

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)

VINICIUS SILVA VARANDAS

**PURIFICAÇÃO DE CELULASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* UTILIZANDO
SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG/CITRATO E APLICAÇÃO EM HIDRÓLISE
DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

SÃO CRISTÓVÃO (SE)

2020

VINICIUS SILVA VARANDAS

PURIFICAÇÃO DE CELULASE PRODUZIDO POR *Aspergillus niger* UTILIZANDO SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG/CITRATO E APLICAÇÃO EM HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Diego de Freitas Coêlho

SÃO CRISTÓVÃO (SE)

2020

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

V288p Varandas, Vinícius Silva
Purificação de celulase produzido por *Aspergillus niger* utilizando sistema bifásico aquoso peg/citrato e aplicação em hidrólise de biomassa lignocelulósica / Vinícius Silva Varandas; orientador Roberto Rodrigues de Souza. - São Cristóvão, 2020.
91 f.: il.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Engenharia química. 2. Enzimas de fungos. 3. Hidrólise. 4. Equilíbrio líquido-líquido. I. Souza, Roberto Rodrigues de, orient. II. Título.

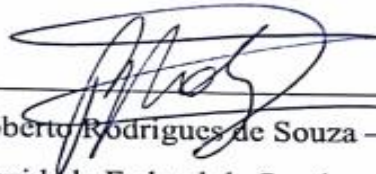
CDU 66.067.8.09

VINICIUS SILVA VARANDAS

PURIFICAÇÃO DE CELULASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* UTILIZANDO SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG/CITRATO E APLICAÇÃO EM HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Dissertação de Mestrado aprovada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe em 18 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza – Orientador
Universidade Federal de Sergipe - UFS



Prof. Dr. Paulo Henrique Leite Quintela
Universidade Federal de Sergipe - UFS



Prof. Dr. Jefferson Arlen Freitas
Universidade Federal de Sergipe - UFS

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha base, em especial à minha mãe Rosana, minha avó Dilza, meu pai Ubirajara (*in memoriam*) e a minhas irmãs Juliana e Sandra.

Ao meu grande amigo, professor Dr. Diego de Freitas Coelho, pela orientação excepcional neste trabalho, por todos os conselhos e conversas fiadas no laboratório. Momentos que levarei além da vida acadêmica.

Ao professor Dr. Roberto Rodrigues de Souza, por todos esses anos de parceria e amizade no LABAM, pelos conselhos e, principalmente, incentivos proporcionados.

Aos meus amigos de graduação, em especial ao Arthur, Andrey, Brício, Raphael, Taline e Tyciane por todos momentos divertidos e descontraídos que tornaram essa jornada menos árdua. Vocês me fazem grande!

À Ludmilla, meu amor, por todo carinho, atenção, companheirismo e paciência durante esta jornada.

À equipe do LABAM, por todas as diversões e “fuleragens” proporcionadas em meus dias na UFS.

A todos os amigos e professores que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Estamos no caminho que parte dos primeiros princípios ou no que se dirige a eles?”

Platão.

RESUMO

As celulasas são enzimas de alto valor agregado no mercado em virtude de atuarem em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais, glicose, é o que desperta maior interesse industrial. Entretanto, o alto custo de produção e purificação dessas enzimas é um fator limitante ao desenvolvimento dessa tecnologia. O objetivo deste estudo foi purificar celulase de *Aspergillus niger* em sistema bifásico aquoso (SAB) PEG/citrato visando à aplicação em hidrólise de biomassa lignocelulósica. A determinação dos dados do equilíbrio líquido-líquido dos sistemas PEG/Citrato mostrou que as metodologias empregadas foram eficientes na caracterização dos mesmos, onde foi possível verificar que as *tie-lines* dos diagramas de fases eram praticamente paralelas, podendo-se obter coeficientes angulares médios para cada sistema. Através dos dados do equilíbrio, foi construído um planejamento fatorial 3^3 com massa molar do PEG, razão de volume (V_r) e comprimento de *tie-line* (TLL) como variáveis independentes. A purificação da CMCase demonstrou que a mesma foi particionada preferencialmente na fase inferior (rica em sal), apresentando um coeficiente de partição mínimo de 0,31, fator de purificação de 7,73 e rendimento de recuperação de 90,69%. As condições operacionais que levaram a este ótimo foram com PEG 6000, razão de volume de 0,25 e TLL de 32,3, sendo essas duas últimas as variáveis que mais influenciaram estatisticamente na partição da enzima. Assim como as demais proteínas, a FPase particionou-se preferencialmente na fase superior (rica em polímero), apresentando como ponto ótimo um coeficiente de partição de 2,69, rendimento de recuperação de 86,79 % e fator de purificação de 2,80, em condições operacionais de PEG 4000, razão de volume de 0,75 e TLL de 32,3. Os resíduos de folhas mostram-se viáveis tanto para a produção de enzima quanto para a produção de açúcares fermentescíveis. Na hidrólise desta biomassa lignocelulósica, a celulase purificada possibilitou uma concentração final de 6,07 g/L de glicose no meio reacional e produtividade máxima de 0,872 g/L.h frente a 4,89 g/L e 0,650 g/L.h obtidas utilizando o extrato bruto, o que demonstra que a purificação das celulasas nos SABs é uma importante estratégia na recuperação da enzima sem provocar perda de atividade catalítica.

PALAVRAS-CHAVE: Celulase; purificação; hidrólise.

ABSTRACT

Cellulases are high value added enzymes in the market because they act in synergy to release sugars, of which glucose is the one that arouses the greatest industrial interest. However, the high cost of producing and purifying these enzymes is a limiting factor for the development of this technology. The objective of this study was to purify *Aspergillus niger* cellulase in a PEG/citrate aqueous biphasic system (SAB) for lignocellulosic biomass hydrolysis. The determination of the liquid-liquid equilibrium data of the PEG / Citrate systems showed that the methodologies employed were efficient in their characterization, where it was possible to verify that the tie-lines of the phase diagrams were practically parallel, obtaining average angular coefficients for each system. The purification of CMCase showed that it has a preference for the bottom phase (rich in salt), with a minimum partition coefficient of 0.31, purification factor of 7.73 and recovery yield of 90.69%. The operating conditions that led to this optimum were with PEG 6000, volume ratio of 0.25 and TLL of 32.3, the last two being the variables that most influenced statistically the enzyme partition. As with the other proteins, FPase showed a preference for the top phase (polymer rich), with the partition point of 2.69, recovery yield of 86.79% and purification factor of 2.80 as the optimal point in operating conditions with PEG 4000, volume ratio of 0.75 and TLL of 32.3. Leaf residues are viable for both enzyme production and sugar production. In the hydrolysis of this lignocellulosic biomass, the purified cellulase allowed a final concentration of 6.07 g/L of glucose in the reaction medium and a maximum productivity of 0.872 g/L.h against 4.89 g/L and 0.650 g/L.h obtained using the extract. which shows that cellulase purification in SABs is an important strategy in enzyme recovery without causing loss of catalytic activity.

KEYWORDS: Cellulase; purification; hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Histórico da geração de biomassa no Brasil..	16
Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica..	17
Figura 3 - Esquema da ação das celulases sobre o substrato..	21
Figura 4 - Representação esquemática do gênero <i>Aspergillus</i> .	27
Figura 5 - Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.	30
Figura 6 - Esquema de ação das celulases sobre o substrato celulose..	32
Figura 7 - Representação esquemática da série de Hofmeister.	35
Figura 8- Representação planar parcial da molécula de PEG.	37
Figura 9 - Esquema de partição de proteína em sistema bifásico aquoso.	38
Figura 10 - Diagramas de fase para um sistema bifásico aquoso hipotético.	39
Figura 11 - Diagramas de fase (binodais) para os sistemas PEG/Citrato..	53
Figura 12 - <i>Tie-lines</i> para o sistema PEG 4000/Citrato..	54
Figura 13 - <i>Tie-lines</i> para o sistema PEG 6000/Citrato..	54
Figura 14 - <i>Tie-lines</i> para o sistema PEG 8000/Citrato..	55
Figura 15 - Diagrama de Pareto para o Rendimento de Recuperação na fase inferior (Y^b)....	60
Figura 16 - Diagrama de Pareto para o Fator de Purificação (PF^b)..	61
Figura 17 - Superfícies de resposta com a influência dos parâmetros no fator de purificação da CMC _{Case} (FP^b). (A) = Influência do comprimento de <i>tie-line</i> (TLL) e razão de volume (V_r). (B) = Influência da massa molar de PEG e razão de volume (V_r). (C) = Influência da TLL e PEG	63
Figura 18 - Perfis da função desejabilidade para a CMC _{Case} ..	64
Figura 19 - Diagrama de Pareto para o Rendimento de Recuperação na fase superior (Y^l)	66
Figura 20 - Superfície de Contorno para o Rendimento de Recuperação na fase inferior (Y^l).	67
Figura 21 - Diagrama de Pareto para o Fator de Purificação na fase superior (PF^l)	68

Figura 22 - Superfícies de resposta com a influência dos parâmetros no fator de purificação da FPase (FP^t). (A) = Influência do comprimento de *tie-line* (TLL) e razão de volume (Vr). (B) = Influência da massa molar de PEG e razão de volume (Vr). (C) = Influência da TLL e PEG. 69

Figura 23 - Perfis da função desejabilidade para a PFase. 70

Figura 24 - Processo de hidrólise da biomassa pela extrato bruto e enzima purificada. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de biomassas lignocelulósicas.	19
Tabela 2 - Referências da literatura para a produção de celulase utilizando biomassa lignocelulósica.	23
Tabela 3 - Trabalhos reportados na literatura para o gênero <i>Aspergillus</i>	26
Tabela 4 - Sistemas Aquosos Bifásicos e suas aplicações na purificação de biomoléculas.	36
Tabela 5 - Matriz de planejamento fatorial 3^3 usada no estudo da purificação da celulase	45
Tabela 6 - Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da FPase	49
Tabela 7 - Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da CMCase.	49
Tabela 8 - Dados gerais das linhas de amarração	55
Tabela 9 - Matriz de planejamento fatorial 3^3 usada no estudo da purificação da celulase	56
Tabela 10 - Características do extrato utilizado nos ensaios de partição	56
Tabela 11 - Valores das variáveis de entrada e de respostas na purificação da CMCase	57
Tabela 12 - Valores das variáveis respostas na purificação da FPase	65
Tabela 13 - Produtividade da glicose para a hidrólise da biomassa lignocelulósica.....	72
Tabela 14 - Composição em massa dos sistemas bifásicos empregas na purificação das celulases	76

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	16
2.1.1 Composição Química e Aplicações	18
2.2 CELULASES.....	20
2.2.1 Obtenção e Aplicações.....	21
2.2.2 Tendências Futuras.....	23
2.3 MICRORGANISMOS E A FERMENTAÇÃO	25
2.3.1 O Gênero <i>Aspergillus</i> de Fungos Filamentosos	25
2.3.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)	27
2.4 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	29
2.4.1 Pré-Tratamento da Biomassa	29
2.4.2 Sacarificação Enzimática da Biomassa.....	31
2.5 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS.....	34
2.6 SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS (SAB)	36
2.6.1 Diagrama de Equilíbrio de Fases	39
2.6.2 Partição de Proteínas nos SABS e Fatores Influenciadores	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 CONSTRUÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES (BINODAIS).....	43
3.2 DETERMINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO	43
3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	45
3.4 OBTENÇÃO DO MICRORGANISMO	45
3.5 PREPARO DO INÓCULO.....	46
3.5.1 Contagem de Esporos.....	46

3.6 PROCESSO FERMENTATIVO	46
3.7 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	47
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	47
3.8.1 Atividade da CMCase	47
3.8.2 Atividade da FPase.....	48
3.8.3 Curva Padrão de glicose.....	48
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	49
3.10 PREPARO DOS SABS E PURIFICAÇÃO DAS CELULASES.....	50
3.11 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO.....	50
3.12 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS SISTEMAS PEG/CITRATO.....	53
4.2 PURIFICAÇÃO DAS CELULASES NOS SABS	56
4.2.1 Partição das Endoglucanases (CMCase).....	57
4.2.2 Partição da Celulase Total (FPase)	64
4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	71
5 CONCLUSÃO.....	74
6 APÊNDICE	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

A geração de resíduos é uma realidade mais que constatável e inerente a qualquer setor produtivo. Com o aumento da conscientização sobre as problemáticas ecológicas, fica claro que um dos grandes desafios da humanidade é equilibrar o crescimento econômico com a sustentabilidade ambiental.

Os resíduos lignocelulósicos, matéria orgânica de origem vegetal, apresentam elevada disponibilidade no Brasil em virtude do desenvolvimento das atividades agroindustriais. Alguns desses resíduos, como o bagaço da cana-de-açúcar e sabugo de milho, são utilizados na geração de eletricidade, enquanto que a maioria não possui um destino adequado (Florencio *et al.*, 2018). Apesar disso, de acordo com Waghmare *et al.* (2018), essa biomassa lignocelulósica é conhecida por ser uma excelente fonte de carbono para alguns microrganismos, os quais, em condições adequadas, são capazes de produzir enzimas celulolíticas de alto valor agregado.

Os resíduos de plantas também podem ser empregados na produção de celulases. Folhas, por exemplo, podem ser uma boa fonte de celulose e outros fatores de crescimento para a produção de celulase e, em uma base peso-substrato, parecem ser melhores que a celulose pura. Além disso, esses resíduos são abundantes e o seu uso como substrato pode diminuir os possíveis impactos negativos ao meio ambiente e potencializar a redução de custos do processo (Behera e Ray, 2016).

As celulases são aplicadas na indústria de papel e celulose para branqueamento da polpa, na indústria têxtil produzindo a aparência “lavada” do jeans e na indústria de alimentos, por exemplo, na produção de sucos e na extração de pigmentos do tecido vegetal. Com isso, a busca por celulases eficientes e de alta produtividade em síntese microbiana são fatores essenciais para a aplicação comercial dessas enzimas (Juturu e Wu, 2014).

O principal obstáculo para a aplicação abrangente da celulase na indústria é o alto custo de produção da enzima, tendo a fonte de carbono utilizada no cultivo dos microrganismos sido apontada como um dos fatores que mais afetam o rendimento e o custo de produção das mesmas (Cardoso *et al.*, 2018). Com isso, o substrato lignocelulósico empregado deve ser barato, de fácil processamento, disponível em grande quantidade e deve permitir tanto a hidrólise quanto a produção das enzimas celulolíticas.

Uma forma de produção alternativa de celulase em cultivos microbianos é a fermentação em estado sólido (FES), a qual, quando comparada à fermentação submersa, apresenta maiores produtividades. Além disso, possui diversas vantagens biotecnológicas e ambientais, entre elas, maior concentração de produtos finais, maior estabilidade dos produtos, cultivo de

microrganismos especializados em substratos insolúveis em água ou cultivo de misturas de vários fungos (Afonso, 2012).

Nesse contexto, é necessário o estudo e desenvolvimento de processos fermentativos que produzam complexos celulolíticos com alta concentração de celulase, elevada estabilidade e atividade, além de um grau de pureza requerido pela aplicação à qual se destina. Além disso, promover uma boa recuperação dessas enzimas do fermentado é crucial para sua aplicação na indústria (Marques *et al.*, 2018).

Operações que integram os três passos clássicos do processo de purificação (separação sólido-líquido, concentração e recuperação de produtos) em uma só unidade têm recebido atenção especial por reduzirem o número de etapas necessárias para a purificação e promoverem alta recuperação com maior economia, quando comparadas a técnicas tradicionais. Dentre essas operações, a utilização de sistemas aquosos bifásicos (SABs) é referida como um processo adequado para purificação de enzimas, uma vez que permite a obtenção de rendimentos elevados em curtos espaços de tempo e com baixos custos (Wu *et al.*, 2017).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é purificar celulase de *Aspergillus niger* utilizando sistema bifásico aquoso PEG/Citrato e aplicar em hidrólise.

Para tanto, foi feita a caracterização do equilíbrio líquido-líquido do sistema PEG/Citrato, a otimização do processo de purificação através de um planejamento experimental e a análise da viabilidade da aplicação da enzima na hidrólise de materiais lignocelulósicos, através do processo de sacarificação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre essas, os materiais agroindustriais se destacam por serem obtidos após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração (Florencio *et al.*, 2018).

A Figura 1 apresenta séries históricas de geração de materiais lignocelulósicos no Brasil, com as massas representadas em base úmida. O bagaço de cana-de-açúcar, dentre as biomassas consideradas, é a predominante com uma geração em 2007 de 147 milhões de toneladas. Igualmente, é notória a quantidade gerada das demais biomassas, as quais, juntas, no ano de 2007, somaram uma massa gerada no Brasil de 606 milhões de toneladas, das quais cerca de 105 milhões de toneladas correspondem à fração celulósica (Castro, 2010).

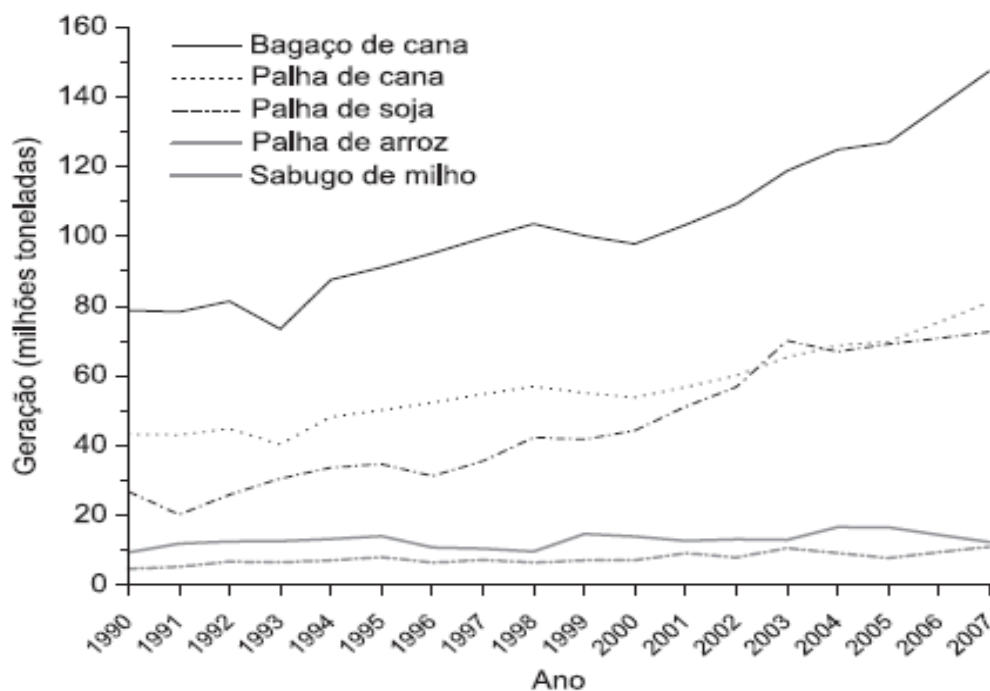


Figura 1 - Histórico da geração de biomassa no Brasil. Fonte: Castro (2010).

O principal componente destas biomassas é a lignocelulose, que compreende cerca da metade da matéria vegetal produzida por fotossíntese, sendo o recurso orgânico renovável mais abundante no solo.

As plantas desenvolveram a capacidade de sintetizar a lignocelulose como um meio para resistir ao estresse biótico e abiótico e, com isso, permitir que a parede celular seja reforçada contra patógenos, mantendo sua arquitetura dinâmica. Isto foi possível devido a sua composição heterogênea, que apresenta uma variedade de ligações químicas entre diferentes polímeros (Xiaoyun *et al.*, 2019).

A lignocelulose é constituída por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. Essas frações majoritárias são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais. A celulose encontra-se cercada pelos outros dois polímeros, sendo a lignina o polímero que une o conjunto. A porcentagem de celulose e hemicelulose na biomassa corresponde a carboidratos, os quais podem ser convertidos em combustíveis e produtos químicos por fermentação (Li, 2017). A Figura 2 exibe a estrutura lignocelulósica.

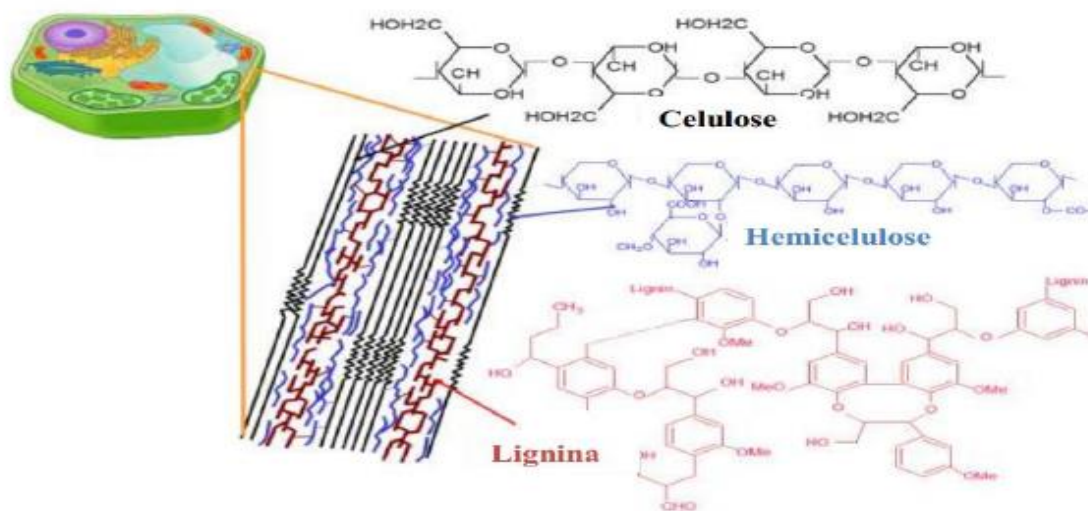


Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica. Fonte: Bispo (2015).

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila, o que resulta na cristalinidade da celulose. Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas conhecidas como amorfas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (Koupaie *et al.*, 2018).

O segundo constituinte mais importante do material lignocelulósico é a hemicelulose. A hemicelulose é um polímero heterogêneo que representa de 15 a 35% da biomassa vegetal e

é constituído por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e/ou ácidos urônicos. Outros açúcares, como ramnose e fucose, também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxil dos açúcares podem ser substituídos por grupos acetil. As polioses de xilose são os principais componentes da hemicelulose da parede celular secundária, constituindo de 20 a 30% da biomassa de madeiras duras e plantas herbáceas (Dhyani e Bhaskar, 2018).

A lignina é o componente não-carboidrato mais importante da biomassa lignocelulósica. Este polímero é composto por unidades de fenilpropano conectadas por diferentes ligações C-C e ligações C-O-C e tem como principal função conferir rigidez à parede celular. A lignina geralmente está distribuída junto com a hemicelulose no espaço entre as microfibrilas de celulose em ambas as paredes celulares, primária e secundária, e na lamela média, para adesão celular. Essa estrutura aromática, altamente estável, é um dos maiores obstáculos para a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose. A lignina forma um escudo de proteção em torno da celulose e da hemicelulose, protegendo esses polissacarídeos da degradação enzimática (Li, 2017).

2.1.1 Composição Química e Aplicações

Assim como a forma e o tamanho da parede celular da biomassa variam de espécie para espécie, sua composição química apresenta-se distinta entre representantes. De forma geral, a celulose encontra-se em maiores proporções, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina (Buitrago, 2017). A Tabela 1 lista a composição de alguns materiais lignocelulósicos, expressa em suas três principais frações.

Tabela 1 - Composição química de biomassas lignocelulósicas.

Material	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Bagaço de cana	40	28	20
Sabugo de milho	36	28	29
Capim elefante	32	20	9
Casca de arroz	36	20	19
Folha de salgueiro	37	23	14
Papel	43	13	6
Folha de pinheiro	44	26	29
Papelão	47	25	12
Jornal	62	16	21
Resíduos Municipais	33	9	17
Palha de Trigo	39	36	10
Casca de amendoim	38	36	16

Fonte: Castro (2010).

Materiais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, sabugo de milho, palha de arroz, gramíneas, cascas de frutas e folhas vegetais são abundantes no meio ambiente e seu descarte inapropriado leva à poluição. O aproveitamento e reciclagem de tais resíduos podem reduzir os problemas ambientais resultantes de sua disposição inadequada na natureza, bem como os transforma em matérias-primas úteis para a obtenção de produtos de valor agregado, com importância industrial e comercial (Hassan *et al.*, 2018).

As estratégias de aproveitamento da biomassa lignocelulósica incluem processos de gaseificação, métodos de produção de calor e eletricidade (cogeração), recuperação de energia de resíduos sólidos urbanos e gás de aterros sanitários, produção de celulases de interesse industrial e a obtenção de bioetanol, que visa diminuir a utilização de combustíveis fósseis (Hassan *et al.*, 2018).

