

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

EMELLYN GABRIELA IORIS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CASCA DE SOJA PARA
OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CELULOSE E DE LIGNINA**

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2021

EMELLYN GABRIELA IORIS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CASCA DE SOJA PARA
OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CELULOSE E DE LIGNINA**

**Biotechnological potential of soybean hull for obtaining cellulose and
lignin nanoparticles**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof^o. Dr. Luis Fernando Marchesi

Coorientadora: Prof^a. Dra. Rosilene Aparecida Prestes

PONTA GROSSA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa**



EMELLYN GABRIELA IORIS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CASCA DE SOJA PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
CELULOSE E DE LIGNINA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 24 de Fevereiro de 2021

Prof Luis Fernando Quintino Pereira Marchesi, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Luiz Alberto Colnago, Doutorado - Embrapa

Prof Rafael Mazer Etto, Doutorado - Universidade Estadual de Ponta Grossa (Uepg)

Prof.a Rosilene Aparecida Prestes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 21/06/2021.

Dedico este trabalho àqueles que futuramente
poderão usufruí-lo de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos colegas de profissão que me incentivaram a continuar os estudos por meio da pós-graduação.

Agradeço aos meus orientadores Profa. Dra. Rosilene A. Prestes e Prof. Dr. Luis F. Marchesi, pelas instruções, recomendações e apoio nesta trajetória. Também ao Prof. Dr. Luis A. Pinheiro pelo auxílio na banca de qualificação e contribuição com as análises de laboratório.

Aos colegas que fiz amizade durante as etapas de todos os experimentos nos laboratórios, tanto da UTFPR quanto da UEPG, que me ajudaram a realizar procedimentos que para mim antes eram desconhecidos, especialmente à Luciana, que esteve comigo durante todo o início do curso, também à Mariely que me ajudou em uma etapa importante do trabalho, à Claudia, ao Jean, ao Felipe, e à todos aqueles que compartilharam momentos e que fizeram parte da construção da minha trajetória não só acadêmica, mas também pessoal.

À Secretaria do Curso, pela cooperação.

À UTFPR pela bolsa de mestrado.

Agradeço à minha família, pois sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio. Especialmente ao meu marido Luciano, que me auxiliou com os dados tratados no Excel, a usar as ferramentas que desconhecia e apoio frente às dificuldades que compartilhei durante toda a construção da minha trajetória.

Enfim, a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

RESUMO

IORIS, Emellyn Gabriela. **Potencial biotecnológico de casca de soja para obtenção de nanopartículas de celulose e de lignina.** 2021. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa), 2021.

Nesta dissertação foram estudados tratamentos diferentes para a produção de nanoestruturas de celulose e lignina utilizando a casca do grão de soja. Com a finalidade de utilizar uma metodologia eficiente para extrair celulose e lignina, sem gerar muito custo e causar o mínimo de impacto ambiental, transformando-a em um produto com valor agregado. Primeiramente, por meio de diluição seriada, foram isolados microrganismos da casca *in natura* com a técnica de estriamento até obtenção de culturas puras, e identificação dos mesmos com análise molecular. A ferramenta utilizada para comparar as sequências de consenso, foi o banco de dados internacional de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI), por meio da ferramenta BLAST. Após o pareamento com a base de dados do site, com porcentagem de 99,99 % de similaridade, foram identificados os microrganismos. Dois tratamentos foram realizados em fermentadores, com 30 gramas de casca e 220 mL de água deionizada, em triplicata, durante o período de 40 dias. O Tratamento 1, consistiu da ação de microrganismos presentes na casca para degradar celulose, lignina, hemicelulose e o Tratamento 2, a casca passou por um pré-tratamento com ácido acético (Acetosolv), para extrair a lignina, e foi inoculado os microrganismos isolados para o processo de hidrólise enzimática. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para separar a fase sólida da líquida, e a parte líquida foi utilizada para análise de concentração (teste gravimétrico), e caracterização (MEV e DRX). Os microrganismos identificados, foram os fungos *Aspergillus flavus*, *Lichtheimia ramosa* e *Lentinus crinitus*. A partir dos resultados da concentração, avaliou-se que o tratamento 1 (nanocelulose e nanolignina) apresentou valores maiores e conseqüentemente maior concentração, diferentemente do tratamento 2 (nanocelulose), onde a lignina estava ausente. Com os resultados de DRX, constatou-se que em ambos os tratamentos se obteve nanocelulose e nanolignina em menor quantidade. Os resultados da Microscopia de Varredura, mostraram que nos períodos de 20 e 25 dias de hidrólise em ambos os tratamentos, obteve-se nanoestruturas de celulose e lignina. Os microrganismos isolados foram depositados na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB) da UTFPR- Campus Ponta Grossa. A metodologia utilizada propiciou destinar um resíduo agroindustrial para pesquisa agregando valor ao substrato, e contribuir na área de nanoestruturas de celulose e lignina com uma base biotecnológica.

Palavras-chave: Casca de soja. Nanocelulose. Nanolignina. Hidrólise enzimática. Fungo.

ABSTRACT

IORIS, Emellyn Gabriela. **Biotechnological potential of soybean hull for obtaining cellulose and lignin nanoparticles**. 2021. 85 p. Thesis (Master's Degree in Biotechnology - Federal Technology University – Paraná), Ponta Grossa, 2021.

In this dissertation, different treatments for the production of cellulose and lignin nanostructures using soybean husk were studied. In order to use an efficient methodology to extract cellulose and lignin, without generating a lot of cost and causing a minimum of environmental impact, transforming it into a product with added value. First, by means of serial dilution, microorganisms were isolated from the fresh skin with the streaking technique until obtaining pure cultures, and their identification with molecular analysis. The tool used to compare the consensus sequences was the international nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI), through the BLAST tool. After pairing with the website's database, with a 99.99% similarity percentage, microorganisms were identified. The treatments were carried out in fermenters, with 30 grams of bark and 220 mL of deionized water, in triplicate, during the period of 40 days. Two treatments, Treatment 1, consisted of the action of microorganisms present in the peel to degrade cellulose, lignin, hemicellulose and Treatment 2, the peel went through a pretreatment with acetic acid (Acetosolv), to extract the lignin, and was inoculated the microorganisms isolated for the enzymatic hydrolysis process. Then, the samples were centrifuged to separate the solid phase from the liquid, and the liquid part was used for analysis of concentration (gravimetric test), and characterization (SEM and XRD). The microorganisms identified were the fungi *Aspergillus flavus*, *Lichtheimia ramosa* and *Lentinus crinitus*. From the results of the concentration, it was evaluated that treatment 1 (nanocellulose and nanolignin) showed higher values and, consequently, higher concentration, unlike treatment 2 (nanocellulose), where lignin was absent. With the results of XRD, it was found that in both treatments, nanocellulose and nanolignin were obtained in a smaller amount. The results of the Scanning Microscopy, showed that in the periods of 20 and 25 days of hydrolysis in both treatments, nanostructures of cellulose and lignin were obtained. The isolated microorganisms were deposited in the Microbiological Collection of Biotechnological Interest (CMIB) of UTFPR- Campus Ponta Grossa. The methodology used made it possible to allocate an agro-industrial residue for research, adding value to the substrate, and to contribute in the area of cellulose and lignin nanostructures with a biotechnological basis.

Keywords: Soybean husk. Nanocellulose. Nanolignin. Enzymatic hydrolysis. Fungus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração de uma fibra vegetal, com as respectivas estruturas da microfibrila.....	16
Figura 2 - Representação dos principais tipos de nanocelulose: nanocristalina.....	17
à esquerda e nanofibrilar à direita.....	17
Figura 3 - Esquema ilustrativo da ação catalítica do complexo enzimático (celulase sobre celulose com geração de glicose).....	21
Figura 4 - Fases do crescimento microbiano.....	23
Figura 5 - Esquema representando estrutura de nanopartículas, correspondente ao tamanho, material, forma e superfície.....	27
Figura 6 - Aspecto da casca do grão de soja.....	28
Figura 7 - Fluxograma da metodologia para produção de nanoestrutura a partir da casca do grão de soja, subdividida em três etapas.....	29
Figura 8 - Estufa com os frascos no momento do processo fermentativo do tratamento 1, contendo a casca de soja adicionada em água e incubada a 30 °C....	35
Figura 9 - Fungo isolado da casca de soja, <i>Aspergillus flavus</i> (A). Estrutura macromorfológica (canto superior esquerdo), micromorfológica - aumento de 400x em Microscópio Ótico (canto inferior esquerdo) e estruturas de esporos reprodutivos em MEV - aumento de 10 KV (à direita).....	40
Figura 10 - Fungo isolado da casca de soja, <i>Lichtheimia ramosa</i> (B). Estrutura macromorfo-lógica (canto superior esquerdo), micromorfológica - aumento de 400x em Microscópio Ótico (canto inferior esquerdo) e estruturas de esporos reprodutivos em MEV - aumento de 10 KV (à direita).	41
Figura 11 - Fungo isolado da casca de soja, <i>Lentinus crinitus</i> (C). Estrutura macromorfológica (canto superior esquerdo), micromorfológica - aumento de 400x em Microscópio Ótico (canto inferior esquerdo) e estruturas de esporos reprodutivos em MEV - aumento de 10 KV (à direita).....	42
Figura 12 - Resultado do procedimento de coloração com vermelho congo para cálculo do índice enzimático de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Lentinus crinitus</i> (B) e <i>Lichtheimia ramosa</i> (C).....	45
Figura 13 - Micrografias de hidrólise enzimática de 24h da casca de soja do Tratamento 1 (T1), em visualização de 15kV. Contraste de coloração branca em A (distância de 100 um) e B (distância de 2 um).....	53
Figura 14 - Micrografias de nanofibras de celulose com 48h de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento 1 (T1), em visualização de 15kV. Contraste de coloração branca em A e B.....	54
Figura 15 - Micrografias de nanofibras de celulose de 72h de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento 1 (T1), em visualização de 15kV. A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.....	55
Figura 16 - Micrografias de nanocristais de celulose com 10 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento 1 (T1). Contraste de coloração branca em A (distância de 100 um) e B (distância de 2 um).....	56

Figura 17 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T1), em diluição de 1:5. A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.....	57
Figura 18 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T1), em diluição de 1:10. A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.....	58
Figura 19 - Micrografias de nanoestruturas de celulose e lignina de 10 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.....	59
Figura 20 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 15 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.....	60
Figura 21 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 20 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.....	61
Figura 22 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C, D, E e F correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.....	62
Continuação das micrografias da Figura 22, de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2).....	63
Figura 23 - Difratoograma da hidrólise enzimática da casca de soja referente ao tratamento 1. Correspondente de 10 até 30 dias. O pico em torno de 20° no eixo 2 θ indica a estrutura da celulose.....	65
Figura 24 - Difratoograma da hidrólise enzimática da casca de soja referente ao tratamento 2. Correspondente de 10 até 30 dias. O pico em torno de 18 e 20° no eixo 2 θ indica a estrutura da celulose.....	65
 Quadro 1 - Composição (em gramas) do meio mineral com ágar, utilizado para crescimento e manutenção dos microrganismos presentes na casca do grão de soja (por litro).....	 30
 Tabela 1 - Atividade celulósica em meio sólido dos microrganismos isolados da casca de soja.....	 45
 Gráfico 1 - Gráfico de crescimento micelial de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Lichtheimia ramosa</i> e <i>Lentinus crinitus</i> , durante o período de 15 dias de incubação, com as respectivas fases de crescimento: 1(LAG), 2 (LOG), 3 (Estacionária) e 4 (Declínio).....	 46
Gráfico 2 - Resultado do teste gravimétrico dos tratamentos 1 e 2 de hidrólise enzimática da casca de soja.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 GERAL.....	13
2.2 ESPECÍFICOS.....	13
3 Revisão de literatura.....	14
3.1 RESÍDUO DA CASCA DO GRÃO DE SOJA.....	14
3.2 CELULOSE E LIGNINA.....	15
3.3 HIDRÓLISE.....	18
3.4 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE CELULOSE.....	21
3.5 NANOTECNOLOGIA.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 AMOSTRA.....	28
4.2 CASCA DO GRÃO DE SOJA.....	28
4.3 FLUXOGRAMA.....	28
4.4 ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO.....	29
4.4.1 Diluição Seriada.....	29
4.4.2 Identificação dos Microrganismos.....	31
4.4.3 Índice Enzimático de Celulase.....	31
4.4.4 Curva de Crescimento.....	32
4.5 PROCESSO FERMENTATIVO.....	33
4.5.1 Hidrólise enzimática.....	33
4.5.2 Tratamentos aplicados à biomassa.....	33
4.5.2.1. Tratamento 1.....	34
4.5.2.2. Tratamento 2.....	35
4.5.2.2.1. Pré-inóculo.....	35
4.5.2.2.2. Inóculo.....	36
4.6 SECAGEM DA AMOSTRA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	36
4.6.1 Spray-Dryer.....	36
4.7 ANÁLISE QUÍMICA.....	37
4.7.1 Teste Gravimétrico.....	37
4.8 ANÁLISES INSTRUMENTAIS.....	37
4.8.1 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	37
4.8.2 Difração de Raios X (DRX).....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
5.1 MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS.....	39
5.1.1 Índice Enzimático.....	44
5.1.2 Curva de Crescimento.....	45
5.1.3 Teste Gravimétrico.....	47
5.2 MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).....	49
5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	63
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO A - Sequência de consenso de <i>Aspergillus flavus</i>.....	79
ANEXO B - Sequência de consenso de <i>Lichteima ramosa</i>.....	81

ANEXO C - Sequência de consenso de <i>Lentinus crinitus</i>.....	83
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista a grande abundância de recursos naturais existentes no Brasil, o país tem propriedade de uma ampla gama de fontes com potencial para gerar produtos de valor agregado. Dessa forma, fontes lignocelulósicas, como os resíduos agroindustriais, destacam-se como uma interessante fonte para explorar os principais componentes estruturais como a celulose, lignina e hemicelulose.

Em geral, a celulose e os outros constituintes servem como os blocos de construção das fibras vegetais, cuja função é agir como barreira natural à degradação microbiana e servir como proteção mecânica, mas para que possam ser utilizados industrialmente, é preciso extraí-los. O entendimento dos processos de fracionamento das fibras se torna necessário para possibilitar a utilização destes componentes estruturais em especificidades diferentes.

Devido às complexas interações da natureza cristalina da celulose e a barreira física formada por ligninas sob as fibras celulósicas, a biomassa requer um pré-tratamento quando se pretende dissociar a matriz extracelular da lignina, e reduzir a cristalinidade da celulose. Para que os componentes que fazem parte da composição estrutural da parede celular sejam separados, a hidrólise enzimática da celulose e lignina, é uma operação fundamental na conversão bioquímica, e possibilita acesso ao produto final de interesse (LAMSAL; SHRESTHA; KHANAL, 2010).

Para tal, no presente trabalho foi utilizado um método de extração de nancelulose e nanolignina de um substrato proveniente de um resíduo agroindustrial, a casca do grão de soja, onde para a separação das fibras vegetais e seus constituintes foram hidrolisadas enzimicamente a partir da ação de microrganismos. Com o intuito de propor uma metodologia menos agressiva/sustentável, pois geralmente utiliza-se a extração com ácidos fortes, o que geram mais resíduos ao meio ambiente, e podem causar corrosão ao equipamento.

Paralelamente ao processo de hidrólise enzimática, buscou-se estudar o melhor período para obtenção de nanopartículas, para que fosse possível mensurar qual era o mais eficiente. No esforço de encontrar aplicações atraentes, transformá-los estruturalmente sem modificar suas propriedades, atribui características mecânicas excepcionais como as nanoestruturas, que contém propriedades

térmicas, mecânicas e de barreira superiores em relação ao polímero puro ou compósitos convencionais (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Desta forma, durante o período de 40 dias, avaliou-se instrumentalmente por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e Raio X, e quimicamente por meio de concentração, a presença de nanocelulose e nanolignina. Com o uso de dois tratamentos, sendo um com a casca do grão de soja *in natura* e outro com pré-tratamento Acetosolv (extração da lignina), para comparar se a presença ou ausência da lignina interfere na obtenção das nanoestruturas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produzir nanoestruturas de celulose e lignina a partir de casca do grão de soja, por metodologia de hidrólise enzimática e consórcio de microrganismos.

2.2 ESPECÍFICOS

Para cumprir o objetivo principal foram realizadas as seguintes etapas:

- Utilizar a casca do grão de soja como matéria-prima para produção de nanoestruturas;
- Bioprospectar os microrganismos presentes na casca do grão de soja capazes de realizar a hidrólise enzimática nos biopolímeros;
- Aplicar métodos quantitativos e qualitativos para descrição das nanoestruturas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RESÍDUO DA CASCA DO GRÃO DE SOJA

Os significativos avanços no desempenho do agronegócio implicaram no aumento do consumo de insumos e da geração de resíduos na atividade agroindustrial. A geração de resíduos está associada ao desperdício dos materiais gerados ao longo da cadeia agroindustrial que não possuem valor econômico evidente. O resíduo agroindustrial vegetal aumenta o potencial poluidor associado à disposição inadequada, que além da poluição de solos e de corpos hídricos quando da lixiviação de compostos, pode acarretar problemas de saúde pública, mostrando-se imediata a necessidade de mudar este cenário, pois a geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo (ROSA et al., 2011).

