERDUZCO-OLIVA, R.; GUTIERREZ-URIBE, J. A. Beyond enzyme production: Solid state fermentation (SSF) as an alternative approach to produce antioxidant polysaccharides. **Sustainability**, v. 12, n. 2, p. 1-14, 2020.

VERNÈS, L.; VIAN, M.; CHEMAT, F. Ultrasound and microwave as green tools for solid-liquid extraction. POOLE, C. F. (ed.). **Liquid-Phase Extraction**. Netherlands: Elsevier, 2020. cap. 12, p. 355–374.

VERSTEEGH, G. J. M.; BLOKKER, P. Resistant macromolecules of extant and fossil microalgae. **Phycological Research**, v. 52, n. 4, p. 325–339, 2004.

- VINATORU, M.; MASON, T. J.; CALINESCU, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 159–178, 2017.
- VISHWAKARMA, R.; MALIK, A. Partial enzymatic cell wall disruption of *Oocystis* sp. for simultaneous cultivation and extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 293, n. 121107, p. 1-11, 2022.
- WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.
- WANG, W. *et al.* Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 234, p. 98–107, 2018.
- WATANABE, T. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2002. 426 p.
- WEN, C. *et al.* Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 538–549, 2018.
- WHITTON, R. *et al.* Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment. **Environmental Technology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 133–148, 2015.
- XIA, A. *et al.* Fermentative hydrogen production using algal biomass as feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 209–230, 2015.
- YAMADA, T.; SAKAGUCHI, K. Comparative studies on *Chlorella* cell walls: Induction of protoplast formation. **Archives of Microbiology**, v. 132, n. 1, p. 10–13, 1982.
- YAMAMOTO, M. *et al.* Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Research**, v. 117, p. 257-264, 2004.
- YU, X. *et al.* Investigation of cell disruption methods for lipid extraction from oleaginous microorganisms. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 5, p. 730–737, 2015.
- YUKESH KANNAH, R. *et al.* A review on anaerobic digestion of energy and cost effective microalgae pretreatment for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 332, n. 125055, p. 1-15, 2021.
- YUN, Y. M. *et al.* Application of a novel enzymatic pretreatment using crude hydrolytic extracellular enzyme solution to microalgal biomass for dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 365–372, 2014.
- ZABED, H. M. *et al.* Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 105–128, 2019.

ZHANG, L. *et al.* Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 115, p. 276–287, 2018.

ZHENG, H. *et al.* Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1215–1224, 2011.

ZHENG, J. *et al.* Dual-frequency ultrasound effect on structure and properties of sweet potato starch. **Starch**, v. 65, n. 7–8, p. 621–627, 2013.

**APÊNDICE A - Aplicação dos testes da ANOVA e Tukey para a seleção dos IE's mais significativos de cada grupo de fungos Celulolíticos e Pectinolíticos**

Tabela 1 - Resultados da ANOVA para os fungos pectinolíticos

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Fungo             | 9                       | 154,18               | 17,131                | 444,724       | <0,001  |
| Resíduos          | 20                      | 0,77                 | 0,039                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 2 - Resultados do Teste de Tukey para as médias dos IE's dos fungos pectinolíticos

|             | AR04   | AR07   | AR1    | AR17   | AR80   | F10    | MAL    | MAR    | MPE    | P5     |           |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| <b>AR04</b> | -      | 0,87   | ≈1     | <0,001 | 0,99   | <0,001 | 0,083  | <0,001 | 0,002  | <0,001 | <b>C</b>  |
| <b>AR07</b> | -0,243 | -      | 0,967  | <0,001 | ≈1     | <0,001 | 0,747  | <0,001 | 0,041  | 0,021  | <b>C</b>  |
| <b>AR1</b>  | -0,053 | 0,19   | -      | <0,001 | ≈1     | <0,001 | 0,155  | <0,001 | 0,003  | 0,002  | <b>C</b>  |
| <b>AR17</b> | 3,63   | 4      | 4      | -      | <0,001 | 0,711  | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <b>B</b>  |
| <b>AR80</b> | -0,157 | 0,087  | -0,103 | -4     | -      | <0,001 | 0,425  | <0,001 | 0,013  | 0,007  | <b>C</b>  |
| <b>F10</b>  | 4      | 4      | 4      | 0,293  | 4,08   | -      | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <b>B</b>  |
| <b>MAL</b>  | -0,527 | -0,283 | -0,473 | -4     | -0,37  | -4,45  | -      | <0,001 | 0,687  | 0,497  | <b>CD</b> |
| <b>MAR</b>  | 6      | 5,91   | 5,72   | 2      | 6      | 2      | 6      | -      | <0,001 | <0,001 | <b>A</b>  |
| <b>MPE</b>  | -0,827 | -0,583 | -0,773 | -4     | -0,67  | -4,75  | -0,3   | -6     | -      | ≈1     | <b>D</b>  |
| <b>P5</b>   | -0,877 | -0,633 | -0,823 | -5     | -0,72  | -4,8   | -0,35  | -7     | -0,05  | -      | <b>D</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 3 - Resultados da ANOVA para os fungos celulolíticos

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Fungo             | 3                       | 6,804                | 2,268                 | 13,86         | 0,0016  |
| Resíduos          | 8                       | 1,309                | 0,1637                |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 4 - Resultados do Teste de Tukey para as médias dos IE's dos fungos celulolíticos

|            | C01   | C02      | C04      | C05     |          |
|------------|-------|----------|----------|---------|----------|
| <b>C01</b> | -     | 0,00339  | 0,00454  | 0,00261 | <b>A</b> |
| <b>C02</b> | -2    | -        | 0,9946   | 0,99582 | <b>B</b> |
| <b>C04</b> | -2    | 0,08     | -        | 0,96485 | <b>B</b> |
| <b>C05</b> | -1,81 | -0,07333 | -0,15333 | -       | <b>B</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE B - Testes da ANOVA e Tukey para identificar em qual período de tempo foi obtida a maior e mais significativa das atividades enzimáticas medidas para cada ensaio de FES**