Vários processos utilizam o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima, a exemplo da geração de eletricidade, da produção de celulose, papel e produtos baseados na fermentação, tais como enzimas, bioetanol, ácidos orgânicos, alcaloides, ração para animais enriquecida com proteínas, antibióticos, entre outros. Em virtude da sua abundante disponibilidade, pode ser considerado como um substrato ideal em processos de bioconversões, como a fermentação em estado sólido, para a produção de produtos de alto valor agregado (Oliveira *et al.*, 2017).

Um dos campos mais promissores da aplicação da biomassa lignocelulósica é a produção de etanol, o qual compreende as seguintes etapas: hidrólise da hemicelulose (via ácida ou enzimática), separação da celulose sólida, da lignina e dos açúcares produzidos; hidrólise ácida ou enzimática da celulose, produzindo glucose e lignina, fermentação dos açúcares produzidos e separação do etanol por destilação. A lignina obtida no processo pode ser utilizada para produção de energia por meio da sua queima (Rattanaporn *et al.*, 2017).

É imprescindível a utilização de celulases na conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis para obtenção de biocombustíveis. Entretanto, o alto custo de produção das enzimas limita uma aplicabilidade bem-sucedida dessa matéria prima. Para sanar esse problema, inúmeros estudos têm sido realizados a fim de se utilizar os próprios resíduos lignocelulósicos na produção de celulases, de forma a se obter um aproveitamento máximo da biomassa, mínimo de custo e alto rendimento em produção enzimática (Cardoso *et al.*, 2018).

2.2 CELULASES

Celulases são biocatalisadores altamente específicos que atuam, em sinergia, na hidrólise de ligações glicosídicas para a liberação de açúcares, dos quais glucose é o que desperta maior interesse industrial devido à possibilidade de sua conversão em etanol. Estas enzimas constituem um complexo cujo mecanismo geral de atuação é baseado no ponto de atuação do substrato celulose, permitindo sua divisão em três grandes grupos: endoglucanases, exoglucanases e B-glicosidas (Salomão *et al.*, 2019).

Endoglucanase, é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Atua de forma randômica nas regiões internas da estrutura celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glucose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glucose adjacente). Da ação da endoglucanase resulta a rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (Dantas *et al.*, 2018).

Exoglucanases são enzimas que atuam na região externa da celulose e são divididas em glucano-hidrolase e a celobio-hidrolase. A glucano-hidrolase ainda é pouco estudada, porém apresenta importância na hidrólise da fibra celulósica, pois sua atuação promove a liberação de glucose diretamente do polímero (Subsamran *et al.*, 2019).

A celobio-hidrolase, por sua vez, participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pelo fenômeno da amorfogênese, o qual promove a desestratificação das fibras por meio de ruptura física do substrato, aumentando as regiões intersticiais e transformando as regiões cristalinas do polímero em amorfas. Dessa forma, a taxa de hidrólise da celulose aumenta, pois, o polímero fica mais exposto à ação das celulasas. A celobio-hidrolase pode ser dividida ainda em dois tipos: tipo I, que hidrolisa terminais redutores e o tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Tais enzimas são inibidas pelo seu produto de hidrólise (Juturu e Wu, 2014).

O terceiro grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β -glicosidase, ou β -glicosídeo gluco-hidrolase. Essas enzimas tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Assim como a celobio-hidrolase, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise (Dantas *et al.*, 2018).

Quando atuam de forma conjunta, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras (Srivastava *et al.*, 2018). A Figura 3 apresenta o esquema de ação dessas enzimas sobre o substrato lignocelulósico.

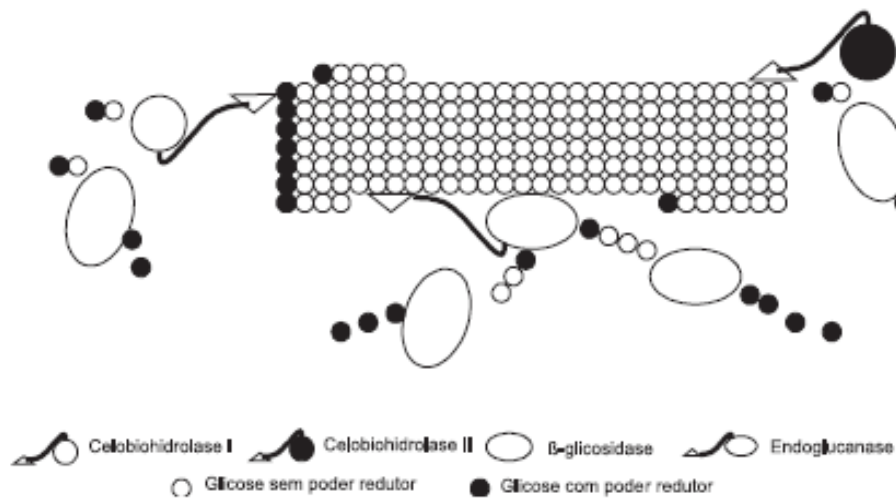


Figura 3 - Esquema da ação das celulasas sobre o substrato. Fonte: Castro (2010)

2.2.1 Obtenção e Aplicações

Desde sua descoberta, a produção de celulasas por ação microbiana tem sido objeto de muitos estudos, os quais buscaram estabelecer as melhores condições para a produção dessas enzimas a partir do momento em que foram surgindo aplicações industriais para as mesmas. Os maiores investimentos e esforços na produção de celulasas foram observados no início do

século XXI, devido à possibilidade de aplicar as celulases na obtenção de etanol combustível (Marques *et al.*, 2018).

As celulases podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias, juntamente com as hemicelulases e pectinases, no processo de extração e clarificação da fruta. Após o esmagamento das frutas, essas enzimas são utilizadas para aumentar a liquefação por meio da degradação da fase sólida. Essas enzimas também são muito aplicadas no tratamento de silagem do processamento de ração animal, aumentando a digestibilidade e melhorando a qualidade nutricional fornecida aos ruminantes e monogástricos (Juturu e Wu, 2014).

Na indústria têxtil, as celulases são utilizadas no processamento de fibras celulósicas com o objetivo de obter tecidos de melhor qualidade e dar efeitos de acabamento em peças tingidas. Já na fabricação de detergentes, a principal vantagem de seu uso é a capacidade de modificar as fibras celulósicas de forma controlada, resultando em um produto de maior e melhor qualidade (Singh *et al.*, 2016).

De acordo com Singh *et al.* (2016), as celulases exercem papel fundamental na indústria de papel e celulose, atuando como coaditivo no branqueamento da polpa, na polpação biomecânica da pasta de papel, na melhoria da drenagem dos efluentes e na redução da necessidade de energia e cloro. Além disso, ainda representam importância em processos fermentativos através da bioconversão de materiais em produtos de alto valor agregado, como biocombustíveis, ácidos orgânicos e lipídeos.

Os processos industriais de produção de celulases envolvem a utilização de um microrganismo como agente metabolizador das fontes de carbono presentes em um meio de cultivo, de forma que as enzimas são sintetizadas e excretadas. Uma grande quantidade de microrganismos tem sido estudada, a fim de selecionar aqueles que apresentem alta produtividade (Idris *et al.*, 2017).

Em seus estudos, Patel *et al.* (2019) relatam que as celulases são sintetizadas por vários tipos de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, durante o seu crescimento em substratos lignocelulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbios, anaeróbios, mesofílicos ou termofílicos. Destacam-se os gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* e *Aspergillus* (produtor de celulase mais estudado).

Além dos microrganismos, muitos substratos são pesquisados como indutores na produção das enzimas. Resíduos agroindustriais e biomassa celulósica de baixo custo podem ser utilizados para produzir as celulases com um rendimento semelhante ao que se obtém com outras fontes de carbono, o que não só reduz grandemente o custo da produção dessas enzimas,

mas também contribui para a conservação do meio ambiente (Onofre *et al.*, 2013). A Tabela 2 reporta alguns trabalhos da literatura empregando biomassa na produção de celulase.

Tabela 2 - Referências da literatura para a produção de celulase utilizando biomassa lignocelulósica.

Microrganismo	Substrato	Referência
<i>Aspergillus flavus</i>	Bagaço de cana	Onofre <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhizopus sp</i>	Casca de maracujá	Sousa <i>et al.</i> (2012)
<i>Trichoderma reesei</i>	Palma forrageira	Bispo (2015)
<i>Aspergillus tamaritii</i>	Farelo de trigo	Soares <i>et al.</i> (2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Mamona	Okereke <i>et al.</i> (2017)

Elevada atividade celulolítica pode ser obtida a partir dos resíduos agroindustriais empregados, sem suplementação com nitrogênio, minerais ou vitaminas. A resposta dos microrganismos aos diferentes tipos de indutores, como a celobiose, carboximetilcelulose, celulose microcristalina e celulose amorfa depende da concentração, do tipo do indutor, e da presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de enzimas celulolíticas têm duas funções: podem servir como fonte de carbono para o crescimento celular e como indutores da síntese (Goncalves *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que um processo de produção de enzimas celulase não deve causar uma redução drástica na atividade e estabilidade enzimática, uma vez que a estabilidade da enzima sob condições adversas é necessária para a sua aplicabilidade em processos industriais. Compreender o mecanismo de estabilidade pode ajudar a projetar processos e operações que não reduzam a atividade nem a estabilidade enzimática (Patel *et al.*, 2019).

2.2.2 Tendências Futuras

Ao longo dos anos, melhorias no processo de produção e aplicação de celulases vêm sendo geradas no que tange ao isolamento de microrganismos produtores de celulases, à clonagem e à seleção de genes para aumento da excreção microbiana de celulases. Além disso, outros estudos concentram-se sobre a purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, à determinação das estruturas tridimensionais das celulases e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (Cheng e Timilsina, 2011).

O mercado externo brasileiro de biocatalisadores é estimado em, aproximadamente, US\$ 200 milhões. Embora as celulases representem o terceiro maior mercado industrial de enzima no mundo, sua produção no Brasil é escassa e os preços são elevados, o que dificulta o crescimento desta área. Todavia, as celulases têm grande potencial de se tornar a maior enzima industrial à medida em que os biocombustíveis obtidos de biomassa lignocelulósica ganham destaque (Andreaus *et al.*, 2014).

O custo das enzimas é considerado uma importante barreira na produção de biocombustíveis. Estes custos são contabilizados e relatados em termos de dólares por litro de etanol. A produção também depende de outros fatores, incluindo a escolha da matéria-prima, a carga da enzima e o rendimento global de biocombustível (Mendes *et al.*, 2017).

Conforme Klein-Marcuschamer *et al.* (2012), a contribuição do custo das enzimas para o etanol produzido pela conversão de palha de milho seria de \$ 0,68 por galão, se os açúcares da biomassa pudessem ser convertidos em rendimento teórico máximo, e de \$ 1,47 por galão, se os rendimentos se baseassem nos rendimentos de sacarificação e fermentação previamente relatados na literatura científica. Em função disto, a produção de celulases por microrganismos a partir de resíduos lignocelulósicos é um método eficaz e barato para a obtenção de produtos com alto valor agregado, uma vez que os extratos enzimáticos obtidos após o processo fermentativo podem ser utilizados na hidrólise da biomassa para a sua conversão em biocombustíveis ou produtos químicos.

Os extratos de celulases comerciais atualmente encontrados no mercado possuem baixas quantidades de enzimas acessórias, o que limita a eficiência da hidrólise dos materiais lignocelulósicos. Assim, para se obter uma alta eficiência hidrolítica, é necessário a utilização de grandes quantidades de celulases, o que onera e muito o processo de produção de etanol de segunda geração, tornando inviável a produção em grande escala (Klein-Marcuschamer *et al.*, 2012). De acordo com Karboune *et al.* (2008), uma quantidade de enzimas cerca de 40 a 100 vezes superior é necessária para se produzir uma equivalente quantidade de etanol a partir de biomassa.

Diante disso, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de aumentar a produção de celulases e reduzir o custo da produção das enzimas. Estas pesquisas estão enfatizando, principalmente, estudos de *screening* de novos organismos produtores de celulases, bem como a avaliação de diferentes sistemas de cultivo e utilização de fontes de carbono que induzem eficientemente à produção das enzimas, e que sejam de baixo custo (Kiran *et al.*, 2014)

O conceito de engenharia de produto pode ser aplicado em processos de produção de celulases, visando a obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas do complexo celulolítico. O formulado ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases; pela produção em separado das

celulases e posterior mistura dos extratos, em proporções pré-otimizadas ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros, como os fungos filamentosos, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (Florencio *et al.*, 2018).

Uma aplicação que vem ganhando destaque nos últimos anos é a utilização de celulases na conversão de biomassa agrícola e materiais lignocelulósicos, em bioetanol. Nesse processo, é promovida a hidrólise da biomassa lignocelulósica para conversão da celulose em glicose, a qual se trata de um açúcar diretamente fermentescível pela levedura produtora do etanol (Mendes *et al.*, 2017).

No âmbito da hidrólise de materiais lignocelulósicos, as celulases são insumos que impactam significativamente o processo, podendo representar até 18% do custo operacional de uma planta. Dessa forma, torna-se necessário o estudo de operações unitárias que permitam o aproveitamento e reciclo desses biocatalisadores ao reator de hidrólise, estudo biológico do microrganismo a ser empregado na produção e o pleno conhecimento das variáveis que afetam a rota biotecnológica da produção enzimática (Liu e Qu, 2018).

2.3 MICRORGANISMOS E A FERMENTAÇÃO

As enzimas celulolíticas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, insetos e microrganismos. Diferentes formas de microrganismos como fungos, bactérias, actinomicetos e leveduras são usados para a produção de celulases, com vasta aplicação em indústrias, apesar dos dois primeiros serem os mais empregados com esta finalidade. Estes microrganismos podem ser aeróbios, anaeróbios, mesófilos ou termófilos (Yoon *et al.*, 2014). Grande parte das celulases para aplicações industriais é obtida a partir de fungos filamentosos, pois eles têm a capacidade de produzir quantidades consideráveis de celulases e hemicelulases, que são secretadas para o meio a fim de facilitar a extração e a purificação (Shajahan *et al.*, 2017).

2.3.1 O Gênero *Aspergillus* de Fungos Filamentosos

O gênero *Aspergillus*, de fungos filamentosos, é composto por uma variedade de espécies, totalizando aproximadamente 180 com alto impacto econômico, social e compreendendo linhagens com valor comercial. Dentre essas linhagens, a mais conhecida é *Aspergillus niger*, o qual é conhecido por consumir um grande número de substratos e, desse modo, produzir várias enzimas extracelulares com importância industrial significativa, englobando celulases, amilases, proteases, lipases, pectinases e quitanases (Passos *et al.*, 2018).

As espécies de *Aspergillus* são exemplos típicos do estilo de vida hetetrófico dos fungos, os quais são encontradas em habitats terrestres e são isoladas do solo e de resíduos vegetais associados. Vários substratos são atacados por consórcios de organismos, em diferentes taxas. O *Aspergillus*, em conjunto com outros fungos, desempenha um papel importante nestes consórcios, pois são capazes de degradar amidos, hemicelulose, pectinas, celulose e outros polímeros de açúcar, gorduras, óleos, quitina e queratina, gerando diversos produtos (Samson *et al.*, 2014). O processo de degradação é o meio de obtenção de nutrientes para este gênero e a Tabela 3 apresenta alguns trabalhos reportados na literatura com a utilização de fungos para a produção de biomoléculas.

Tabela 3 - Trabalhos reportados na literatura para o gênero *Aspergillus*

Espécie de Fungo	Substrato	Produto	Autor
<i>Aspergillus oryzae</i>	Molho de soja	Amilase	Sahnoun <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Mandioca	Ácido cítrico	Adeoye <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Casca da laranja	Pectinase	Ahmed <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho	Ácido oxálico	Mai <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Palha de milho	Ácido glucônico	Zhang <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	Bolo de mostarda	Lipase	Sethi <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Palha de sorgo	Xilanase	Adhyaru <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho	Amilase	Aliyah <i>et al.</i> (2017)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de soja	Xilanase	Ajijolakewu <i>et al.</i> (2017)
<i>Aspergillus niger</i>	Fibra de coco	Lipase	Prabaningtyas <i>et al.</i> (2018)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farinha de soja	Bioativos	Handa <i>et al.</i> (2019)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de Trigo	Protease	Zhao <i>et al.</i> (2019)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Palha de arroz	Celulase	Jin <i>et al.</i> (2019)

Uma das mais conhecidas, a linhagem *A. niger*, é oriunda de colônias com pouca ou nenhuma coloração, diferenciando-se pelos seus conídios esféricos pretos, apresentando um ótimo crescimento na faixa de temperatura de 35 a 37° C. Este fungo consome um grande número de substratos e, desse modo, produz várias enzimas extracelulares com importância industrial significativa, englobando celulasas, amilases, proteases, lipases, pectinases e quitinases (Parshikov e Sutherland, 2014). Para a escolha da cepa, deve-se levar em consideração que ela produzirá enzimas extracelulares com a purificação e a recuperação bem mais fácil do que quando gerada intracelularmente (Nampoothiri e Larroche, 2015).

Conforme relatam Machida e Gomi (2010), as espécies deste grupo produzem o “aspergillum” ou “cabeça aspergillar”, formada por uma haste (estípede) asseptada, a qual é responsável pelo surgimento das células conidiogênicas. A cabeça aspergillar é formada por uma vesícula e um conjunto de células alongadas (fiálides) de onde surgem os conídeos. A estrutura inteira, apresentada na Figura 4, composta pela cabeça aspergillar, a haste e a célula pé, forma o conidióforo.

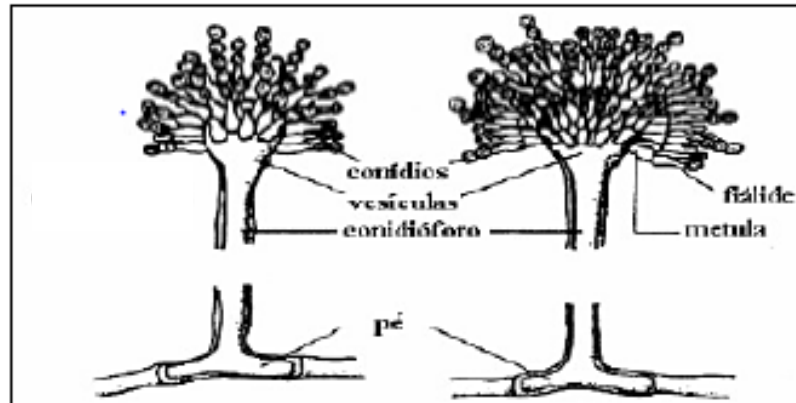


Figura 4 - Representação esquemática do gênero *Aspergillus*. Fonte: Oliveira (2018)

2.3.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo no qual os microrganismos crescem sobre ou dentro das partículas de uma matriz sólida, cujo conteúdo de água ligado a ela garante apenas o crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida (Soccol *et al.*, 2017).

No desenvolvimento de um processo de fermentação em estado sólido é feita uma seleção do substrato e de um microrganismo específico, de acordo com o produto biotecnológico desejado. Além disso, é necessário o controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, tais como: pré-tratamento do substrato, tamanho de partícula (espaço interpartícula e área superficial) do substrato, umidade e atividade de água do substrato, temperatura, período de cultivo, manutenção de uniformidade no ambiente e taxa de consumo de oxigênio (Passos *et al.*, 2018).

A seleção do substrato é um aspecto extremamente importante para este processo, uma vez que atuará como um suporte físico e fonte de nutrientes. Vários materiais podem ser usados com esta finalidade, como suportes inertes (vermiculita, perlita e polietileno) e os naturais, como os resíduos agroindustriais, que apresentam as propriedades necessárias para promover o

crescimento dos microrganismos. Todavia, seu emprego dependerá de alguns parâmetros físicos, como o tamanho de partícula, o nível de umidade, espaçamento intrapartícula e composição de nutrientes dentro do substrato (Handa *et al.*, 2014).

O principal fator limitante desta técnica refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, os quais, considerando a possibilidade de reprodução nas condições de crescimento natural, adaptam bem ao processo (Farinas, 2015).

Os principais seres empregados nas fermentações em estado sólido são os fungos filamentosos, em virtude da sua forma de crescimento (em hifas) favorecer a colonização do meio. Esses seres são produtores de enzimas hidrolíticas e apresentam relativa facilidade em sua excreção, tendo contribuído significativamente no campo da produção enzimática para fins industriais. Para suprimento das necessidades energéticas, muitos destes organismos produzem as enzimas celulolíticas, visando decompor a celulose de fontes vegetais, as quais são comumente empregadas como substrato nas FES (Subsamran *et al.*, 2019).

Meyer e Schmidhalter (2014) destacam que, embora a maioria das enzimas comerciais seja obtida por fermentação submersa (FS), que tem como atrativos o alto rendimento, o baixo risco de contaminação e a possibilidade de se utilizar modernos métodos de controle de processos, muitos estudos tem sido realizados com fermentação semissólida devido a algumas de suas vantagens, como a utilização de menor infraestrutura e matérias-primas mais baratas para a produção enzimática, aumento da economia deste tipo de processo e possibilidade de obter-se um produto concentrado, o que é bastante vantajoso.

De acordo com Castro e Sato (2015), os sistemas de biorreatores empregados nesse processo são mais simples quando comparados com a submersa. Além da composição, tamanho das partículas, porosidade, capacidade do substrato de reter água e a baixa condutividade térmica do substrato no leito são parâmetros fundamentais que devem ser estudados para os projetos dos biorreatores. Em escala de bancada, a FES é realizada em placas de Petri, frascos Erlenmeyer, garrafas de *Roux* e frascos cilíndricos. Estes sistemas são simples e as análises são feitas com facilidade (Cheirsilp e Kitcha, 2015).

A fermentação em estado sólido possui diversas vantagens biotecnológicas e ambientais. As vantagens biotecnológicas envolvem maior produtividade, maior concentração de produtos finais, maior estabilidade dos produtos, menor repressão catabólica, cultivo de microrganismos especializados em substratos insolúveis em água, ou cultivo de misturas de vários fungos. Além dessas vantagens, os esporos fúngicos produzidos por FES mostram maior

estabilidade e maior resistência à seca, além de maiores taxas de germinação do que os esporos produzidos por outro processo fermentativo (Behera e Ray, 2016).

Os produtos fúngicos de interesse biotecnológico, como os esporos e as enzimas, foram desenvolvidos por estes microrganismos para o uso em substratos sólidos úmidos, mas não em líquidos. Assim sendo, o cultivo desses microrganismos em suspensões aquosas pode prejudicar a sua eficiência metabólica, pois o teor de água da fermentação submersa é superior a 95%. Em contraste, o teor de água do substrato sólido deve ser mantido na faixa de 12 a 80%, principalmente em torno de 60%, o que torna a FES o processo mais viável para o crescimento desses seres vivos (Thomas *et al.*, 2013).

Embora possua muitas vantagens, a FES apresenta alguns desafios, entre eles a dificuldade da remoção do calor ocasionado pelo crescimento dos microrganismos, a dificuldade na agitação do sistema, pelo fato do meio ser heterógeno, dificuldade para determinar o crescimento microbiano, outros parâmetros do cultivo (temperatura, pH e umidade) e dificuldade de ampliação de escala (Azabou *et al.*, 2016). Ambos os tipos de processos fermentativos apresentam características importantes, sendo necessário a avaliação das vantagens e desvantagens que cada um apresenta, o que dependerá do tipo de produto desejado e, principalmente, do grupo de microrganismos a ser utilizado (Vasconcellos *et al.*, 2015).

2.4 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As matérias-primas de origem lignocelulósica contêm de 20 a 60% de celulose, que pode ser totalmente convertida em glicose por ação enzimática. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado como bloco de construção para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse. Tais tecnologias visam ao aproveitamento integral e integrado dos resíduos agroindustriais gerados em uma determinada cadeia produtiva, de modo a agregar valor à mesma (Waghmare *et al.*, 2018).

2.4.1 Pré-Tratamento da Biomassa

A hidrólise da biomassa lignocelulósica pode ser conduzida de três formas: por tratamento químico, utilizando ácido ou base, por tratamento físico ou por tratamento enzimático, utilizando-se, sobretudo, celulasas e xilanasas. A hidrólise química e física é considerada um pré-tratamento, o qual visa deixar a celulose mais acessível para a ação das

enzimas através das modificações na estrutura da biomassa, como aumento de área superficial e redução do grau de cristalização da estrutura (Liu e Qu, 2018). A Figura 5 apresenta o esquema de pré-tratamento.