A *Glycine max* (soja), é uma das cinco espécies mais produzidas do mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial do grão. Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, respectivamente, são os estados que mais produzem em nível nacional. Mostrando ser uma importante fonte de economia, pois a partir desse vegetal se extraem vários derivados como o óleo, mistura para alimentos, ração animal, entre outros. Entre os anos de 2018/19 foram produzidas mais de 362 milhões de toneladas de soja no mundo (CONAB, 2020).

Diante dessa quantidade de produção, para cada tonelada de soja processada são gerados 50 kg de casca do grão de soja, um grande volume de resíduos gerados todos os anos. Este material comumente usado como alimento para gado, também pode ser queimado ou deixado no campo para evitar a erosão do solo. Outras possíveis aplicabilidades da casca do grão de soja como matéria-prima incluem a produção de polímeros, fibras, energia, biocombustíveis, adsorventes e substrato para processos de fermentação (RAMBO; SCHMIDT; FERREIRA, 2015).

A casca do grão de soja é considerada uma fonte secundária de celulose, por ser um subproduto não processado, um resíduo de atividade agrícola, representa 7 a 8 % do peso do grão (GARCÍA et al., 2016). Com relação à sua composição química, a casca do grão de soja é a parte que apresenta a maior

concentração de carboidratos, cerca de 86%, 9% de proteínas, 1% de lipídios e 1% de cinzas (com base na massa seca). A celulose e a hemicelulose representam 35,8% e 23,1% do peso seco total da casca do grão de soja, respectivamente. A lignina, por sua vez, é responsável por 9,1% do peso. Também possui alto teor de ferro (cerca de 32%), e alto teor de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) (ZAMBOM et al., 2001; DE PRETTO et al., 2018).

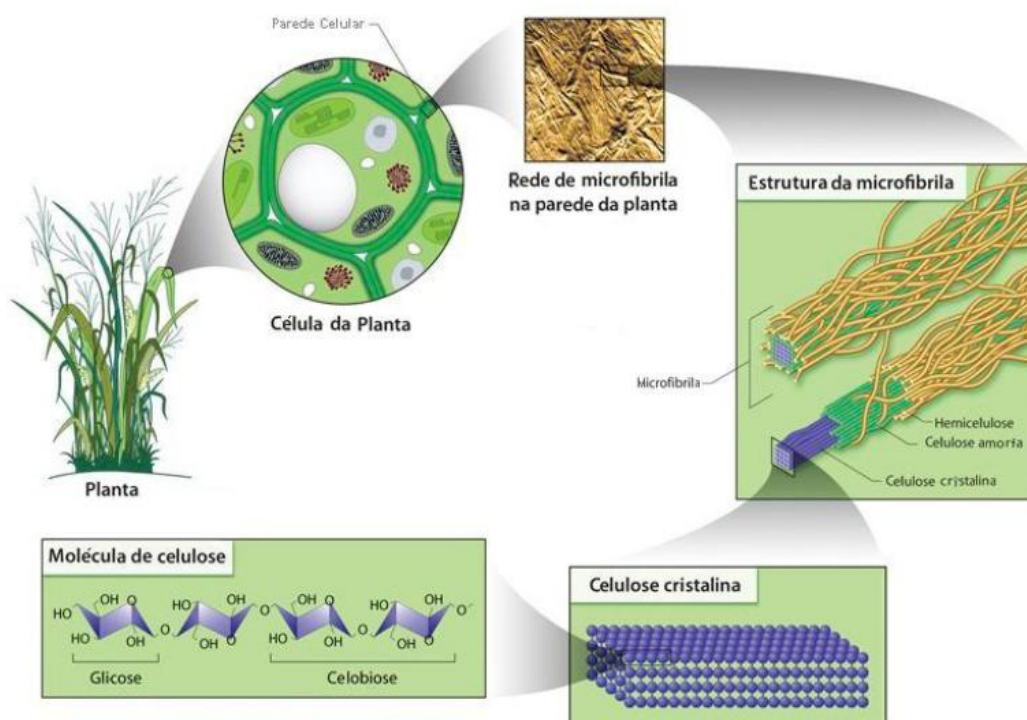
Com a valorização do processo de aproveitamento dos resíduos agroindustriais, tornou-se necessário a manipulação de técnicas para utilização como fonte energética. Desta forma, processos de como otimizar o vegetal foram desenvolvidos para catalisar a celulose, que devido ao alto teor de carboidratos da casca do grão de soja, sua estrutura complexa requer atividades enzimáticas de hidrólise, e assim a torna um recurso atraente para reaproveitamento (ISLAM et al., 2017).

Os resíduos da soja podem ser beneficiados por meio de vários processos diferentes: combustão direta para energia térmica, pirólise, gaseificação, digestão anaeróbica para produção de hidrogênio e fermentação. Com o seu alto teor de celulose, o resíduo da soja pode ser usado para a produção de bioetanol de segunda geração e muitos outros produtos obtidos pela fermentação de açúcares. Para esse fim, a celulose deve ser degradada em sua unidade fundamental, a glicose, e isso geralmente se alcança por hidrólise ácida ou enzimática (DE PRETTO et al., 2018).

3.2 CELULOSE E LIGNINA

Em geral, a celulose e outros constituintes não celulósicos servem como blocos de construção das fibras vegetais. A celulose é o principal componente dessas fibras e pode ser extraída naturalmente, podendo constituir cerca de 30 % do vegetal. É um biopolímero quase inesgotável, pois é considerado o composto mais abundante na Terra (BARRAGÁN, 2019). Possui partes amorfas e cristalinas em sua estrutura, onde estão presentes a lignina, hemicelulose, e outros compostos, moldando a configuração da malha vegetal (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). A Figura 1 ilustra os principais componentes estruturais das fibras vegetais.

Figura 1 - Ilustração de uma fibra vegetal, com as respectivas estruturas da microfibrila.

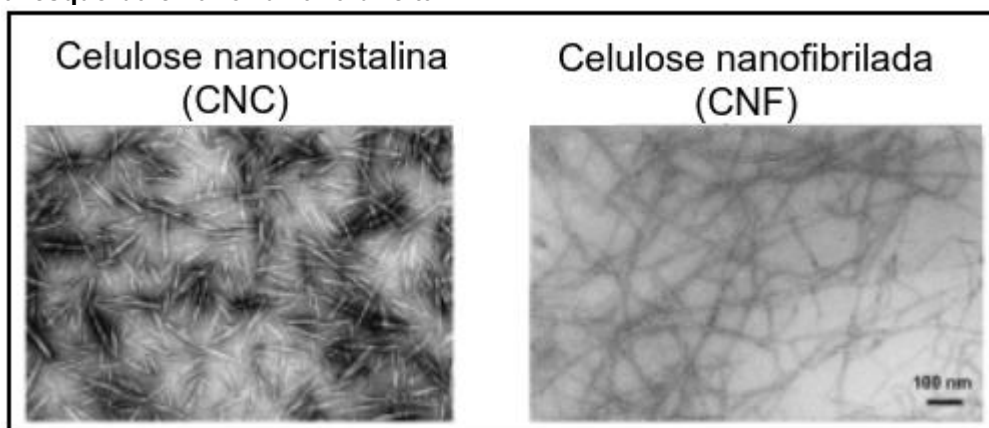


Fonte: Adaptado de Souza, (2014).

A configuração das microfibrilas na parede celular existe como um conjunto semelhante a uma malha, onde cada microfibrila é conectada uma à outra por agente aglutinante, a hemicelulose. Uma fibra de celulose consiste em feixes de fibras de celulose individuais, que têm diâmetros de 25-30 μm . Essa única fibra de celulose é composta por feixes de microfibrilas, que têm diâmetros de 0,1–1 μm e consiste em cadeias contínuas de celulose com conteúdo insignificante de lignina e hemiceluloses, com um comprimento mínimo correspondente entre 2–20 μm (ISLAM et al., 2014).

Existem dois tipos de celulose que podem ser extraídos da biomassa vegetal, os nanocristais de celulose (CNCs) e nanofibras de celulose (CNFs) (Figura 2). Os CNCs são um tipo de nanowhiskers e os CNFs são referidos à celulose nanofibrilar, com dimensões abaixo de 1 μm (BARRAGÁN, 2019). Essas nanopartículas ocorrem como nanocristais ou estruturas semelhantes a bastões. Suas dimensões geométricas dependem da origem do substrato de celulose e das condições de hidrólise. Cada arranjo pode ser considerado como um cristal de celulose (DUFRESNE, 2013).

Figura 2 - Representação dos principais tipos de nanocelulose: nanocristalina à esquerda e nanofibrilar à direita.



Fonte: Adaptado de Ilyas et al., (2018).

Já a lignina, atua como a estrutura da matriz, composta de polímero fenólico e ocupa o espaço entre os compostos de celulose, hemicelulose e pectina (MISHRA; SABU; TIWARI, 2018). Sendo o biopolímero mais disponível depois da celulose, está ganhando importância devido à demanda do aumento do uso em substituição aos materiais tradicionais à base de petróleo, reconhecido como compósito biodegradável (JUIKAR; VIGNESHWARAN, 2017).

Possui uma estrutura tridimensional altamente ramificada, sendo este um fator limitante para extraí-la, pois forma uma barreira física que restringe o acesso (LIN et al., 2010). Também possui uma solubilidade muito limitada, e complexidade estrutural com distribuições de peso molecular muito amplas e uma microestrutura complexa (WURM; WEISS, 2014). Desta forma, a valorização da lignina é um fator chave para ampliar os meios de extraí-la. Apenas microrganismos específicos são capazes de realizar a degradação da lignina sem o uso de solventes químicos, como os fungos da podridão branca (*Sclerotium cepivorum*), que são os mais eficientes na degradação da lignina (BRUIJNINCX; RINALDI; WECKHUYSEN, 2015; JUIKAR; VIGNESHWARAN, 2017).

Existem alguns tratamentos com ácidos que realizam a extração de lignina do substrato, como a utilização de ácido diluído, hidróxido de sódio e organosolv (SANTOS et al., 2012). Organosolv, utiliza de solventes orgânicos recuperáveis, como acetona, etanol, ácido acético, entre outros, uma vez que não há formação de produtos sulfatados. Nesse método, a lignina obtida por meio do processo é insolúvel em água sendo de fácil separação (SOUZA, 2014).

Outras técnicas também podem ser utilizadas, de uma forma menos agressiva e poluente para o meio ambiente, como a hidrólise enzimática, que corresponde a um processo onde os ingredientes são biodegradáveis e ecologicamente corretos. Realizada sem a utilização de solventes industriais, apenas em um processo que se baseia no efeito biológico onde os responsáveis são microrganismos capazes de clivar as estruturas da parede celular vegetal (VAZQUEZ et al., 2000).

3.3 HIDRÓLISE

Processo responsável por quebrar as macroestruturas de determinada matéria-prima, podendo estar na presença de catalisadores e água, para transformar em microestruturas. Ocorre a degradação dos compostos em tamanhos menores, proporcionando ao substrato uma área de superfície aumentada. Quando aplicado em materiais de substrato celulósicos, por exemplo, a partir de fontes naturais, são transformados em CNFs e até CNCs (MISHRA; SABU; TIWARI, 2018).

Existem três tipos de hidrólise: ácida, alcalina e enzimática, que podem ser usadas como tratamento. A escolha de qual tipo de hidrólise será usada, interfere no tratamento. A hidrólise por ácido pode ser classificada em dois grupos, com ácidos concentrados ou com ácidos diluídos. A utilização de ácidos concentrados é menos atraente, devido à maior formação de compostos inibidores. Além disso, problemas de corrosão do equipamento e recuperação de ácido são desvantagens importantes ao usar pré-tratamentos com ácidos concentrados. Usa-se a hidrólise ácida para o pré-tratamento de materiais celulósicos, amidos ou hemicelulósicos, para quebrar os polissacarídeos em açúcares simples (TOMÁS-PEJÓ et al., 2010).

Há também o pré-tratamento denominado organosolv, onde utiliza ácidos fracos ou solventes orgânicos (etanol, metanol, etilenoglicol, acetona, glicerol, álcool tetra-hidrofurfurílico, etc.) para extrair lignina e fornecer celulose mais acessível. O solvente orgânico é misturado com água em várias porções, adicionado à biomassa e depois aquecido a temperaturas variando de 100 a 250°C. O pré-tratamento com organosolv produz um substrato de celulose altamente digerível a partir de quase todos os tipos de matérias-primas. Outro benefício do pré-tratamento com

organosolv, é que a remoção da lignina minimiza os problemas de absorção das enzimas celulolíticas na lignina, o que se reflete nos requisitos mais baixos de dosagem de enzimas (TOMÁS-PEJÓ et al., 2010).

Já a hidrólise enzimática, corresponde a um processo que apresenta reações catalisadas por enzimas que podem ser industriais ou biológicas (produzidas por microrganismos), onde são proteínas especializadas em catalisar uma reação química, aumentando a velocidade sem interferir no processo. Sendo um sistema para obter produtos gerados por fermentação, apresentam a capacidade de reagir com os substratos, formando complexos enzima-substrato com formação do produto (CRUZ, 2017).

A técnica abrange a degradação de materiais orgânicos sem a utilização de ácidos ou solventes industriais, que viabiliza a união de microrganismos e água para a hidrólise. As enzimas geram uma atividade de metabólitos produzidos pelos microrganismos, e em resposta à associação ocorre a degradação da biomassa. As vantagens da hidrólise enzimática são a economia de custos de energia, devido às condições de reação relativamente pequenas e a prevenção do uso de produtos químicos tóxicos e corrosivos (DE PRETTO et al., 2018). As preparações enzimáticas geralmente contêm as principais enzimas hidrolíticas importantes para esses processos, como a poligalacturonase, a celulase e a hemicelulase (COURI, 2000).

Algumas linhagens de fungos filamentosos, que produziram enzimas hidrolases (xilanase, endoglucanase, amilase e poligalacturonase) em substrato de resíduos agroindustriais, foram estudados por Stroparo et al., (2012), onde obtiveram a maior produção de xilanases em bagaço de malte, demonstrando a viabilidade da ação das enzimas em substratos agroindustriais.

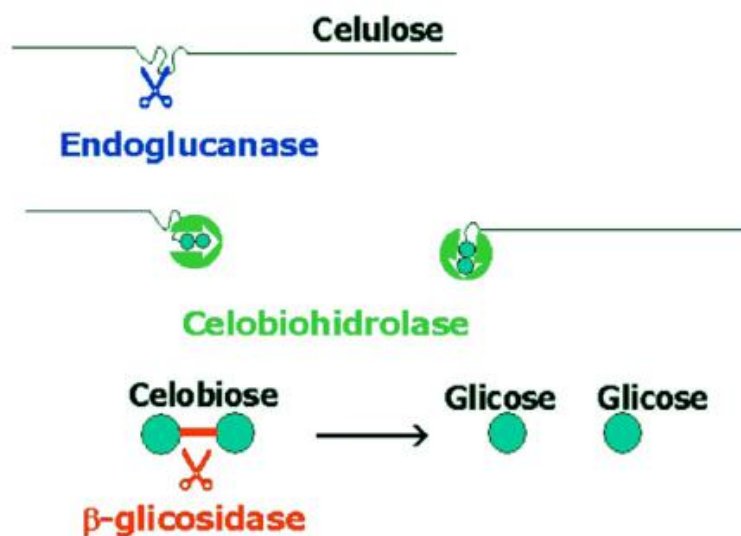
A produtividade enzimática da reação de hidrólise é definida pelo microrganismo, as condições de cultivo e o tempo de atividade. Como as reações são conduzidas sob condições brandas (pH entre 4 e 5 e temperaturas entre 40 e 50°C), não existem problemas associados à corrosão de reatores, os custos de energia elétrica são menores e a toxicidade dos reagentes é muito baixa. Por estes motivos, a hidrólise enzimática torna-se um processo atrativo e vantajoso para ser utilizado na obtenção de nanocristais e nanofibras de biomassas lignocelulósicas, onde conforme o tempo da hidrólise, o processo de quebra molecular da celulose se torna mais eficaz (CRUZ, 2017).

A biomassa celulósica não se degrada por uma única enzima, mas por um conjunto delas, como as celulases. Estas podem ser categorizadas como celulases dos tipos A e B, denominadas celobiohidrolases (exoglucanases) e celulases dos tipos C e D ou endoglucanases. As celobiohidrolases podem se ligar a celulose altamente cristalina, enquanto as endoglucanases geralmente requerem algum distúrbio na estrutura para degradar a celulose. As celobiohidrolases e endoglucanases mostram fortes efeitos sinérgicos para facilitar a desintegração da celulose microfibrilada (ISLAM et al., 2014).

A degradação enzimática da celulose é dependente de vários fatores tais como a superfície disponível do substrato de celulose, temperatura de reação e a duração da atividade enzimática (GEORGE et al., 2011 apud CRUZ, 2017). Assim, com a separação das estruturas vegetais, a celulose reduz a cristalinidade, proporcionando melhor degradação das moléculas.

A Figura 3 representa de forma simplificada a ação enzimática de cada classe de enzimas. Sendo as endoglucanases atuando randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas. As celobiohidrolases atuando nos terminais redutores das cadeias de celulose, liberando celobiose. E as β -glucosidases catalisam a liberação de unidades monoméricas de glicose a partir da celobiose e celodextrinas solúveis (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999; LI; CONVERSE; WYMAN, 2003 apud OGEDA; PETRI, 2010).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da ação catalítica do complexo enzimático (celulase sobre celulose com geração de glicose).