Tabela 5 - Resultados da ANOVA para as atividades enzimáticas diárias do fungo C1

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 0,001706             | 0,000341              | 6,933         | 0,00292 |
| Resíduos          | 12                      | 0,00059              | 0,000049              |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 6 - Resultados do Teste de Tukey para as atividades enzimáticas diárias do fungo C1

|    | T0       | T1       | T2       | T3       | T4       | T5       |          |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 | -        | 0,033101 | 0,001365 | 0,045892 | 0,018648 | 0,009711 | <b>A</b> |
| T1 | 0,020643 | -        | 0,425433 | 0,99995  | 0,999233 | 0,974505 | <b>B</b> |
| T2 | 0,031757 | 0,011113 | -        | 0,332876 | 0,613015 | 0,822923 | <b>B</b> |
| T3 | 0,019532 | -0,00111 | -0,01223 | -        | 0,99354  | 0,933342 | <b>B</b> |
| T4 | 0,022588 | 0,001944 | -0,00917 | 0,003056 | -        | 0,998545 | <b>B</b> |
| T5 | 0,024811 | 0,004167 | -0,00695 | 0,005279 | 0,002222 | -        | <b>B</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 7 - Resultados da ANOVA para as atividades enzimáticas diárias do fungo C5

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 0,001722             | 0,000344              | 6,218         | 0,00455 |
| Resíduos          | 12                      | 0,000664             | 0,000055              |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 8 - Resultados do Teste de Tukey para as atividades enzimáticas diárias do fungo C5

|    | T0       | T1       | T2       | T3       | T4       | T5       |          |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 | -        | 0,046891 | 0,002605 | 0,027339 | 0,031907 | 0,010041 | <b>A</b> |
| T1 | 0,020643 | -        | 0,534946 | 0,999424 | 0,999888 | 0,935328 | <b>B</b> |
| T2 | 0,031202 | 0,010558 | -        | 0,717142 | 0,66571  | 0,957443 | <b>B</b> |
| T3 | 0,022588 | 0,001944 | -0,00861 | -        | 0,999998 | 0,989465 | <b>B</b> |
| T4 | 0,022033 | 0,001389 | -0,00917 | -0,00056 | -        | 0,980211 | <b>B</b> |
| T5 | 0,026200 | 0,005556 | -0,005   | 0,003612 | 0,004167 | -        | <b>B</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 9 - Resultados da ANOVA para as atividades enzimáticas diárias do fungo MAR

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 5,879                | 1,175900              | 38,490        | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 0,367                | 0,0305                |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 10 - Resultados do Teste de Tukey para as atividades enzimáticas diárias do fungo MAR

|    | T0 | T1       | T2       | T3       | T4       | T5       |           |
|----|----|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| T0 | -  | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <b>C</b>  |
| T1 | 1  | -        | 0,476555 | 0,028166 | 0,731997 | 0,234538 | <b>B</b>  |
| T2 | 1  | 0,263034 | -        | 0,469384 | 0,996982 | 0,992981 | <b>AB</b> |
| T3 | 2  | 0,527969 | 0,264935 | -        | 0,261948 | 0,773137 | <b>A</b>  |
| T4 | 1  | 0,198416 | -0,06462 | -0,32955 | -        | 0,910547 | <b>AB</b> |
| T5 | 2  | 0,340576 | 0,077542 | -0,18739 | 0,14216  | -        | <b>AB</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 11 - Resultados da ANOVA para as atividades enzimáticas diárias do fungo MAL

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 2,0784               | 0,415700              | 12,420        | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 0,4017               | 0,0335                |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 12 - Resultados do Teste de Tukey para as atividades enzimáticas diárias do fungo MAL

|    | T0       | T1       | T2       | T3       | T4       | T5       |          |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 | -        | 0,004131 | 0,001278 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <b>B</b> |
| T1 | 0,724371 | -        | 0,972937 | 0,710137 | 0,900505 | 0,406813 | <b>A</b> |
| T2 | 0,834603 | 0,110231 | -        | 0,979417 | 0,999657 | 0,81025  | <b>A</b> |
| T3 | 0,937992 | 0,21362  | 0,103389 | -        | 0,998226 | 0,992759 | <b>A</b> |
| T4 | 0,877555 | 0,153183 | 0,042952 | -0,06044 | -        | 0,924634 | <b>A</b> |
| T5 | 1,019715 | 0,295343 | 0,185112 | 0,081723 | 0,14216  | -        | <b>A</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE C - Testes da ANOVA e Tukey para identificar qual fungo Celulolítico e Pectinolítico apresentaram atividade enzimática máxima**

Tabela 13 - Resultados da ANOVA para atividades enzimáticas máximas da FES

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>Graus de Liberdade (GL)</b> | <b>Soma Quadrática (SQ)</b> | <b>Média Quadrática (MQ)</b> | <b>Estatística F</b> | <b>P-Valor</b> |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------|----------------|
| Fungo                    | 3                              | 5,845                       | 1,95                         | 266,50               | <0,001         |
| Resíduos                 | 8                              | 0,06                        | 0,01                         |                      |                |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 14 - Resultados do Teste de Tukey para atividades enzimáticas máximas da FES

|            | <b>C1</b> | <b>C5</b> | <b>MAL</b> | <b>MAR</b> |          |
|------------|-----------|-----------|------------|------------|----------|
| <b>C1</b>  | -         | ≈1        | <0,001     | <0,001     | <b>C</b> |
| <b>C5</b>  | -0,001    | -         | <0,001     | <0,001     | <b>C</b> |
| <b>MAL</b> | 0,693     | 693       | -          | <0,001     | <b>B</b> |
| <b>MAR</b> | 1,704     | 1,704     | 1,011      | -          | <b>A</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