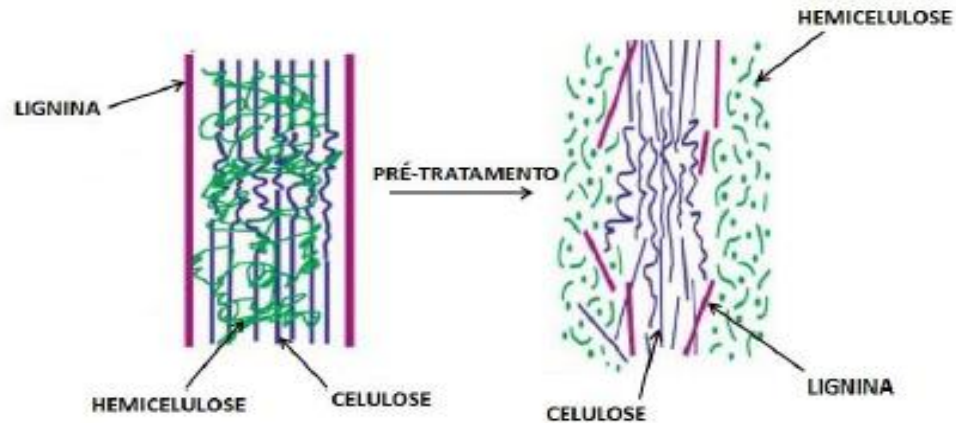


Figura 5 - Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Fonte: Afonso (2012).

Vários processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos têm sido usados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Os pré-tratamentos físicos são aqueles caracterizados pela fragmentação do material através de uma ação mecânica, seja por trituração, moagem ou esfarelamento, sendo que esta fragmentação não altera sua composição química. Os tratamentos físico-químicos consistem na submissão do material a altas temperaturas, catalisados ou não, por agentes químicos e caracterizam-se pelas condições drásticas de temperatura que são utilizadas. Os pré-tratamentos químicos variam de muito ácido para bastante alcalino, tendo assim, diferentes efeitos nos principais componentes da biomassa (Tian *et al.*, 2018).

A radiação ionizante pode ser um método eficaz de pré-tratamento físico de biomassa lignocelulósica, pois é capaz de modificar e romper a estrutura da lignocelulose. A ação da radiação em macromoléculas da biomassa dá-se pela interação dos radicais livres produzidos tanto pela interação com a água presente na biomassa, como pela ação direta nas ligações de átomos de carbono e oxigênio. A eficiência das reações induzidas pela radiação sobre o material celulósico depende da estrutura do polímero e da dose de radiação absorvida (Khan *et al.*, 2006).

Entre os processos físico-químicos, a explosão à vapor é um dos pré-tratamentos mais comumente utilizado em materiais lignocelulósicos. Neste método, a biomassa é tratada com vapor saturado à alta pressão e, em seguida, a pressão é rapidamente reduzida, o que faz com que o material sofra uma descompressão explosiva. O processo causa a degradação da hemicelulose e a transformação da lignina devido as altas temperaturas, aumentando assim o

potencial de hidrólise da celulose (Kumar *et al.*, 2009). A adição de H₂SO₄ ou CO₂ (tipicamente 0,3-3% em massa) ao processo de explosão à vapor pode diminuir o tempo e a temperatura do processo, melhorar efetivamente a hidrólise, diminuir a produção de compostos inibitórios e remover completamente a hemicelulose (Zheng *et al.*, 2014).

De acordo com Xu *et al.* (2019), uma das limitações do pré-tratamento por explosão à vapor é a geração de produtos que podem ser inibitórios para o crescimento microbiano e a hidrólise enzimática, tais como furfural e hidroximetilfurfural. Devido a formação desses produtos, a biomassa pré-tratada precisa ser lavada com água para remover os materiais inibitórios juntamente com a hemicelulose solúvel em água. A lavagem com água diminui o rendimento da sacarificação global através da remoção de açúcares solúveis, tais como aqueles gerados pela hidrólise da hemicelulose

O objetivo do pré-tratamento químico ácido é remover a hemicelulose, o que possibilita atingir rendimentos elevados de açúcares a partir do material lignocelulósico. A desvantagem desse método é a formação de produtos voláteis provenientes da degradação do carbono, ocasionando uma diminuição na conversão dos açúcares em etanol (Solarte *et al.*, 2019).

O pré-tratamento básico facilita o acesso das enzimas à celulose a partir da remoção da lignina, ocasionando um aumento dos poros na celulose e diminuindo a cristalinidade das biomassas. O hidróxido de sódio diluído é a base mais utilizada, por ser barato e muito eficiente na remoção da lignina. No geral, este método apresenta vantagem frente ao tratamento ácido em virtude da utilização de temperaturas e pressões mais baixas, minimizando as perdas de açúcares no processo (Mood *et al.*, 2013).

Normalmente, hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento pode alcançar até mais de 90%. Assim, os pré-tratamentos ideais têm que alcançar as seguintes exigências: melhorar a formação de açúcares ou a habilidade subsequente destes açúcares sofrerem hidrólise enzimática, evitar a degradação ou perda de carboidrato, evitar a formação de inibidores para os processos subsequentes de hidrólise e fermentação e ser viável economicamente (Láinez *et al.*, 2018).

2.4.2 Sacarificação Enzimática da Biomassa

A sacarificação enzimática utilizando biomassas é uma etapa bastante lenta devido à heterogeneidade do substrato (presença de lignina e hemicelulose), pois esses componentes dificultam o acesso à celulose e, também, devido à cristalinidade da mesma. Além disso, poucos

são os fungos e bactérias que produzem elevados níveis de celulases extracelulares capazes de hidrolisar a celulose cristalina (Xu *et al.*, 2016).

De acordo com Pitarelo (2013), o processo de sacarificação de biomassa por ação enzimática é heterogêneo, pois é necessário que ocorra em três etapas: adsorção da enzima sobre a superfície do substrato, hidrólise da ligação glicosídica e dessorção da superfície e retorno da enzima ao meio. A Figura 6 apresenta um resumo da ação catalítica das celulases na conversão do substrato.

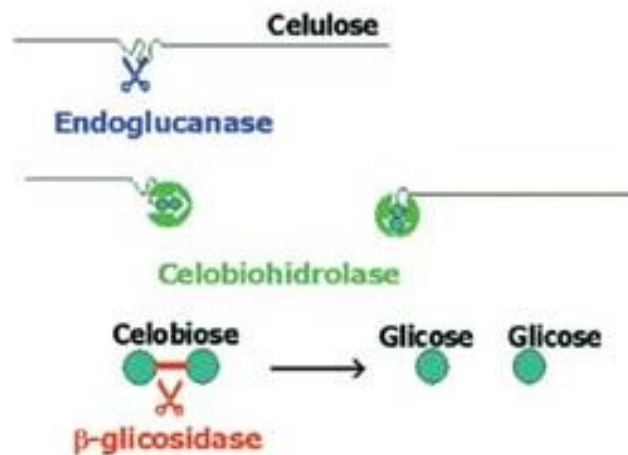


Figura 6 - Esquema de ação das celulases sobre o substrato celulose. Fonte: Ogeda e Petri (2010)

A hidrólise enzimática da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH em comparação à hidrólise química. Além disso, exibe elevada especificidade, o que elimina a ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados da lignina) às células microbianas que serão utilizadas na fermentação dos açúcares liberados (Fenila e Shastri, 2016).

O rendimento da hidrólise enzimática depende de muitos fatores, entre eles, o tipo e concentração de substrato, pré-tratamento aplicado à biomassa, área superficial para ação, termoestabilidade da enzima, carga de sólidos no meio reacional, tempo de reação, pH e agitação. Em geral, a diminuição na produtividade pode estar relacionada com inibição pelo produto, bem como pela adsorção que a lignina pode promover no biocatalisador (Fenila e Shastri, 2016).

Comparado ao emprego da hidrólise química, o uso de enzimas celulolíticas para a sacarificação da biomassa é vantajoso porque a reação é específica e não gera compostos tóxicos à fermentação. A hidrólise é conduzida em condições mais amenas de pH e temperatura (na faixa de 45-50°C e pH entre 4-5) e por isto uma menor quantidade de energia é requisitada

no processo (Falkoski *et al.*, 2012). Durante a hidrólise enzimática também se observa que os equipamentos utilizados no processo (tanques, tubulações) sofrem menos danos quando comparados ao uso de processos químicos que usam ácidos concentrados. O etanol produzido de um mosto obtido por hidrólise enzimática é de melhor qualidade, contendo menos agentes corrosivos (Martín *et al.*, 2017)

Até o momento, a comunidade científica ainda não chegou a uma conclusão sobre qual a proporção ideal das enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Além do complexo sinergismo entre as enzimas, essa indefinição também se deve a adequação do coquetel a uma determinada biomassa e ao tipo de pré-tratamento ao qual ela foi submetida. Como as biomassas têm distintas composições, a proporção de enzimas utilizadas para a sua hidrólise também deve ser diferente (Almeida *et al.*, 2013).

Muitos estudos recentes têm mostrado que, além das celulases, a presença de outras enzimas acessórias é muito importante para a formulação de um bom coquetel enzimático. Dentre estas enzimas, estão as hemicelulases, que podem atuar sobre a hemicelulose residual e contribuir para uma hidrólise mais eficiente da biomassa. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que as hemicelulases também podem atuar sinergisticamente com as celulases, aumentando a eficiência da hidrólise da biomassa. Contudo, a determinação de quais hemicelulases devem ser utilizadas na suplementação dos coquetéis é dependente da composição da biomassa (Xue *et al.*, 2017).

A eficiência da sacarificação enzimática também pode ser influenciada pela inibição das endoglucanases e exoglucanases pelos produtos finais de hidrólise, a celobiose e glicose. Este fato, entretanto, pode ser amenizado pela suplementação de β -glicosidase ao coquetel enzimático ou então promovendo as etapas de sacarificação e fermentação simultaneamente, processo conhecido como SSF. Nesse processo, a presença da levedura juntamente com o complexo enzimático celulolítico reduz o acúmulo de açúcares dentro do reator, evitando, então, a inibição das enzimas e, conseqüentemente, aumentando a taxa de sacarificação e o rendimento final (Ariaeenejad *et al.*, 2019) .

Embora apresentem inúmeras vantagens biotecnológicas e econômicas, a produção de celulases e sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos são tecnologias em fase de desenvolvimento, para as quais determinadas ferramentas de otimização podem ser aplicadas visando seu aumento de produtividade e economicidade (Anwar *et al.*, 2014).

2.5 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

Após a produção das enzimas, segue uma outra etapa destinada a recuperação dos produtos obtidos denominada de *downstream processing*. Esta etapa compreende as fases de separação e purificação do produto e as estratégias utilizadas dependem dos aspectos citológicos e fisiológicos do microrganismo, que determinam se o produto será excretado ou permanecerá no interior das células. Dependendo da localização do produto, técnicas diferentes são empregadas na recuperação dos produtos obtidos (Behera e Ray, 2016).

A técnica mais usada na etapa de purificação seletiva é a cromatografia de afinidade com proteína, que pode gerar, em alguns casos, um produto com mais de 98% de pureza. Apesar disso, esta técnica apresenta várias desvantagens como a possibilidade de contaminação devido ao desprendimento da proteína da matriz, o que é intolerável em aplicações clínicas; o custo muito alto das resinas, tampões e outros consumíveis, dificuldade de imobilização do ligante com orientação correta, suscetibilidade à degradação durante procedimentos de limpeza, baixa capacidade e lenta difusão intraparticular (Rosa *et al.*, 2010).

A precipitação é um dos métodos de purificação mais simples, no qual, sob condições amenas, a precipitação da proteína é reversível e a dissolução subsequente restaura a atividade total. Entretanto, é uma técnica de separação de baixa resolução devido à ausência de especificidade, além de apresentar, quando realizada em larga escala, desvantagens como o alto custo dos agentes precipitantes e o impacto ambiental causado pelo descarte dos seus resíduos (Martinez *et al.*, 2019).

As proteínas ou enzimas de interesse presentes no extrato fermentado bruto podem ser precipitadas pela adição de sal, solventes ou polímeros orgânicos ou pela variação do pH e temperatura da solução. A adição de sal em uma solução contendo proteínas promove a precipitação destas devido a uma redução na solubilidade, decorrente do efeito *salting-out* (hidrofóbico) ou da combinação de um efeito *salting-in* (eletrostático) com o efeito *salting-out* (Arakawa *et al.*, 2011). A propriedade de um sal particular ser utilizado como agente precipitante é descrito pela chamada série de Hofmeister, apresentada na Figura 7:

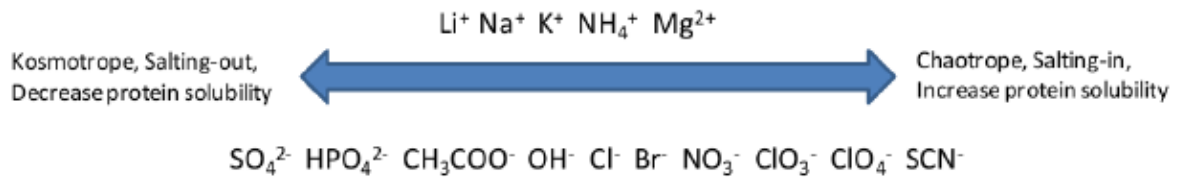


Figura 7 - Representação esquemática da série de Hofmeister. Fonte: Zhang (2012).

A cristalização é uma tecnologia barata e que realiza simultaneamente a concentração, a purificação e a estabilização do produto alvo, mas a sua implementação em um processo em larga escala para separação e purificação de enzimas é inviável devido à glicosilação, ao alto grau de flexibilidade segmental, da inerente complexidade do processo e das dificuldades em controlá-lo (Gottschalk, 2008).

A adsorção em membrana, apesar de estar crescendo como uma alternativa à tradicional cromatografia em coluna, apresenta algumas limitações que precisam ser superadas antes da implantação dessa técnica em um processo de larga escala. Entre esses problemas podem-se citar a distribuição distorcida do fluxo de injeção, a distribuição de tamanho não-idêntica dos poros da membrana, a desigualdade da espessura da membrana e a baixa capacidade de ligação (Lojewska *et al.*, 2016).

As colunas de separação magnética são feitas com partículas superparamagnéticas pequenas (sub-micron), obtidas de cristais magnéticos, revestidas com poliglutaraldeído. Essas partículas têm sido utilizadas para a purificação de enzimas, enquanto um novo adsorvente magnético tem sido usado para purificação de imunoglobulinas em um leito fluidizado magneticamente estabilizado. Certas bactérias também têm habilidade para produzir partículas magnéticas que podem ser fabricadas para dispor de proteína em suas superfícies, de forma a viabilizar economicamente a técnica caso a capacidade para enzima seja suficientemente alta (Yoshino e Matsunaga, 2006).

Em virtude de uma maior preocupação dos órgãos de regulamentação em minimizar o descarte de resíduos que são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, pesquisas acadêmicas e industriais têm voltado seus esforços ao estudo de técnicas de purificação mais seguras, entre elas, a utilização de sistemas bifásicos aquosos. A partição de proteínas utilizando este método representa uma alternativa promissora às tradicionais extrações líquido-líquido, por se basear nos princípios de química verde (Okereke *et al.*, 2017).

2.6 SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS (SAB)

O Sistema Aquoso Bifásico (SAB) é formado pela mistura de duas fases aquosas imiscíveis, acima da concentração crítica, e é empregado em processos de extração líquido-líquido. No campo da biotecnologia, tem sido apresentado com uma alternativa interessante frente aos métodos tradicionais de purificação de proteínas, como a precipitação, ultrafiltração e cromatografia, os quais, geralmente, fornecem dificuldade em *scale-up* e elevados custos durante o processo de *downtream* (Soares *et al.*, 2017).

Os SABs tem sido bastante empregados na recuperação e purificação de biomoléculas de diversas fontes, como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, bio-nanopartículas, organelas celulares, entre outros, em virtude do alto conteúdo de água presente nesse sistema (70-80% em ambas as fases). Isto garante um ambiente ameno para a atividade biológicas da molécula alvo, evitando degradação e permitindo uma eficiente separação (Baskaran *et al.*, 2018).

Segundo Barros *et al.* (2016), a maioria dos SABs aplicados na recuperação de enzimas são formados por dois polímeros de cadeia flexível, como os sistemas formados por PEG (polietileno glicol) e dextrana ou são formados por um polímero e um sal inorgânico, que pode ser o sulfato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de amônio, entre outros. Entretanto, os sistemas polímeros/sal demonstram-se mais vantajosos por apresentarem baixo custo e uma elevada diferença de densidade entre as fases.

A Tabela 4 apresenta algumas aplicações de sistemas aquosos bifásicos reportados na literatura.

Tabela 4 - Sistemas Aquosos Bifásicos e suas aplicações na purificação de biomoléculas.

Biomolécula	SAB	Autores	Recuperação (%)
Albumina	PEG/K ₂ HPO ₄	Ng et al. (2018)	70
Lipase	PEG/K ₂ HPO ₄	Carvalho et al. (2017)	92
Celulase	PEG/Citrato	Ho et al. (2017)	88,88
Ectoína	PPG/Citrato	Wan et al. (2018)	94,70
Ficocianina	Líquido Iônico/ K ₂ HPO ₄	Zhang et al. (2015)	90,23

O sistema polímero-polímero mais comum é composto de dextrana e PEG. No entanto, o custo elevado da dextrana inviabiliza a sua utilização em larga escala, fazendo com que os sistemas PEG/sais sejam mais atrativos devido ao baixo custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade (Johansson *et al.*, 2008).

Apesar dos sistemas formados por polímero/sal inorgânico serem muito aplicados por seu baixo custo, os mesmos geram correntes efluentes com altas concentrações de fosfato, o qual é conhecido por causar fortes impactos ambientais. Este problema tem sido evitado através da substituição por sais orgânicos, como os citratos, que apesar de serem biodegradáveis, ainda estão limitados a poucos estudos (Ho *et al.*, 2017).

Há ainda sistemas bifásicos alternativos, como os do tipo álcool-sal, que apresentam algumas vantagens sobre os convencionais, tais como: elevada polaridade, baixa viscosidade e fácil recuperação do álcool por evaporação. Além disso, a técnica é barata e, dependendo do solvente utilizado, a toxicidade para o ambiente é baixa. Porém, tais sistemas podem ser agressivos para enzimas que não toleram a presença de solventes. Recentemente, SABs formados por líquidos iônicos e sais tem se mostrado eficientes na recuperação de várias biomoléculas (Amid *et al.*, 2012).

O PEG, Figura 8, é um poliéter neutro, solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos e que pode ser produzido com diferentes massas molares. É uma substância de grande interesse para a comunidade biotécnica e médica, uma vez que é biodegradável, não tóxico, não desnatura proteínas ou células ativas e pode ser facilmente modificado quimicamente, o que permite a sua anexação a outras moléculas e superfícies. Além disso, tem a capacidade de, quando em ambiente aquoso, excluir outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles e formando SABs do tipo polímero-polímero, como o sistema PEG-Dextrana (Ng *et al.*, 2018).

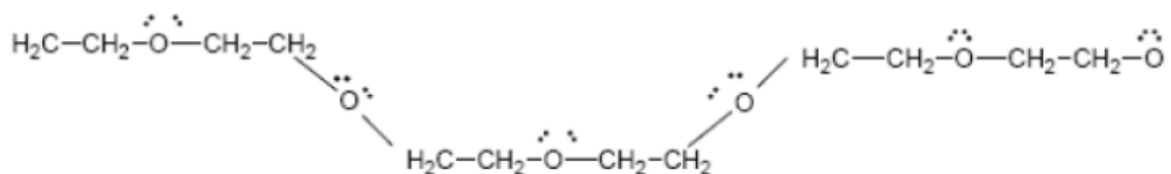


Figura 8- Representação planar parcial da molécula de PEG. Fonte: Nascimento (2017).

O citrato de sódio é um sal tribásico, que por ser a base conjugada do ácido cítrico, pode formar um agente tamponador que resiste a mudanças no pH. Muito utilizado na indústria alimentícia como aditivo ou conservante, o citrato começou a ser estudado como substituinte de sais de fosfato para a formação de SABs devido a sua não-toxicidade e biodegradabilidade, de forma que o descarte desses resíduos não ocasionasse problemas ambientais (Ribeiro *et al.*, 2015).

A partição de biomoléculas em SABs apresenta muitas vantagens, pois trata-se de uma técnica de separação seletiva simples, rápida e de fácil ampliação. Além disso, por não conter compostos orgânicos voláteis e por apresentar mais de 70% de água, garante um ambiente ameno para as biomoléculas. Rendimentos superiores a 90% podem ser obtidos em apenas um passo de extração e quando um passo não é suficiente, é possível a realização de repetidas extrações que podem ser conduzidas em unidades de separação em cadeia ou cascata (Sankaran *et al.*, 2019).

A utilização dos SABs é adequada para recuperação primária, pois misturas complexas, como caldo de fermentação contendo materiais particulados, podem ser diretamente carregadas sem centrifugação ou filtração prévia, o que resulta na integração em uma única operação unitária das etapas de clarificação, concentração e purificação parcial da biomolécula alvo (Wu *et al.*, 2017).

A extração em SABs inicia-se pela preparação do sistema e adição da mistura a ser separada. Após homogeneização, a separação das fases é realizada por sedimentação ou por centrifugação. As fases são coletadas e utilizadas para recuperar os produtos de interesse separados da mistura inicial (Carvalho *et al.*, 2017).

Quando um extrato fermentado bruto é adicionado a um SAB, ocorre a distribuição das biomoléculas e fragmentos de proteínas entre as fases. Sob condições operacionais adequadas, a proteína alvo será concentrada em uma das fases e os fragmentos não desejados (contaminantes) migrarão para a outra fase (Bispo, 2015). A Figura 9 apresenta o esquema de partição de proteína.

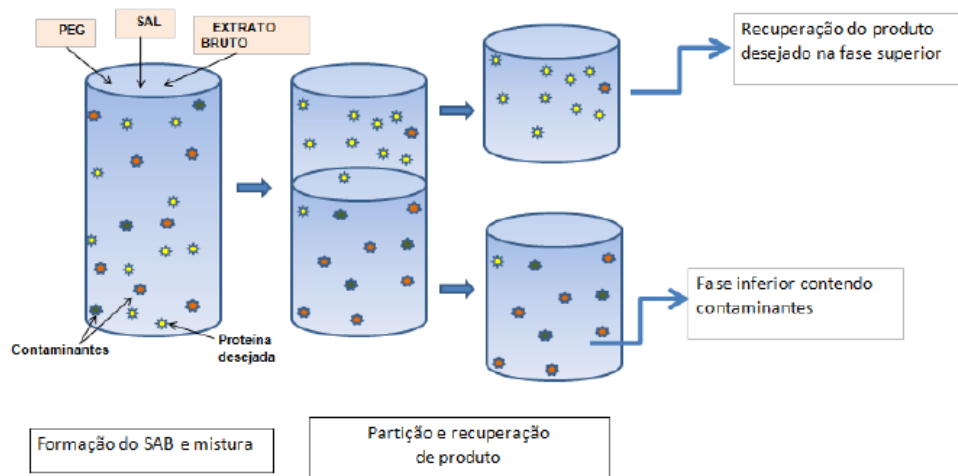


Figura 9 - Esquema de partição de proteína em sistema bifásico aquoso. Fonte: Bispo (2015)

Comumente, quando se deseja extrair proteínas presentes em uma mistura multicomponente, como um caldo fermentado ou extrato celular, é necessário rastrear uma variedade de SAB a fim de selecionar aquele que forneça condições de recuperação e purificação necessárias da molécula alvo. Da mesma forma, para projetar condições de análise de uma dada proteína, é necessário buscar diferentes SABs para estabelecer quais fornecem condições para uma diferenciação confiável entre a proteína alvo e suas variantes (Wu *et al.*, 2017).

2.6.1 Diagrama de Equilíbrio de Fases

O comportamento segregativo ou associativo entre componentes que formam os sistemas aquosos bifásicos é, geralmente, representado em diagramas de fases ortogonais, como na Figura 10. Segundo Bispo (2015), esses diagramas são usados como ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração e são de fundamental importância na purificação de biomolécula.