Fonte: Tebeka; Silva; Petri (2009) apud Ogeda; Petri (2010).

3.4 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE CELULOSE

Os microrganismos são importantes ferramentas para otimizar o processo de aproveitamento de resíduos agroindustriais, pois são organismos fáceis de manusear e tem uma manutenção de baixo custo. Esses resíduos utilizados como substratos das fermentações, representam uma importante fonte alternativa para o crescimento microbiano e produção de enzimas. Estes são de interesse industrial favorecidos pela complexidade nutricional deste tipo de resíduo, agregando valor à cadeia produtiva e contribuindo com a viabilidade econômica do processo (PEREIRA, 2016).

A atuação de microrganismos altera a estrutura cristalina de materiais celulósicos, como os resíduos agroindustriais, e pode oferecer um avanço na obtenção de uma decomposição rápida da celulose por suas enzimas degradantes (WADA; IKE; TOKUYASU, 2010). A celulose é um composto insolúvel, formada por unidades repetidas de moléculas de glicose (celobiose), que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular (SILVA et al., 2009). A hemicelulose, uma fibra interligada, interage muito mais fortemente com a celulose e torna a rede mais rígida. A lignina (região amorfa), covalentemente ligada a

polissacarídeos, possui características que reduz a área superficial acessível da celulose (BALLESTEROS, 2010).

A intervenção biológica como opção de tratamento para a separação destes compostos, como os microrganismos degradadores de celulose, tanto bacterianos quanto fúngicos, possibilita realizar a dissociação das fibras constituintes. Estes utilizam a celulose por meio da produção de enzimas celulases extracelulares, e realizam o processo. Uma das vantagens da cultura mista pode estar na sobrevivência de algumas espécies de crescimento lento (como os degradadores de lignina) que podem utilizar alguns dos sacáridos liberados pelos organismos enquanto degradam a lignina (DATTA, 1981).

Capazes de desestruturar as fibras da parede celular, estes microrganismos fazem esse processo por meio da hidrólise enzimática, com o enfraquecimento gradual da correlação interfibrilar da biomassa e o aumento da proporção de estruturas menores, onde as enzimas são capazes de hidrolisar completamente os segmentos fibrílicos, deixando-os mais suscetíveis para a completa degradação (PENTTILÄ et al., 2013).

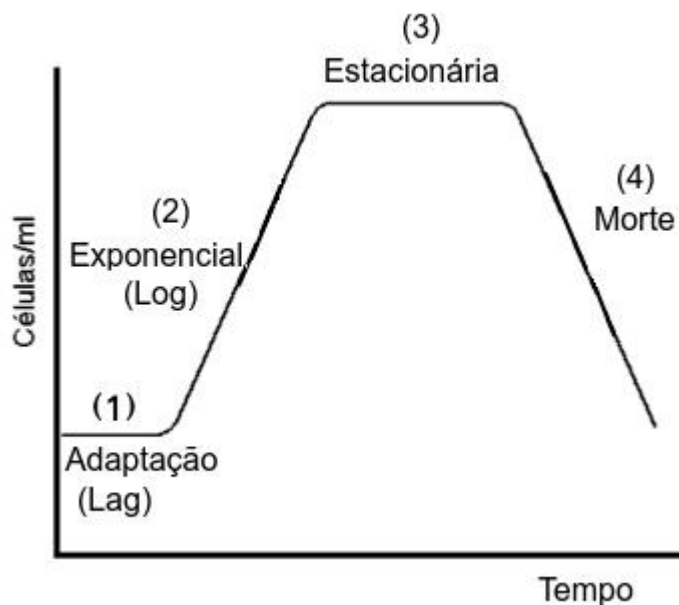
Microrganismos que participam de processos hidrolíticos, possuem um ciclo de vida, o qual tem relação com o rendimento da hidrólise. As fases de vida do crescimento dos microrganismos no substrato afetam o conteúdo de fibra bruta e proteína bruta. A fase de vida do organismo é dividida em 4: fase de adaptação (LAG), fase de crescimento exponencial (LOG), fase estacionária e fase da morte (Figura 4) (CARELI; DUARTE; PEREIRA, 2011).

A fase de adaptação (1), período inicial, sendo uma fase de ajuste, portanto, não há aumento no número de células e às vezes o número de células diminui, há uma reparação das células com danos, não ocorrendo aumento populacional. Na fase 2 (LOG), as células sofrem alterações na composição química e aumentam de tamanho e a substância intracelular aumenta. A fase logarítmica é um período de multiplicação, fase mais saudável das células, onde todas estão se dividindo mais ativamente (GUERRA, 2016).

Na fase estacionária (3), a multiplicação começa a diminuir e algumas células morrem. Se a taxa de multiplicação for igual à taxa de morte, o número total de células permanecerá constante. Isso pode ser devido à redução ou limitação de nutrientes ou a formação de produtos metabólicos que tendem a se acumular e que pode ser tóxica para os microrganismos. A fase da morte (4), fase em que o

processo de multiplicação parou, as células estão mortas e sofrerão um processo de lise. Se a taxa de morte exceder a taxa de multiplicação, o número real de células diminuirá (SUMARDIONO; WN; PUDJIHASTUTI, 2018).

Figura 4 - Fases do crescimento microbiano.



Fonte: Adaptado de Guerra (2016).

Os principais microrganismos utilizados para degradação de biomassa celulósica são fungos, como os de podridão pardos, brancos e macios que degradam a lignina e a hemicelulose. Vários fungos de podridão branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus* mostram alta eficiência de deslignificação (TIEN; KIRK, 1988).

O pré-tratamento com fungos marrons tem sido apontado como um bom método para melhorar os rendimentos de hidrólise enzimática de *Pinus radiata* e *Pinus sylvestris*, atingindo rendimentos de sacarificação em torno de 70%. Os fungos de podridão branca com seletividade à degradação da lignina sobre a celulose podem ser aplicados com sucesso em pré-tratamentos microbianos, dada a presença de enzimas como peroxidase, peroxidase de manganês e lacase (TOMÁS-PEJÓ et al., 2011).

O fungo *Lentinus crinitus* foi avaliado em resíduos agroindustriais para analisar o efeito da composição dos resíduos por meio da taxa de crescimento micelial, onde foi confirmado que pode crescer em substratos agroindustriais, sendo

afetado pela composição do mesmo. Pertence a um grupo de fungos que representa um grupo morfológico/ecológico com potencial como biorremediador de solos contaminados por hidrocarbonetos. Avanços promissores para o uso de metabólitos de *L. crinitus* para fins médicos e agrícolas, e seu possível uso como degradante de substratos agroindustriais para obter diferentes produtos alimentares e de interesse agroindustrial, foram observados no trabalho de Giraldo (2017).

A utilização do fungo *Aspergillus flavus* encontra-se em vários trabalhos relacionados com vegetais, como no trabalho de Horn (2005) e Lahouar et al., (2016) que pesquisaram em sementes de amendoim e sorgo, respectivamente. Um consórcio microbiano de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* foi utilizado por Dos Santos et al., (2019), para a hidrólise enzimática de sorgo como substrato para enzimas degradadoras de lignocelulose por fermentação em estado sólido (SSF). Pirola et al., (2015), avaliaram fungos isolados da região Amazônica, onde obtiveram um total de 40 isolados cultivados, o fungo que se destacou quanto à produção de endoglucanase e β -glicosidase foi o *Aspergillus niger*. Sendo o gênero *Aspergillus* encontrado em frutas, vegetais e outros substratos, além de envolvido na deterioração de alimentos, apresenta importância econômica, onde é utilizado na fermentação industrial, na produção de ácido cítrico e de ácido glucônico (PELCZAR, 1980 apud KAMUHA, 2013).

O gênero *Lichtheimia* consiste de fungos sapróbios que habitam o solo, decompondo o material vegetal (KAUR et al., 2014). Quatro espécies já foram identificadas como *Lichtheimia corymbifera*, *L. ramosa*, *L. blakesleeana*, *L. hyalospora*, que crescem apresentando colônias de crescimento rápido, principalmente em temperaturas ótimas entre 37 e 42 °C, predominantemente termotolerantes com temperaturas máxima de crescimento de 55 °C. *L. corymbifera* e *L. ramosa* podem causar infecções em pacientes com a imunidade comprometida (KAMUHA, 2013).

A degradação de resíduos agroindustriais usando microrganismos pode gerar vários produtos de valor agregado, principalmente porque a transferência de tecnologia pode ser realizada a baixo custo e com vários benefícios. Por outro lado, os produtos da transformação dos resíduos agroindustriais gerados pelos fungos apresentam um nível de degradação parcial que facilita sua reciclagem e incorporação no solo, além de apresentarem bom teor de nitrogênio, fósforo e pH neutro, para que possam ser utilizados como fertilizantes orgânicos ou como ração

animal (BERMÚDEZ, et al., 2014 apud GIRALDO, 2017). Tornando uma alternativa concomitante ao apelo ambiental dos processos que empregam a fermentação, junto com o desenvolvimento de ferramentas para o aumento da aplicação industrial (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

3.5 NANOTECNOLOGIA

Ciência que estuda partículas possuindo pelo menos uma dimensão na faixa de nanômetros (1-100 nm), e explora o fato de que as propriedades do material podem ser muito diferentes em escala nanométrica, em comparação com o nível macroscópico (KUMAR; KAUR; BHATIA, 2017).

Quando se reduz a escala do material a ser utilizado abaixo dos 100 nm, as funções primordiais se alteram e aplica-se o conceito de nanotecnologia, com modificação das propriedades físicas e químicas do material, passando a exibir propriedades únicas como, por exemplo, maior resistência, leveza, pureza e adequabilidade. O desafio e interesse em desenvolver nanocompósitos é encontrar maneiras de criar componentes macroscópicos que se beneficiem das propriedades físicas e mecânicas únicas de objetos de tamanho nanométrico (TOLEDO; SOARES, 2016).

O tamanho nanométrico torna possível explorar os fenômenos e as propriedades do composto. Recentemente, uma nova classe de materiais, os bionanocompósitos, provou ser um substituto que garante a melhoria das propriedades mecânicas e de barreira física. Os biopolímeros incluem materiais derivados de plantas (amido, celulose, outros polissacarídeos e proteínas), produtos de origem animal (proteínas e polissacarídeos), produtos microbianos (poli-hidroxibutirato) e polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros de origem natural (ácido polilático) (KUMAR; KAUR; BHATIA, 2017).

A nanotecnologia vem se estabelecendo como ferramenta emergente com grande potencial para a solução de problemas presentes na sociedade. Podem contribuir para o desenvolvimento das indústrias eletrônica, automobilística, têxtil, agrícola, farmacêutica, médica, cosmética, entre outras. Esses atributos advindos do seu tamanho nano dimensionado, permitem atuar como excelentes dispositivos

de armazenamento, transporte e distribuição para lugares específicos dentro de um organismo ou estrutura (LIMA; ALMEIDA, 2012).

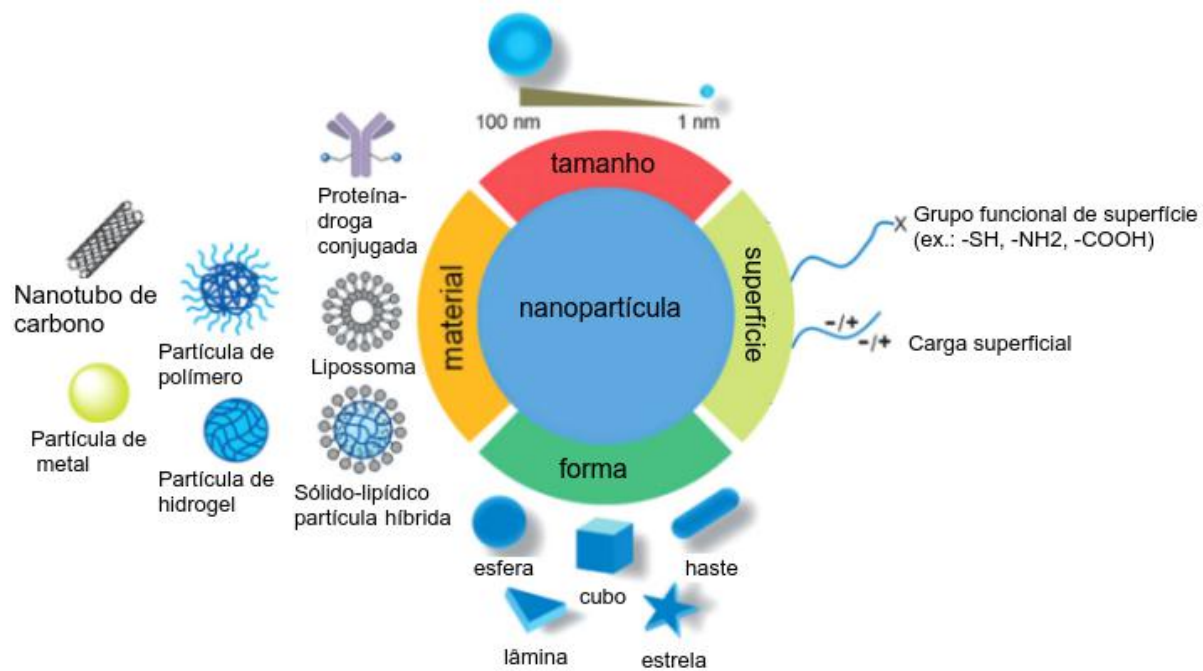
A maioria dos procedimentos conhecidos da nanotecnologia para a execução de ideias, são baseados na área de colóides e superfícies, que propõe uma inovação tecnológica. Um exemplo em relação à superfícies, são as nanopartículas que se aplicam em revestimentos de frutas que impedem o crescimento de fungos, como *Sphaceloma ampelinum*, um molde vermelho escuro que muitas vezes aparece em uvas (HENRIQUES, 2015).

Estudos em nanoescala com biomassa vegetal a partir do processo de hidrólise enzimática, expõe as alterações estruturais ocorridas na biomassa durante a reação, impactando na digestibilidade da celulose. Geralmente, a nanocelulose derivada de plantas é adquirida do procedimento mecânico e/ou químico de cima para baixo (Upstream) de precursores celulósicos. Porém, a obtenção de CNCs e NFCs de celulose com uma abordagem que consiste na desintegração de matéria vegetal por meio de tratamento enzimático, torna o processo mais favorável ambientalmente (THOMAS et al., 2018).

Para ser considerado uma estrutura nano, precisa-se mais do que o tamanho nanométrico, sendo necessário ter dois ou mais constituintes com distintas composições, estruturas e propriedades que estão separados por uma interface. A Figura 5 mostra um esquema de nanopartícula correspondente com algumas de suas formas nanométricas, tipos de superfícies que são compatíveis, formato que assume quando em interação com um material aplicado.

O controle sobre a geometria das partículas (tamanho e forma) desempenha um papel essencial para o mecanismo de ação das nanopartículas, pode ajudar a melhorar seu desempenho em aplicações específicas, carga de superfície, grupos funcionais, hidrofiliabilidade, a fixação de polissacarídeos e a conjugação com os alvos também são parâmetros essenciais.

Figura 5 - Esquema representando estrutura de nanopartículas, correspondente ao tamanho, material, forma e superfície.



Fonte: Adaptado de Heinz (2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Os experimentos foram realizados com resíduos de casca do grão de soja proveniente do processo de extração de óleo vegetal, cedida por uma empresa do complexo industrial da cidade de Ponta Grossa-PR.

4.2 CASCA DO GRÃO DE SOJA

O substrato sólido usado no processo fermentativo foi a casca do grão de soja, representada na Figura 6.

Figura 6 - Aspecto da casca do grão de soja.



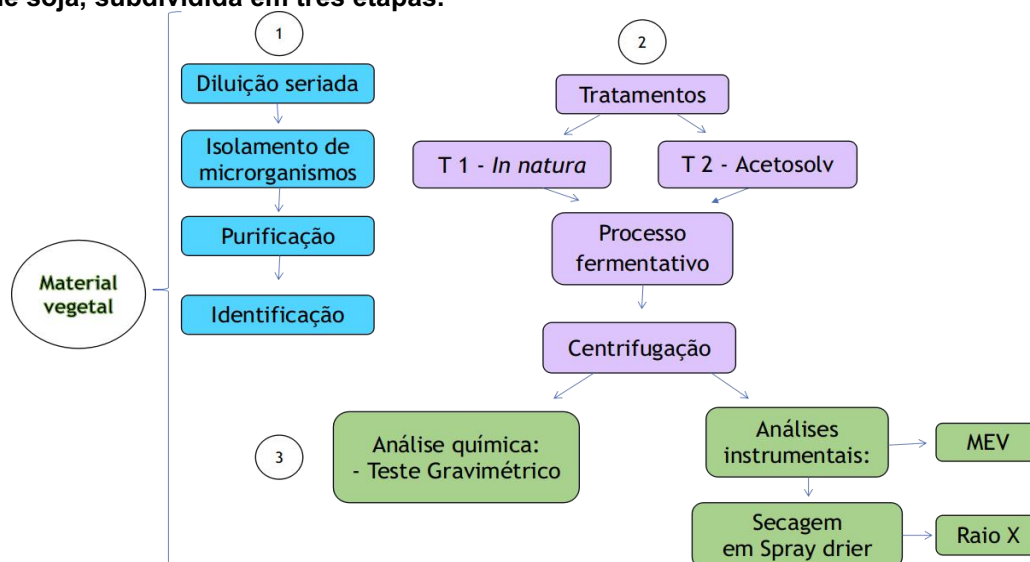
Fonte: Autoria própria (2021).