## APÊNDICE D - Testes da ANOVA e Tukey para identificar qual pré-tratamento físico obteve maior eficiência

Tabela 15 - Resultados da ANOVA para as eficiências dos pré-tratamentos físicos

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tratamento        | 7                       | 1071                 | 152,94                | 193,30        | <0,001  |
| Resíduos          | 16                      | 12,7                 | 0,79                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 16 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências dos pré-tratamentos físicos

|                 | MO        | MO+MW  | MO+US  | MO+US+MW | MW      | UC      | US      | US+MW   |          |
|-----------------|-----------|--------|--------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|
| <b>MO</b>       | -         | <0,001 | <0,001 | <0,001   | 0,19224 | 0,99998 | <0,001  | <0,001  | <b>E</b> |
| <b>MO+MW</b>    | 4,67      | -      | <0,001 | <0,001   | 0,03001 | <0,001  | <0,001  | 0,23732 | <b>D</b> |
| <b>MO+US</b>    | 10        | 5      | -      | <0,001   | <0,001  | <0,001  | 0,00159 | 0,00803 | <b>C</b> |
| <b>MO+US+MW</b> | 20        | 16     | 10,47  | -        | <0,001  | <0,001  | <0,001  | <0,001  | <b>A</b> |
| <b>MW</b>       | 1,96      | -2,71  | -8     | -18      | -       | 0,1163  | <0,001  | <0,001  | <b>E</b> |
| <b>UC</b>       | -0,216666 | -5     | -10    | -20      | -2      | -       | <0,001  | <0,001  | <b>E</b> |
| <b>US</b>       | 14        | 9      | 3,81   | -6,66    | 12      | 14      | -       | <0,001  | <b>B</b> |
| <b>US+MW</b>    | 7         | 2      | -3     | -14      | 5       | 6,75    | -7      | -       | <b>D</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE E - Testes da ANOVA e Tukey para identificar em que tempo foi atingida a maior e mais significativa eficiência para cada pré-tratamento combinado que utilizou enzimas da FES**

Tabela 17 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+EF

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 1277                 | 255,39                | 21,38         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 143,3                | 11,94                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 18 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+EF

|    | T0     | T1     | T2      | T3      | T4      | T5    |           |
|----|--------|--------|---------|---------|---------|-------|-----------|
| T0 | -      | <0,001 | <0,001  | <0,001  | <0,001  | 0,012 | <b>C</b>  |
| T1 | 18,500 | -      | 0,397   | 0,815   | 0,650   | 0,251 | <b>AB</b> |
| T2 | 24,133 | 5,633  | -       | 0,968   | 0,997   | 0,010 | <b>A</b>  |
| T3 | 21,967 | 3,467  | -2,167  | -       | 1,000   | 0,035 | <b>A</b>  |
| T4 | 22,833 | 4,333  | -1,300  | 0,867   | -       | 0,021 | <b>A</b>  |
| T5 | 11,900 | -6,600 | -12,233 | -10,067 | -10,933 | -     | <b>B</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 19 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+EF

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 1625                 | 325,00                | 63,34         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 61,6                 | 5,10                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 20 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+EF

|    | T0 | T1     | T2       | T3       | T4       | T5       |          |
|----|----|--------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 | -  | <0,001 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | 0,040914 | <b>E</b> |
| T1 | 29 | -      | 0,008966 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <b>A</b> |
| T2 | 21 | -8,1   | -        | 0,012123 | 0,008966 | <0,001   | <b>B</b> |
| T3 | 13 | -16    | -8       | -        | 0,999966 | 0,02366  | <b>C</b> |
| T4 | 13 | -16,2  | -8,1     | -0,33333 | -        | 0,032085 | <b>C</b> |
| T5 | 6  | -22,9  | -14,8    | -7       | -6,7     | -        | <b>D</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 21 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MW+EF

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 761                  | 152,20                | 12,84         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 142,3                | 11,86                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 22 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MW+EF

|    | T0   | T1     | T2       | T3       | T4       | T5       |           |
|----|------|--------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001   | 0,007568 | 0,034457 | 0,572347 | <b>C</b>  |
| T1 | 19   | -      | 0,987604 | 0,338285 | 0,087205 | 0,003612 | <b>A</b>  |
| T2 | 17   | -2     | -        | 0,667554 | 0,227791 | 0,00998  | <b>A</b>  |
| T3 | 12,6 | -6     | -4       | -        | 0,938952 | 0,123014 | <b>AB</b> |
| T4 | 10   | -8,5   | -7       | -3       | -        | 0,441747 | <b>AB</b> |
| T5 | 4,7  | -14    | -12      | -7,9     | -5       | -        | <b>BC</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 23 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+EF

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 3415                 | 682,90                | 240,70        | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 34,0                 | 2,80                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 24 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+EF

|    | T0   | T1     | T2       | T3       | T4     | T5       |           |
|----|------|--------|----------|----------|--------|----------|-----------|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001   | <0,001   | <0,001 | <0,001   | <b>E</b>  |
| T1 | 34   | -      | 0,012252 | 0,366612 | <0,001 | <0,001   | <b>B</b>  |
| T2 | 40,1 | 6      | -        | 0,333522 | <0,001 | <0,001   | <b>A</b>  |
| T3 | 37   | 3      | -3       | -        | <0,001 | <0,001   | <b>AB</b> |
| T4 | 24   | -10,4  | -16      | -13      | -      | 0,008505 | <b>C</b>  |
| T5 | 18   | -16    | -22      | -19,3    | -6     | -        | <b>D</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 25 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+MW+EF

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 1194                 | 238,85                | 19,70         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 145,5                | 12,13                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 26 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+MW+EF

|    | T0   | T1     | T2       | T3       | T4       | T5       |           |
|----|------|--------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | 0,022027 | <b>C</b>  |
| T1 | 19,9 | -      | 0,683754 | 0,986059 | 0,976321 | 0,07039  | <b>AB</b> |
| T2 | 24,1 | 4,2    | -        | 0,952873 | 0,308061 | 0,005912 | <b>A</b>  |
| T3 | 21,7 | 1,8    | -2,4     | -        | 0,754753 | 0,024321 | <b>A</b>  |
| T4 | 18   | -2     | -6       | -4       | -        | 0,217458 | <b>AB</b> |
| T5 | 11   | -9     | -13      | -11      | -7       | -        | <b>B</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 27 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+MW+EF