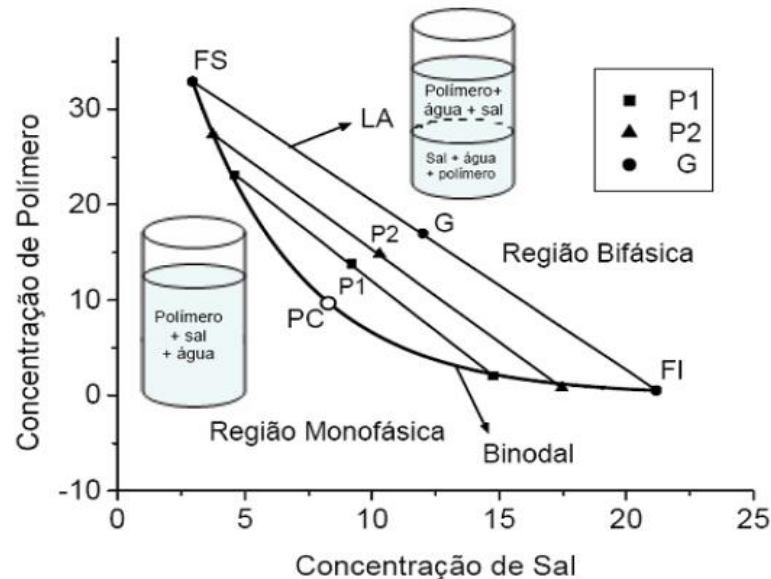


Figura 10 - Diagramas de fase para um sistema bifásico aquoso hipotético. Fonte: Bispo (2015)

A curva que divide a região de concentração dos componentes é denominada de curva binodal ou curva de equilíbrio. Os sistemas cuja composição fica abaixo da binodal formam uma única fase (região monofásica), enquanto os que ficam acima desta formam duas fases (região bifásica). As linhas que caem sobre a binodal são chamadas *tie-lines* ou linha de

amarração, as quais são retas que ligam pontos no diagrama que representa a composição das duas fases em equilíbrio (Iqbal *et al.*, 2016).

Qualquer ponto sobre uma mesma *tie-line* fornecerá fases superiores e inferiores com a mesma composição final, embora com diferentes relações de volumes entre as fases. Outra particularidade mostrada neste diagrama é o ponto crítico (Pc), no qual as propriedades físicas e químicas das duas fases são teoricamente iguais (Iqbal *et al.*, 2016).

Nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas podem provocar mudanças drásticas, como levar o sistema de uma para duas fases e vice-versa. Este ponto pode ser obtido pela intersecção de uma linha que passa pelo ponto médio de várias linhas de amarração, com a binodal (Sodré, 2007).

Para se estudar a separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases denominada comprimento da linha de amarração (CLA). Este é um importante parâmetro termodinâmico utilizado como variável determinante dos processos de partição dos solutos em SABs formados por diferentes componentes. CLA é a raiz quadrada da soma do quadrado da diferença das concentrações dos componentes formadores do sistema, exceto água, nas fases superior e inferior. Sendo assim, é o tamanho da linha que liga os pontos de diagrama que representa a composição das duas fases em equilíbrio termodinâmico (Santos *et al.*, 2018).

Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração (ILA). Ela é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade termofísica, como a temperatura e a massa molar dos constituintes. A ILA corresponde ao coeficiente angular formado pela linha de amarração no diagrama de fase (Santos *et al.*, 2018).

2.6.2 Partição de Proteínas nos SABs e Fatores Influenciadores

Quando os compostos são adicionados aos SAB's, estes distribuem-se seletivamente entre as duas fases, sendo este processo caracterizado pelo coeficiente de partição (K). O coeficiente de partição é definido pela relação entre a concentração da biomolécula na fase superior e inferior, sendo obtido pela Equação 1 (Cardozo *et al.*, 2014).

$$K = \frac{C_{sup}}{C_{inf}} \quad (1)$$

em que C_{sup} e C_{inf} são as concentrações de equilíbrio do soluto na fase superior e inferior, respectivamente.

Para que uma purificação parcial significativa seja alcançada, a biomolécula de interesse deve ser preferencialmente particionada para uma das fases, enquanto que as outras substâncias interferentes do processo de extração devem migrar para a outra fase do sistema. A distribuição desigual da biopartícula entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies (polímeros, água e/ou sais), as quais estão presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (Nagaraja e Iyyaswami, 2015).

Em geral, ambas as fases são compostas em sua maioria por água, o que explica o porquê das biomoléculas não serem facilmente desnaturadas, constituindo, por conseguinte, uma vantagem importante quando o objetivo é extrair proteínas e/ou enzimas. A separação dessas fases certamente dependerá do tipo de sal e de sua concentração, do tamanho da biomolécula a ser recuperada, propriedades de superfície, massa molecular, temperatura, pH, carga líquida, entre outros, tendo como ponto de partida o estudo dos diagramas de fases (Raja *et al.*, 2011a).

De acordo com (Regupathi *et al.*, 2009), a temperatura tem um complexo efeito na partição, pois níveis mais baixos desta variável resultam em polímeros com maiores viscosidades, o que aumenta a diferença entre as fases, direcionando a biomolécula preferencialmente para uma delas. Entretanto, ainda não há um efeito claro da temperatura no processo, demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição de biomoléculas.

Outra propriedade físico-química que influencia marcadamente a partição de uma proteína é o pH, uma vez que sua carga global muda com a acidez da solução. As biomoléculas, em geral, contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes valores de pKa, resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Esta densidade de carga elétrica na superfície da proteína pode modificar com processos de associação ou dissociação entre as macromoléculas presentes no sistema. Variações no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação (Silva e Loh, 2006).

Em geral, o aumento da massa molar e na concentração de um polímero diminui a tendência de partição da proteína para a fase rica nesse polímero. Tal fenômeno ocorre porque, com o aumento na massa molar do polímero, também aumenta o comprimento da cadeia do polímero e o efeito de exclusão, que levam a redução no volume livre. Dessa forma, a partição das biomoléculas para a fase superior é dificultada, pois o polímero adquire uma conformação mais compacta, com ligações intramoleculares hidrofóbicas (Ratanapongleka, 2010).

Em relação à concentração do polímero, seu aumento também aumenta as diferenças de densidade, índice de refração e viscosidade entre as fases, modificando o valor do coeficiente de partição. A viscosidade é uma característica importante, pois é função da concentração e da massa molar do polímero, podendo impactar diretamente no processo de partição. Quanto à fase rica em sal, o aumento da concentração favorecerá o efeito denominado salting-out, ou efeito salino, que força a biomolécula a mover-se para a fase superior, rica em polímero (Goja *et al.*, 2013).

A avaliação do desempenho da purificação de proteínas é baseada em dois parâmetros: a recuperação e o fator de purificação da proteína. Esses valores são obtidos em relação à solução inicial, relacionando-se a concentração do material purificado com a concentração do material inicial, ou quaisquer etapas dentro do bioprocessamento, tendo sempre uma etapa anterior como referência (Ho *et al.*, 2017).

A recuperação da atividade (RA) é uma relação entre a atividade total no material purificado e a atividade total presente no material bruto (em porcentagem), dada pela Equação 2. O fator de purificação (FP) é um parâmetro que permite comparar a atividade enzimática específica total no material purificado com a atividade enzimática específica total no material bruto, dado pela Equação 3 (Biazus *et al.*, 2010).

$$RA = \frac{\textit{Atividade enzimática recuperada}}{\textit{Atividade enzimática inicial}} \quad (2)$$

$$FP = \frac{\textit{Atividade enzimática específica recuperada}}{\textit{Atividade enzimática específica inicial}} \quad (3)$$

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES (BINODAIS)

Para o levantamento dos diagramas de fase, foram utilizados PEG's 4000, 6000 e 8000 g/mol, citrato de sódio dihidratado e ácido cítrico monohidratado. Tanto os polímeros quanto os sais foram usados sem purificação prévia.

As soluções aquosas de PEG foram preparadas na concentração de 50% m/m, enquanto as soluções de citrato foram a 40% m/m com pH, 6,0. Para atingir esse pH, foi adicionando-se quantidades apropriadas da solução de ácido cítrico 40% m/m na solução de citrato de sódio. Utilizou-se um pHmetro digital para auxiliar no ajuste do pH das soluções tampão.

As curvas binodais foram construídas através de uma titulação turbidimétrica, mais conhecida como método *cloud-point*, descrito por Freire e Pereira (2016). Nesta metodologia, a solução de tampão citrato foi gotejada com o auxílio de uma micropipeta em uma massa conhecida (1 g) da solução de PEG, sob agitação em um vortex, até que o sistema se tornasse turvo. A turbidez indicava que o sistema havia atingido a região bifásica. Deve-se mencionar que inicialmente o sistema era límpido. A massa da solução tampão foi obtida por gravimetria, utilizando-se uma balança eletrônica com precisão de 0,001 g. Depois disso, uma massa de água foi adicionada ao sistema até que se tornasse transparente novamente. Esse procedimento foi repetido contínuas vezes até a obtenção de pontos suficientes para a formação da curva binodal de cada sistema. A composição global, em cada ponto, foi determinada pela equação a seguir.

$$w_m = w_{cit} + w_{PEG} + w_{água} \quad (4)$$

em que w representa a fração mássica de cada componente e w_m a fração mássica total da mistura.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO

Inicialmente, a Equação (5), proposta por Merchuk *et al.* (1998), foi ajustada aos dados experimentais que compõem a binodal.

$$w_{PEG} = A \exp[(Bw_{Cit}^{0,5}) - (Cw_{Cit}^3)] \quad (5)$$

em que, w_{PEG} e w_{Cit} , são as frações mássicas dos componentes do sistemas e A, B, C são parâmetros de Merchuk.

As linhas de amarração (LA) foram obtidas utilizando um método gravimétrico simples, o qual consiste em selecionar um ponto genérico da região bifásica através do qual a LA vai

passar, chamado de ponto global. Foram utilizados três pontos globais para cada sistema PEG-Citrato, com composição em sal-polímero (% m/m) de (10-20; 15-15; 17.5-17.5).

As misturas ternárias de PEG + citrato + água, com massa total de 10 gramas, foram preparadas pesando-se as quantidades apropriadas das soluções de PEG e tampão citrato, conforme pontos globais escolhidos. A homogeneização destas foi feita utilizando-se um agitador vortex durante 30 segundos, de forma a permitir a mistura de ambas as fases. As misturas foram deixadas em repouso por 24 horas, de forma a garantir a completa separação das fases.

Após ser atingido o equilíbrio e as duas fases límpidas serem observadas, alíquotas de cada fase resultante foram coletadas com o auxílio de uma micropipeta. Primeiramente, coletou-se a fase superior até que restasse uma camada de aproximadamente 5 mm acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada. Em seguida, a fase inferior foi cuidadosamente removida e ambas foram pesadas. Para a determinação das composições em cada fase, foram resolvidas as seguintes equações simultaneamente, as quais formam um sistema não linear com quatro variáveis e quatro equações.

$$w_{PEG}^{Top} = A \exp \left[\left(B w_{Cit}^{Top^{0.5}} \right) - \left(C w_{Cit}^{Top^3} \right) \right] \quad (6)$$

$$w_{PEG}^{Bot} = A \exp \left[\left(B w_{Cit}^{Bot^{0.5}} \right) - \left(C w_{Cit}^{Bot^3} \right) \right] \quad (7)$$

$$w_{PEG}^{Top} = \frac{w_{PEG}^M}{\alpha} - \frac{1 - \alpha}{\alpha} w_{PEG}^{Bot} \quad (8)$$

$$w_{Cit}^{Top} = \frac{w_{Cit}^M}{\alpha} - \frac{1 - \alpha}{\alpha} w_{Cit}^{Bot} \quad (9)$$

A designação Top, Bot e M indicam, respectivamente, a fase superior, inferior e ponto global selecionado, enquanto α representa a razão entre a massa da fase superior pela massa total da mistura.

Para determinação dos coeficientes angulares e do comprimento das linhas de amarração serão utilizadas as seguintes equações, respectivamente:

$$\delta = \frac{w_{PEG}^{Top} - w_{PEG}^{Bot}}{w_{Cit}^{Bot} - w_{Cit}^{Top}} \quad (10)$$

$$TLL = \sqrt{\Delta w_{Cit}^2 + \Delta w_{PEG}^2} \quad (11)$$

A determinação dessas *tie-lines* teve como objetivo principal o cálculo dos coeficientes angulares gerais para binodal, pois as linhas de amarração tendem a ser paralelas. Através deles

e, selecionando um par ordenado que caia sobre a binodal, pode-se obter a equação da reta e comprimento (Equação 8) de qualquer *tie-line* presente nos diagramas de fases.

3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos de purificação serão realizados seguindo um planejamento fatorial 3^3 , sendo o comprimento de *tie-line* (TLL), a razão de volume das fases (volume da fase superior pela inferior, V_r) e massa molar do polímero (MM_{PEG}) escolhidos como variáveis independentes. Com os dados de equilíbrio líquido-líquido dos sistemas PEG (4000, 6000, 8000)/Citrato a $27^\circ C$, pH 6 e dos coeficientes angulares gerais, utilizou-se o pacote LLSR (Coelho, 2018) do software R para a determinação dos níveis experimentais presentes na Tabela 5.

A razão de volume entre as fases foi escolhida como variável de estudo neste projeto para analisar como o volume efetivo livre das moléculas influencia na partição das enzimas na fase salina e na fase polimérica.

Tabela 5 - Matriz de planejamento fatorial 3^3 usada no estudo da purificação da celulase

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
TLL	18,10	25,20	32,29
V_r	0,25	0,50	0,75
MM_{PEG} (g/mol)	4000	6000	8000

Os comprimentos foram selecionados de forma a introduzir os conceitos de *tie-line* mínima e máxima, ou seja, as menores e maiores linhas de amarração em comum nos diagramas de fase levantados nesta dissertação. Através delas, é possível analisar como o aumento da concentração de sal e de polímero influencia na partição das celulasas entre as fases.

3.4 OBTENÇÃO DO MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosos *Aspergillus niger*, isolado a partir de uma cultura já preexistente no laboratório. No primeiro repique, a cultura foi semeada em meio ágar *Sabouroud* presente em tubos inclinados e em placas de Petri, os quais foram incubados a $30^\circ C$ por cinco dias, para proporcionar o crescimento de colônias fúngicas. Depois deste período, os esporos obtidos foram armazenados a $4^\circ C$, para a sua preservação. A partir dos tubos, foi realizado um segundo repique, com o mesmo meio de cultivo do anterior, onde

os fungos foram inoculados em frascos Erlenmeyers, para obter uma maior área de desenvolvimento da cultura e, com isso, uma maior esporulação.

3.5 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, 50 mL da solução estéril de *Tween* 80 a 0,01% (v/v) (Reinehr *et al.*, 2014) foram adicionados aos frascos Erlenmeyers, com os microrganismos no meio *Sabouroud*, para desprender os esporos a partir de raspagem com uma alça. Posteriormente, a suspensão de esporos foi filtrada em gaze e transferida para outro frasco esterilizado e armazenada a 4° C.

3.5.1 Contagem de Esporos

A contagem dos esporos foi realizada em câmara de *Neubauer*, com o auxílio de um microscópio, segundo metodologia descrita por Alves (2012). A câmara é constituída por cinco quadrantes (um central e quatro periféricos), onde cada um é composto por 16 quadrados com área igual a 0,0025 mm² e profundidade a 0,1 mm. O volume de inóculo requerido para uma dada concentração de esporos desejada é calculada a através da Equação 12 (Barros *et al.*, 2014).

$$V_{inóculo} = \frac{C_{desejada} \times M_{substrato}}{C_{calculada}} \quad (12)$$

em que, $V_{inóculo}$ é o volume de inóculo a ser adicionado (mL), $M_{substrato}$ é a massa de substrato usada na fermentação (g), $C_{desejada}$ é a concentração final de esporos na fermentação (esporos/g); $C_{calculada}$ é a concentração de esporos na suspensão (esporos/mL).

3.6 PROCESSO FERMENTATIVO

Os materiais lignocelulósicos empregados na fermentação em estado sólido foram resíduos de folhas, coletados na região adjacente ao LABAM, de plantas da espécie *Ficus benjamina*. Estes substratos foram moídos, (para a obtenção de um pó homogêneo) e classificados utilizando peneira *Tyler* 20. Em seguida, os resíduos foram armazenados em recipiente hermeticamente fechado.

As fermentações em estado sólido foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 7 g de substrato e volume de solução nutriente para atingir 30% de umidade no meio. Os biorreatores foram esterilizados em autoclave a 1 atm durante 15 min e, após o resfriamento, o meio foi inoculado com uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* suficiente para 10⁷ esporos/grama de substrato e incubado a 40° C por um período de 72 horas. As condições de

realização da fermentação empregadas neste trabalho foram obtidas atrás de um estudo de otimização feito por Cavalcante *et al.* (2018).

A solução nutriente utilizada foi preparada baseando-se nos trabalhos de Boggione *et al.* (2016), Cunha *et al.* (2012) e Narra *et al.* (2012), analisando os reagentes mais empregados e com disponibilidade no laboratório. A solução final foi composta por: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/L; KH_2PO_4 , 3 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L; CaCl_2 , 0,5 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0016 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0014 g/L.

3.7 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Ao final da fermentação, as enzimas celulolíticas foram extraídas a partir da biomassa fermentada. Em cada frasco Erlenmeyer, foi adicionado tampão citrato 50 mM e pH 4,8, na proporção de 1:10 (m/v), e misturados em um agitador rotativo a 120 rpm e 30° C durante 1 h. O extrato enzimático obtido foi filtrado a vácuo e centrifugado a 3.000 rpm durante 15 min, sendo o sobrenadante a fonte de enzima extracelular para a determinação da atividade enzimática, proteína total e para o preparo dos sistemas bifásicos aquosos no processo de purificação.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os sobrenadantes do caldo enzimático foram analisados para a quantificação das atividades da carboximetilcelulase (CMCase) e da atividade da celulase total (FPase), segundo metodologia sugerida por Ghose (1987). Uma unidade de atividade enzimática (U) (FPase e CMCase) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um μmol de açúcares redutores por minuto, como a glicose, sob as condições de análise. Para a quantificação desses açúcares, uma curva padrão com os valores das concentrações de glicose versus a absorbância foi elaborada.

O método de determinação da atividade enzimática FPase baseia-se na liberação de açúcares redutores utilizando o DNS, sendo o substrato o papel filtro qualitativo Whatman nº 1. Já a determinação da CMCase consiste na liberação de glicose do substrato carboximetilcelulose também empregando o método DNS descrito pelo autor.

3.8.1 Atividade da CMCase

A atividade da CMCase foi analisada usando como substrato uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 2% (m/v). Neste ensaio, uma amostra de 0,5 mL do caldo

enzimático foi adicionada em tubos de ensaio de 25 mL. A solução enzimática foi aquecida em banho termostático durante 5 min a 50° C. Posteriormente, 0,5 mL de substrato foi adicionado aos tubos. As amostras foram incubadas a 50° C por 30 min. Após este período, 3 mL do reagente DNS foram adicionados para cessar a reação. A mistura foi colocada em água fervente por 5 min, em seguida, foi resfriada e diluída com a adição de 20 mL de água destilada.

A absorbância da reação foi aferida, no espectrofotômetro, em comprimento de onda 540 nm. O branco do espectrofotômetro (absorbância zero) foi composto por 0,5 mL da solução de substrato e 0,5 mL do tampão citrato. Com base na quantidade de glicose liberada pela reação, obtida através da curva padrão de glicose, e na definição de unidade enzimática, calculou-se a atividade enzimática em U/mL.

3.8.2 Atividade da FPase

A atividade em FPase foi determinada usando como substrato uma tira de papel filtro qualitativo Whatman nº 1 (1 por 6 cm, com 50 mg aproximadamente). Em tubos de ensaio de 25 mL foram adicionados 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e o substrato. Esta mistura reagiu por 5 min a 50° C. Em seguida, 0,5 mL do caldo enzimático foi adicionado aos tubos e os mesmos foram incubados em banho termostático a 50° C, durante 60 min. Após este período, foram adicionados 3 mL de reagente DNS para interromper a reação. A mistura foi colocada em água fervente por 5 min, sendo posteriormente resfriada em banho de gelo e, então, diluída com a adição de 20 mL de água destilada.

A cor formada após o término do processo foi analisada em um espectrofotômetro a 540 nm. No caso do zero do espectrofotômetro, a enzima não foi utilizada, apenas 1,5 mL do tampão. Com base na quantidade de glicose liberada pela reação, obtida através da curva padrão de glicose, e na definição de unidade enzimática, calculou-se a atividade enzimática em U/mL.

3.8.3 Curva Padrão de glicose

A construção da curva padrão baseou-se no procedimento proposto por Adney e Baker (1996), o qual parte de duas soluções estoque de glicose anidra: 2 mg/mL (CMCase) e 10 mg/mL (FPase).

Para o padrão da FPase, foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL das diluições de glicose com 1 mL do tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8), os quais foram incubados a 50° C durante 60 min. Nos tubos de ensaio para a curva de calibração da CMCase, foram

adicionados 0,5 mL das diluições de glicose com 0,5 mL da solução de CMC (carboximetilcelulose) 2% e, em seguida, foram incubados por 30 min a 50° C.

A reação foi interrompida, após o período de incubação, com o acréscimo de 3 mL da solução DNS. Os tubos foram colocados em água fervente por 5 min e, depois do aquecimento, foram colocados em banho de gelo e deixados em repouso por alguns instantes. Por fim, foram acrescentados 20 mL de água destilada, homogeneizou-se e a cor formada foi analisada em espectrofotômetro a 540 nm, o qual deve ser zerado com uma amostra sem glicose. As diluições para a FPase são apresentadas na Tabela 6 e, para a CMCase, na Tabela 7.

Tabela 6 - Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da FPase

Diluição	Solução Estoque (mL)	Tampão citrato (mL)	Concentração (mg/mL)
1:1,5	1,0	0,5	6,67
1:2	1,0	1,0	5,00
1:3	1,0	2,0	3,30
1:5	1,0	4,0	2,00
1:7	1,0	6,0	1,42
1:9	1,0	8,0	1,12

Fonte: Adaptado de Ghose (1987)

Tabela 7 - Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da CMCase.

Diluição	Solução Estoque (mL)	Tampão citrato (mL)	Concentração (mg/mL)
1:1	1,0	0,0	2,00
1:1,5	1,0	0,5	1,33
1:2	1,0	1,0	1,00
1:4	1,0	3,0	0,50
1:6	1,0	5,0	0,33

Fonte: Adaptado de Ghose (1987)

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas no extrato enzimático e no processo de purificação foi determinada pelo método de Bradford (1976). A solução corante, utilizada na determinação analítica, é preparada com azul brilhante de *Coomassie* G-250 em etanol, ácido fosfórico 85% e água destilada, em proporções adequadas. Para a quantificação, foi construída uma curva padrão utilizando soluções de albumina bovina, com concentrações na faixa de 0,02 g/L a 0,10 g/L.

Para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 100mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250* em 50 mL de etanol 95°GL. Em seguida adicionou-se 100mL de ácido fosfórico. A solução resultante foi diluída para um litro com água deionizada. A solução ficou sob agitação magnética por quatro horas, ao abrigo da luz, sendo em seguida filtrada em papel qualitativo e transferida para um vidro âmbar coberto com papel alumínio. O reagente foi guardado em geladeira (8 °C).

Para a dosagem de proteínas, em tubos de ensaio, foram adicionados 0,1 mL do extrato enzimático e 1 mL da solução corante. Após 10 min de reação, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 590 nm. O zero do espectrofotômetro foi composto por 0,1 mL de água destilada e 1 mL do corante.

3.10 PREPARO DOS SABS E PURIFICAÇÃO DAS CELULASES

Os sistemas foram preparados utilizando concentrações globais de PEG, tampão citrato e água correspondentes aos níveis do planejamento experimental, valores apresentados na Tabela 14 do Anexo 1. Cada experimento continha 10 g de massa total, sendo 15% (esse valor estava incluso na porcentagem total de água dos sistemas) correspondente ao extrato enzimático a ser purificado. Os experimentos ficaram 24 horas de repouso (Ho *et al.*, 2017), para que o equilíbrio termodinâmico fosse atingido e, em seguida, as fases coletadas e analisadas quanto ao teor de proteínas e atividade enzimática (CMCase e FPase).

3.11 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

A eficiência do processo de purificação foi avaliada pela determinação dos coeficientes de partição da enzima (K_E), coeficiente de partição de proteínas (K_P) rendimento de atividade enzimática na fase rica em sal (Y^b) e na fase rica em polímero (Y^l) e fator de purificação (PF), escolhidos como variáveis de resposta neste estudo. Essas variáveis foram calculadas com as seguintes equações (Prodanović e Antov, 2008), respectivamente.

$$K_E = \frac{A_{Top}/C_{Top}}{A_{Bot}/C_{Bot}} \quad (13)$$

$$K_P = \frac{C_{Top}}{C_{Bot}} \quad (14)$$

em que A_{Top} , A_{Bot} são as atividades, em U/mL, das fases superior e inferior enquanto C_{Top} e C_{Bot} as concentrações de proteínas, em mg/mL, das respectivas fases.

$$Y^b(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_t}{V_b} * K_E\right)} \quad (15)$$

$$Y^t(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_t}{V_b} * \frac{1}{K_E} \right)} \quad (16)$$

em que V_t e V_b são os volumes, em mL, da fase superior e inferior, respectivamente.

$$PF = \frac{A_f/C_f}{A_e/C_e} \quad (17)$$

em que A_f e A_e representa a atividade enzimática numa dada fase (superior ou inferior) e no extrato, em U/mL respectivamente, e C_f e C_e a concentração de proteína na respectiva fase e no extrato, em mg/mL, respectivamente. ,

É importante ressaltar que as variáveis de respostas serão estabelecidas para ambas celulases estudadas nesta dissertação, CMCase e FPase, a fim de se determinar as melhores condições de purificação para as enzimas do complexo celulolítico.