4.3 FLUXOGRAMA

A Figura 7 apresenta o fluxograma das atividades que foram realizadas subdivididas em etapas: (1) corresponde ao processo de isolamento dos

microrganismos; (2) representa os tipos de tratamentos realizados e (3) esquematiza as análises química e instrumental das nanoestruturas.

Figura 7 - Fluxograma da metodologia para produção de nanoestrutura a partir da casca do grão de soja, subdividida em três etapas.



Fonte: Autoria própria (2021).

4.4 ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO

Inicialmente, buscou-se isolar microrganismos contidos na casca do grão de soja, desta forma foi realizado o isolamento dos microrganismos por meio da técnica de diluição seriada.

4.4.1 Diluição Seriada

Todos os materiais, meios de cultura e soluções utilizados foram previamente esterilizados em autoclave vertical (Alpha Life Science-Série ALS) a 121 °C por 20 minutos. A manipulação dos materiais foram realizadas em cabine de fluxo laminar (SP Labor) em condições estéreis, tais como luz ultravioleta (radiação não-ionizante), álcool 70% e chama de bico de Bunsen.

Para o procedimento de diluição seriada, usou-se 25 g de substrato que foram pesados em balança semi-analítica de precisão (Modelo JC-32), 225 mL de

água peptonada 0,1% e 9 tubos de ensaios, que foram acondicionados na cabine de fluxo laminar. O substrato foi homogeneizado em água destilada em Erlenmeyer, e iniciado a diluição seriada em triplicata: 1 mL da solução foi transferido nos tubos e adicionados 9 mL de água peptonada, finalizando a primeira diluição (10^{-1}); em seguida, foi adicionado 1 mL da primeira diluição e 9 mL de água, finalizando a segunda diluição (10^{-2}). Por fim, na terceira diluição (10^{-3}), 1 mL da segunda diluição e 9 mL de água peptonada foram misturados.

De cada diluição foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e realizada a inoculação na superfície do meio solidificado contendo ágar e meio mineral (Quadro 1): Sulfato de Manganês P.A. (DINÂMICA), Cloreto de Sódio P.A. (ISO FAR), Sulfato de Magnésio P.A. (BIOTEC), Sulfato de Ferro P.A. (Alphatec), Glucose P.A. (Biotec), Fosfato de Potássio P.A. (Alphatec), Nitrato de Sódio P.A. (Neon), Cloreto de Cálcio P.A. (Dinâmica), Carboximetilcelulose Sal Sódico (Alta Viscosidade, Neon), realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. Logo depois, foram incubadas em estufa (Solid Steel) a 22 °C, durante 5 dias para o crescimento dos microrganismos.

Quadro 1 - Composição (em gramas) do meio mineral com ágar, utilizado para crescimento e manutenção dos microrganismos presentes na casca do grão de soja (por litro).

Reagente	Quantidade (g)
Sulfato de Manganês ($MnSO_4$)	0,001
Cloreto de Sódio (NaCl)	0,5
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$)	0,5
Sulfato de Ferro ($FeSO_4$)	0,01
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	0,4
Fosfato de Potássio (KH_2PO_4)	1,3609
Nitrato de Sódio ($NaNO_3$)	3,0
Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$)	0,04
Carboximetilcelulose (CMC)	15,0
Ágar	14,0

Fonte: Adaptado de Scott; Dehority (1965).

Após o crescimento dos microrganismos, culturas mistas foram obtidas, e para obtenção de uma cultura pura, realizou-se uma sequência de isolamentos por meio da metodologia de semeadura por esgotamento por estrias, seguidas de repetições até a origem de uma cultura pura. As culturas puras foram mantidas em solução com glicerol 30 %, em tubos de Eppendorf em freezer a -80°C para preservação dos mesmos.

4.4.2 Identificação dos Microrganismos

Os microrganismos isolados foram submetidos aos procedimentos de extração, amplificação e purificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) dos mesmos, seguindo a metodologia de Vicent et al., (2008). A extração e purificação do DNA foram realizadas a partir de micélio obtido em meio sólido. Verificada a pureza do DNA, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os marcadores moleculares utilizados para este estudo foram ITS4 e ITS5 (Região Espaçadora Interna Transcrita), para realizar a reação e amplificação dos produtos de PCR.

Os DNAs purificados foram enviados para sequenciamento na empresa Myleus Biotechnology (www.myleus.com), os quais foram preparados de acordo com as normas exigidas pela empresa. As sequências foram tratadas no software BioEdit, descartando as partes não legíveis da sequência, deixando somente as bases que foram possíveis de ler, para evitar qualquer discrepância nos resultados. Em seguida, as sequências de consenso, foram comparadas no banco de dados internacional de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI–<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A partir dos dados obtidos pelo sequenciamento, foram relacionadas as espécies encontradas e confirmando os resultados das amostras que obtiveram o valor mais próximo de 100% de semelhança com a sequência em depósito no banco de dados (SANTOS; NASCIMENTO; BITTENCOURT, 2017).

Posteriormente ao processo de identificação, os microrganismos foram depositados na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB) da UTFPR- Campus Ponta Grossa, que faz parte da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP), para contribuir com o número de microrganismos disponíveis para pesquisa científica.

4.4.3 Índice Enzimático de Celulase

Para avaliar os microrganismos com maior grau de degradação de celulose, a determinação da atividade enzimática foi feita pelo método de difusão em ágar, com metodologia adaptada de Hankin e Anagnostakis (1975) e Chang et al., (2009). Primeiramente, em placas de Petri previamente preparadas com ágar e meio mineral

solidificado (esterilizadas em autoclave, 121 °C por 20 minutos), os testes foram feitos em triplicata, com técnica de propagação por inoculação pontual com micélio, a partir de culturas puras. As placas foram incubadas por 120 horas em estufa (Solid Steel) a 22 °C, e depois durante 24 h mantidas em estufa a 50 °C para inibir o crescimento das colônias. Dentre cada triplicata, foi escolhida a que apresentou o melhor crescimento organizado na placa.

Na próxima etapa, seguindo a metodologia de Stamford, Araújo e Stamford (1998), as placas foram cobertas com uma solução aquosa a 1 % de brometo de etídio (ACS Científica) durante trinta minutos e 0,1 % de solução do vermelho Congo (ACS Científica), durante cinco minutos sobre a colônia. Posteriormente, a solução foi eliminada, e observou-se o diâmetro da zona clara, que corresponde a área de atividade enzimática. O diâmetro registrado por meio de um paquímetro digital (Fibra Carbono Western) foi usado para calcular as médias entre os microrganismos.

As medições do diâmetro do halo produzido e da colônia foram feitas com um paquímetro digital 150 mm Fibra Carbono Western, e a atividade enzimática foi determinada por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expresso como Índice Enzimático (IE), representado pela equação (1).

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

4.4.4 Curva de Crescimento

O crescimento dos microrganismos foi registrado durante o período de 15 dias, para contabilizar diariamente o desenvolvimento dos mesmos. Preparado em placas de Petri com meio mineral solidificado (Quadro 1), a técnica de propagação por inoculação pontual com micélio, a partir de culturas puras, onde ficaram incubadas em estufa a 22 °C. Após 24h do inóculo, se iniciou a medição do raio (r), que corresponde a distância do centro da colônia até a borda, com o auxílio de um paquímetro digital (Fibra Carbono Western), para calcular a área total da colônia (A), expresso na equação (2). Onde “ π ” representa 3,14 e “r” o raio da colônia.

$$A = \pi r^2 \quad (2)$$

4.5 PROCESSO FERMENTATIVO

4.5.1 Hidrólise enzimática

Na primeira etapa foi realizada a hidrólise com a casca do grão de soja *in natura*, com a finalidade de produzir nanoestruturas (nanocelulose e nanolignina) sem adição de solventes industriais (método químico). Na hidrólise por método enzimático, foram utilizados os microrganismos presentes na casca do grão de soja, capazes de se desenvolver no meio estudado e realizarem a degradação da casca.

O procedimento teve como variáveis de estudo o tempo e tratamento (variáveis independentes). A variável tempo teve 10 níveis, sendo 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 dias. Foram aplicados dois tratamentos (dois níveis) antes da hidrólise enzimática: Tratamento 1: com lignina, celulose, hemicelulose e Tratamento 2: deslignificada (sem lignina e hemicelulose, com celulose). A variável dependente foi a concentração final de nanoestrutura (lignina e celulose) e nanocelulose.

A contagem do tempo da reação de hidrólise iniciou no primeiro dia (1) ao quadragésimo (40) dia de incubação. Este período serviu para analisar qual o melhor tempo necessário para obter nanoestruturas, tanto pelo método sem acetosolv (Tratamento 1), com a presença de lignina, celulose e hemicelulose (nanoestrutura), quanto pelo método com acetosolv (Tratamento 2), sem a presença da lignina (nanocelulose).

4.5.2 Tratamentos aplicados à biomassa

O tipo de hidrólise enzimática escolhida foi realizada para proporcionar uma boa reprodutibilidade dos microrganismos e obtenção de nanoestruturas de celulose e lignina. O processo submerso com o substrato sólido, casca do grão de soja, é constituído basicamente de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água, e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, serve como ancoragem para as células microbianas mesmo sem a adição de nutrientes suplementares (SPIER, 2005).

O preparo de cada tratamento buscou estudar qual o melhor método para a obtenção de nanoestruturas e nanocelulose, variando o modo em que a casca foi ou

não tratada. No tratamento 1, a casca do grão de soja foi utilizada de maneira íntegra, sem nenhum tipo de interferência, e adicionada 220 mL de água deionizada e autoclavada para o processo de hidrólise e mantida em condição estática.

O tamanho do substrato para a hidrólise enzimática não sofreu interferência física, a fim de manter a estrutura original. Sabe-se que partículas pequenas promovem grande área de superfície para os microrganismos degradarem, porém, se forem muito pequenas, podem gerar aglomeração do substrato e pouco crescimento microbiano. Em contraste, partículas grandes promovem melhor aeração, mas limitada superfície de ataque microbiano (PANDEY et al., 1999).

No tratamento 2, a casca do grão de soja passou por um pré-tratamento, o procedimento Acetosolv, o qual teve a finalidade de extrair a lignina presente na casca. Para preparar o método acetosolv, a matéria-prima foi moída e seca em estufa bacteriológica (Solid Steel) aquecida a 50 °C por 24 horas para ser submetida à etapa de polpação. O ácido acético (NEON) foi utilizado para a extração da lignina, e o método de extração foi adaptado de Nascimento et al., (2014), onde consiste em adicionar a matéria-prima seca em uma solução constituída por 435 mL de ácido acético P.A. (ACS Científica), 1,5 mL de ácido clorídrico P.A. (NEON), e 31,84 mL de água deionizada. A reação foi realizada sob agitação mecânica constante (Agitador Mecânico de Hélice IKA RW 20 Digital), a 115 °C por 3 horas em um sistema de refluxo em balão de fundo chato em uma manta de aquecimento (Fisatom).

Em seguida, a polpa foi filtrada para que lignina residual fosse separada por lavagem com água destilada até que pH neutro fosse alcançado. Num momento posterior, as fibras foram lavadas com 400 mL de ácido acético P.A. (ACS Científica) a 60 °C, e depois com água deionizada até que o líquido de lavagem apresentasse um aspecto incolor e pH neutro. A celulose obtida foi seca em estufa (Solid Steel) a 50 °C por 24 horas e armazenada em frascos fechados, mantidos em temperatura ambiente, para posterior uso na hidrólise do Tratamento 2.

4.5.2.1. Tratamento 1

Primeiramente, em cada kitassato com rolha (utilizado como reator), foram adicionados 30 g de casca do grão de soja, 220 mL de água deionizada, em triplicata, e armazenado em estufa digital Timer modelo SSD Solid Steel, a 30 °C

(Figura 8). Após o término do tempo do processo de hidrólise enzimática, o conteúdo dos frascos foram centrifugados em tubos Falcon na centrífuga de bancada refrigerada da marca Hermler, modelo Z 326 K, em 5.000 rpm por 15 minutos, para separação das fases sólida e líquida, armazenadas em freezer a 0°C. Sendo a parte sólida a casca e a parte líquida o meio onde as nanoestruturas se desprenderam das cascas após ação dos microrganismos. O conteúdo líquido foi seco em spray-drier e analisado em Raio X e Microscopia Eletrônica.

Figura 8 - Estufa com os frascos no momento do processo fermentativo do tratamento 1, contendo a casca de soja adicionada em água e incubada a 30 °C.



Fonte: Autoria própria (2021).

4.5.2.2. Tratamento 2

4.5.2.2.1. Pré-inóculo

Os microrganismos isolados da casca do grão de soja pelo método de diluição seriada foram cultivados individualmente em placas com meio mineral (Quadro 1) e incubados por 7 dias a 30 °C para serem inoculados no tratamento 2. A casca após-tratamento químico com acetosolv, as vidrarias e a água destilada foram previamente esterilizadas a 121 °C por 20 minutos. Em uma cabine de fluxo (SP Labor), 30 g de casca do grão de soja e 220 mL de água foram homogeneizadas em um kitassato, seguida da inoculação com alça de platina de 1 g de meio de cultura de cada fungo, *Aspergillus flavus*, *Lichtheimia ramosa* e *Lentinus crinitus*, crescido em meio mineral, e incubados por 10 dias. Este período possibilitou aos microrganismos produzirem esporos suficientes para inoculação, a 30 °C, sem agitação. Nesse meio os microrganismos cresceram utilizando a casca do grão de soja como única fonte de carbono.

4.5.2.2.2. Inóculo

A partir do pré-inóculo, se iniciou a hidrólise do segundo tratamento, utilizando o meio com o consórcio de microrganismos, com metodologia adaptada de Pereira (2016). Cada reator teve 5 mL do caldo fúngico do pré-inóculo adicionado junto a 30 g de casca do grão de soja e água deionizada, ambas esterilizadas. O experimento foi realizado em triplicada, no tempo de 24 horas a 40 dias, com retirada dos frascos nos períodos estabelecidos nas variáveis de tempo e incubados a 30° C sem agitação.

4.6 SECAGEM DA AMOSTRA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

4.6.1 Spray-Dryer

Para o procedimento de secagem atômica, amostras da parte líquida da hidrólise foram secas no Spray-drier modelo LSD 0.5, do Laboratório Multiusuários (Lab-Mu) – Setor de Ciências Biológicas e da Saúde (SEBISA), da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Foi utilizado álcool etílico 95% PA (ACS Científica) como solvente no equipamento para esterilização. As condições de

operação do equipamento foram a taxa de fluxo de ar de 0,3 m³/min, taxa de alimentação da suspensão de 0,27 L/h e temperatura da câmara de saída de 100 °C.

4.7 ANÁLISE QUÍMICA

4.7.1 Teste Gravimétrico

O teste foi utilizado para cálculo de concentração das nanoestruturas. Os materiais utilizados para realizar o teste gravimétrico foram cadinhos de cerâmica de 50 mL. Estes permaneceram vazios em estufa a 50° C por 24 horas, para eliminar a umidade, e pesados em balança analítica de precisão (SHIMADZU). Em seguida, adicionou-se 1 mL de amostra, pesados e acondicionados a 50° C em estufa, durante 24 horas. Após este período, foram novamente pesados para cálculo da concentração por meio da equação 3. Para a medida da massa seca, foi descontada a massa do cadinho. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e desvios padrão foram relatados com a média.

$$\text{Concentração} = \frac{\text{massa seca}}{\text{volume submetido à secagem}} \quad (3)$$

4.8 ANÁLISES INSTRUMENTAIS

4.8.1 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

O método de preparação e detecção de amostra para MEV foi realizado com 1 mL dos hidrolisados obtidos, sendo que no Tratamento 1 as amostras foram diluídas em água destilada na proporção de (1:10) e para as amostras do tratamento 2, não foi realizado diluição. Em seguida, 10 mL de ácido fosfotúngico e 10 mL de cada amostra foram misturadas e permaneceram durante 30 minutos em agitador magnético (Cienlab), para que o ácido corasse as nanoestruturas de celulose e lignina. Posteriormente, 100 µL da solução foi depositada em grades revestidas de

carbono (modelo Electron Microscopy Sciences (EMS)), cobre 400 mesh e um papel filtro qualitativo 185 mm, foi usado para absorver o excesso de líquido.

As amostras foram secas à temperatura ambiente por 24 h e observadas em MEV de alta resolução com emissão de elétrons por um canhão de emissão de campo (FEG - Field Emission Gun), MIRA 3 TESCAN, tipo de análise STEM, do Laboratório Multiusuários (Lab-Mu) da UEPG, para obter a imagem e morfologia das nanoestruturas. A microscopia foi operada no modo de transmissão a 15.0 kV com uma distância de trabalho de 4,0 mm, e aumento de até 30 kx.

4.8.2 Difração de Raios X (DRX)

DRX é uma das técnicas mais comumente usadas para identificação de estruturas cristalinas. A nanocelulose foi caracterizada por análise de DRX a partir de amostras secas em Spray-dryer. Os difratogramas foram registrados na faixa 2θ de 5° a 60° (40 kV, 30 mA) em temperatura de análise a 25° C, em um difratômetro Rigaku, modelo Ultima IV, no C-Labmu da UEPG. O mesmo emprega a radiação $K\alpha$ do cobre, com comprimento de onda de 0,154 nm.