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 3212                 | 642,40                | 89,96         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 86,0                 | 7,10                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 28 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+MW+EF

|    | T0   | T1     | T2       | T3       | T4       | T5       |           |
|----|------|--------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <b>E</b>  |
| T1 | 31,2 | -      | 0,034775 | 0,065938 | 0,628654 | 0,001363 | <b>BC</b> |
| T2 | 39   | 7,8    | -        | 0,998652 | 0,002549 | <0,001   | <b>A</b>  |
| T3 | 38   | 7      | -0,83333 | -        | 0,004729 | <0,001   | <b>AB</b> |
| T4 | 28   | -3     | -11      | -10,4    | -        | 0,017775 | <b>C</b>  |
| T5 | 19,1 | -12,1  | -19,9    | -19      | -9       | -        | <b>D</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 29 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+MW+EF

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 3169                 | 633,90                | 127,20        | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 60,0                 | 5,00                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 30 - Resultados do teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+MW+EF

|    | T0   | T1     | T2       | T3       | T4       | T5       |    |
|----|------|--------|----------|----------|----------|----------|----|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <0,001   | E  |
| T1 | 38   | -      | 0,039919 | 0,284833 | <0,001   | <0,001   | A  |
| T2 | 31,8 | -6     | -        | 0,808126 | 0,001158 | <0,001   | B  |
| T3 | 34   | -4,1   | 2        | -        | <0,001   | <0,001   | AB |
| T4 | 21,5 | -17    | -10,3    | -13      | -        | 0,006919 | C  |
| T5 | 13   | -25    | -19      | -21      | -8       | -        | D  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE F - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência entre todos os pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas da FES**

Tabela 31 - Resultados da ANOVA para as eficiências dos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas da FES

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tratamento        | 6                       | 1345                 | 224,20                | 15,72         | <0,001  |
| Resíduos          | 14                      | 199,7                | 14,30                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 32 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências dos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas da FES

|                         | MO+E<br>F   | MO+MW+<br>EF | MO+US+<br>EF | MO+US+MW+<br>EF | MW+E<br>F   | US+E<br>F   | US+MW+<br>EF |                |
|-------------------------|-------------|--------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|----------------|
| <b>MO+EF</b>            | -           | ≈1           | 0,00207      | 0,00391         | 0,5653<br>4 | 0,6347<br>8 | 0,00637      | <b>C<br/>D</b> |
| <b>MO+MW+EF</b>         | 0,0333<br>3 | -            | 0,00203      | 0,00383         | 0,5716<br>3 | 0,6284<br>7 | 0,00624      | <b>C<br/>D</b> |
| <b>MO+US+EF</b>         | 16          | 16           | -            | 0,99976         | <0,001      | 0,0435<br>9 | 0,99462      | <b>A</b>       |
| <b>MO+US+MW+<br/>EF</b> | 15          | 14,9         | -1,1         | -               | <0,001      | 0,0817<br>6 | ≈1           | <b>A<br/>B</b> |
| <b>MW+EF</b>            | -6          | -6           | -22          | -20             | -           | 0,0435<br>9 | <0,001       | <b>D</b>       |
| <b>US+EF</b>            | 5,2         | 5            | -11          | -10             | 11          | -           | 0,12926      | <b>B<br/>C</b> |
| <b>US+MW+EF</b>         | 14          | 14           | -2           | -0,83333        | 19,6        | 9           | -            | <b>A<br/>B</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE G - Testes da ANOVA e Tukey para identificar em que tempo foi atingida a maior e mais significativa eficiência para cada pré-tratamento combinado que utilizou enzimas comerciais**

Tabela 33 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+EC

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 1241                 | 248,20                | 16,97         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 175,5                | 14,63                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 34 - Resultados do teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+EC

|    | T0   | T1       | T2       | T3       | T4       | T5       |          |
|----|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 | -    | 0,001245 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <b>B</b> |
| T1 | 17,5 | -        | 0,698037 | 0,309702 | 0,392165 | 0,999211 | <b>A</b> |
| T2 | 22   | 5        | -        | 0,973153 | 0,992266 | 0,868171 | <b>A</b> |
| T3 | 24   | 7        | 2,3      | -        | 0,999964 | 0,474663 | <b>A</b> |
| T4 | 24   | 6        | 2        | -0,56667 | -        | 0,576002 | <b>A</b> |
| T5 | 19   | 1        | -3       | -6       | -5,2     | -        | <b>A</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 35 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+EC

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 3393                 | 678,70                | 811,70        | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 10,0                 | 0,80                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 36: resultados do teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+EC

|    | T0 | T1     | T2     | T3      | T4     | T5     |          |
|----|----|--------|--------|---------|--------|--------|----------|
| T0 | -  | <0,001 | <0,001 | <0,001  | <0,001 | <0,001 | <b>E</b> |
| T1 | 32 | -      | <0,001 | <0,001  | <0,001 | <0,001 | <b>B</b> |
| T2 | 37 | 4,9    | -      | 0,09874 | <0,001 | <0,001 | <b>A</b> |
| T3 | 39 | 7,1    | 2,2    | -       | <0,001 | <0,001 | <b>A</b> |
| T4 | 24 | -8,5   | -13,4  | -15,6   | -      | <0,001 | <b>C</b> |
| T5 | 15 | -17    | -22    | -24     | -9     | -      | <b>D</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 37 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MW+EC