3.12 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O extrato enzimático e o produto da purificação dos sistemas bifásicos (condição ótima dada pelo planejamento experimental) foram aplicados na hidrólise da biomassa. O material lignocelulósico escolhido foram os próprios resíduos de folha utilizados na fermentação, em virtude da disponibilidade.

Inicialmente, as amostras foram pré-tratadas segundo a metodologia empregada por Sukumaran *et al.* (2009). Cerca de 10g de resíduos foram imersos em NaOH 0,1mol/L e deixados por 1 hora em autoclave, a 120°C. Após esfriamento à temperatura ambiente, a amostra foi lavadas várias vezes em água destilada para neutralizar o pH (monitorado por meio de pHmetro), seguido por uma lavagem final. Em seguida, as amostras foram secas em estufas e guardadas em geladeira para posterior utilização.

A sacarificação enzimática da biomassa foi realizada por meio da incubação da biomassa pré-tratada seca em extrato enzimático bruto ou num preparado proveniente da operação dos SABs, conforme a metodologia empregada pelo mesmo autor, com modificações. A proporção empregada na operação, em balão de 250 mL de capacidade, foi de 1 grama de biomassa para 50 mL do extrato enzimático. Os frascos foram tampados e permaneceram sob agitação em Shaker 150 rpm por 13 horas.

Medições de concentração de açúcares redutores foram realizadas durante o período da hidrólise, em tempos regulares, para verificar se ocorreu produção de glicose, o que comprovaria a hidrólise do material lignocelulósico. A produtividade, em termos de glicose, foi

calculada dividindo-se a quantidade de glicose produzida pelo tempo que o processo levou para produzi-la (Baracho *et al.*, 2009), de acordo com a Equação 18.

$$P = \frac{AR_t - AR_i}{t} \quad (18)$$

em que P é a produtividade (g/L.h), AR_t a quantidade de açúcares redutores presente no tempo t, AR_i a quantidade presente no tempo inicial e t o tempo de processo em hora.

A determinação dos açúcares redutores foi feita com base no método fenol sulfúrico proposto por Dubois *et al.* (1956), o qual resume-se à desidratação dos açúcares em meio ácido concentrado e posterior formação de complexo dos mesmos com fenol. Neste procedimento, uma amostra do sobrenadante do meio reacional era retirada e diluída 200 vezes. Em seguida, 2 ml desse meio diluído era transferido para um tubo de 10 mL, onde eram adicionados 50 μ L de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após o resfriamento do meio, a cor era analisada em espectrofotômetro a 490 nm e comparada a um referencial, ou seja, uma curva padrão de glicose, a fim de apresentar o valor de absorbância da solução linearmente proporcional à concentração de açúcares totais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos deste trabalho foram todos realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM) da Universidade Federal de Sergipe, sendo os resultados divididos em três partes:

- A primeira refere-se ao levantamento de dados de equilíbrio líquido-líquido dos sistemas PEG/Citrato, com o objetivo da obtenção dos níveis do planejamento experimental;
- A segunda refere-se à otimização da purificação da celulase nos sistemas bifásicos aquosos PEG/Citrato, através do estudo da influência da razão de volume entre fases, da massa molar do polímero e do comprimento de *tie-line* na partição da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase);
- A terceira discorre sobre a análise da utilização do extrato enzimático bruto e da enzima purificada na hidrólise da biomassa lignocelulósica (resíduos de folhas pré-tratados).

4.1 EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS SISTEMAS PEG/CITRATO

Os diagramas de fase para cada sistema PEG/Citrato, elaborados segundo método *cloud point*, estão representados na Figura 11.

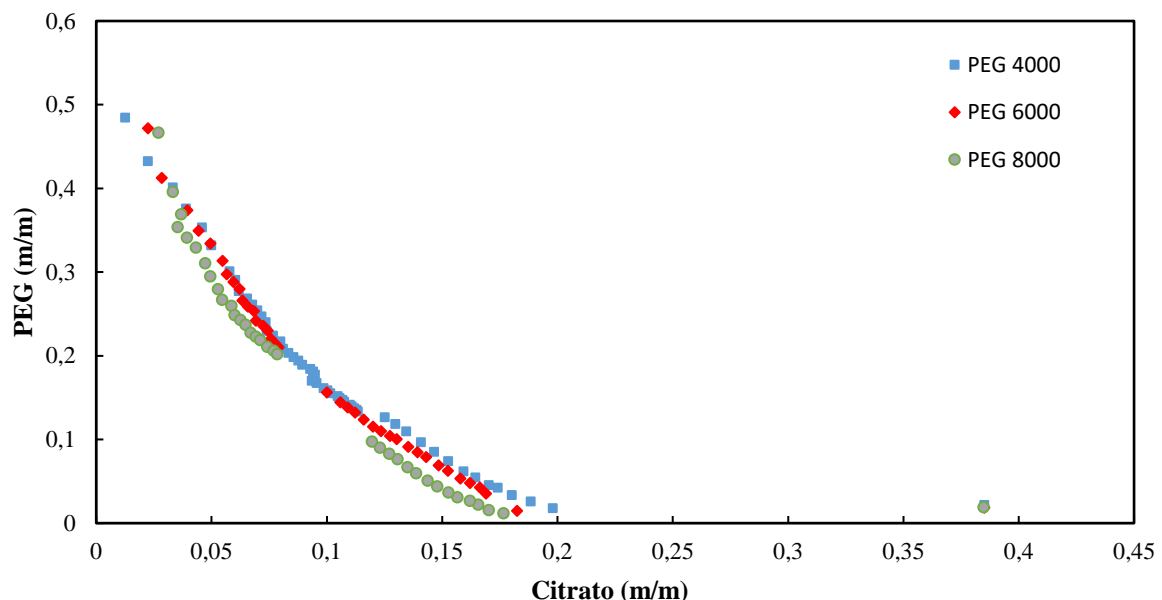


Figura 11 - Diagramas de fase (binodais) para os sistemas PEG/Citrato

Pode-se observar, a partir das binodais construídas, que o aumento da massa molar do PEG leva a uma pequena expansão da região bifásica. De acordo com Asenjo e Andrews (2011), quanto maior a massa molar do polímero, menor é a concentração necessária para a

formação das duas fases e, quanto maior for a diferença entre os pesos moleculares dos polímeros, mais assimétrica é a curva, aproximando-a da origem do diagrama de fases. Isto ocorre devido à alta hidrofobicidade do PEG à medida que se aumenta a massa molar, o que leva à exclusão do polímero da mistura e, conseqüentemente, à formação das duas fases.

A Figura 12, Figura 13 e Figura 14 apresentam o modelo de Merchuk ajustado aos dados experimentais, bem como as linhas de amarração para cada ponto global selecionado.

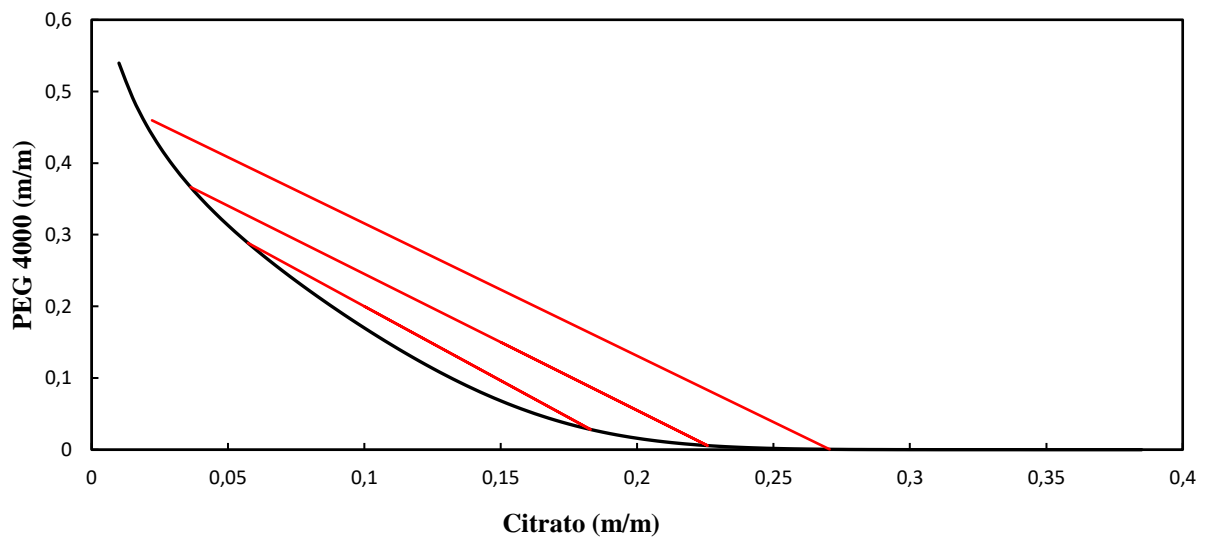


Figura 12 - *Tie-lines* para o sistema PEG 4000/Citrato

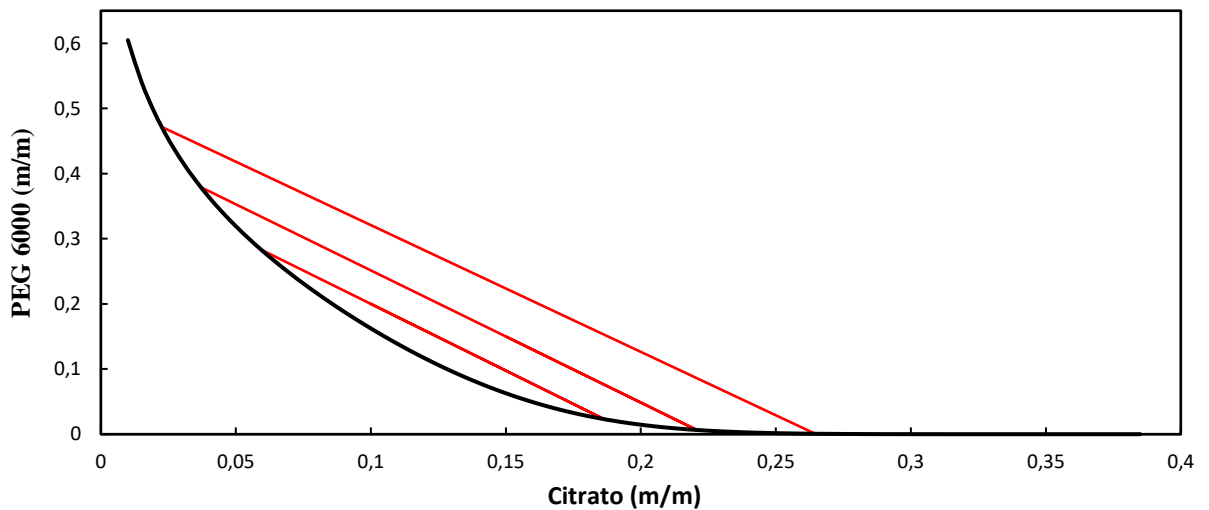


Figura 13 - *Tie-lines* para o sistema PEG 6000/Citrato

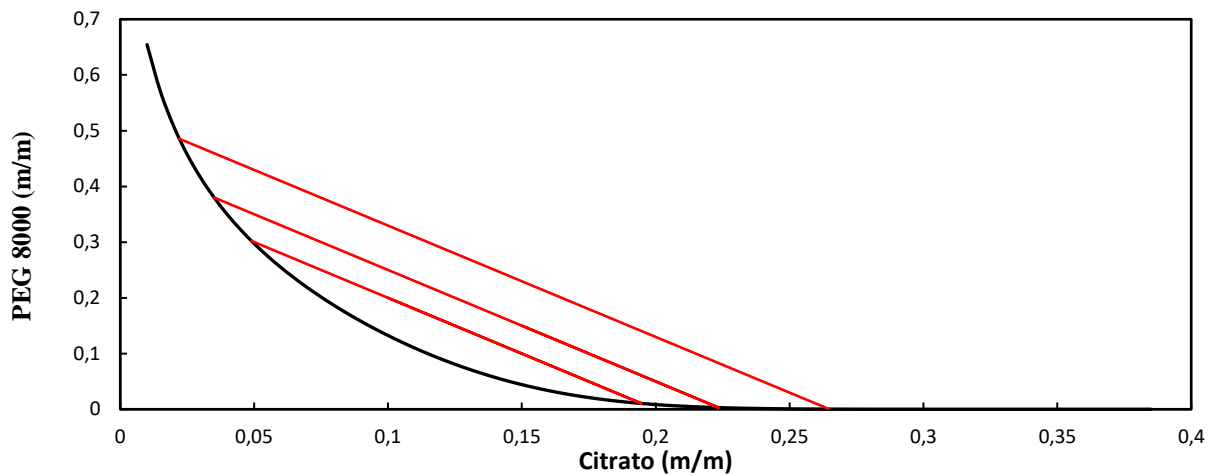


Figura 14 - *Tie-lines* para o sistema PEG 8000/Citrato

As composições de cada fase das *tie-lines* estudadas, bem como seu coeficiente angular e comprimento estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados gerais das linhas de amarração

PEG	$[W_{cit}]^M$	$[W_{PEG}]^M$	$[W_{cit}]^{TOP}$	$[W_{PEG}]^{TOP}$	$[W_{cit}]^{BOT}$	$[W_{PEG}]^{BOT}$	δ	TLL
4000	10,00	20,00	5,72	28,85	18,29	2,82	-1,98	28,90
	15,00	15,00	3,62	36,64	22,58	0,56	-1,90	40,75
	17,50	17,50	1,91	45,96	27,05	0,05	-1,88	52,34
6000	10,00	20,00	5,93	28,32	18,63	2,31	-2,04	28,94
	15,00	15,00	3,70	37,91	22,07	0,65	-2,02	41,55
	17,50	17,50	2,25	47,17	26,45	0,07	-1,96	52,95
8000	10,00	20,00	4,90	30,20	19,46	1,04	-2,00	32,60
	15,00	15,00	3,50	37,99	22,34	0,29	-2,03	42,14
	17,50	17,50	2,20	48,54	26,01	0,03	-2,02	54,07

Através dos dados da tabela acima, é perceptível que as linhas de amarração construídas apresentam um coeficiente angular (inclinação) bem próximos, indicando que são praticamente paralelas. Pode-se, com isso, determinar um coeficiente médio para calcular qualquer *tie-line* presente no sistema, a partir de um ponto genérico sobre a binodal. Além disso, nota-se que a massa molar não influenciou significativamente nas inclinações e nos comprimentos das *tie-lines*,

Os dados resultantes de equilíbrio líquido-líquido foram inseridos no pacote LLSR do software R para a determinação dos níveis do planejamento experimental. A Tabela 5, presente

na metodologia, apresenta os comprimentos de *tie-line* desejados determinados pelo programa, utilizando as condições já discutidos.

Tabela 9 - Matriz de planejamento fatorial 3^3 usada no estudo da purificação da celulase

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
TLL	18,10	25,20	32,29
V _r	0,25	0,50	0,75
MM _{PEG} (g/mol)	4000	6000	8000

Além da TLL desejada, o programa forneceu as composições globais de citrato e PEG necessárias para o preparo dos sistemas bifásicos, em cada combinação das variáveis do planejamento experimental. A Tabela 14 contendo essas composições está presente no Apêndice I deste trabalho.

4.2 PURIFICAÇÃO DAS CELULASES NOS SABS

O extrato bruto utilizado nos ensaios de purificação não passou por nenhum tratamento além da filtração e centrifugação, tendo sido obtido diretamente da etapa de extração sólido-líquido. As características desse extrato enzimático estão exibidas na Tabela 10.

Tabela 10 - Características do extrato enzimático utilizado nos ensaios de partição

Parâmetro	Valor
pH	4,80
Densidade (g/mL)	1,03
Açúcares Redutores (mg/mL)	0,63
Proteínas solúveis (μg/mL)	118,33
Atividade em FPase (U/mL)	0,27
Atividade em CMCase (U/mL)	1,02

Após a formação dos SABS, constatou-se que a fase superior era rica em PEG e a inferior em citrato de sódio.

4.2.1 Partição das Endoglucanases (CMCase)

Ensaio preliminares demonstraram uma maior partição das endoglucanases na fase inferior. Portanto, o rendimento de recuperação (Y) e fator de purificação (PF) foram determinados apenas para a fase rica em sal.

Os valores dos parâmetros: coeficiente de partição de proteínas (K_P), coeficiente de partição de CMCase (K_{CMCase}), rendimento de recuperação de atividade enzimática na fase inferior (Y^b) e fator de purificação na fase inferior (FP^b) estão exibidos na Tabela 11, além das combinações das variáveis de entrada propostas no planejamento experimental.

Tabela 11 - Valores das variáveis de entrada e de respostas na purificação da CMCase

E	MM (g/mol)	TLL (%)	Vr	K_P	K_{CMCase}	Y^b(%)	PF^b
1	4000	18,1	0,75	1,39	0,54	38,34	2,04
2	4000	18,1	0,50	2,23	0,51	66,20	2,97
3	4000	18,1	0,25	3,56	0,50	85,76	3,58
4	4000	25,2	0,75	1,56	0,49	40,35	2,40
5	4000	25,2	0,50	1,85	0,48	67,57	2,98
6	4000	25,2	0,25	3,77	0,45	86,87	5,33
7	4000	32,3	0,75	1,56	0,43	43,73	3,33
8	4000	32,3	0,50	3,44	0,39	72,01	5,93
9	4000	32,3	0,25	3,55	0,38	88,70	7,37
10	6000	18,1	0,75	1,84	0,48	40,77	2,30
11	6000	18,1	0,50	2,54	0,46	68,61	3,20
12	6000	18,1	0,25	4,14	0,42	87,75	3,99
13	6000	25,2	0,75	2,13	0,43	43,82	2,71
14	6000	25,2	0,50	2,44	0,41	71,02	3,00
15	6000	25,2	0,25	3,94	0,39	88,38	5,96
16	6000	32,3	0,75	3,45	0,40	45,18	4,38
17	6000	32,3	0,50	4,65	0,35	74,30	6,05
18	6000	32,3	0,25	4,20	0,31	90,69	7,73
19	8000	18,1	0,75	1,08	0,55	37,63	1,25
20	8000	18,1	0,50	1,34	0,54	64,88	2,00
21	8000	18,1	0,25	1,82	0,51	85,45	2,16
22	8000	25,2	0,75	1,09	0,59	36,15	1,28
23	8000	25,2	0,50	1,55	0,55	64,66	2,07
24	8000	25,2	0,25	2,24	0,51	85,38	2,20
25	8000	32,3	0,75	1,56	0,83	28,56	1,65
26	8000	32,3	0,50	1,57	0,78	56,30	2,32
27	8000	32,3	0,25	3,49	0,62	82,99	3,84

Conforme mostram os dados apresentados na Tabela 11, a partição da CMCase apresentou os valores mais desejáveis das variáveis respostas no ensaio 18, onde se alcançou um coeficiente de partição de 0,31, uma recuperação de atividade de 90,69 % e um fator de purificação de 7,73.

Os valores do coeficiente de partição de proteínas mostrados na Tabela 11 revelam que as mesmas se particionaram preferencialmente na fase superior, rica em PEG, em virtude de todos terem sido maior que a unidade ($K_P > 1$). Embora as três variáveis independentes tenham influenciado na partição das proteínas, os valores mais significativos do K_P são encontrados nos ensaios com maior comprimento de *tie-line*, onde também estão as maiores concentrações de citrato de sódio (Anexo I). Tal comportamento é consistente com o fato de que, quanto maior a concentração de sal, menor a solubilidade da proteína na fase, direcionando sua partição para a fase superior, rica em polímero, pelo efeito *salting out* (Lima *et al.*, 2013).

Os coeficientes de partição da CMCase em todos os sistemas bifásicos PEG/Citrato foram menores que um ($K_{CMCase} < 1$), variando de 0,31 a 0,83 (Tabela 11), o que indica que a enzima migrou preferencialmente para a fase inferior rica em citrato. De acordo com Ilari *et al.* (2009), algumas endoglucanases produzidas por microrganismos contêm uma rede de ligações de hidrogênio, as quais favorecem sua partição e afinidade para fases aquosas ricas em sal.

É importante destacar também que a partição enzimática foi realizada em pH 6, conforme discutido na metodologia. Segundo Raja *et al.* (2011b), o efeito do pH no particionamento de proteínas em SABs dá-se por meio da alteração da carga líquida das mesmas, a qual depende se o pH é maior (negativo), menor (positivo), ou igual (zero) ao ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico (PI) das principais endoglucanases produzidas por fungos varia entre 3,9 e 7,5 (Ogeda e Petri, 2010), levando à possibilidade da CMCase produzida pelo *Aspergillus niger* ter um PI maior que o pH utilizado neste trabalho, carregando-a positivamente. Nessa situação, a enzima concentra-se preferencialmente na fase inferior, reduzindo o valor do coeficiente de partição.

Diferente deste trabalho, Dustet *et al.* (2009) verificaram uma preferência das CMCases pela fase rica em PEG ao estudarem a partição de celulasas produzidas por *Aspergillus niger* em SABs formados por PEG 1500 e tampão fosfato de sódio. Nesse sistema, os autores observaram uma recuperação de 90% da atividade enzimática na fase superior dos SABs. Já Herculano *et al.* (2012) estudaram a partição de celulasas produzidas por *Aspergillus japonicus* URM5620 em SABs formados por PEG e citrato de sódio, onde observaram um coeficiente de

partição máximo de 3,03 para o sistema formado por 20% de PEG 1000 e 20% de citrato de sódio em pH 6,0

O peso molecular do PEG é um fator crucial para o particionamento de enzimas em sistemas bifásicos PEG/Sal, porque diferentes pesos resultarão em diferentes volumes livres disponíveis, o que acaba alterando a composição da fase (Ratagleka, 2010). Os efeitos de três pesos moleculares diferentes de PEG (4000, 6000 e 8000) foram investigados neste trabalho.

Os maiores Y^b (90,69 %) e PF^b (7,73), bem como o menor K_{CMCase} (0,31), foram alcançados no sistema PEG 6000/Citrato. Os resultados mostraram que mais CMCase foi segregada para a fase inferior quando o peso molecular do polímero aumentou de 4000 para 6000 g/mol, conforme indica a diminuição nos valores do coeficiente de partição em todas as combinações do planejamento experimental. O maior comprimento da cadeia do PEG 6000 reduz o volume livre da fase superior em comparação com o PEG 4000, levando a mais CMCase se particionar na fase inferior rica em sal.

Uma cadeia de PEG, que é primordialmente hidrofóbica, aumenta a hidrofobicidade do sistema bifásico aquoso à medida que o peso molecular do polímero aumenta. Portanto, mais enzima pode ser particionada para a fase inferior após um fenômeno denominado de efeito de exclusão de volume (Suan *et al.*, 2011).

No entanto, o longo comprimento da cadeia do PEG 8000 diminui ainda mais o volume livre da fase superior dos sistemas bifásicos e isso promove o particionamento de proteínas indesejadas na fase inferior rica em sal. Essas proteínas competiriam com a CMCase por espaços livres, resultando na repulsão da celulase à fase superior rica em polímero ou precipitação na interface após o efeito de *salting out* (Coimbra *et al.*, 2009). Assim, nos ensaios PEG 8000/Citrato, foi observado uma redução nos valores de recuperação e purificação em todas as condições experimentais, com destaque aos menores valores de Y^b (28,56%) e PF^b (1,56) simultaneamente ao maior valor do K_{CMCase} (0,83).

O fator de purificação é um parâmetro que reflete o aumento de pureza da enzima em uma das fases do SAB, revelando o quanto a atividade específica da fase aumentou em relação à atividade específica do extrato bruto, conforme Equação 17. O valor máximo observado foi de 7,73 para o ensaio 18. Isso significa que na fase inferior deste SAB havia, proporcionalmente, uma relação entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas totais 7,73 vezes maior que no extrato bruto.

Esse valor é superior ao observado por alguns trabalhos encontrados na literatura, entre eles, Fischer *et al.* (2015), que estudaram a partição de CMCase produzida por *Aspergillus niger*

na fermentação semissólida de farelo de arroz e bagaço de cana. Os autores observaram um fator de purificação máximo de 2,0 na fase inferior quando trabalharam com SABs compostos por 22% PEG 2000 e tampão citrato de pH 7,0. Já em Bispo (2015), ao estudar a purificação de CMCase produzida por *Trichoderma reesei* na fermentação semissólida da palma forrageira, foi obtido um fator de purificação máximo de 5,31 na fase superior e um rendimento de recuperação de 92 %.