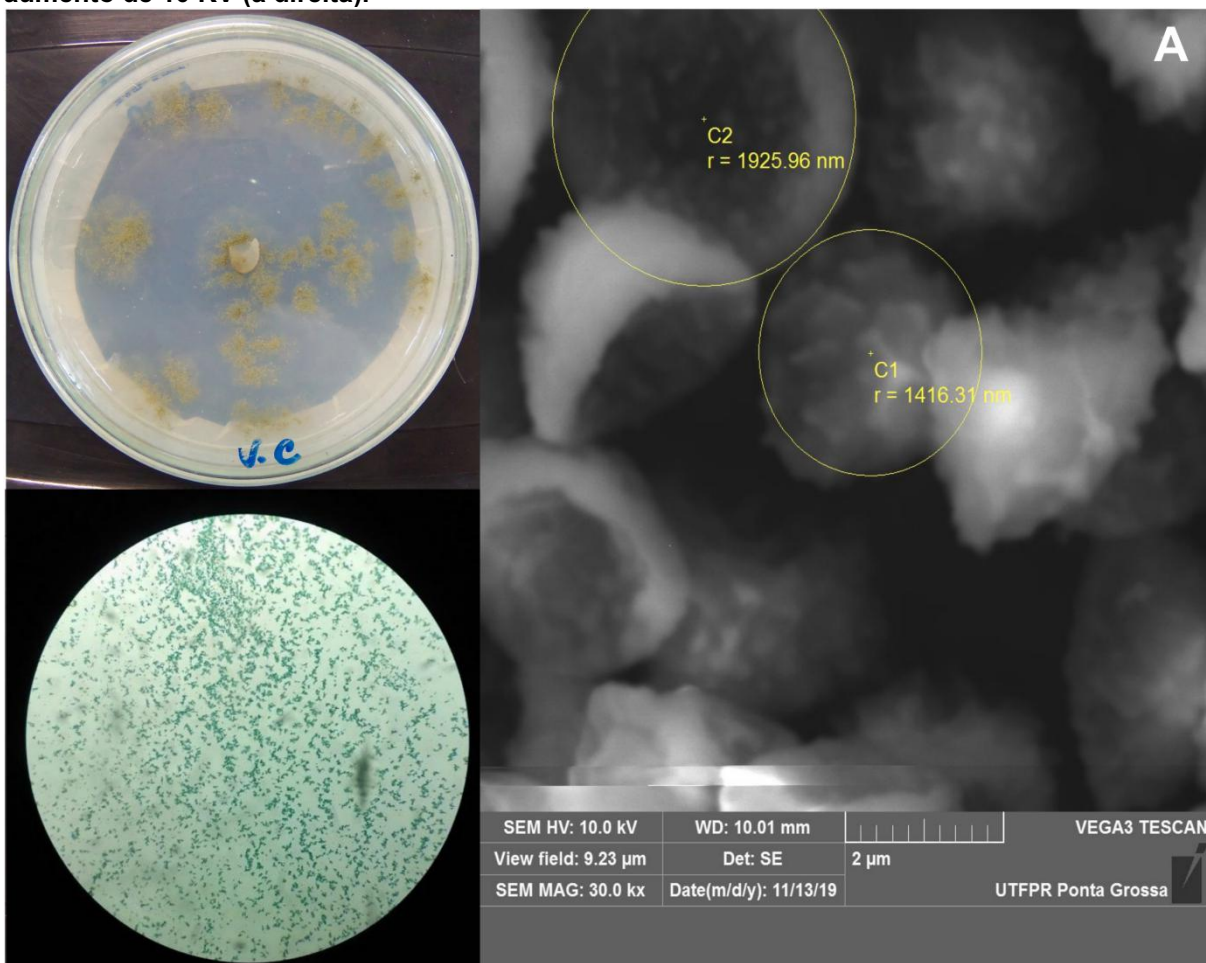
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS

Como resultado do processo de isolamento, os microrganismos presentes no substrato cresceram em condições estabelecidas, sendo possível isolar três diferentes fungos provenientes desse procedimento. A identificação de microrganismos ocorre por meio da sua aparência física, incluindo características das colônias, como hifas, dos esporos reprodutivos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005), e por meio de extração e sequenciamento do DNA. No presente trabalho foram avaliadas as características físicas, como a presença de hifas na colônia e características moleculares, como as sequências do DNA.

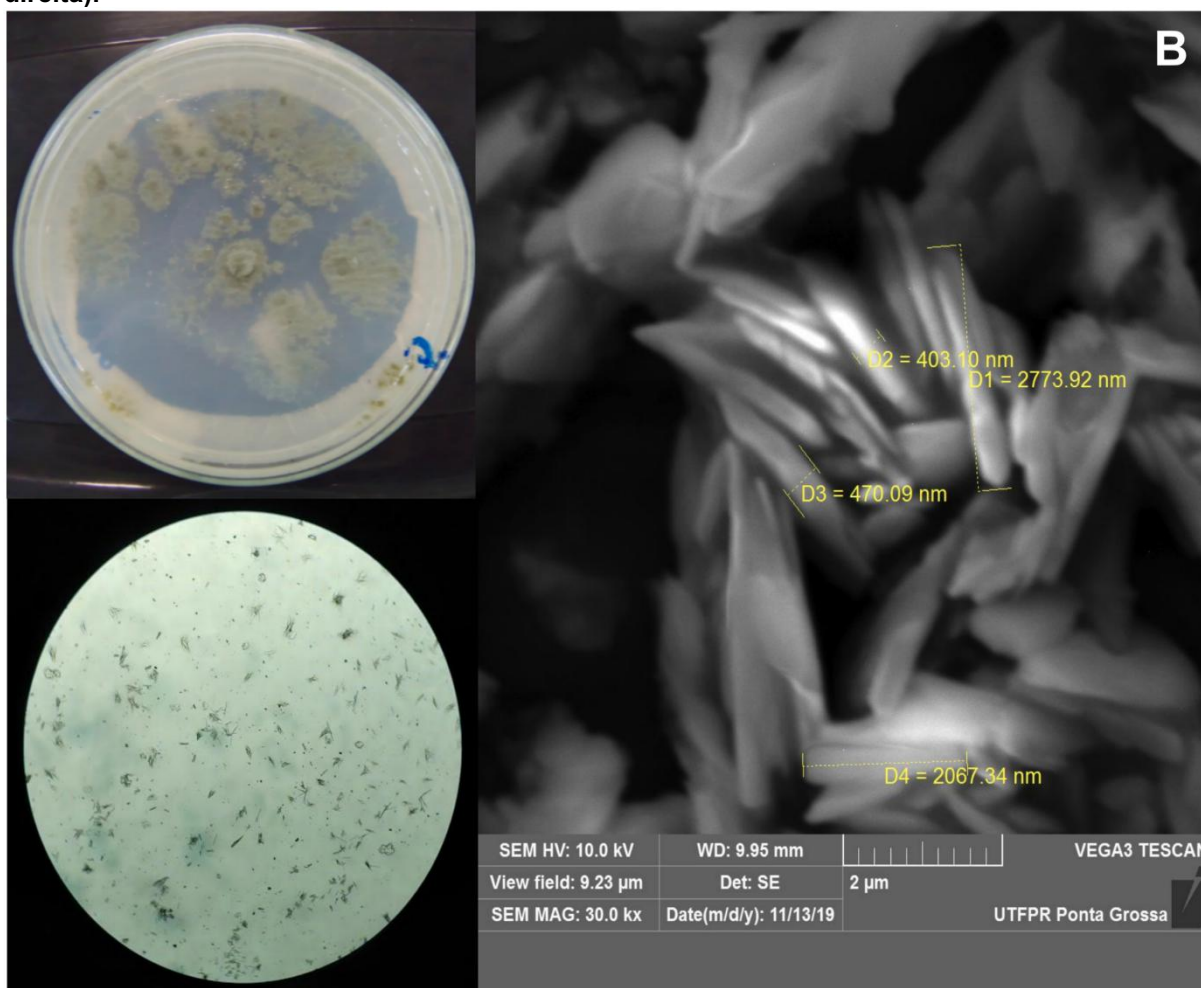
O sequenciamento das amostras foram tratadas no software BioEdit e comparadas no banco de dados internacional de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Após o pareamento, com porcentagem de 99,99 % de similaridade, resultou na obtenção dos seguintes microrganismos: *Aspergillus flavus*, *Lichtheimia ramosa* e *Lentinus crinitus* (Figuras 9, 10 e 11). As sequências de consenso obtidas estão nos anexos A, B e C.

Figura 9 - Fungo isolado da casca de soja, *Aspergillus flavus* (A). Estrutura macromorfológica (canto superior esquerdo), micromorfológica - aumento de 400x em Microscópio Ótico (canto inferior esquerdo) e estruturas de esporos reprodutivos em MEV - aumento de 10 KV (à direita).



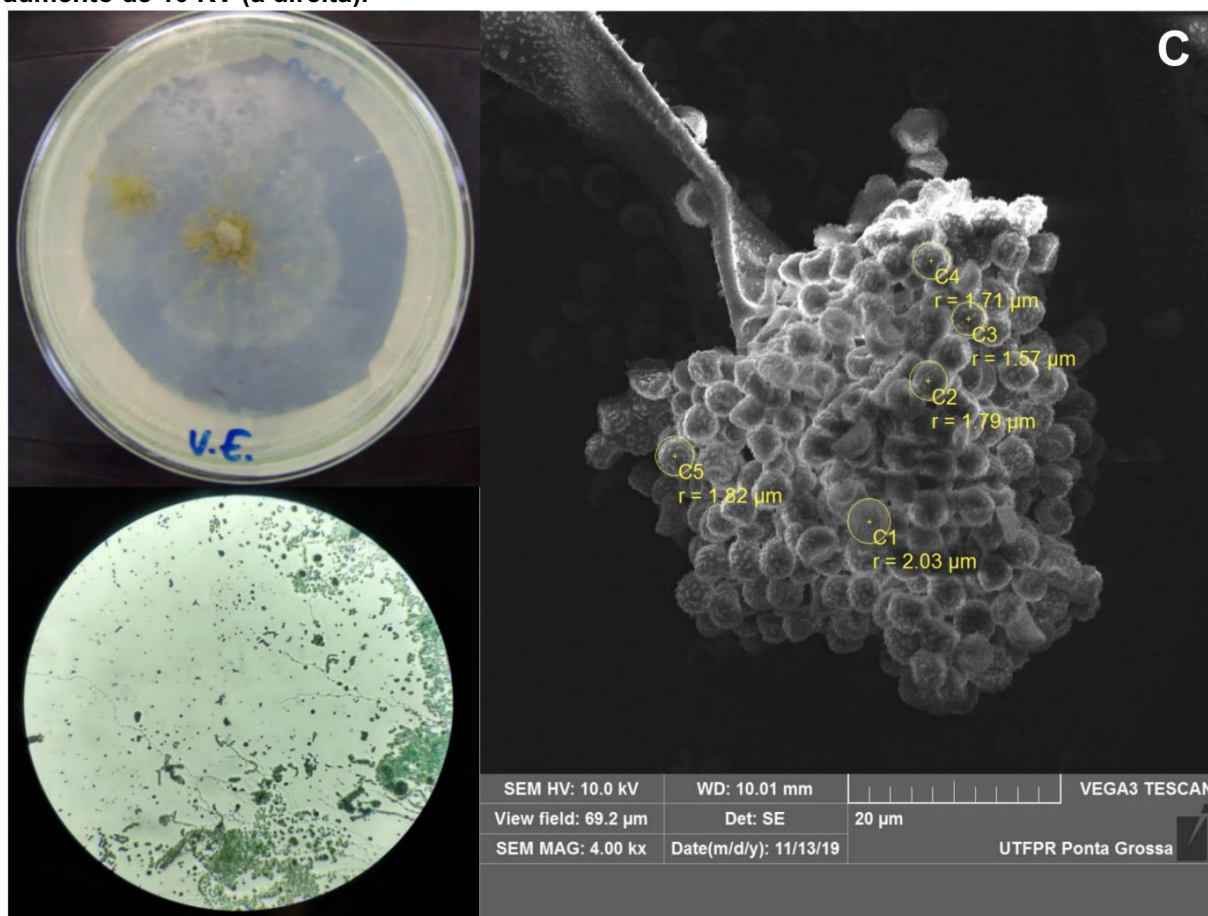
Fonte: Aatoria própria (2021).

Figura 10 - Fungo isolado da casca de soja, *Lichtheimia ramosa* (B). Estrutura macromorfológica (canto superior esquerdo), micromorfológica - aumento de 400x em Microscópio Ótico (canto inferior esquerdo) e estruturas de esporos reprodutivos em MEV - aumento de 10 KV (à direita).



Fonte: Aatoria própria (2021).

Figura 11 - Fungo isolado da casca de soja, *Lentinus crinitus* (C). Estrutura macromorfológica (canto superior esquerdo), micromorfológica - aumento de 400x em Microscópio Ótico (canto inferior esquerdo) e estruturas de esporos reprodutivos em MEV - aumento de 10 KV (à direita).



Fonte: Autoria própria (2021).

O gênero *Lentinus* é distribuído em todo o mundo, mas espécies do subgênero *Lentinus crinitus* são distribuídas pelas Américas (JUSTO et al., 2015 apud MURILLO; SUÁREZ, 2020). Reconhecido como degradador de uma ampla gama de moléculas devido à sua plasticidade enzimática, no entanto, o conhecimento de sua capacidade de degradar resíduos no ambiente ainda é limitado (GIRALDO, 2017).

No trabalho de Serbent et al., (2020) o fungo *L. crinitus* cresceu em um meio contendo ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), um dos herbicidas de controle de ervas daninhas mais comumente usados. Foi o primeiro estudo mostrando o potencial da linhagem em tolerar o 2,4-D, o que representa o início do trabalho para o processo de biorremediação com aplicações práticas.

Murillo e Suárez (2020) utilizaram três tipos de resíduos da agroindústria como substrato para avaliar o crescimento micelial de *L. crinitus* nos meios de

cultura (farelo, casca de laranja e casca de arroz), sendo o tratamento com casca de laranja e farelo considerado o melhor para o crescimento micelial do microrganismo.

Lichtheimia ramosa representa um fungo filamentososo que apresenta rápida colonização e favoráveis características para cultivos sólidos (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2010). Microrganismo de importância clínica, causador de mucormicose, uma infecção rara em humanos imunocomprometidos (LINDE et al., 2014). Também está presente no solo, como em amostras coletadas de uma vegetação recém queimada após a colheita dos produtos agrícolas, relatado no trabalho de Nsa et al., (2020), onde foi isolado e plaqueado.

De Andrade Silva et al., (2020), relataram que o uso de *L. ramosa* em resíduos de frutas apresentaram condições ideais para o crescimento e a biotransformação de fungos, os quais podem promover a liberação de produtos de interesse biotecnológico. O mesmo foi isolado do bagaço da cana e foram utilizados como substratos casca de abacaxi, laranja, manga, maracujá e de uva, onde foi observado o enriquecimento proteico em todos os substratos residuais, no entanto, o maior valor foi encontrado para o maracujá.

O fungo *Aspergillus flavus* foi isolado dos solos de todos os principais biomas, com mais frequência em zonas temperadas quentes, do que em zonas temperadas tropicais ou mais frias. No campo, é predominantemente um problema nas plantas oleaginosas como amendoim, algodão e nozes por produzir micotoxinas, gerando perdas econômicas (KLICH, 2007).

Por ser um fungo saprófito, *A. flavus* infecta e contamina as culturas de plantio e apresenta uma grande variedade de hospedeiros de plantas, com o metabólito secundário cancerígeno aflatoxina. Também é um patógeno humano e animal oportunista, causando doenças por aspergilose com incidência crescente na população imunocomprometida (AMAIKE; KELLER, 2011). Recentemente, práticas avançadas para seu controle de contaminação em áreas de plantio foram relatadas em Bhandari, Longing e West (2020), com uso de cepas conspecíficas atoxigênicas de *A. flavus*, onde são utilizadas como método de biocontrole para reduzir a aflatoxina.

Derbalah, Khattab e Allah (2020) realizaram isolamento e identificação molecular de microrganismos biorremediadores de resíduos de pesticidas na água, e dentre os isolados, *A. flavus* estava presente. Também foi investigado o efeito de diferentes fatores ambientais (pH, temperatura e concentração inicial de malatão),

da água para a biodegradação do malatião em sistema aquático. Indu e Pappa (2020) trabalharam com *A. flavus* para degradar a queratina de farinha de pena de ave utilizada como substrato, para produzir a enzima queratinase, a qual foi produzida, purificada e caracterizada pelo microrganismo.

A partir dos três microrganismos isolados nesta pesquisa, todos demonstraram potencial biotecnológico como degradadores de resíduos tanto sólido quanto líquido, mas é necessário um conhecimento mais profundo da biologia molecular e dos aspectos genéticos por trás das vias biossintéticas microbianas. Por exemplo, a caracterização de mecanismos bioquímicos e uma identificação completa de enzimas extracelulares secretadas pelos fungos filamentosos, para obter um controle aprimorado do comportamento das composições químicas (GRASSO; ZANE; DRAGONE, 2020).