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 955                  | 190,99                | 32,45         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 70,6                 | 5,89                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 38 - Resultados do teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MW+EC

|    | T0   | T1     | T2      | T3       | T4       | T5       |           |
|----|------|--------|---------|----------|----------|----------|-----------|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001  | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <b>C</b>  |
| T1 | 18   | -      | 0,75576 | 0,643226 | 0,991127 | 0,410949 | <b>AB</b> |
| T2 | 21   | 3      | -       | 0,99994  | 0,966924 | 0,053803 | <b>AB</b> |
| T3 | 21   | 3      | 0,4     | -        | 0,917099 | 0,038335 | <b>A</b>  |
| T4 | 19,1 | 1      | -2      | -2       | -        | 0,186622 | <b>AB</b> |
| T5 | 14   | -3,9   | -7      | -7       | -5       | -        | <b>B</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 39 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+EC

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 3070                 | 614,10                | 45,57         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 161,7                | 13,50                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 40 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+EC

|    | T0   | T1     | T2      | T3       | T4       | T5       |          |
|----|------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001  | <0,001   | 0,002685 | 0,013457 | <b>C</b> |
| T1 | 33,1 | -      | 0,38376 | 0,035726 | <0,001   | <0,001   | <b>A</b> |
| T2 | 39   | 6      | -       | 0,001287 | <0,001   | <0,001   | <b>A</b> |
| T3 | 22   | -11    | -17     | -        | 0,240599 | 0,050961 | <b>B</b> |
| T4 | 15   | -18    | -24     | -7,1     | -        | 0,916249 | <b>B</b> |
| T5 | 12,4 | -20,7  | -27     | -10      | -3       | -        | <b>B</b> |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 41 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+MW+EC

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 636                  | 127,16                | 90,01         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 17,0                 | 1,41                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 42 - Resultados do teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+MW+EC

|    | T0 | T1     | T2      | T3       | T4       | T5       |   |
|----|----|--------|---------|----------|----------|----------|---|
| T0 | -  | <0,001 | <0,001  | <0,001   | <0,001   | <0,001   | D |
| T1 | 16 | -      | 0,22857 | 0,023274 | <0,001   | <0,001   | A |
| T2 | 18 | 2      | -       | <0,001   | <0,001   | <0,001   | A |
| T3 | 12 | -3,7   | -6      | -        | 0,006937 | 0,010354 | B |
| T4 | 8  | -8,1   | -10     | -4,4     | -        | 0,999857 | C |
| T5 | 8  | -8     | -10,2   | -4       | 0,233333 | -        | C |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 43 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+MW+EC

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 2488                 | 497,60                | 60,21         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 99,2                 | 8,30                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 44 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento MO+US+MW+EC

|    | T0   | T1     | T2       | T3       | T4       | T5       |   |
|----|------|--------|----------|----------|----------|----------|---|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | 0,001131 | C |
| T1 | 26   | -      | 0,131147 | 0,225275 | 0,999591 | 0,001235 | A |
| T2 | 33   | 6,5    | -        | 0,99905  | 0,207212 | <0,001   | A |
| T3 | 32   | 6      | -0,83333 | -        | 0,341002 | <0,001   | A |
| T4 | 27   | 0,7    | -5,8     | -5       | -        | <0,001   | A |
| T5 | 13,3 | -13    | -20      | -19      | -14      | -        | B |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 45 - Resultados da ANOVA para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+MW+EC

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tempo             | 5                       | 1732                 | 346,30                | 90,81         | <0,001  |
| Resíduos          | 12                      | 45,8                 | 3,80                  |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 46 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências registradas ao longo do tempo do pré-tratamento US+MW+EC

|    | T0   | T1     | T2       | T3       | T4       | T5       |           |
|----|------|--------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| T0 | -    | <0,001 | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <0,001   | <b>D</b>  |
| T1 | 21,4 | -      | 0,038648 | 0,002251 | 0,381934 | 0,112784 | <b>BC</b> |
| T2 | 27   | 5,6    | -        | 0,548039 | 0,679652 | <0,001   | <b>A</b>  |
| T3 | 30   | 8      | 3        | -        | 0,065317 | <0,001   | <b>A</b>  |
| T4 | 25   | 3      | -2       | -5,1     | -        | 0,003853 | <b>AB</b> |
| T5 | 17   | -5     | -10      | -12,9    | -7,8     | -        | <b>C</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE H - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência entre todos os pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas comerciais**

Tabela 47 - Resultados da ANOVA para as eficiências dos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas comerciais

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tratamento        | 6                       | 1292                 | 215,41                | 20,63         | <0,001  |
| Resíduos          | 14                      | 146,2                | 10,44                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 48 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências dos pré-tratamentos combinados que utilizaram enzimas comerciais

|                         | MO+E<br>C | MO+MW+<br>EC | MO+US+<br>EC | MO+US+MW+<br>EC | MW+E<br>C   | US+E<br>C   | US+MW+<br>EC |                 |
|-------------------------|-----------|--------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|
| <b>MO+EC</b>            | -         | 0,27712      | <0,001       | 0,06432         | 0,8625<br>9 | <0,00<br>1  | 0,43028      | <b>BC<br/>D</b> |
| <b>MO+MW+EC</b>         | -6        | -            | <0,001       | <0,001          | 0,9100<br>7 | <0,00<br>1  | 0,00804      | <b>D</b>        |
| <b>MO+US+EC</b>         | 15        | 21,1         | -            | 0,28735         | <0,001      | ≈1          | 0,03749      | <b>A</b>        |
| <b>MO+US+MW+<br/>EC</b> | 9         | 14,9         | -6,2         | -               | 0,0067      | 0,262<br>27 | 0,87296      | <b>AB</b>       |
| <b>MW+EC</b>            | -3,3      | 3            | -18          | -12             | -           | <0,00<br>1  | 0,06153      | <b>CD</b>       |
| <b>US+EC</b>            | 15        | 21           | 0,16666      | 6               | 18,3        | -           | 0,03346      | <b>A</b>        |
| <b>US+MW+EC</b>         | 5,4       | 12           | -9           | -3              | 8,7         | -9,6        | -            | <b>BC</b>       |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE I - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência para todos os pré-tratamentos que utilizaram hidrólise enzimática**

Tabela 49 - Resultados da ANOVA para as eficiências de todos os pré-tratamentos que utilizaram hidrólise enzimática