Apesar da purificação enzimática ser um processo complexo, influenciado por muitas variáveis, é possível avaliar a contribuição de cada parâmetro individual quando se varia mais de um ao mesmo tempo. Este procedimento pode ser feito através dos resultados do planejamento experimental, os quais podem indicar algumas tendências. A Figura 15 apresenta o diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis de entrada no rendimento de recuperação, para um intervalo com 95% de confiança (com níveis de significância, p , inferiores a 0,05).

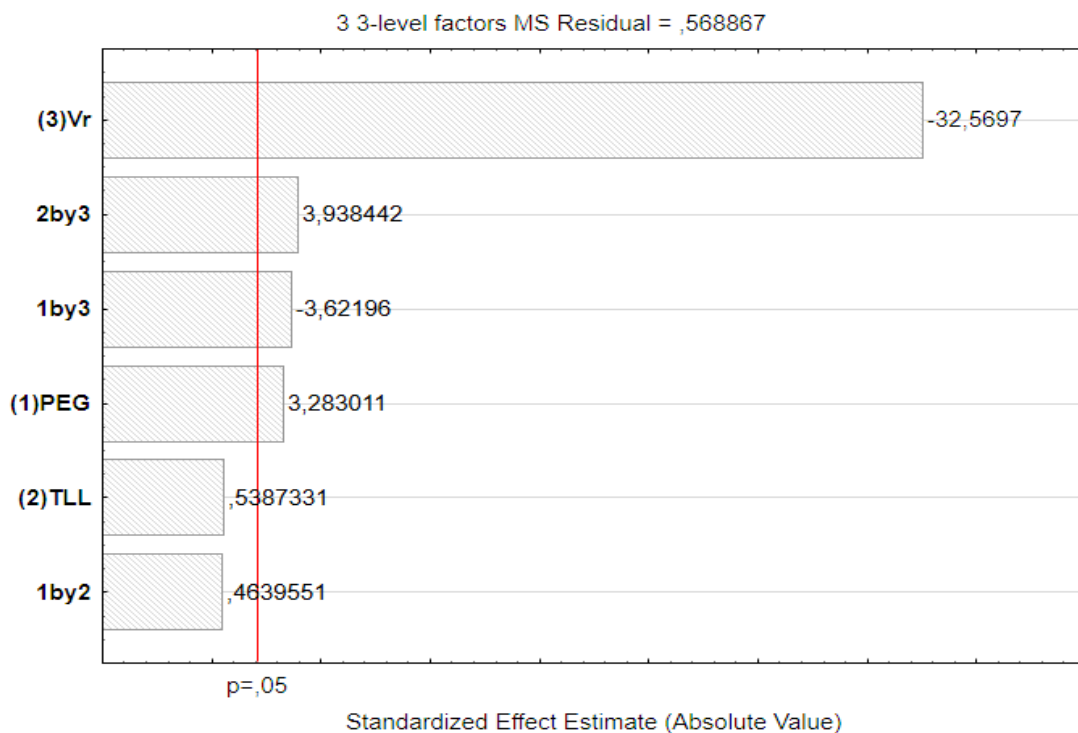


Figura 15 - Diagrama de Pareto para o Rendimento de Recuperação na fase inferior (Y^b)

Analisando o diagrama, percebe-se que a razão de volume foi quem apresentou o maior efeito estatístico na variável resposta. Este efeito (-32,5697) indica que são nos menores valores deste parâmetro que são obtidos os valores mais elevados de fator de purificação ou aumento de pureza. Isto pode ser comprovado analisando os resultados da Tabela 11, onde foram encontrados os maiores rendimentos quando $V_r = 0,25$.

Por definição da variável, quanto menor a razão de volume, maior o volume da fase inferior, rica em citrato. De acordo com Nagaraja e Iyyaswami (2015), uma maior fase salina gera maior volume livre efetivo no sistema, proporcionando partição de moléculas que possuam afinidade com esta fase, neste caso, a CMC_{case}. Além disso, em baixas razões de volume, limites de saturação podem ser atingidos, levando a precipitação de proteínas na interface e, conseqüentemente, a um aumento do fator de purificação da enzima na fase.

Na Figura 15, pode-se observar que o valor de TLL não apresentou efeito significativo no rendimento de recuperação, apenas a sua combinação com a razão de volume apresentou influência nos resultados. A massa molar teve efeito positivo, conforme verificado na Tabela 11, pois o aumento de 4000 para 6000 g/mol gerou melhores valores de Y^b .

A Figura 16 apresenta o diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis de entrada no fator de purificação, para um intervalo com 95% de confiança (com níveis de significância, p , inferiores a 0,05). Novamente, a razão de volume apresentou efeito negativo, pois foram nos menores valores dessa variável que foram encontrados os melhores resultados da purificação. A teoria discutida anteriormente justifica essa análise.

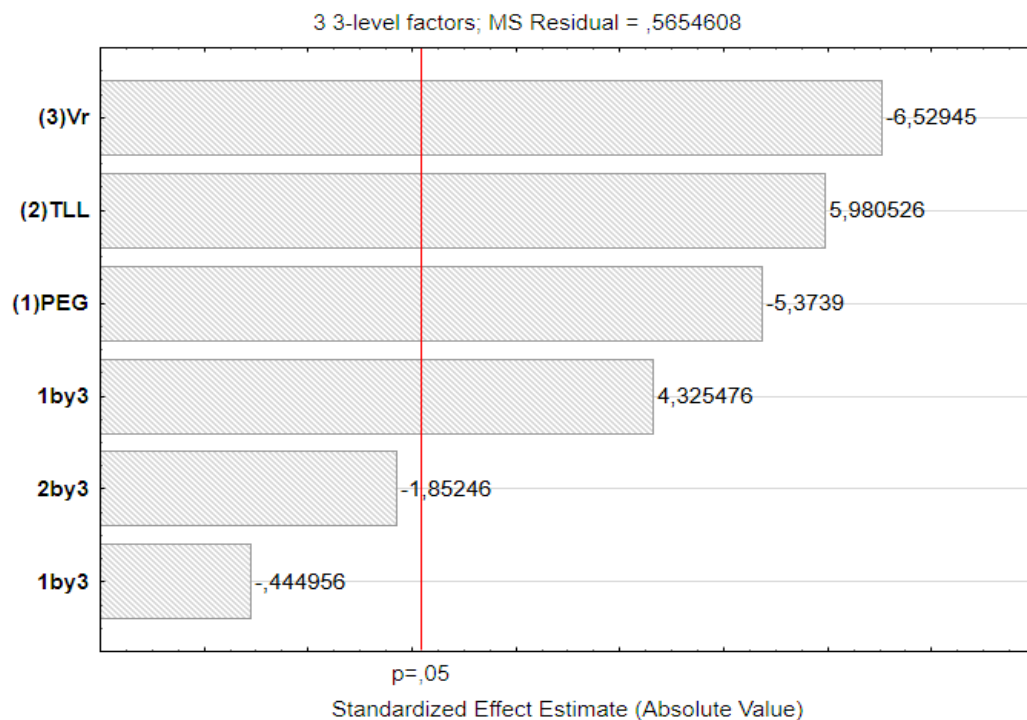


Figura 16 - Diagrama de Pareto para o Fator de Purificação (PF^b).

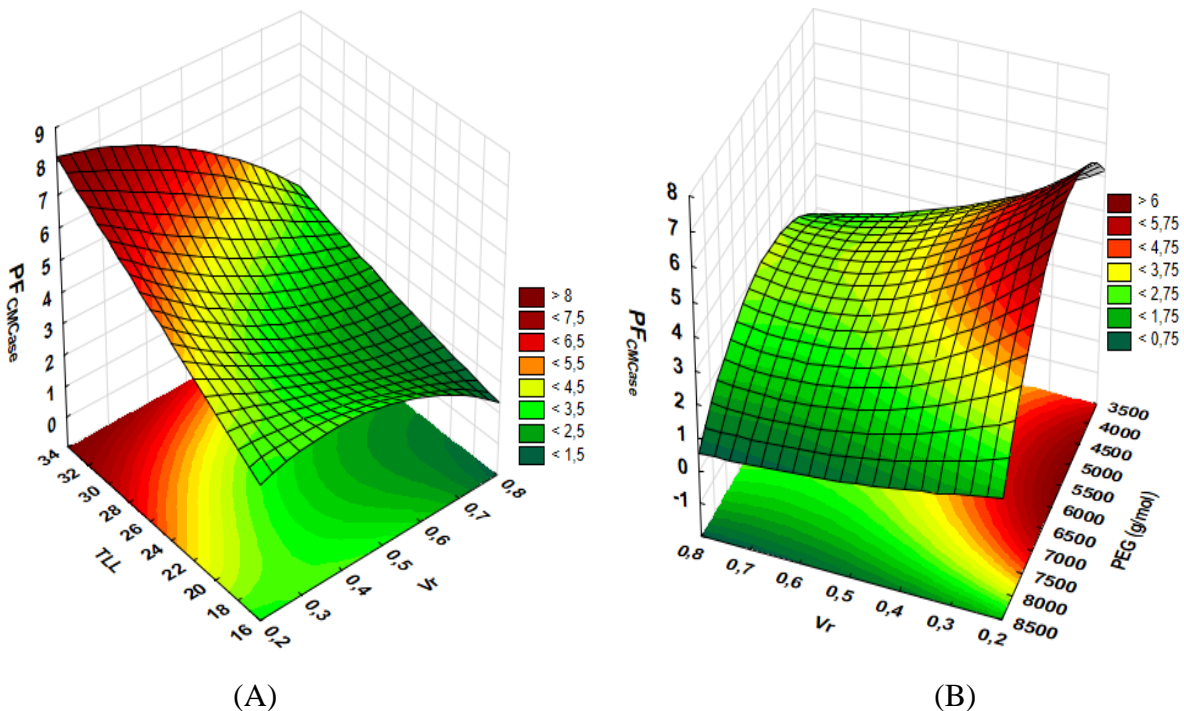
Neste caso, o comprimento de *tie-line* teve um efeito positivo no fator de purificação, com significância positiva. Isto indica que nos maiores valores de TLL foram encontrados os melhores resultados da purificação da CMC_{case}. Isto pode ser comprovado observando a Tabela

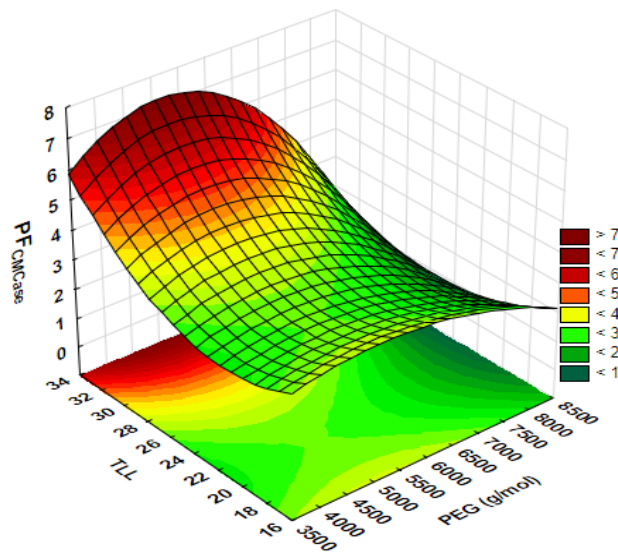
11, onde os maiores fatores de purificação (7,37;7,73) foram para ensaios com comprimento de *tie-line* de 32,1 %.

O aumento do comprimento de *tie-line* é acompanhado, simultaneamente, pelo aumento das concentrações de PEG e citrato, conforme Anexo 1. De acordo com Antov *et al.* (2004), com o incremento da TLL, propriedades físicas (densidade e viscosidade) do sistema e o volume livre disponível para a biomolécula-alvo também aumentam, o que leva a CMCase à fase inferior por um fenômeno denominado de efeito de exclusão molecular. Além disso, TLLs mais longos também aumentam a tensão interfacial entre as duas fases, o que facilita a transferência de massa, resultando em mais CMCase para particionar na fase rica em sal (Ramana *et al.*, 2016).

No caso do fator de purificação, a Figura 16 indica que todas as variáveis tiveram efeitos individuais significativos, com o PEG tendo significância negativa. No caso de variação simultânea, apenas a combinação linear entre PEG e V_r teve efeito estatístico, de valor positivo, enquanto as demais combinações não representam influência nos resultados da variável de resposta.

Para melhor visualizar os efeitos das variáveis independentes, individuais e em combinação, foram construídas superfícies de resposta. A Figura 17 mostra a influência das três variáveis de entrada do planejamento nos resultados do fator de purificação.





(C)

Figura 17 - Superfícies de resposta com a influência dos parâmetros no fator de purificação da CMCCase (FP^b). (A) = Influência do comprimento de *tie-line* (TLL) e razão de volume (Vr). (B) = Influência da massa molar de PEG e razão de volume (Vr). (C) = Influência da TLL e PEG

Analisando as superfícies de resposta, pode-se perceber que os melhores resultados são obtidos quando se aumenta o comprimento de *tie-line*, em todas as combinações, diferentemente da razão de volume, a qual, diminuindo, aumenta-se o fator de purificação. Já a massa molar do PEG, um aumento na região de 3000 g/mol até 6500 ocorre um aumento na purificação da enzima, enquanto que um aumento de 6500 para 8000 g/mol, menores valores são encontrados.

Os resultados obtidos foram superiores aos apresentados por Ho *et al.* (2017), que estudaram a purificação de carboximetilcelulase de *Bacillus subtilis* em sistema bifásico aquoso PEG/Citrato. Neste trabalho, os autores encontraram um coeficiente de partição máximo de 0,37 na fase inferior, com um rendimento de recuperação de 88,82% e um fator de purificação de 4,8. Esses resultados foram obtidos para um PEG 6000, a uma TLL de 42,16 e uma Vr de 0,29.

Para destacar o ponto ótimo do planejamento experimental, foi utilizada a função desejabilidade, a qual envolve a transformação de cada variável de resposta estimada em um valor desejável, o qual varia de 0 a 1. Na Figura 18, são apresentados os perfis da função de desejabilidade.

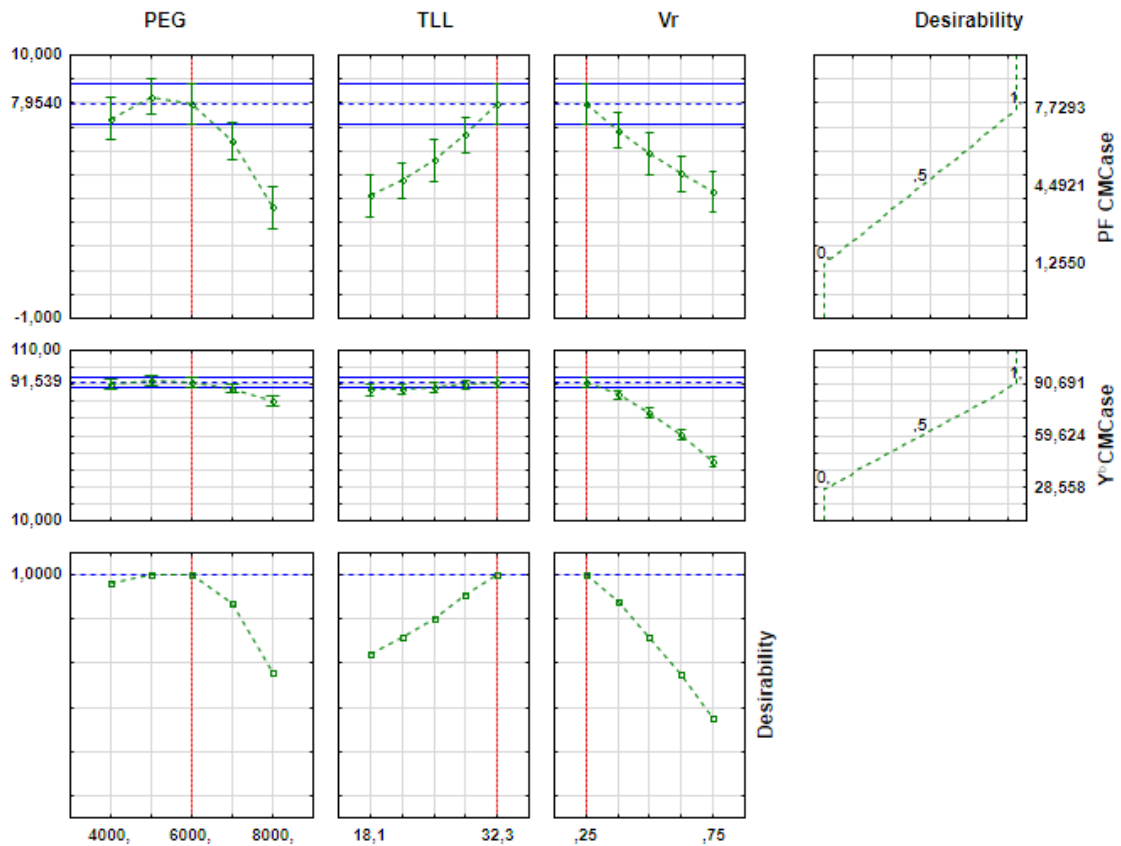


Figura 18 - Perfis da função desejabilidade para a CMCase.

Estes perfis mostram os valores dos pontos ótimos para as variáveis de resposta: Y^b (90,69) e PF^b (7,73). Neste caso, as condições operacionais que levam ao ótimo dessas variáveis são: massa molar de PEG de 6000 g/mol, comprimento de *tie-line* de 32,3 e razão de volume de 0,25.

4.2.2 Partição da Celulase Total (FPase)

Ensaio preliminares demonstraram uma maior partição da FPase na fase superior. Portanto, o rendimento de recuperação (Y) e fator de purificação (PF) foram determinados apenas para a fase rica em polímero (superior).

Os valores dos parâmetros: coeficiente de partição de proteínas (K_P), coeficiente de partição de FPase (K_{FPase}), rendimento de recuperação de atividade enzimática na fase superior (Y^t) e fator de purificação na fase superior (FP^t) estão exibidos na Tabela 12 além das combinações das variáveis de entrada propostas no planejamento experimental.

Tabela 12 - Valores das variáveis respostas na purificação da FPase

E	MM (g/mol)	TLL	Vr	Kp	K_{FPase}	Y^t(%)	PF^t
1	4000	18,1	0,75	1,39	1,70	83,65	1,80
2	4000	18,1	0,50	2,23	1,61	61,73	1,52
3	4000	18,1	0,25	3,56	1,57	34,35	1,06
4	4000	25,2	0,75	1,56	1,81	84,46	1,78
5	4000	25,2	0,50	1,85	1,73	63,42	1,76
6	4000	25,2	0,25	3,77	1,70	36,16	1,40
7	4000	32,3	0,75	1,56	2,69	86,79	2,80
8	4000	32,3	0,50	3,44	1,77	63,93	1,95
9	4000	32,3	0,25	3,55	1,76	36,93	1,60
10	6000	18,1	0,75	1,84	1,42	80,96	1,40
11	6000	18,1	0,50	2,54	1,34	57,35	1,30
12	6000	18,1	0,25	4,14	1,31	30,39	0,92
13	6000	25,2	0,75	2,13	1,47	81,52	1,43
14	6000	25,2	0,50	2,44	1,43	58,82	1,30
15	6000	25,2	0,25	3,94	1,37	31,26	1,47
16	6000	32,3	0,75	3,45	1,52	82,04	1,57
17	6000	32,3	0,50	4,65	1,35	57,49	1,33
18	6000	32,3	0,25	4,20	1,15	27,77	1,16
19	8000	18,1	0,75	1,08	1,11	76,95	0,95
20	8000	18,1	0,50	1,34	1,05	51,29	1,25
21	8000	18,1	0,25	1,82	1,05	25,82	0,88
22	8000	25,2	0,75	1,09	1,16	77,68	1,05
23	8000	25,2	0,50	1,55	1,07	51,75	1,35
24	8000	25,2	0,25	2,24	1,04	25,72	0,84
25	8000	32,3	0,75	1,56	1,22	78,59	1,34
26	8000	32,3	0,50	1,57	1,06	51,44	1,04
27	8000	32,3	0,25	3,49	1,12	27,23	0,79

Conforme mostram os dados apresentados na Tabela 12, a partição da FPase apresentou os valores mais desejáveis das variáveis respostas no ensaio 7, onde se alcançou um coeficiente de partição de 2,69, uma recuperação de atividade de 86,79 % e um fator de purificação de 2,80.

Os coeficientes de partição da FPase em todos os sistemas bifásicos PEG/Citrato foram maiores que um ($K_{FPase} > 1$), variando de 1,04 a 2,69 (Tabela 12), o que indica que a enzima migrou preferencialmente para a fase superior rica em polímero. Estes resultados estão em conformidade com todos os trabalhos pesquisados na literatura, onde a celulase total migrava preferencialmente para a fase superior.

Herculano *et al.* (2012) também observaram a partição da FPase para a fase superior, ao estudarem a recuperação do complexo celulolítico *do Aspergillus japonicus* URM5620 por

meio de SABs. Os autores observaram valores de coeficiente de partição de no máximo 2,38 para sistemas formados por 24% de PEG1000, 15% de Citrato e pH 8,0. Já Bispo (2015), encontrou um coeficiente de partição de 2,96 e uma recuperação de 87,46 para a FPase de *Trichoderma reesei* na fase superior para sistema com composição de 22% de PEG 4000, 16% de Citrato e pH 5,0.

É possível verificar, analisando a Tabela 12, que os maiores Y^t (86,79 %), PF^t (2,80) e K_{FPase} (2,69) foram encontrados nos sistemas com PEG 4000 g/mol. Embora não haja uma justificativa na literatura para a FPase ter maior afinidade com a fase polimérica, pode-se fazer uma correlação com a partição da CMC_{Case}. Como esta teve melhores resultados de partição nos sistemas com PEG 4000 e 6000, o volume livre efetivo na fase inferior estaria reduzido para as demais moléculas, o que favorece sua migração da FPase para a fase superior.

Neves *et al.* (2012) observaram um valor de coeficiente de partição de 14,42 para a fitase produzida por *Absidia blakesleeana* URM5604, em um SAB composto por 26% PEG 4000 e 20% citrato de sódio em pH 6,0. Assim como neste trabalho, o valor máximo obtido por esses autores foi observado no SAB de maior concentração de PEG, maior concentração de citrato, menor massa molar de PEG e pH 6,0.

A Figura 19 apresenta o diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis de entrada no rendimento de recuperação, para um intervalo com 95% de confiança (com níveis de significância, p , inferiores a 0,05).

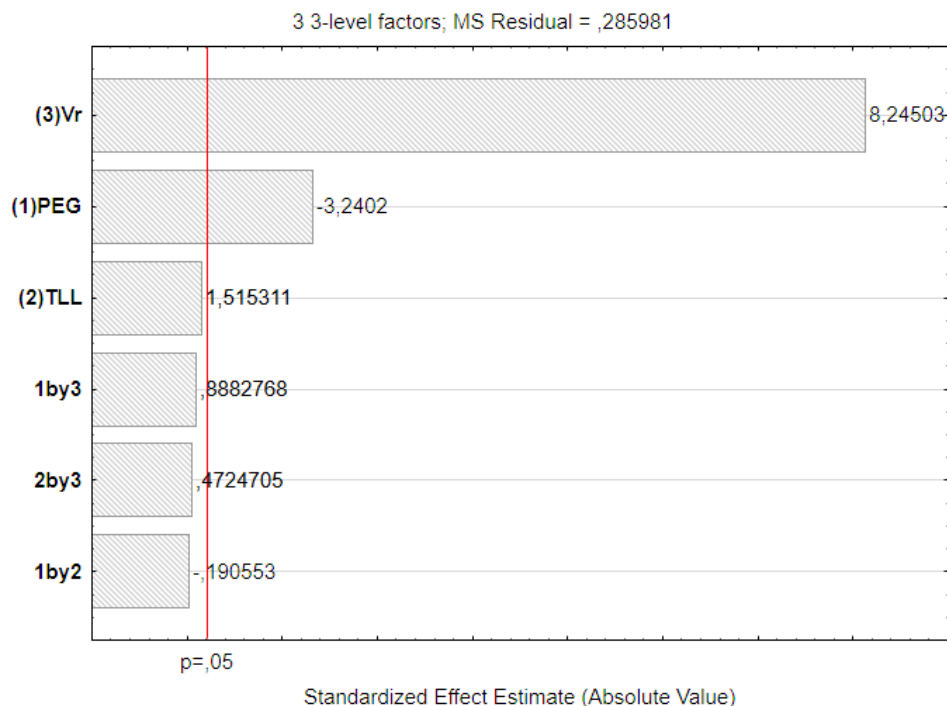


Figura 19 - Diagrama de Pareto para o Rendimento de Recuperação na fase superior (Y^t)

Analisando a Figura 19, apenas a razão de volume, com efeito positivo e massa molar do PEG, com efeito negativo, de forma individual, tiveram influência nos resultados. Além do comprimento de *tie-line*, nenhuma das combinações entre variáveis foram significativas na recuperação da atividade.