5.1.1 Índice Enzimático

O meio de cultivo mineral enriquecido com celulose, fez com que houvesse a indução do metabolismo dos fungos a secretarem celulasas para degradarem as estruturas celulósicas (INFORSATO; PORTO, 2016). Para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio sólido, os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos microrganismos (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998).

Lealem e Gashe (1994) recomendam um valor do índice de atividade enzimática $\geq 2,0$ para mostrar a habilidade do microrganismo em degradar celulose em meio sólido. Observa-se na Tabela 1, que todos os resultados foram menor que 2, representando que não apresentaram atividade celulósica significativa. Contudo, mesmo com resultados abaixo do valor recomendado, foi observado a atividade de degradação de celulose.

Belmont-Montefusco et al., (2020), consideraram atividade enzimática de isolados fúngicos que produziram halo de hidrólise com índices enzimáticos entre 1,0 e 3,1, indicando o potencial de produção de enzimas celulolíticas de fungos onde foram capazes de crescer no meio de cultivo contendo carboximetilcelulose como única fonte de carbono. O mesmo é relatado no trabalho de Silva et al., (2011), onde

consideraram como destaque fungos com capacidade de degradar celulose com índice enzimático acima de 1,0.

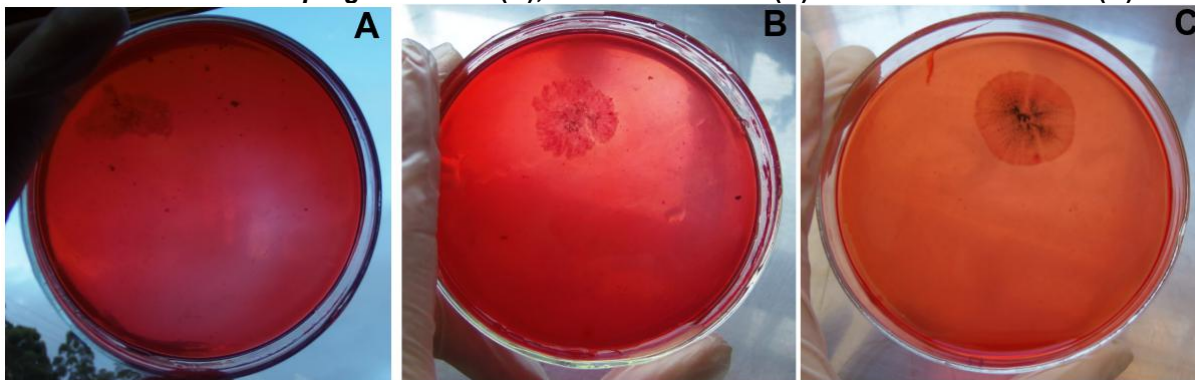
Tabela 1 - Atividade celulósica em meio sólido dos microrganismos isolados da casca de soja.

Microrganismos	Diâmetro do halo de degradação (cm)	Diâmetro da colônia (cm)	Índice Enzimático
<i>Aspergillus flavus</i>	24,7	16,2	1,52
<i>Lentinus crinitus</i>	23,9	18,4	1,30
<i>Lichtheimia ramosa</i>	30,3	21	1,44

Fonte: Autoria própria (2021).

A Figura 12 representa os resultados do índice enzimático após coloração das placas de Petri com o vermelho congo nos respectivos fungos (Tabela 1). Para esta pesquisa foi optado pelo consórcio dos 3 fungos isolados, acarretando resultados de hidrólise do material um estudo satisfatório para a produção de nanocarga.

Figura 12 - Resultado do procedimento de coloração com vermelho congo para cálculo do índice enzimático de *Aspergillus flavus* (A), *Lentinus crinitus* (B) e *Lichtheimia ramosa* (C).



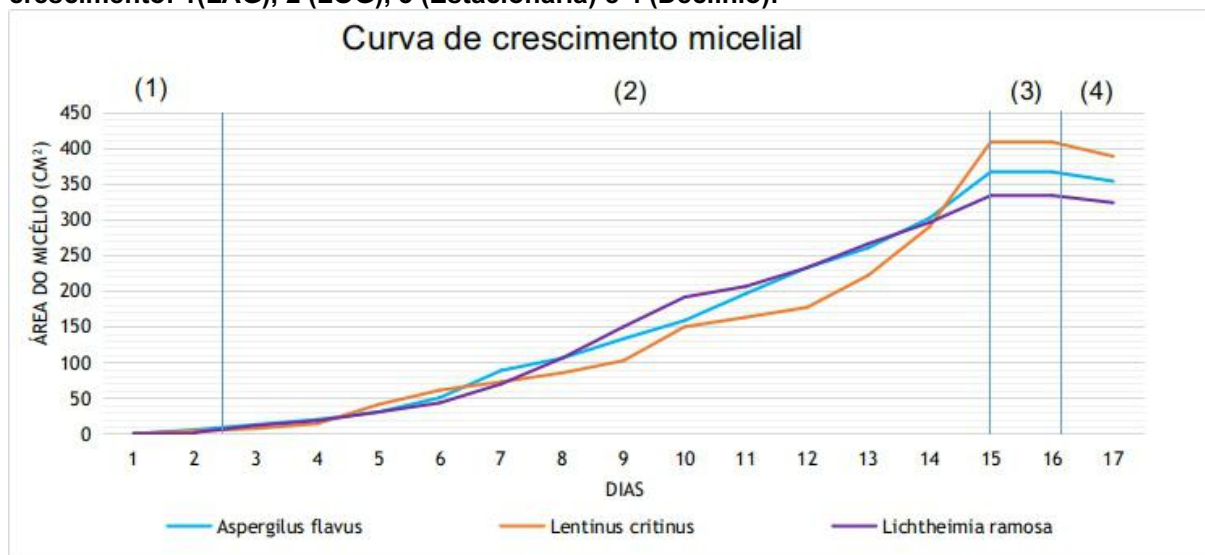
Fonte: Autoria própria(2021).

5.1.2 Curva de Crescimento

Durante o período de 15 dias foi realizado o acompanhamento do crescimento dos microrganismos, com medições da área do micélio em cm². O microrganismo que obteve maior área de crescimento foi *Aspergillus flavus*, atingiu uma área de 301,56 cm², em seguida, *Lichtheimia ramosa* com área de 295,44 cm², e por fim *Lentinus crinitus* com 289,38 cm² de área, como representado no Gráfico 1. Houve crescimento dos três microrganismos sob as mesmas condições no meio de

cultura e temperatura constante, evidenciando-se que o isolamento foi um sucesso para o experimento.

Gráfico 1 - Gráfico de crescimento micelial de *Aspergillus flavus*, *Lichtheimia ramosa* e *Lentinus crinitus*, durante o período de 15 dias de incubação, com as respectivas fases de crescimento: 1(LAG), 2 (LOG), 3 (Estacionária) e 4 (Declínio).



Fonte: Autoria própria (2021).

É notável que a primeira fase (LAG) foi observada entre as primeiras 24 e 48 horas, onde os fungos estavam se adaptando ao substrato, sendo pouco perceptível o crescimento. A partir de 72 horas, se iniciou a fase exponencial (LOG), onde as células aumentaram de tamanho para ocorrer a duplicação, e ocorreu uma evidente reprodução fúngica, pode-se inferir que esse período ocorreu a partir de 72 horas após a inoculação e incubação dos fungos, até o período de 15 dias.

A *Lichtheimia ramosa* se destacou no crescimento durante os primeiros 11 dias, por consequência de ser um microrganismo com melhor adaptação no meio mineral e termotolerantes, porque crescem em uma ampla faixa de temperaturas, de 20 a 53 °C (NSA et al., 2020).

Aspergillus flavus teve crescimento característico de 65 a 70 mm de diâmetro após 7 dias de incubação a 25 °C. O microrganismo possui uma mudança de desenvolvimento do tipo quorum, de esclerócios para conídios, ou seja, esporos formados por mitose e responsáveis pela reprodução assexuada, à medida que a densidade populacional aumenta (AMAIKE; KELLER, 2011).

O crescimento micelial de *Lentinus crinitus* mostra sua capacidade de crescimento sobre este tipo de resíduo agroindustrial. No trabalho de Giraldo (2017), foi demonstrado que o micélio de *L. crinitus* apresentou altas porcentagens de

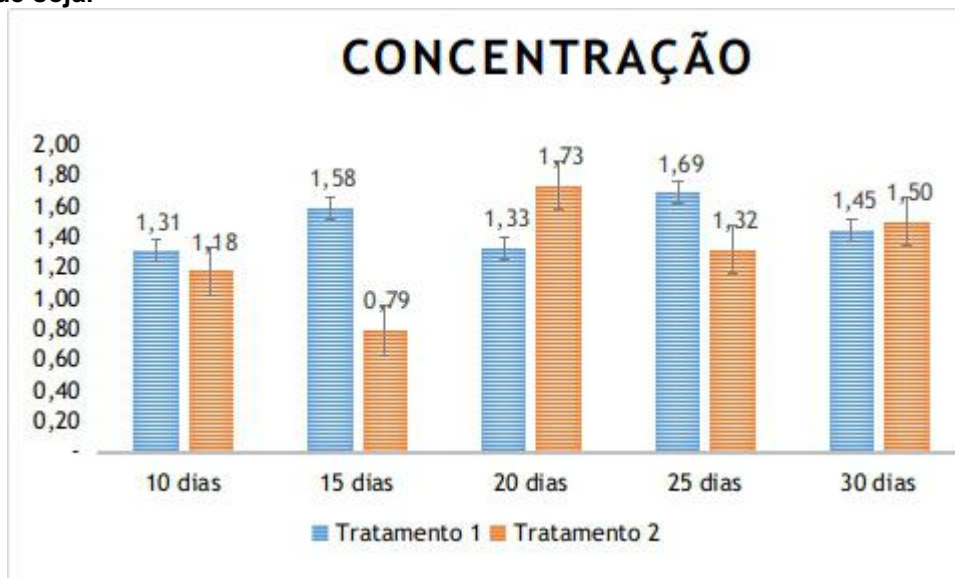
biodegradação da lignina (54,4%). Porém, deve ser esclarecido que além do potencial de degradação existe uma inter-relação cepa-substrato, que é específica para cada espécie de fungo. Portanto, o crescimento micelial em resíduos agroindustriais, mostra que *L. crinitus* pode crescer nos referidos tratamentos, e seu crescimento está correlacionado com a relação Carbono/Nitrogênio, o teor de fósforo e o teor de nitrogênio do materiais lignocelulósicos (SILVA; CORSO; MATHEUS, 2010).

O período estacionário de diminuição/estabilização do sistema metabólico ocorreu a partir de 15 dias (fase 3), o crescimento dos microrganismos ficou mais lento indicando o processo de declínio, 16 dias (fase 4), sendo essa fase marcada pela diminuição do número de indivíduos e decréscimo significativo da atividade enzimática, onde encerrou-se o acompanhamento da incubação.

5.1.3 Teste Gravimétrico

O teste gravimétrico foi realizado para determinar a concentração das nanoestruturas a partir do peso constante. O Gráfico 2 mostra os resultados calculados da relação de tempo de hidrólise, onde apresentam expressos a média de cada reação com o desvio padrão de cada amostra estudada. Com a estabilidade térmica de 50 °C do teste proporcionou perda de peso uniforme e verificou-se que em ambos os tratamentos a média ficou entre 1 e 2%.

Gráfico 2 - Resultado do teste gravimétrico dos tratamentos 1 e 2 de hidrólise enzimática da casca de soja.



Fonte: Autoria própria (2021).

O tratamento 1 continha na composição dois tipos de nanoestruturas (nanocelulose e nanolignina), já no tratamento 2, com a aplicação do pré-tratamento de extração de lignina, permaneceu apenas nanocelulose. Em comparação, o tratamento 1 apresentou valores maiores e conseqüentemente maior concentração, diferentemente do tratamento 2, onde a lignina estava ausente.

A lignina é geralmente distribuída com hemiceluloses nos espaços das microfibrilas intercelulósicas, nas paredes primárias e secundárias e nas lamelas intermediárias como um componente de cimentação para conectar células e endurecer as paredes celulares (BUGG et al., 2011). Com a atuação dos fungos, ocorre a mineralização da lignina com as enzimas que a degradam, onde é despolimerizada e mineralizada por reações radicais que são desencadeadas pela oxidação com essas enzimas. Sem a lignina no Tratamento 2, os fungos não produziram estas enzimas e conseqüentemente não houve a oxidação no meio fermentativo, que também justifica o resultado da concentração ser menor.

O período de 20 dias do tratamento 2, teve destaque com a maior porcentagem de concentração, com 1,73 %, representando que foi a amostra com a maior quantidade de nanoestruturas. Havendo mais celulose com as fibras livres de lignina devido ao pré-tratamento, os microrganismos tiveram mais espaço para quebrar as moléculas de celulose e produzir mais nanoestruturas, justificando o resultado com maior concentração.

Como o espaço ocupado pela lignina, que atuava como um adesivo químico dentro e entre as fibras de celulose (HIGUCHI, 1990), estava disponível para os fungos, a degradação foi mais eficaz. Concomitantemente ao período onde resultados de estruturas de nanocelulose foram encontrados com as imagens de MEV (Figura 20).

5.2 MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é a técnica mais adequada para a caracterização de partículas para obter informações como a morfologia, o tamanho e a dispersão de nanopartículas. De acordo com as condições de extração, o tamanho e a morfologia são amplamente dependentes da fonte da matéria-prima (DA SILVA et al., 2020).

Como o objeto de análise do presente trabalho foi a casca do grão de soja, obteve-se nas micrografias a presença de nanocelulose e nanolignina. Considerando as duas metodologias trabalhadas, obteve-se ambos os biopolímeros e no Tratamento 2, apenas celulose, em consequência do pré-tratamento Acetosolv. Foram obtidas imagens de todas as variáveis de tempo, mas apenas nos resultados apresentados no trabalho foram possíveis obter imagens de interesse. Também, o processo de secagem pode fazer com que as fibrilas se agrupem prejudicando a visualização antes do processo de análise e várias nanopartículas podem ter sido afetadas devido às condições de hidrólise.

A etapa para obtenção das nanopartículas se inicia com o processo químico da remoção de polissacarídeos ligados à superfície da fibrila, seguido pela clivagem e destruição das regiões amorfas mais facilmente acessíveis para liberar seções de celulose cristalina em forma de bastonete. Tradicionalmente, a nanofibra de celulose tem sido definida como cadeias de celulose puramente cristalinas com diâmetros na faixa de 5 a 40 nm com comprimentos de alguns micrômetros (ISLAM et al., 2014).

Os principais tipos de nanocelulose são obtidos conforme ao tipo de extração e se adquire os seguintes formatos: nanowhiskers, hastes ou bigodes, com tamanho normalmente variando de 3 a 50 nm de largura e 50 - 500 nm de comprimento e NFC, um feixe de nanofibras de celulose esticadas, com cadeias de

celulose emaranhadas e flexíveis com uma grande área superficial que variam de dez a algumas centenas de nanômetros e comprimentos na escala de micrômetro (THOMAS et al., 2018).

A presença dos microrganismos agindo de forma associada durante a hidrólise, contribuíram para a quebra da celulose, pois as regiões amorfas das fibras são preferencialmente degradadas para liberar componentes em nanoescala devido a maior proporção (SUCINDA et al., 2020). Em destaque para o fungo *Lentinus crinitus*, um exemplar degradante da lignina que produz lacase e outras enzimas de interesse biotecnológico (MARIM et al., 2020).

Nas micrografias do Tratamento 1 as amostras foram diluídas em água destilada na proporção (1:5), (1:10) e (1:20), apenas na proporção de (1:10) foi possível observar um bom resultado. Tal tratamento preserva a lignina, que circunda os polissacarídeos estruturais da lignocelulose, visível com formato esférico (Figuras 17 e 18). Isso se deve à atuação dos microrganismos que consomem as estruturas da parede celular primárias mais externas e superficiais, e a parte mais interna, a parede celular secundária. Isso reduz a biodegradabilidade, com mais demanda de tempo de hidrólise para ser obtida, justificando a sua ausência nas micrografias de curto período. Resultados similares de nanolignina foram obtidos no trabalho de Juikar e Vigneshwaran (2017).

Chen et al., (2019) analisaram o tamanho das partículas de nanolignina por espalhamento dinâmico de luz (DLS), e constataram que a área superficial específica da nanolignina é de 5,3765 m²/g. Os autores utilizaram resina de lignina fenol formaldeído, com objetivo de substituir parcialmente o fenol por nanolignina, com tamanho médio de partícula de cerca de 300 nm.

De acordo com Nirmal et al., (2020) onde os autores trabalharam com celulose nanocristalina bacteriana (CNCB), adquiriram resultados a partir de MET, usado para investigar as microestruturas da nanocelulose produzida, de CNCB com formas distintas de agulha com comprimento médio calculado de 130,00 +/- 30,99 nm com uma largura de 15,00 +/- 3,05 nm de 250 nanocristais selecionados aleatoriamente. As dimensões, no entanto, se correlacionam bem com o NCC isolado de resíduos de produtos e polpa de madeira dura natural. Tais resultados foram comparados com as micrografias de nanocelulose neste trabalho. Diante do Tratamento 1, obteve-se nanolignina e nanofibras (Figuras 13 e 15), com um diâmetro na faixa de 10–70 nm, constituintes das microfibras de celulose que

consistem em regiões amorfas com formas alongadas, feixes emaranhados de grande área superficial.