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Estatística F | P-Valor |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Tratamento        | 13                      | 2654                 | 204,20                | 16,50         | <0,001  |
| Resíduos          | 28                      | 345,9                | 12,40                 |               |         |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 50 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências de todos os pré-tratamentos que utilizaram hidrólise enzimática

|                         | MO+E<br>C   | MO+E<br>F   | MO+MW+<br>EC | MO+MW+<br>EF | MO+US+<br>EC | MO+US+<br>EF | MO+US+MW<br>+EC |                  |
|-------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|------------------|
| <b>MO+EC</b>            | -           | ≈1          | 0,64266      | ≈1           | 0,00117      | <0,001       | 0,19349         | <b>CDE</b>       |
| <b>MO+EF</b>            | -0,2        | -           | 0,68665      | ≈1           | <0,001       | <0,001       | 0,16972         | <b>CDE</b>       |
| <b>MO+MW+EC</b>         | -6          | -6          | -            | 0,69385      | <0,001       | <0,001       | 0,0011          | <b>E</b>         |
| <b>MO+MW+EF</b>         | 0,2333<br>3 | 0,0333<br>3 | 6            | -            | <0,001       | <0,001       | 0,16599         | <b>CDE</b>       |
| <b>MO+US+EC</b>         | 15          | 15          | 21,1         | 15           | -            | ≈1           | 0,65744         | <b>AB</b>        |
| <b>MO+US+EF</b>         | 16          | 16          | 22           | 16           | 0,93333      | -            | 0,45053         | <b>A</b>         |
| <b>MO+US+MW<br/>+EC</b> | 9           | 9           | 14,9         | 9            | -6,2         | -7           | -               | <b>ABC</b>       |
| <b>MO+US+MW<br/>+EF</b> | 15          | 15          | 21           | 14,9         | -0,16666     | -1,1         | 6               | <b>AB</b>        |
| <b>MW+EC</b>            | -3,3        | -3,1        | 3            | -3           | -18          | -19          | -12             | <b>DE</b>        |
| <b>MW+EF</b>            | -6          | -6          | 0,5          | -6           | -20,6        | -22          | -14,4           | <b>E</b>         |
| <b>US+EC</b>            | 15          | 15,2        | 21           | 15           | 0,16666      | -0,76666     | 6               | <b>AB</b>        |
| <b>US+EF</b>            | 5           | 5,2         | 11           | 5            | -10          | -11          | -4              | <b>BCD</b>       |
| <b>US+MW+EC</b>         | 5,4         | 5,6         | 12           | 6            | -9           | -10          | -3              | <b>ABC<br/>D</b> |
| <b>US+MW+EF</b>         | 14          | 14          | 20,1         | 14           | -1           | -2           | 5,2             | <b>AB</b>        |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 50 (continuação) - Resultados do teste de Tukey para as eficiências de todos os pré-tratamentos que utilizaram hidrólise enzimática

|                         | MO+US+MW+<br>EF | MW+E<br>C   | MW+E<br>F   | US+E<br>C   | US+E<br>F   | US+MW+E<br>C | US+MW+<br>EF |                  |
|-------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------------|
| <b>MO+EC</b>            | 0,00137         | 0,9951<br>2 | 0,7497<br>3 | <0,001      | 0,8828<br>2 | 0,81943      | 0,00291      | <b>CDE</b>       |
| <b>MO+EF</b>            | 0,00114         | 0,9972<br>8 | 0,7889<br>5 | <0,001      | 0,8529<br>5 | 0,7826       | 0,00243      | <b>CDE</b>       |
| <b>MO+MW+EC</b>         | <0,001          | 0,9982<br>2 | ≈1          | <0,001      | 0,0270<br>1 | 0,01935      | <0,001       | <b>E</b>         |
| <b>MO+MW+EF</b>         | 0,0011          | 0,9975<br>4 | 0,7952<br>2 | <0,001      | 0,8476<br>1 | 0,77618      | 0,00236      | <b>CDE</b>       |
| <b>MO+US+EC</b>         | ≈1              | <0,001      | <0,001      | ≈1          | 0,0836<br>8 | 0,1121       | ≈1           | <b>AB</b>        |
| <b>MO+US+EF</b>         | ≈1              | <0,001      | <0,001      | ≈1          | 0,0405<br>9 | 0,0557       | 0,99998      | <b>A</b>         |
| <b>MO+US+MW+<br/>EC</b> | 0,69385         | 0,0154<br>3 | 0,0017<br>4 | 0,6203<br>2 | 0,9885<br>9 | 0,99596      | 0,85295      | <b>ABC</b>       |
| <b>MO+US+MW+<br/>EF</b> | -               | <0,001      | <0,001      | ≈1          | 0,0946<br>6 | 0,12617      | ≈1           | <b>AB</b>        |
| <b>MW+EC</b>            | -18             | -           | 0,9997<br>3 | <0,001      | 0,2386<br>6 | 0,1853       | <0,001       | <b>DE</b>        |
| <b>MW+EF</b>            | -20             | -2          | -           | <0,001      | 0,0405<br>9 | 0,02933      | <0,001       | <b>E</b>         |
| <b>US+EC</b>            | 0,33333         | 18,3        | 21          | -           | 0,0738<br>3 | 0,09938      | ≈1           | <b>AB</b>        |
| <b>US+EF</b>            | -10             | 8,3         | 11          | -10         | -           | ≈1           | 0,16972      | <b>BCD</b>       |
| <b>US+MW+EC</b>         | -9              | 8,7         | 11          | -9,6        | 0,4         | -            | 0,21975      | <b>ABC<br/>D</b> |
| <b>US+MW+EF</b>         | -0,83333        | 17          | 19,6        | -1          | 9           | 8            | -            | <b>AB</b>        |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

**APÊNDICE J - Testes da ANOVA e Tukey para identificar a maior e mais significativa eficiência para todos os pré-tratamentos testados no estudo**

Tabela 51 - Resultados da ANOVA para as eficiências de todos os pré-tratamentos testados no estudo