A superfície de contorno, apresentada na Figura 20, apresenta a influência das duas variáveis mais significativas nos resultados do processo de recuperação. Pode-se notar, como já deduzido no gráfico de Pareto, que são nos maiores valores de razão de volume e menores de massa molar que são encontrados os maiores rendimentos. Para uma razão de volume grande, maior a fase polimérica e maior a concentração da CMC_{Case} na fase inferior, o que proporciona volume livre efetivo para a FPase.

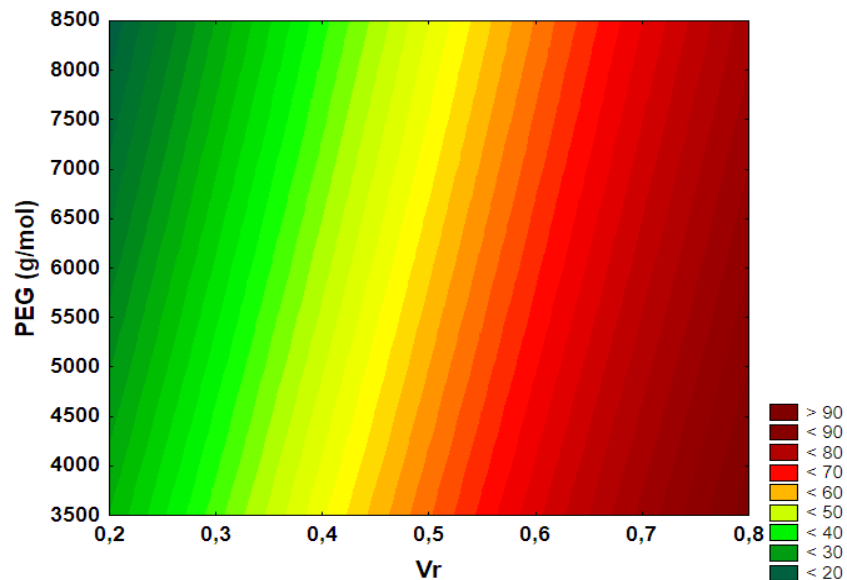


Figura 20 - Superfície de Contorno para o Rendimento de Recuperação na fase inferior (Y').

A Figura 21 apresenta o diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis de entrada no fator de purificação, para um intervalo com 95% de confiança (com níveis de significância, p, inferiores a 0,05). Neste caso, todas as variáveis independentes tiveram contribuições individuais significativas no processo de purificação, podendo destacar que, novamente, a razão de volume foi quem apresentou o maior efeito estatístico. Sua interpretação indica que os melhores resultados são obtidos com razões maiores.

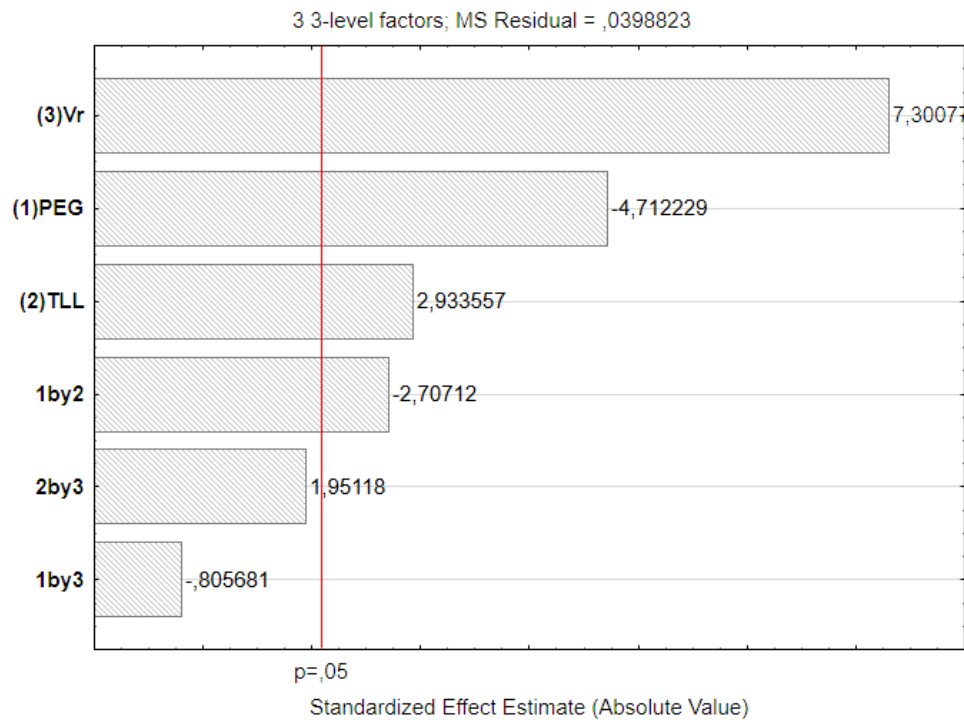


Figura 21 - Diagrama de Pareto para o Fator de Purificação na fase superior (PF¹)

Além de um efeito combinado com a massa molar de PEG, o comprimento de *tie-line*, de forma individual, teve uma contribuição estatística relevante no fator de purificação, com significância positiva. Assim como na partição da CMC_{Case}, isto indica que nos maiores valores de TLL foram encontrados os melhores resultados da purificação da FPase. Isto pode ser comprovado observando a Tabela 12, onde os maiores fatores de purificação (1,95; 2,80) foram para ensaios com TLL de 32,3

Este efeito proporcionado pela variação do comprimento de *tie-line* foi abordado por Barbosa *et al.* (2015), onde indicou-se que, com o aumento do TLL, a biomolécula de interesse tende a migrar preferencialmente para uma das fases, isto é, a recuperação e a purificação são mais eficientes. Esse comportamento é resultado do aumento da diferença de composição entre as fases, que aumenta as contribuições entálpicas e entrópicas na transferência da biomolécula para uma das fases.

A Figura 22 mostra a influência das três variáveis de entrada do planejamento nos resultados do fator de purificação.

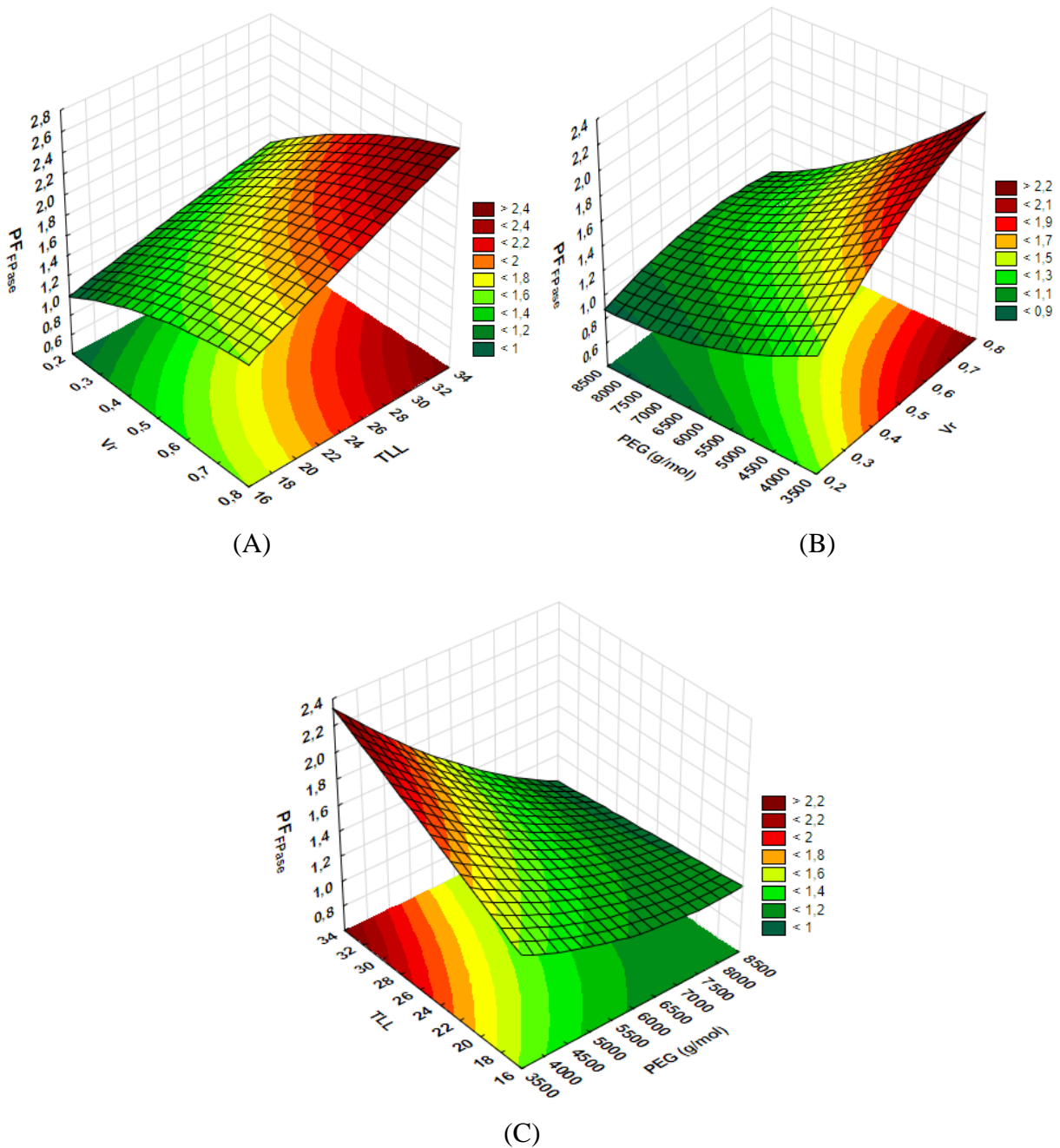


Figura 22 - Superfícies de resposta com a influência dos parâmetros no fator de purificação da FPase (PF^*). (A) = Influência do comprimento de tie-line (TLL) e razão de volume (V_r). (B) = Influência da massa molar de PEG e razão de volume (V_r). (C) = Influência da TLL e PEG.

A Figura 22 A mostra uma relação muito clara entre os parâmetros no fator de purificação da FPase, em que os melhores resultados são encontrados para razões de volumes e comprimentos de *tie-line* maiores. Na Figura 12 (B), pode-se perceber que a massa molar do PEG não teve grande influência, embora revele que maiores purificações são obtidas com massas molares menores. A Figura 12 (C) revela as mesmas tendências discutidas para as Figuras 12 (A) e (B).

É importante destacar que os fatores de purificação da FPase são bem menores que os determinados para a CMCase, devido à maior concentração de proteínas na fase rica em polímero. Ainda assim, os resultados são superiores aos encontrados por Neves *et al.* (2012), os quais observaram um valor de fator de purificação de 1,75 para a fitase produzida por *Absidia blakesleeana* URM5604, em SABs formados por PEG 4000 e citrato de sódio de pH 6. Já Yücekan e Önal (2011), encontraram valores de fator de purificação de até 3,3 para a partição da invertase do tomate em SABs formados por PEG 2000 e sulfato de sódio em pH 5,0.

Na Figura 23, são apresentados os perfis da função de desejabilidade com os valores mais desejáveis das variáveis independentes e valores ótimos encontrados para as variáveis de resposta.

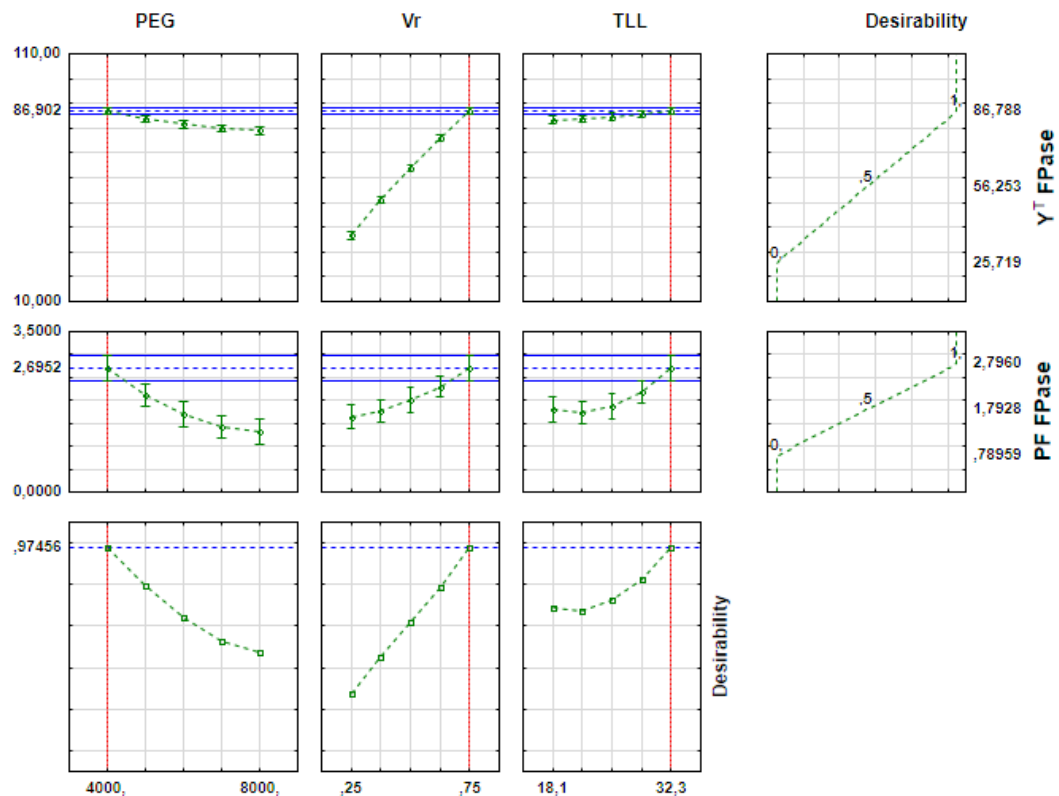


Figura 23 - Perfis da função desejabilidade para a PFase.

Estes perfis mostram que os valores dos pontos ótimos para as variáveis de resposta foram: Y^t (86,79) e PF^t (2,80). Neste caso, as condições operacionais que levam ao ótimo dessas variáveis são: massa molar de PEG de 4000 g/mol, comprimento de *tie-line* de 32,3 e razão de volume de 0,75.

4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Esta etapa do trabalho visou à comparação da eficiência no processo de hidrólise de biomassa entre o extrato bruto e a enzima purificada. A solução enzimática purificada foi preparada utilizando as condições ótimas do planejamento experimental, ou seja, de massa molar do polímero, comprimento de *tie-line* e razão de volume, tanto para a FPase quanto para a CMCCase. O extrato enzimático utilizado nos ensaios de hidrólise apresentou os valores de atividade e glicose inicial apresentados na tabela 10.

Como foram empregados 25 mL do extrato para cada balão contendo 0,5 g de biomassa, de acordo com a metodologia de Sukumaran *et al.* (2009) havia na mistura reacional um total de 9,05U de CMCCase, 5,05 U de FPase. Essa quantidade de unidades enzimáticas foi utilizada como padrão na metodologia da hidrólise, ou seja, o preparado enzimático purificado deveria conter a mesma quantidade. Para isso, foi feita uma coleta de fases do processo de purificação de forma adequada a fim de se atingir esse valor.

O preparado final enzimático teve um volume de 30 mL, contendo a mesma quantidade de unidades do extrato utilizado. A coleta das fases foi feita de forma estratégica a se obter menos PEG possível das fases, para que não houvesse interferência na hidrólise. Neste caso, pela proporção, a quantidade de biomassa utilizada no processo de hidrólise foi de 0,6 g.

Partindo-se de uma concentração inicial de açúcares redutores, o processo de hidrólise foi acompanhado por 13 horas, com análises da concentração de glicose no meio reacional em intervalos regulares de 1 hora, como mostra a Figura 24.

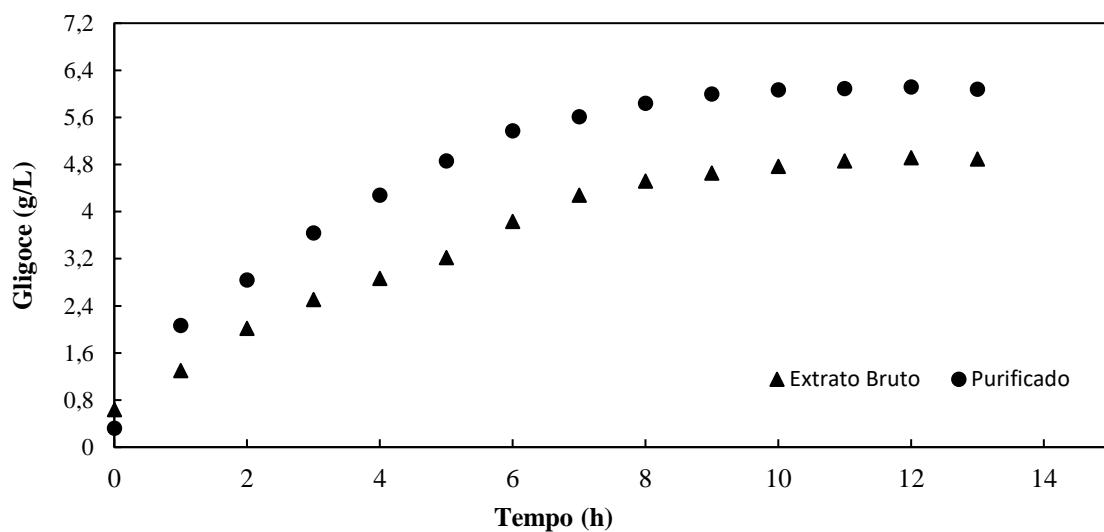


Figura 24 - Processo de hidrólise da biomassa pelo extrato bruto e enzima purificada.

Analisando a Figura 24, é possível perceber aumento na concentração de açúcares redutores (glicose) durante o período de 13 horas de processo, o que significa que as enzimas, tanto do extrato quanto do preparado purificado, foram capazes de catalisar a clivagem da celulose da biomassa dos resíduos de folha em açúcares redutores.

No geral, a concentração de glicose no meio catalisado pela enzima purificada foi maior, obtendo-se um valor máximo de 6,07 g/L frente a 4,89 g/L para o extrato bruto. De acordo com Ogeda e Petri (2010), durante o processo o processo de purificação, inibidores de atividade enzimática e proteases podem ser removidos do meio, o que pode justificar uma melhor produção de glicose pelo preparado em relação ao extrato bruto.

Observa-se que, a partir de 8 horas, a concentração de glicose nos sistemas começa a ficar constante, o que indica que a biomassa já pode ter sido quase toda hidrolisada. A produtividade máxima ocorre nas primeiras horas do processo, conforme valores apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Produtividade da glicose para a hidrólise da biomassa lignocelulósica

Tempo (h)	P_{Extrato Bruto} (g/L.h)	P_{Purificado} (g/L.h)
1	0,650	0,872
2	0,504	0,628
3	0,417	0,552
4	0,358	0,495
5	0,322	0,454
6	0,319	0,421
7	0,306	0,378
8	0,282	0,345
9	0,259	0,315
10	0,238	0,287
11	0,221	0,262
12	0,205	0,241
13	0,188	0,221

Ogeda e Petri (2010) apontam que a redução na produtividade de glicose pode ser causada por inibição pelos produtos da hidrólise, como glicose e celobiose. Portanto, esta etapa pode ainda ser otimizada, seja com o aumento da concentração do extrato, com a otimização do preparado purificado ou com o melhoramento do pré-tratamento da biomassa. Destaca-se

ainda que, estes ensaios demonstram ser o resíduo de folhas urbanas uma fonte de celulose que pode ser hidrolisada e convertida em glicose.

Embora os valores de conversão obtidos sejam baixos, deve-se levar em consideração o fato do extrato bruto não ter passado por nenhum processo de concentração e apresentar valores baixos de atividade por encontrar-se diluído.

Sukumaran *et al.* (2009), por exemplo, obtiveram concentrações de 14,20 g/L, 26,30 g/L e 17,79 g/L de glicose ao final de 48 horas na hidrólise de bagaço de cana, palha de arroz e biomassa de aguapé, respectivamente. Porém, o extrato enzimático utilizado, de *Trichoderma Reesei* RUT 30 produzido na fermentação semissólida do farelo de trigo, teve os valores em atividade das celulasas aumentadas em dez vezes através de uma precipitação com acetona. Já Bispo (2015), obteve concentração e produtividade máximas de 3,016 g/L e 0,334 g/L.h na hidrólise da biomassa da palma forrageira, utilizado um extrato bruto sem estar concentrado e produzido na fermentação semissólida de *Trichoderma reesei* LCB 48.

Para a utilização das celulasas produzidas na hidrólise de matérias lignocelulósicas, é interessante a produção de extratos que aproveitem o máximo da sinergia entre as celulasas, sendo a atividade FPase, CMCase e celobiase muito importante nesse processo. Dessa forma, um processo que consiga enriquecer a presença dessas enzimas no extrato produzido, certamente levará a uma maior eficiência da aplicação do mesmo.

A purificação de enzimas individuais é de interesse quando se quer recuperar apenas a enzima alvo. No caso das celulasas destinadas a processos de hidrólise de biomassa, é interessante que se tenha um preparado enzimático composto por todas as enzimas que atuam na conversão da celulose em glicose. Portanto, os resultados da partição obtidos neste trabalho podem servir de ponto de partida para um estudo maior de otimização nos SABs, seja testando níveis diferentes ou estudando outros parâmetros que não foram testados, para se obter enzimas em proporções otimizadas e aplicá-las, de forma mais eficiente, na conversão de açúcares.

5 CONCLUSÃO

As metodologias empregadas nesse trabalho foram eficientes na caracterização dos sistemas bifásicos aquosos, compostos por PEG de diferentes massas molares e tampão citrato de sódio. Os diagramas de fase (binodais) construídos mostraram um aumento da região bifásica à medida que se aumentou a massa molar do polímero, em virtude do aumento da hidrofobicidade do mesmo. Além disso, conclui-se que as linhas de amarração de cada sistema são praticamente paralelas, podendo-se estabelecer um coeficiente angular médio, e que a massa molar do PEG não influenciou significativamente na inclinação e nem nos comprimentos das *tie-lines*.

Os SABs formados por PEG e citrato de sódio mostraram-se adequados como etapa de recuperação e purificação de celulasas obtidas da fermentação semissólida de resíduos de folhas. As variáveis de entrada (massa molar do PEG, razão de volume e comprimento de *tie-line*) estudadas neste trabalho conseguiram demonstrar influências estatísticas significativas na recuperação das enzimas a partir do caldo fermentado, disponibilizando condições de diferenciação entre pontos ótimos.

Através da análise do coeficiente de partição, a recuperação da CMC_{Case} demonstrou que a enzima particionou-se preferencialmente pela fase rica em sal (inferior), obtendo-se um K_{CMCase} mínimo de 0,31. Este mesmo ensaio foi acompanhado do maior fator de purificação ($PF^b = 7,73$) e rendimento de recuperação da atividade ($Y^b = 90,69\%$), quando se empregou condições operacionais de PEG (6000), V_r de 0,25 e TLL de 32,3. A razão de volumes e o comprimento de *tie-line* foram as variáveis estudadas neste trabalho que apresentaram os maiores efeitos estatísticos na partição da carboximetil celulase nos SABs.

Além das proteínas, a celulase total apresentou preferência pela fase superior, rica em PEG, obtendo-se coeficientes de partição máximos de $K_p = 4,20$ e $K_{FPase} = 2,69$. O ensaio que apresentou a maior partição da enzima foi acompanhado da melhor purificação ($PF^t = 2,80$) e recuperação da atividade ($Y^t = 86,79\%$), quando se empregou condições operacionais de PEG 4000, V_r de 0,75 e TLL 32,3. A razão de volume e a massa molar do PEG foram os fatores que mais influenciaram estatisticamente a partição da FPase no SABs.

As celulasas presentes no caldo fermentado e no preparado enzimático purificado demonstraram possuir potencial aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Os resíduos de folhas mostraram-se úteis na produção de glicose por meio da hidrólise enzimática, obtendo-se um valor máximo de 6,07 g/L, quando hidrolisado pela enzima purificada, e de 4,89

g/L quando hidrolisado pela enzima no extrato bruto. No geral, a enzima purificada apresentou uma melhor eficiência na hidrólise da biomassa, com uma produtividade máxima de glicose de 0,872 (g/L.h) frente a 0,650 (g/L.h) do extrato bruto. Com isso, pode-se concluir que a purificação nos sistemas bifásicos aquosos PEG/Citrato é uma excelente estratégia para a recuperação da celulase, tendo em vista que as mesmas não apresentaram perda de sua atividade catalítica.