Na amostra de 24h (Figura 13) nota-se que houve pouca degradação da parede celular da casca do grão de soja, pois nesse período os microrganismos precisam se adaptar ao meio antes de se multiplicarem e consumirem o material orgânico. Nas imagens se observa apenas o meio homogeneizado. Nas amostras de 48 e 72h (Figuras 14 e 15), se inicia o processo de crescimento dos microrganismos e o começo da quebra da parede celular, observa-se algumas estruturas isoladas de celulose (fibras emaranhadas).

A partir de 10 dias (Figura 16) de hidrólise, o processo de degradação aumenta, pois os microrganismos já passaram da fase de adaptação e se multiplicaram para consumir o material, observa-se um número maior de estruturas de celulose, e é possível ver novas fibras de formato arredondado, como a lignina, também presente no trabalho de Souza et al., (2010). Nanofibras de celulose são encontradas nas paredes celulares secundárias, sendo espessa pela deposição de lignina, celulose e hemicelulose (TOLEDO; SOARES, 2016).

Já nas micrografias de 25 dias (Figuras 17 e 18), obteve-se o melhor resultado de imagens, nanocristais de celulose e lignina podem ser visualizadas, pois o período de hidrólise favoreceu aos microrganismos mais tempo para consumirem a casca do grão de soja e conseqüentemente mais estruturas foram expostas ao meio, nota-se uma grande quantidade de celulose e lignina dispersas nas imagens.

Diante do objetivo da pesquisa em comparar o rendimento da obtenção de nanoestruturas produzidas a partir das duas metodologias, o tratamento 2 resolve o impedimento causado pela lignina, que é uma das principais razões pelas quais um pré-tratamento capaz de quebrar a estrutura lignocelulósica ou até mesmo remover lignina, é necessária antes da hidrólise enzimática da biomassa (PIELHOP et al., 2015).

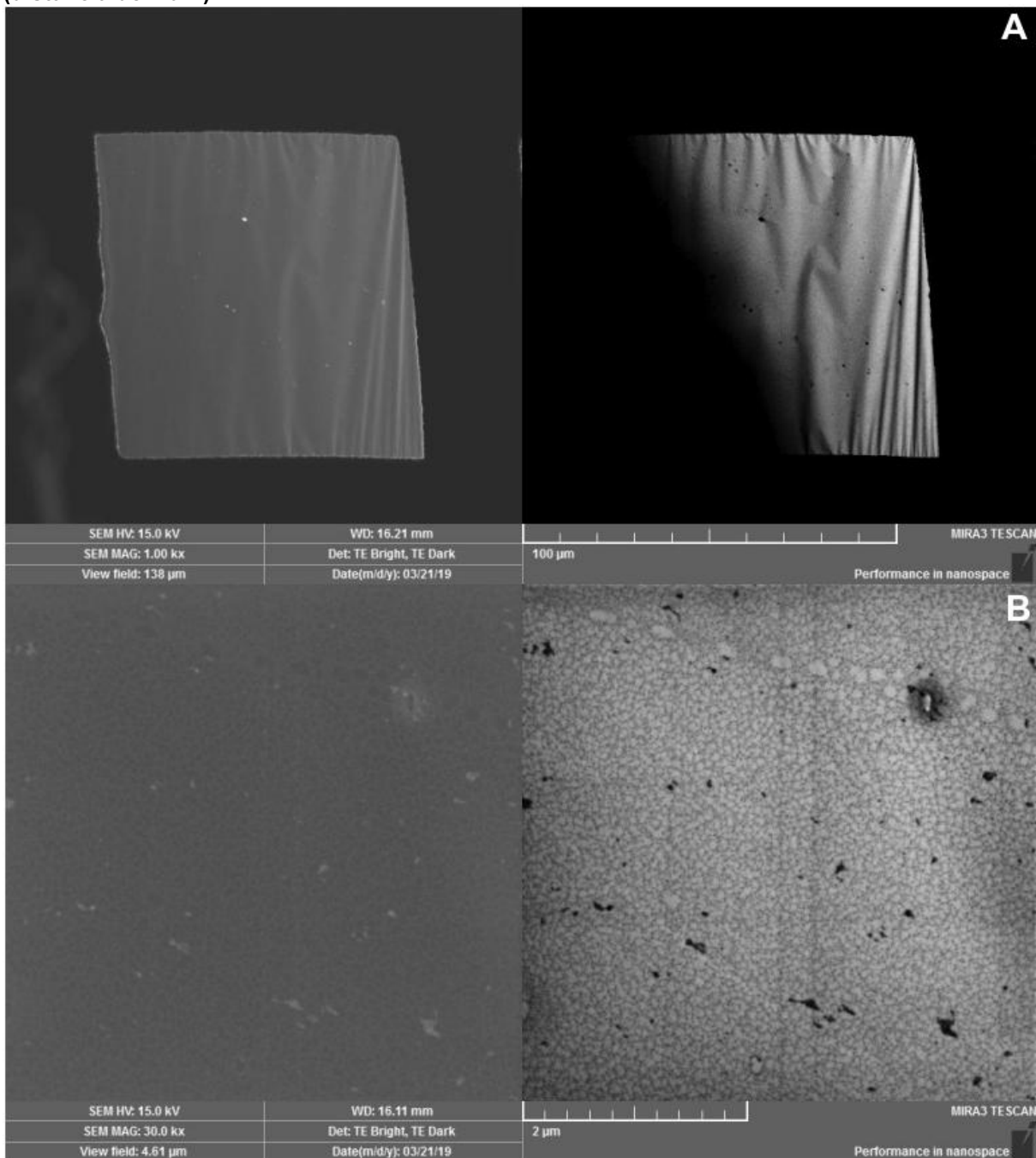
A partir das micrografias da Figura 19, nota-se uma resolução mais homogênea em relação às anteriores, em decorrência do pré-tratamento Acetosolv ter atuado sob a casca do grão de soja com influência das reações de temperatura, agitação, mudança no pH, filtração e secagem. Como apontado por Fortunati et al., (2013) em seus resultados com fibras de fórmio e linho, obteve imagens de microscopia eletrônica de varredura que sugeriram a remoção parcial de impurezas,

hemiceluloses, lignina e pectina após tratamento químico, que são os componentes de cimentação ao redor dos feixes de fibras. Após o pré-tratamento alcalino e branqueador aplicado às fibras naturais, as estruturas apareceram separadas em filamentos micro-dimensionados apresentando uma redução de diâmetro em relação às fibras brutas, em consequência da remoção de componentes não fibrosos da superfície da fibra (lignina e hemicelulose).

Xiong et al., (2015), usaram Tetrahidrofurano (THF) como solvente para a dissolução de lignina de um processo Organosolv de ácido acético, e obtiveram concentrações de lignina no THF com variação de 10–100 g/L. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão apresentaram tamanhos médios mínimos com 151 e 161 nm confirmando os tamanhos de partículas determinados por DLS (espalhamento dinâmico de luz), porém, mostraram a presença de aglomerados.

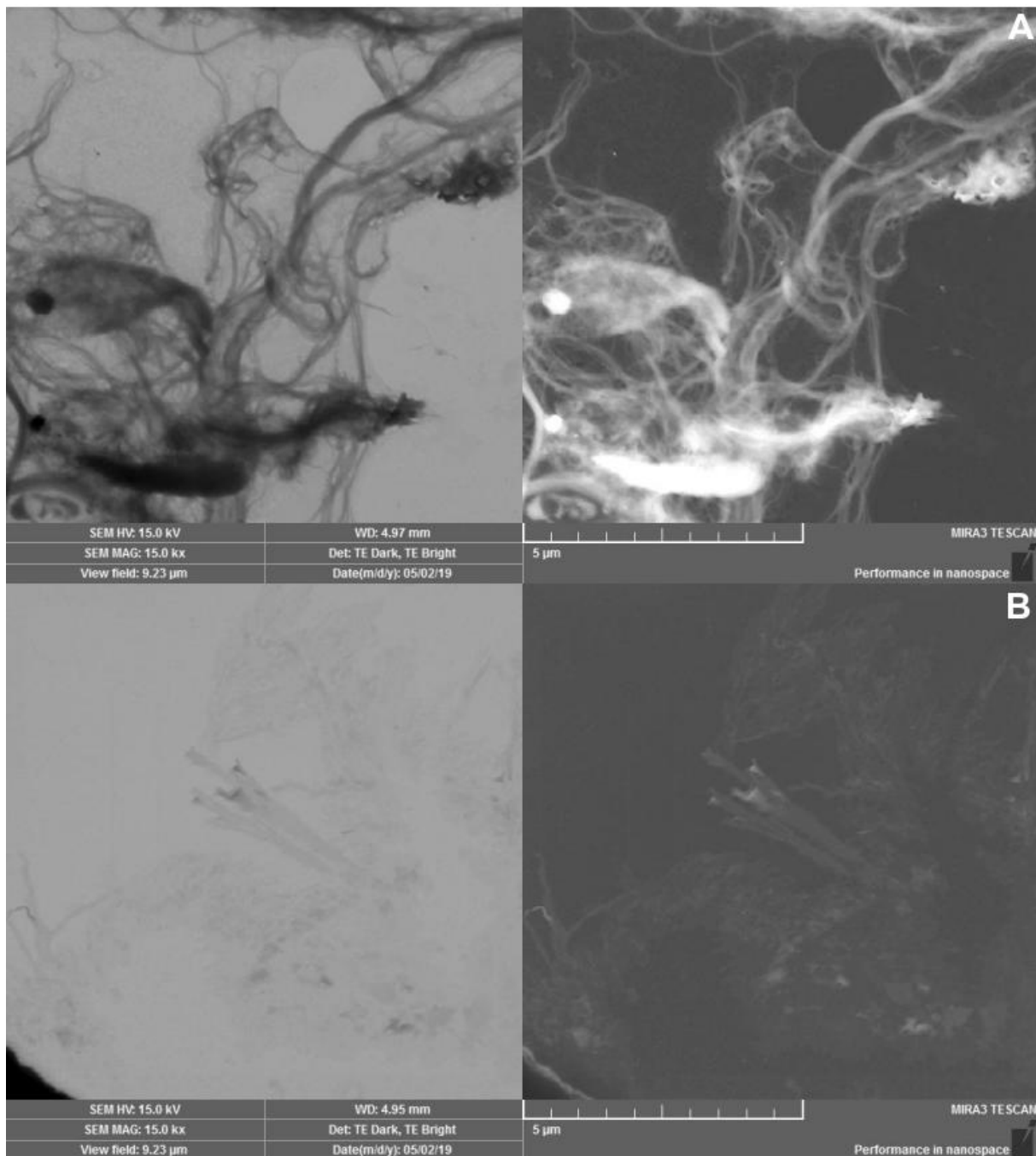
As Figuras 19 a 22, correspondentes ao Tratamento 2, afirmam a presença de nanocelulose e nanolignina de forma mais dispersa, contudo, é notável que as micrografias do Tratamento 1 apresentaram estruturas de celulose com pouca alteração na conformação, com fibras alongadas e uniformes, como exemplo as Figuras 14 e 15.

Figura 13 - Micrografias de hidrólise enzimática de 24h da casca de soja do Tratamento 1 (T1), em visualização de 15kV. Contraste de coloração branca em A (distância de 100 μm) e B (distância de 2 μm).



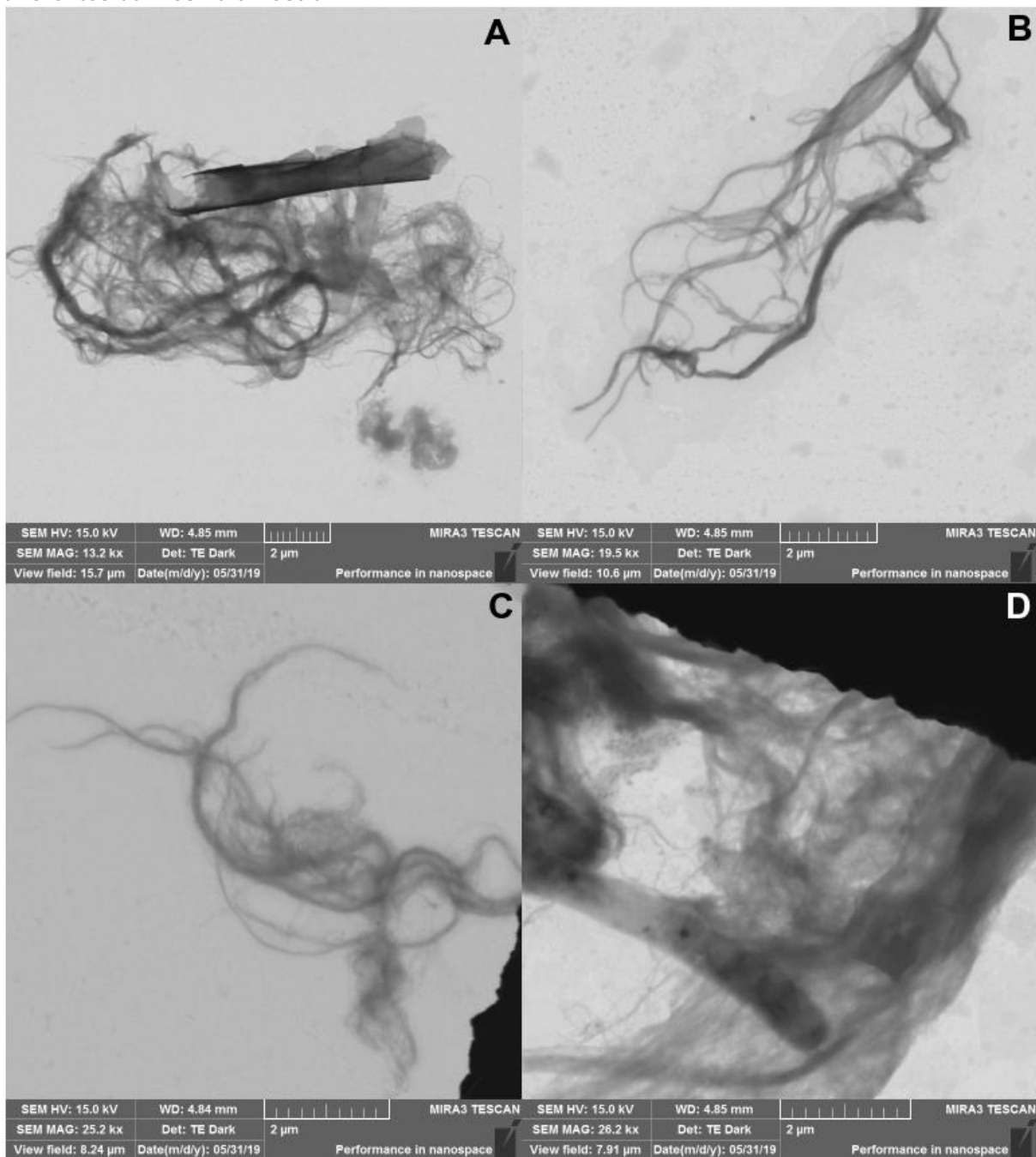
Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 14 - Micrografias de nanofibras de celulose com 48h de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento 1 (T1), em visualização de 15kV. Contraste de coloração branca em A e B.



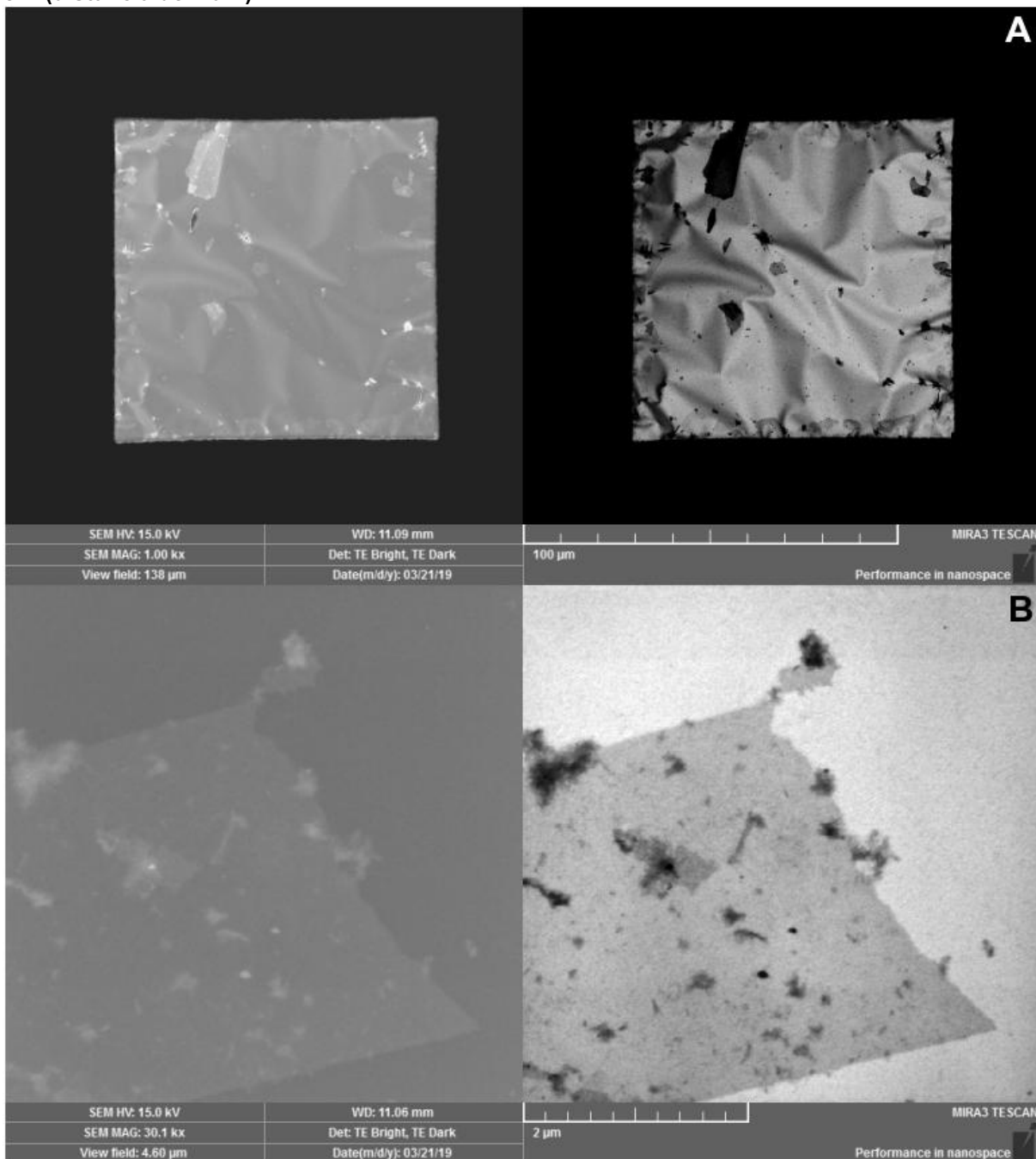
Fonte: Aatoria própria(2021).