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>Graus de Liberdade (GL)</b> | <b>Soma Quadrática (SQ)</b> | <b>Média Quadrática (MQ)</b> | <b>Estatística F</b> | <b>P-Valor</b> |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------|----------------|
| Tratamento               | 21                             | 8330                        | 396,70                       | 48,68                | <0,001         |
| Resíduos                 | 44                             | 359,0                       | 8,10                         |                      |                |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 52 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências de todos os pré-tratamentos testados no estudo

(continua)

|                         | MO        | MO+E<br>C | MO+E<br>F | MO+M<br>W | MO+MW+E<br>C | MO+MW+E<br>F | MO+U<br>S | MO+US+E<br>C | MO+US+E<br>F | MO+US+M<br>W | MO+US+MW+E<br>C |                 |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|-----------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>MO</b>               | -         | <0,001    | <0,001    | 0,909     | <0,001       | <0,001       | 0,019     | <0,001       | <0,001       | <0,001       | <0,001          | <b>I</b>        |
| <b>MO+EC</b>            | 18,8<br>9 | -         | ≈1        | <0,001    | 0,502        | ≈1           | 0,038     | <0,001       | <0,001       | ≈1           | 0,067           | <b>CD<br/>E</b> |
| <b>MO+EF</b>            | 18,6<br>9 | -0,2      | -         | <0,001    | 0,561        | ≈1           | 0,047     | <0,001       | <0,001       | ≈1           | 0,054           | <b>CD<br/>E</b> |
| <b>MO+MW</b>            | 4,67      | -14,22    | -14,02    | -         | 0,134        | <0,001       | 0,834     | <0,001       | <0,001       | <0,001       | <0,001          | <b>GHI</b>      |
| <b>MO+MW+EC</b>         | 12,6<br>3 | -6,27     | -6,07     | 7,96      | -            | 0,571        | ≈1        | <0,001       | <0,001       | 0,189        | <0,001          | <b>EFG</b>      |
| <b>MO+MW+EF</b>         | 18,6<br>6 | -0,23     | -0,03     | 13,99     | 6,03         | -            | 0,049     | <0,001       | <0,001       | ≈1           | 0,052           | <b>CD<br/>E</b> |
| <b>MO+US</b>            | 9,74      | -9,16     | -8,96     | 5,07      | -2,89        | -9           | -         | <0,001       | <0,001       | 0,008        | <0,001          | <b>FG<br/>H</b> |
| <b>MO+US+EC</b>         | 33,7<br>3 | 14,83     | 15,03     | 29,06     | 21,1         | 15,07        | 23,99     | -            | ≈1           | <0,001       | 0,521           | <b>A</b>        |
| <b>MO+US+EF</b>         | 34,6<br>6 | 15,77     | 15,97     | 29,99     | 22,03        | 16           | 24,92     | 0,93         | -            | <0,001       | 0,276           | <b>A</b>        |
| <b>MO+US+MW</b>         | 20,2<br>1 | 1,31      | 1,51      | 15,54     | 7,58         | 1,55         | 10,47     | -13,52       | -14,45       | -            | 0,237           | <b>CD<br/>E</b> |
| <b>MO+US+MW+E<br/>C</b> | 27,5<br>3 | 8,63      | 8,83      | 22,86     | 14,9         | 8,87         | 17,79     | -6,2         | -7,13        | 7,32         | -               | <b>AB<br/>C</b> |
| <b>MO+US+MW+E<br/>F</b> | 33,5<br>6 | 14,67     | 14,87     | 28,89     | 20,93        | 14,9         | 23,82     | -0,17        | -1,1         | 13,35        | 6,03            | <b>A</b>        |
| <b>MW</b>               | 1,96      | -16,93    | -16,73    | -2,71     | -10,67       | -16,7        | -7,78     | -31,77       | -32,7        | -18,25       | -25,57          | <b>HI</b>       |
| <b>MW+EC</b>            | 15,5<br>9 | -3,3      | -3,1      | 10,92     | 2,97         | -3,07        | 5,86      | -18,13       | -19,07       | -4,61        | -11,93          | <b>DEF</b>      |
| <b>MW+EF</b>            | 13,13     | -5,77     | -5,57     | 8,46      | 8,46         | 0,5          | -5,53     | 3,39         | -20,6        | -21,53       | -7,08           | <b>EFG</b>      |
| <b>UC</b>               | -0,22     | -19,11    | -18,91    | -4,89     | -4,89        | -12,84       | -18,88    | -9,95        | 33,9<br>4    | -34,88       | -20,42          | <b>I</b>        |

|                 |       |        |        |       |       |        |           |           |        |        |        |                 |
|-----------------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-----------|-----------|--------|--------|--------|-----------------|
| <b>US</b>       | 13,55 | -5,35  | -5,15  | 8,88  | 0,92  | -5,11  | 3,81      | 20,1<br>8 | -21,11 | -6,66  | -13,98 | <b>EFG</b>      |
| <b>US+EC</b>    | 33,89 | 15     | 15,2   | 29,22 | 21,27 | 15,23  | 24,1<br>6 | 0,17      | -0,77  | 13,69  | 6,37   | <b>A</b>        |
| <b>US+EF</b>    | 23,89 | 5      | 5,2    | 19,22 | 11,27 | 5,23   | 14,1<br>6 | -9,83     | -10,77 | 3,69   | -3,63  | <b>BC<br/>D</b> |
| <b>US+MW</b>    | 6,53  | -12,36 | -12,16 | 1,86  | -6,09 | -12,13 | -3,2      | 27,1<br>9 | -28,13 | -13,67 | -20,99 | <b>GHI</b>      |
| <b>US+MW+EC</b> | 24,29 | 5,4    | 5,6    | 19,62 | 11,67 | 5,63   | 14,5<br>6 | -9,43     | -10,37 | 4,09   | -3,23  | <b>BC<br/>D</b> |
| <b>US+MW+EF</b> | 32,73 | 13,83  | 14,03  | 28,06 | 20,1  | 14,07  | 22,9<br>9 | -1        | -1,93  | 12,52  | 5,2    | <b>AB</b>       |