Como sugestões para trabalhos futuros, podem-se destacar: a ampliação dos níveis do planejamento fatorial, através de comprimentos de *tie-lines* maiores e diferentes razões de volume, determinação de parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática, um estudo mais aprofundado da hidrólise da biomassa através de um planejamento fatorial, com inclusão de tempo, diferentes resíduos lignocelulósicos e manipulação da quantidade de unidades enzimáticas no processo, entre outros.

6 APÊNDICE

Tabela 14 - Composição em massa dos sistemas bifásicos empregas na purificação das celulases

E	MM (g/mol)	TLL	Vr	Citrato (%)	PEG (%)	H₂O (%)
1	4000	18,1	0,75	10,42	16,96	72,62
2	4000	18,1	0,50	12,50	12,94	74,56
3	4000	18,1	0,25	14,57	8,92	76,51
4	4000	25,2	0,75	9,65	19,97	70,38
5	4000	25,2	0,50	12,54	14,37	73,09
6	4000	25,2	0,25	15,43	8,77	75,79
7	4000	32,3	0,75	9,00	23,38	67,62
8	4000	32,3	0,50	12,71	16,21	71,08
9	4000	32,3	0,25	16,41	9,04	74,55
10	6000	18,1	0,75	10,36	16,58	73,05
11	6000	18,1	0,50	12,38	12,53	75,09
12	6000	18,1	0,25	14,39	8,48	77,13
13	6000	25,2	0,75	9,60	19,73	70,67
14	6000	25,2	0,50	12,40	14,09	73,51
15	6000	25,2	0,25	15,21	8,45	76,34
16	6000	32,3	0,75	8,95	23,29	67,76
17	6000	32,3	0,50	12,54	16,06	71,40
18	6000	32,3	0,25	16,13	8,83	75,03
19	8000	18,1	0,75	9,59	15,85	74,55
20	8000	18,1	0,50	11,61	11,80	76,59
21	8000	18,1	0,25	13,63	7,75	78,62
22	8000	25,2	0,75	9,00	19,07	71,93
23	8000	25,2	0,50	11,81	13,43	74,76
24	8000	25,2	0,25	14,62	7,79	77,59
25	8000	32,3	0,75	8,54	22,77	68,68
26	8000	32,3	0,50	12,14	15,54	72,31
27	8000	32,3	0,25	15,74	8,32	75,94

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOYE, A.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 568-574, 2015.

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 6, p. 51-57, 2016.

ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **Laboratory analytical procedure**, v. 6, n. 465, p. 1996, 1996.

AFONSO, L. C. **Produção de celulasas por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. Universidade de São Paulo

AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 148-154, 2016.

AJIJOLAKEWU, A. K.; LEH, C. P.; ABDULLAH, W. N. W.; KEONG LEE, C. Optimization of production conditions for xylanase production by newly isolated strain *Aspergillus niger* through solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 239-247, 2017.

ALIYAH, A.; ALAMSYAH, G.; RAMADHANI, R.; HERMANSYAH, H. Production of α -Amylase and β -Glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. **Energy Procedia**, v. 136, p. 418-423, 2017.

ALMEIDA, M. N.; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; RAMOS, H. J. D. O.; VISSER, E. M.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; DE REZENDE, S. T. Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource technology**, v. 143, p. 413-422, 2013.

ALVES, G. F. Solubilização do fosfato de rocha por *Aspergillus niger*. **Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia**, 2012.

AMID, M.; SHUHAIMI, M.; SARKER, M. Z. I.; MANAP, M. Y. A. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. **Food chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1382-1386, 2012.

ANDREAUS, J.; PINTO DA SILVA BON, E.; SANTANA FERREIRA-LEITÃO, V. **Enzyme technology in Brazil—A need and a challenge**: Taylor & Francis 2014.

ANTOV, M. G.; PERIČIN, D. M.; PEJIN, S. N. Pectinases partitioning in aqueous two-phase systems: an integration of the systems poly (ethylene glycol) crude dextran and poly (ethylene glycol) ammonium sulphate. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 69, n. 4, p. 299-307, 2004.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.

ARAKAWA, T.; KITA, Y.; SHIRAKI, K.; OHTAKE, S. The mechanism of protein precipitation by salts, polymers and organic solvents. **Global J Anal Chem**, v. 2, p. 152-167, 2011.

ARIAEENEJAD, S.; MOTAMEDI, E.; SALEKDEH, G. H. Stable cellulase immobilized on graphene oxide@ CMC-g-poly (AMPS-co-AAm) hydrogel for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Carbohydrate Polymers**, p. 115661, 2019.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826-8835, 2011.

AZABOU, S.; ABID, Y.; SEBII, H.; FELFOUL, I.; GARGOURI, A.; ATTIA, H. Potential of the solid-state fermentation of tomato by products by *Fusarium solani* pisi for enzymatic extraction of lycopene. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 280-287, 2016.

BARACHO, T. H. D. A.; DA SILVA, F. L. H.; NETO, A. B. T. UTILIZAÇÃO DE MATÉRIAS-PRIMAS LIGNOCELULÓSICAS PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO: ESTUDOS DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA PALMA FORRAGEIRA E DA DESTILAÇÃO DO HIDROLISADO FERMENTADO. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2009.

BARBOSA, A. A.; BONOMO, R. C.; MARTINS, C. V.; FONTAN, R. C.; JÚNIOR, E. C. S.; MINIM, L. A.; PIGNATA, M. C. Equilibrium Data and Physical Properties of Aqueous Two Phase Systems Formed by PEG (1500 and 4000) g·mol⁻¹+ Sodium Sulfate+ Water at Different Temperatures and pH 2. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 61, n. 1, p. 3-11, 2015.

BARROS, D. P.; CAMPOS, S. R.; AZEVEDO, A. M.; BAPTISTA, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Predicting protein partition coefficients in aqueous two phase system. **Journal of Chromatography A**, v. 1470, p. 50-58, 2016.

BARROS, T. V. F.; DO BONFIM, K. S.; DE MELO, A. L. M.; SANTOS, F. A.; DE MELO SANTOS, S. F. PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO FSDE3 EM CULTIVO SEMISSÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 164-173, 2014.

BASKARAN, D.; CHINNAPPAN, K.; MANIVASAGAN, R.; MAHADEVAN, D. K. Partitioning of crude protein from aqua waste using PEG 600-inorganic salt Aqueous Two-Phase Systems. **Chemical Data Collections**, v. 15, p. 143-152, 2018.

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.

BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; DE SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Purificação de amilases de malte de Zea mays. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 218-223, 2010.

BISPO, C. A. Produção e recuperação de celulases produzidas por *Trichoderma reesei* LCB 48 na fermentação semissólida da palma forrageira. **Tese de Doutorado (Engenharia Química) UFCG, Campina Grande**, 2015.

BOGGIONE, M.; BELÉN, A. M.; GEORGINA, B.; BEATRIZ, F. Potential use of soybean hulls and waste paper as supports in SSF for cellulase production by *Aspergillus niger*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 1-8, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUITRAGO, P. A. Production of reducing sugars from lignocellulosic kikuyu grass residues by hydrolysis using subcritical water in batch and semibatch reactors. **CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 7, n. 1, p. 137-146, 2017.

CARDOSO, W. S.; QUEIROZ, P. V.; TAVARES, G. P.; SANTOS, F. A.; SOARES, F. E. D. F.; KASUYA, M. C. M.; QUEIROZ, J. H. D. Multi-enzyme complex of white rot fungi in

saccharification of lignocellulosic material. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 4, p. 879-884, 2018.

CARDOZO, E.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; DE OLIVEIRA, E. B.; BONOMO, R. C. F. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 973, p. 84-88, 2014.

CARVALHO, T.; FINOTELLI, P. V.; BONOMO, R. C.; FRANCO, M.; AMARAL, P. F. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259-266, 2017.

CASTRO, A. M. D. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and biomass valorization**, v. 6, n. 6, p. 1085-1093, 2015.

CAVALCANTE, P. A. W.; COÊLHO, D. F.; SILVA, C. F.; DE SOUZA ABUD, A. K.; SOUZA, R. R. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, 2018.

CHEIRSILP, B.; KITCHA, S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 73-80, 2015.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, 2011.

COELHO, D. D. F. LLSR: Data analysis of liquid-liquid systems. **R package version 0.0.2.4**. Available on <http://diegofcoelho.github.io/LLSR/>, 2018.

COIMBRA, J. S. D. R.; ROJAS, E. E. G.; TEIXEIRA, J. Partitioning of glycomacropptide in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 11, p. 1213-1216, 2009.

CUNHA, F.; BACCHIN, A.; HORTA, A.; ZANGIROLAMI, T.; BADINO, A.; FARINAS, C. Indirect method for quantification of cellular biomass in a solidscontaining medium used as pre-culture for cellulase production. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 17, n. 1, p. 100-108, 2012.

DANTAS, S.; DE ARAÚJO PADILHA, C. E.; ASEVEDO, E. A.; PIMENTEL, V. C.; DE ARAÚJO, F. R.; DE MACEDO, G. R.; DOS SANTOS, E. S. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, n. 1, p. 937-944, 2018.

DHYANI, V.; BHASKAR, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**, v. 129, p. 695-716, 2018.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUSTET, J.; CARMENATE, M.; HARAMBOURE, T.; HERNÁNDEZ, O.; MARTÍNEZ, J. L. Obtención de celulasas de *Aspergillus niger*, técnica de cultivo y método de separación. **Cuba. Pág.**, p. 1-50, 2009.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; DE REZENDE, S. T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1586-1603, 2012.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FENILA, F.; SHASTRI, Y. Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, p. S96-S104, 2016.

FISCHER, J.; LOPES, V.; SANTOS, E.; GUIDINI, C.; RAMADAN, L.; CARDOSO, V. PURIFICAÇÃO DE COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *Aspergillus niger* USANDO SISTEMA AQUOSO DE DUAS FASES COM PEG-CITRATO. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 532-539, 2015.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082-1093, 2018.

FREIRE, L. A.; PEREIRA, C. G. Aqueous Two-Phase Systems Applied to Partition Proteins from Goat Milk Whey In-Nature. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 7, n. 09, p. 350, 2016.

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

GOJA, A. M.; YANG, H.; CUI, M.; LI, C. Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. **J. Bioprocess. Biotechnol.**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2013.

GONCALVES, F. A.; DOS SANTOS, E. S.; DE MACEDO, G. R. Use of cultivars of low cost, agroindustrial and urban waste in the production of cellulosic ethanol in Brazil: A proposal to utilization of microdistillery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1287-1303, 2015.

GOTTSCHALK, U. Bioseparation in antibody manufacturing: the good, the bad and the ugly. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 3, p. 496-503, 2008.

HANDA, C.; COUTO, U.; VICENSOTI, A.; GEORGETTI, S.; IDA, E. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food chemistry**, v. 152, p. 56-65, 2014.

HANDA, C. L.; DE LIMA, F. S.; GUELFY, M. F. G.; DA SILVA FERNANDES, M.; GEORGETTI, S. R.; IDA, E. I. Parameters of the fermentation of soybean flour by *Monascus purpureus* or *Aspergillus oryzae* on the production of bioactive compounds and antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 271, p. 274-283, 2019.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, 2018.

HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MACIEL, M. H.; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by *Aspergillus japonicus* URM5620 using PEG–citrate in an aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 8-13, 2012.

HO, S. L.; LAN, J. C.-W.; TAN, J. S.; YIM, H. S.; NG, H. S. Aqueous biphasic system for the partial purification of *Bacillus subtilis* carboxymethyl cellulase. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 276-281, 2017.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S.; SUKUMARAN, R. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource technology**, v. 242, p. 265-271, 2017.

ILARI, A.; FIORILLO, A.; ANGELACCIO, S.; FLORIO, R.; CHIARALUCE, R.; VAN DER OOST, J.; CONSALVI, V. Crystal structure of a family 16 endoglucanase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*—structural basis of substrate recognition. **The FEBS journal**, v. 276, n. 4, p. 1048-1058, 2009.

IQBAL, M.; TAO, Y.; XIE, S.; ZHU, Y.; CHEN, D.; WANG, X.; HUANG, L.; PENG, D.; SATTAR, A.; SHABBIR, M. A. B. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological procedures online**, v. 18, n. 1, p. 18, 2016.

JIN, X.; SONG, J.; LIU, G.-Q. Bioethanol production from rice straw through an enzymatic route mediated by enzymes developed in-house from *Aspergillus fumigatus*. **Energy**, p. 116395, 2019.

JOHANSSON, H.-O.; MAGALDI, F. M.; FEITOSA, E.; PESSOA JR, A. Protein partitioning in poly (ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography A**, v. 1178, n. 1-2, p. 145-153, 2008.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

KARBOUNE, S.; GERAERT, P.-A.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 3, p. 903-909, 2008.

KHAN, F.; AHMAD, S.; KRONFLI, E. γ -Radiation induced changes in the physical and chemical properties of lignocellulose. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 8, p. 2303-2309, 2006.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 903-917, 2014.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B. A.; BLANCH, H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.

KOUPAIE, E. H.; DAHADHA, S.; LAKEH, A. B.; AZIZI, A.; ELBESHBISHY, E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. **Journal of environmental management**, 2018.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LÁINEZ, M.; RUIZ, H. A.; CASTRO-LUNA, A. A.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, S. Release of simple sugars from lignocellulosic biomass of *Agave salmiana* leaves subject to sequential pretreatment and enzymatic saccharification. **Biomass and bioenergy**, v. 118, p. 133-140, 2018.

LI, X. Lignin-enzyme interaction: mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 4, p. 466-489, 2017.

LIMA, C. A.; JÚNIOR, A. C. F.; LIMA FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; MARQUES, D. A. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; PORTO, A. L. F. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical engineering journal**, v. 75, p. 64-71, 2013.

LIU, G.; QU, Y. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects. **Biotechnology advances**, 2018.

LOJEWSKA, E.; KOWALCZYK, T.; OLEJNICZAK, S.; SAKOWICZ, T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. **Protein expression and purification**, v. 120, p. 110-117, 2016.

MACHIDA, M.; GOMI, K. **Aspergillus: molecular biology and genomics**. Horizon Scientific Press, 2010. ISBN 1904455530.

MAI, H. T. N.; LEE, K. M.; CHOI, S. S. Enhanced oxalic acid production from corncob by a methanol-resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 9-15, 2016.

MARQUES, N. P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018.

MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F. M.; GARCÍA, B. D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 244, p. 48-56, 2017.

MARTINEZ, M.; SPITALI, M.; NORRANT, E. L.; BRACEWELL, D. G. Precipitation as an Enabling Technology for the Intensification of Biopharmaceutical Manufacture. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 237-241, 2019.

MENDES, F. B.; ATALA, D. I. P.; 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.

MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 711, n. 1-2, p. 285-293, 1998.

MEYER, H.-P.; SCHMIDHALTER, D. **Industrial scale suspension culture of living cells**. John Wiley & Sons, 2014. ISBN 3527683356.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

NAGARAJA, V. H.; IYYASWAMI, R. Aqueous two phase partitioning of fish proteins: partitioning studies and ATPS evaluation. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 6, p. 3539-3548, 2015.

NAMPOOTHIRI, K. M.; LARROCHE, C. **INDUSTRIAL BIOREFINERIES & WHITE BIOTECHNOLOGY**. Elsevier BV Publication, Amsterdam, 2015.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NASCIMENTO, M. B. Dados de Equilíbrio Líquido-Líquido de Sistemas Bifásicos Aquosos Compostos por PEG (1500 e 4000), Citrato de Sódio e Água e Aplicação na Partição de α -Amilase. **Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-Uesb. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos**, v. , 2017.

NEVES, M. L. C.; PORTO, T. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; SPIER, M. R.; SOCCOL, C. R.; MOREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F. Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 318, p. 34-39, 2012.

NG, H. S.; WANG, C.-C.; TAN, J. S.; LAN, J. C.-W. Primary recovery of recombinant human serum albumin from transgenic *Oryza sativa* with a single-step aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 84, p. 60-66, 2018.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OKEREKE, O.; AKANYA, H.; EGWIM, E. Purification and characterization of an acidophilic cellulase from *Pleurotus ostreatus* and its potential for agrowastes valorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 253-259, 2017.

OLIVEIRA, P. R.; DE CÁSSIA PEREIRA, J.; SANTOS, D. Q.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 173-181, 2017.

OLIVEIRA, S. D. D. Produção de celulases por *Aspergillus fumigatus* através da fermentação em estado sólido e recuperação e purificação por extração micelar em duas fases aquosas. 2018.

ONOFRE, B.; SILVA, G.; MATTIELLO, S. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus flavus* using solid state fermentation based on sugarcane bagasse. **Am J Biochem**, v. 3, p. 25-28, 2013.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2086-2100, 2014.

PASSOS, D.; PEREIRA, N.; DE CASTRO, A. M. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 2018.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource technology**, 2019.

PITARELO, A. P. Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. 2013.

PRABANINGTYAS, R. K.; PUTRI, D. N.; UTAMI, T. S.; HERMANSYAH, H. Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method

using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. **Energy Procedia**, v. 153, p. 242-247, 2018.

PRODANOVIĆ, J. M.; ANTOV, M. G. The influence of molecular weight of polyethylene glycol on separation and purification of pectinases from *Penicillium cyclopium* in aqueous two-phase system. **Acta Periodica Technologica**, n. 39, p. 193-199, 2008.

RAJA, S.; MURTY, V. R.; THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR, V.; RAMESH, V. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. **Sci Technol**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2011a.

_____. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2011b.

RAMANA, V. L.; REGUPATHI, I.; RASHMI, B.; BASAVARAJ, S. N. Partitioning of Nitralase Enzyme from *Pseudomonas putida* in Polymer/Salt Aqueous Two Phase System. In: (Ed.). **Biotechnology and Biochemical Engineering**: Springer, 2016. p.93-100.

RATAGLEKA, K. Recovery of biological products in aqueous two phase systems. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 1, n. 2, p. 191, 2010.

RATANAPONGLEKA, K. Recovery of biological products in aqueous two phase systems. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 1, n. 2, p. 191, 2010.

RATTANAPORN, K.; RODDECHA, S.; SRIARIYANUN, M.; CHEENKACHORN, K. Improving Saccharification of Oil Palm Shell by Acetic Acid Pretreatment for Biofuel Production. **Energy Procedia**, v. 141, p. 146-149, 2017.

REGUPATHI, I.; MURUGESAN, S.; GOVINDARAJAN, R.; AMARESH, S. P.; THANAPALAN, M. Liquid– liquid equilibrium of poly (ethylene glycol) 6000+ triammonium citrate+ water systems at different temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 54, n. 3, p. 1094-1097, 2009.

REINEHR, C.; RIZZARDIA, J.; SILVA, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

RIBEIRO, A. R.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; FERREIRA, L. A.; MARCOS, J. C.; SANTOS, I. J. B.; SALDAÑA, M. D.; TEIXEIRA, J. A. C. Partitioning of bovine lactoferrin in aqueous

two-phase system containing poly (ethylene glycol) and sodium citrate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 118-124, 2015.

ROSA, P.; FERREIRA, I.; AZEVEDO, A.; AIRES-BARROS, M. Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2296-2305, 2010.

SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M. A.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 18-25, 2012.

SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, L. B.; DE LIRA, T. S.; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1-6, 2019.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANKARAN, R.; CRUZ, R. A. P.; SHOW, P. L.; HAW, C. Y.; LAI, S. H.; NG, E.-P.; LING, T. C. Recent advances of aqueous two-phase flotation system for the recovery of biomolecules. **Fluid Phase Equilibria**, v. 501, p. 112271, 2019.

SANTOS, J. H.; FLORES-SANTOS, J. C.; MENEGUETTI, G. P.; RANGEL-YAGUI, C. O.; COUTINHO, J. A.; VITOLO, M.; VENTURA, S. P.; PESSOA JR, A. In situ purification of periplasmatic L-asparaginase by aqueous two phase systems with ionic liquids (ILs) as adjuvants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 7, p. 1871-1880, 2018.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143-149, 2016.

SHAJAHAN, S.; MOORTHY, I. G.; SIVAKUMAR, N.; SELVAKUMAR, G. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. **Journal of King Saud University-Science**, v. 29, n. 3, p. 302-310, 2017.

SILVA, L. H. M. D.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, 2006.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial cellulases in industrial applications. **Annals of Applied Bio-Sciences**, v. 3, n. 4, p. 23-29, 2016.

SOARES, O.; GOMES, M. H. G.; DE OLIVEIRA, R. L.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.

SOCOL, C. R.; DA COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.

SODRÉ, C. A. S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos. Dissertação de Mestrado.** 2007. Universidade Federal de Viçosa

SOLARTE, J. C.; ROMERO-GARCÍA, J. M.; MARTÍNEZ-PATIÑO, J. C.; RUIZ-RAMOS, E.; CASTRO-GALIANO, E.; CARDONA-ALZATE, C. A. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 587-601, 2019.

SOUSA, C. A.; DA SILVA, F. L.; CONRADO, L. D. S. Lixiviação de poligalacturonases obtidas pela fermentação semissólida da casca e albedo do maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 16, n. 7, 2012.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

SUAN, H.; TAN, C. P.; CHEN, S. K.; MOKHTAR, M. N.; ARIFF, A.; LING, T. C. Primary capture of cyclodextrin glycosyltransferase derived from *Bacillus cereus* by aqueous two phase system. **Separation and purification technology**, v. 81, n. 3, p. 318-324, 2011.

SUBSAMRAN, K.; MAHAKHAN, P.; VICHITPHAN, K.; VICHITPHAN, S.; SAWAENGKAEW, J. Potential use of vetiver grass for cellulolytic enzyme production and bioethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 261-268, 2019.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

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

TIAN, S.-Q.; ZHAO, R.-Y.; CHEN, Z.-C. Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 483-489, 2018.

VASCONCELLOS, V.; TARDIOLI, P.; GIORDANO, R.; FARINAS, C. Production efficiency versus thermostability of (hemi) cellulolytic enzymatic cocktails from different cultivation systems. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1701-1709, 2015.

WAGHMARE, P. R.; PATIL, S. M.; JADHAV, S. L.; JEON, B.-H.; GOVINDWAR, S. P. Utilization of agricultural waste biomass by cellulolytic isolate *Enterobacter* sp. SUK-Bio. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 5, p. 399-406, 2018.

WAN, P. K.; LAN, J. C.-W.; CHEN, P.-W.; TAN, J. S.; NG, H. S. Recovery of intracellular ectoine from *Halomonas salina* cells with poly (propylene) glycol/salt aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 82, p. 28-32, 2018.

WU, Z.; HU, G.; WANG, K.; ZASLAVSKY, B. Y.; KURGAN, L.; UVERSKY, V. N. What are the structural features that drive partitioning of proteins in aqueous two-phase systems? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 1, p. 113-120, 2017.

XIAOYUN, L.; XU, R.; YANG, J.; NIE, S.; LIU, D.; LIU, Y.; SI, C. Production of 5-hydroxymethylfurfural and levulinic acid from lignocellulosic biomass and catalytic upgradation. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 184-197, 2019.

XU, H.; CHE, X.; DING, Y.; KONG, Y.; LI, B.; TIAN, W. Effect of crystallinity on pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass based on multivariate analysis. **Bioresource technology**, v. 279, p. 271-280, 2019.

XU, J.; WANG, X.; LIU, X.; XIA, J.; ZHANG, T.; XIONG, P. Enzymatic in situ saccharification of lignocellulosic biomass in ionic liquids using an ionic liquid-tolerant cellulases. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 180-186, 2016.

XUE, D.; LIN, D.; GONG, C.; PENG, C.; YAO, S. Expression of a bifunctional cellulase with exoglucanase and endoglucanase activities to enhance the hydrolysis ability of cellulase from a marine *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 115-122, 2017.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T. Efficient and stable display of functional proteins on bacterial magnetic particles using Mms13 as a novel anchor molecule. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 1, p. 465-471, 2006.

YÜCEKAN, İ.; ÖNAL, S. Partitioning of invertase from tomato in poly (ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 226-232, 2011.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; BAO, J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. **Bioresource technology**, v. 203, p. 211-219, 2016.

ZHANG, J. Protein-protein interactions in salt solutions. In: (Ed.). **Protein-protein interactions-computational and experimental tools**: IntechOpen, 2012.

ZHANG, X.; ZHANG, F.; LUO, G.; YANG, S.; WANG, D. Extraction and separation of phycocyanin from *Spirulina* using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **J Food Nut Res**, v. 3, n. 1, p. 15-19, 2015.

ZHAO, G.; DING, L.-L.; PAN, Z.-H.; KONG, D.-H.; HADIATULLAH, H.; FAN, Z.-C. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. **Food chemistry**, v. 271, p. 606-613, 2019.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in energy and combustion science**, v. 42, p. 35-53, 2014.