Tabela 52 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências de todos os pré-tratamentos testados no estudo

(continuação)

|                 | <b>MO+US+MW+EF</b> | <b>MW</b> | <b>MW+EC</b> | <b>MW+EF</b> | <b>UC</b> | <b>US</b> | <b>US+EC</b> | <b>US+EF</b> | <b>US+MW</b> | <b>US+MW+EC</b> | <b>US+MW+EF</b> |            |
|-----------------|--------------------|-----------|--------------|--------------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|------------|
| <b>MO</b>       | <0,001             | ≈1        | <0,001       | <0,001       | ≈1        | <0,001    | <0,001       | <0,001       | 0,425        | <0,001          | <0,001          | <b>I</b>   |
| <b>MO+EC</b>    | <0,001             | <0,001    | 0,998        | 0,65         | <0,001    | 0,767     | <0,001       | 0,848        | 0,001        | 0,753           | <0,001          | <b>CDE</b> |
| <b>MO+EF</b>    | <0,001             | <0,001    | 0,999        | 0,707        | <0,001    | 0,816     | <0,001       | 0,803        | 0,001        | 0,698           | <0,001          | <b>CDE</b> |
| <b>MO+MW</b>    | <0,001             | ≈1        | 0,004        | 0,081        | 0,871     | 0,052     | <0,001       | <0,001       | ≈1           | <0,001          | <0,001          | <b>GHI</b> |
| <b>MO+MW+EC</b> | <0,001             | 0,006     | 0,999        | ≈1           | <0,001    | ≈1        | <0,001       | 0,003        | 0,553        | 0,002           | <0,001          | <b>EFG</b> |
| <b>MO+MW+EF</b> | <0,001             | <0,001    | 0,999        | 0,717        | <0,001    | 0,824     | <0,001       | 0,795        | 0,001        | 0,689           | <0,001          | <b>CDE</b> |
| <b>MO+US</b>    | <0,001             | 0,158     | 0,624        | 0,997        | 0,015     | 0,987     | <0,001       | <0,001       | 0,998        | <0,001          | <0,001          | <b>FGH</b> |
| <b>MO+US+EC</b> | ≈1                 | <0,001    | <0,001       | <0,001       | <0,001    | <0,001    | ≈1           | 0,017        | <0,001       | 0,028           | ≈1              | <b>A</b>   |

|                    |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |            |
|--------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| <b>MO+US+EF</b>    | ≈1      | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | ≈1     | 0,005  | <0,001 | 0,009  | ≈1     | <b>A</b>   |
| <b>MO+US+MW</b>    | <0,001  | <0,001 | 0,917  | 0,287  | <0,001 | 0,391  | <0,001 | 0,991  | <0,001 | 0,972  | 0,001  | <b>CDE</b> |
| <b>MO+US+MW+EC</b> | 0,571   | <0,001 | 0,001  | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,473  | 0,992  | <0,001 | 0,998  | 0,803  | <b>ABC</b> |
| <b>MO+US+MW+EF</b> | -       | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | ≈1     | 0,021  | <0,001 | 0,033  | ≈1     | <b>A</b>   |
| <b>MW</b>          | -31,600 | -      | <0,001 | 0,003  | ≈1     | 0,002  | <0,001 | <0,001 | 0,923  | <0,001 | <0,001 | <b>HI</b>  |
| <b>MW+EC</b>       | -17,970 | 13,63  | -      | ≈1     | <0,001 | ≈1     | <0,001 | 0,095  | 0,042  | 0,063  | <0,001 | <b>DEF</b> |

Tabela 52 - Resultados do Teste de Tukey para as eficiências de todos os pré-tratamentos testados no estudo

(conclusão)

| <b>MO+US+MW+EF</b> | <b>MW</b> | <b>MW+EC</b> | <b>MW+EF</b> | <b>UC</b> | <b>US</b> | <b>US+EC</b> | <b>US+EF</b> | <b>US+MW</b> | <b>US+MW+EC</b> | <b>US+MW+EF</b> |        |            |
|--------------------|-----------|--------------|--------------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|--------|------------|
| <b>MW+EF</b>       | -20,430   | 11,17        | -2,470       | -         | <0,001    | ≈1           | <0,001       | 0,005        | 0,409           | 0,003           | <0,001 | <b>EFG</b> |
| <b>UC</b>          | -33,780   | -2,18        | -15,810      | -13,340   | -         | <0,001       | <0,001       | <0,001       | 0,367           | <0,001          | <0,001 | <b>I</b>   |
| <b>US</b>          | -20,010   | 11,59        | -2,050       | 0,420     | 13,760    | -            | <0,001       | 0,009        | 0,303           | 0,005           | <0,001 | <b>EFG</b> |
| <b>US+EC</b>       | 0,330     | 31,93        | 18,300       | 20,770    | 34,110    | 20,350       | -            | 0,014        | <0,001          | 0,023           | ≈1     | <b>A</b>   |
| <b>US+EF</b>       | -9,670    | 21,93        | 8,300        | 10,770    | 24,110    | 10,350       | -10,000      | -            | <0,001          | ≈1              | 0,054  | <b>BCD</b> |
| <b>US+MW</b>       | -27,030   | 4,57         | -9,060       | -6,590    | 6,750     | -7,010       | -27,360      | -17,360      | -               | <0,001          | <0,001 | <b>GHI</b> |
| <b>US+MW+EC</b>    | -9,270    | 22,33        | 8,700        | 11,170    | 24,510    | 10,750       | -9,600       | 0,400        | 17,760          | -               | 0,083  | <b>BCD</b> |
| <b>US+MW+EF</b>    | -0,830    | 30,77        | 17,130       | 19,600    | 32,940    | 19,180       | -1,170       | 8,830        | 26,190          | 8,430           | -      | <b>AB</b>  |

Fonte: Elaborado pela autora (2021).