Figura 15 - Micrografias de nanofibras de celulose de 72h de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento 1 (T1), em visualização de 15kV. A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.



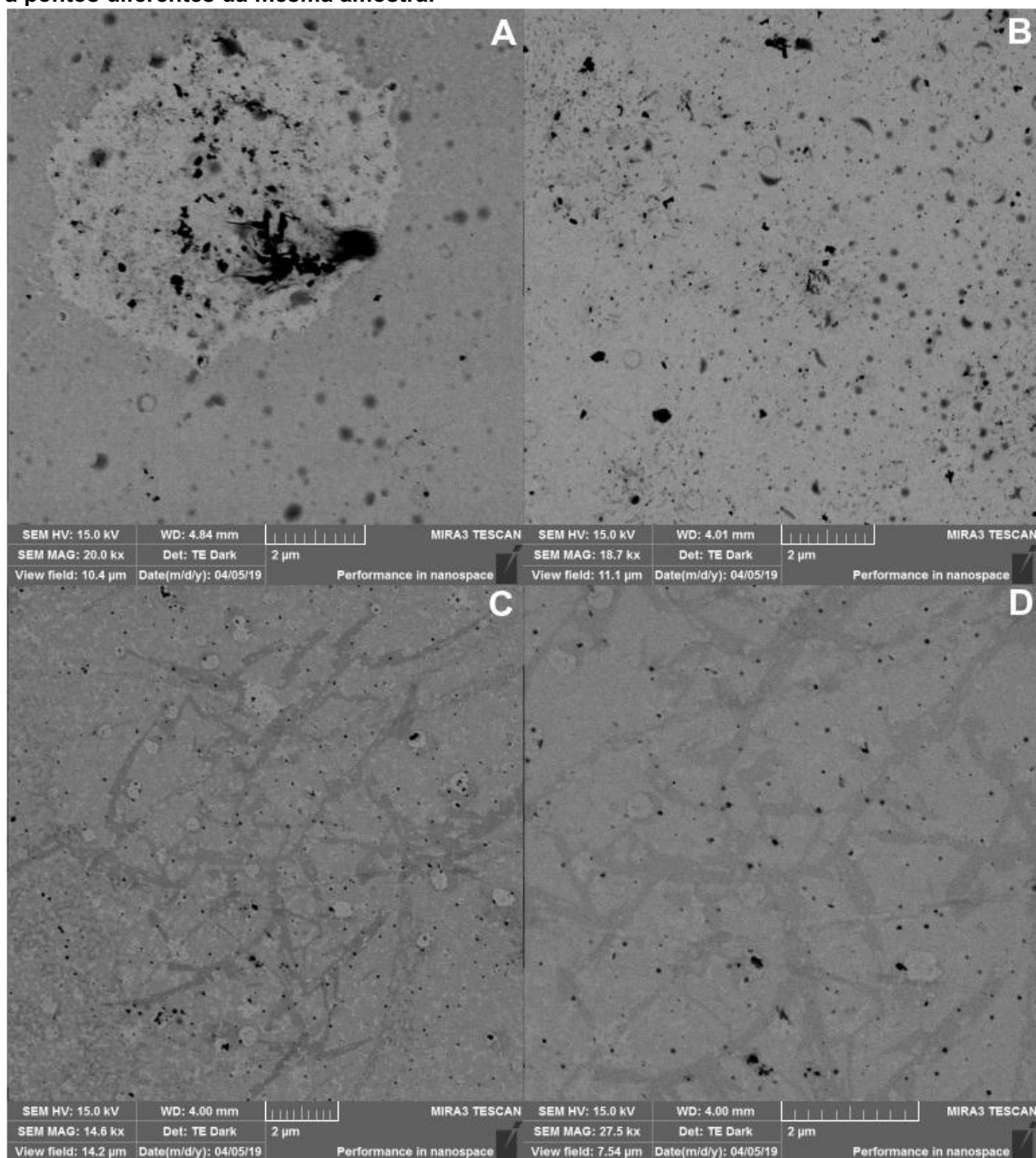
Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 16 - Micrografias de nanocristais de celulose com 10 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento 1 (T1). Contraste de coloração branca em A (distância de 100 μm) e B (distância de 2 μm).



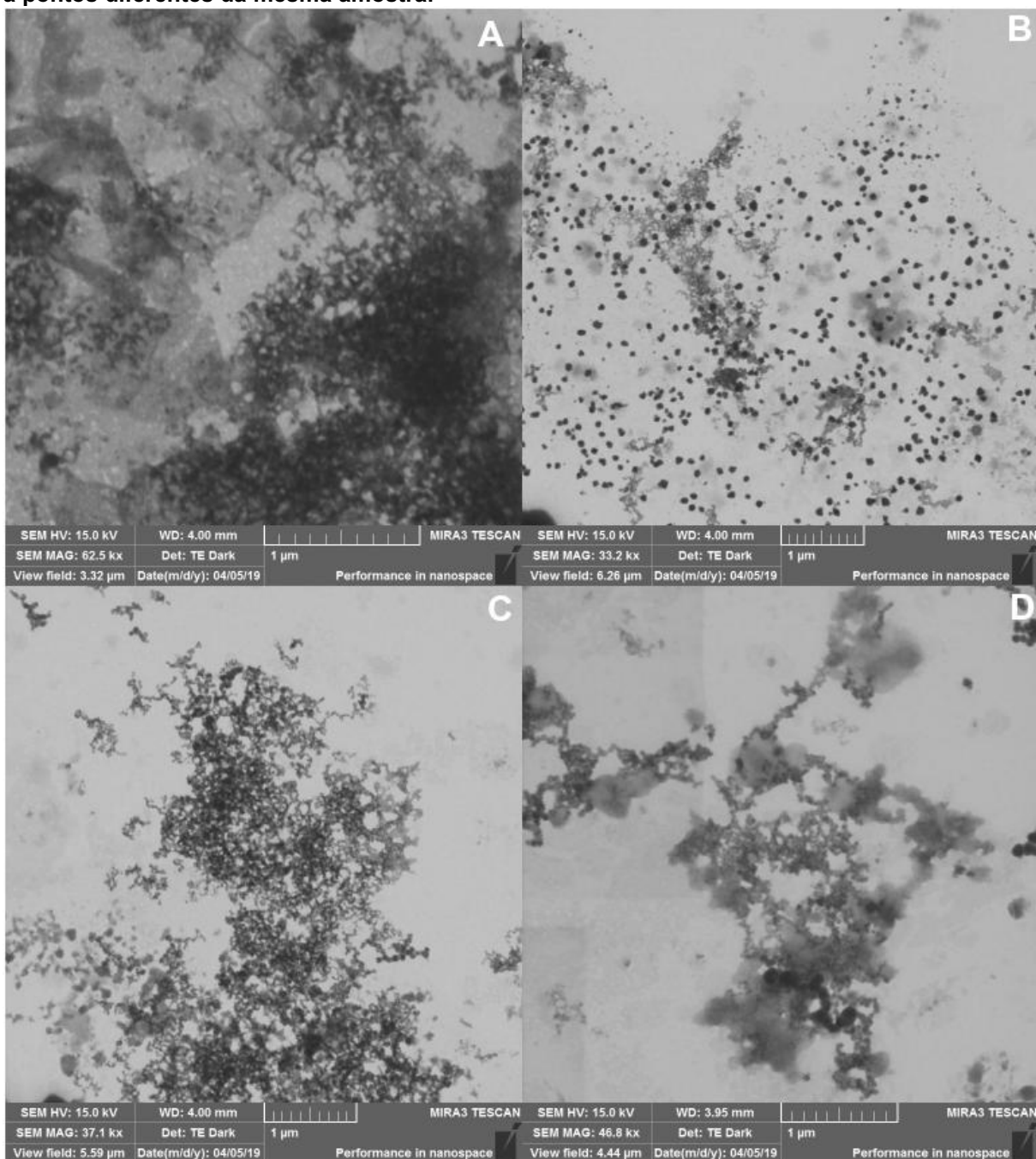
Fonte: Aatoria própria(2021).

Figura 17 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T1), em diluição de 1:5. A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.



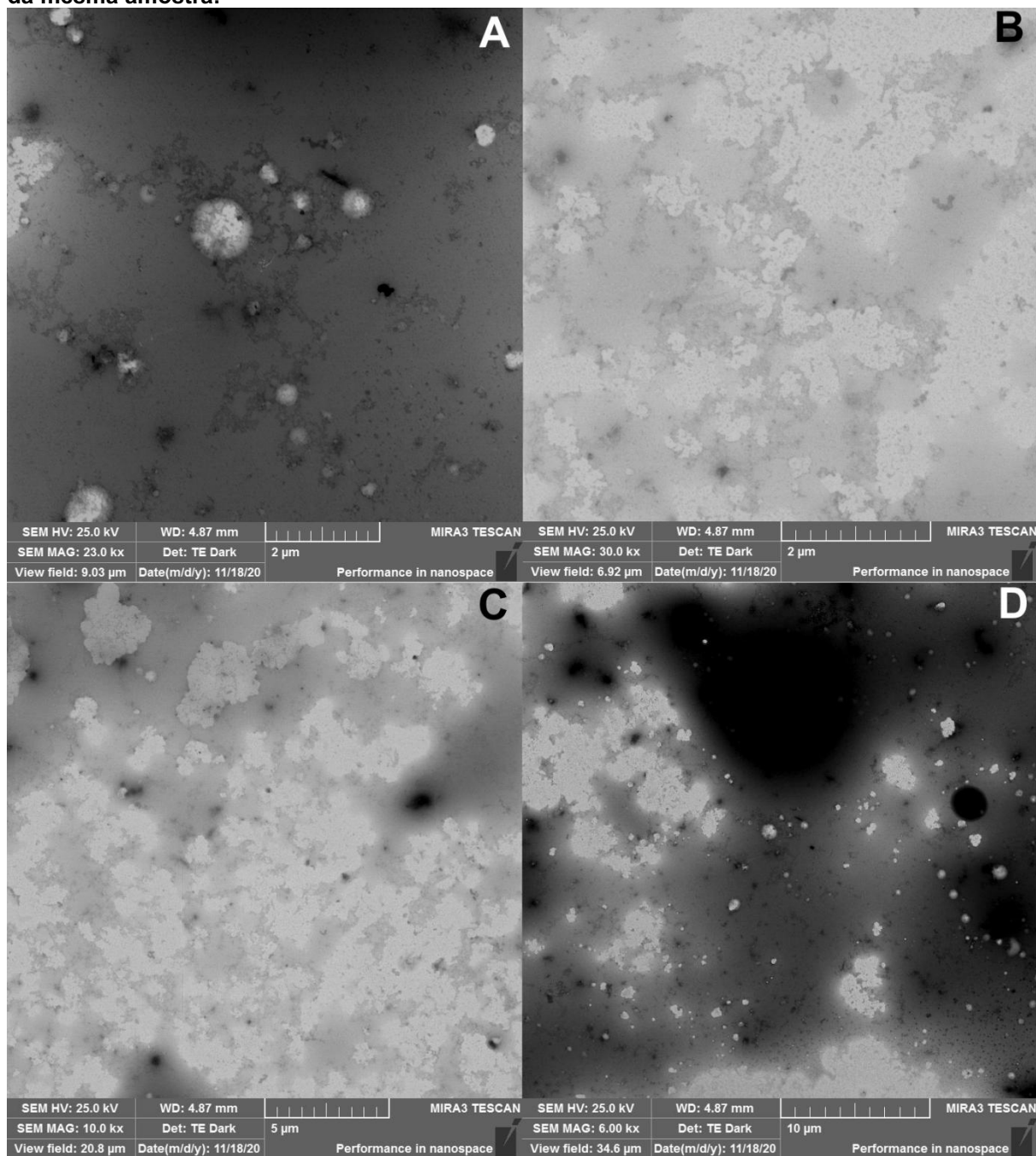
Fonte: Aatoria própria (2021).

Figura 18 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T1), em diluição de 1:10. A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.



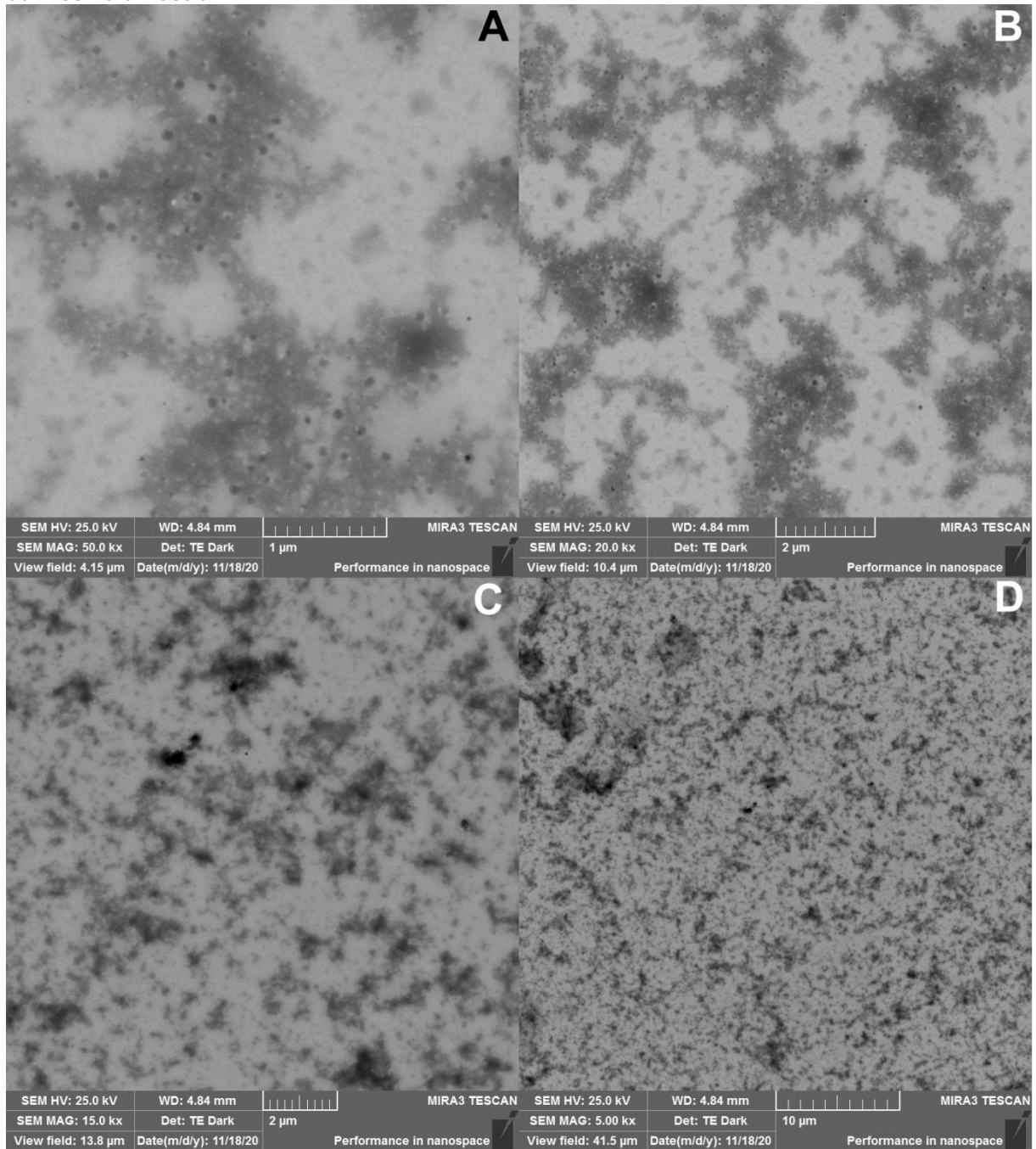
Fonte: Autoria própria(2021).

Figura 19 - Micrografias de nanoestruturas de celulose e lignina de 10 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.



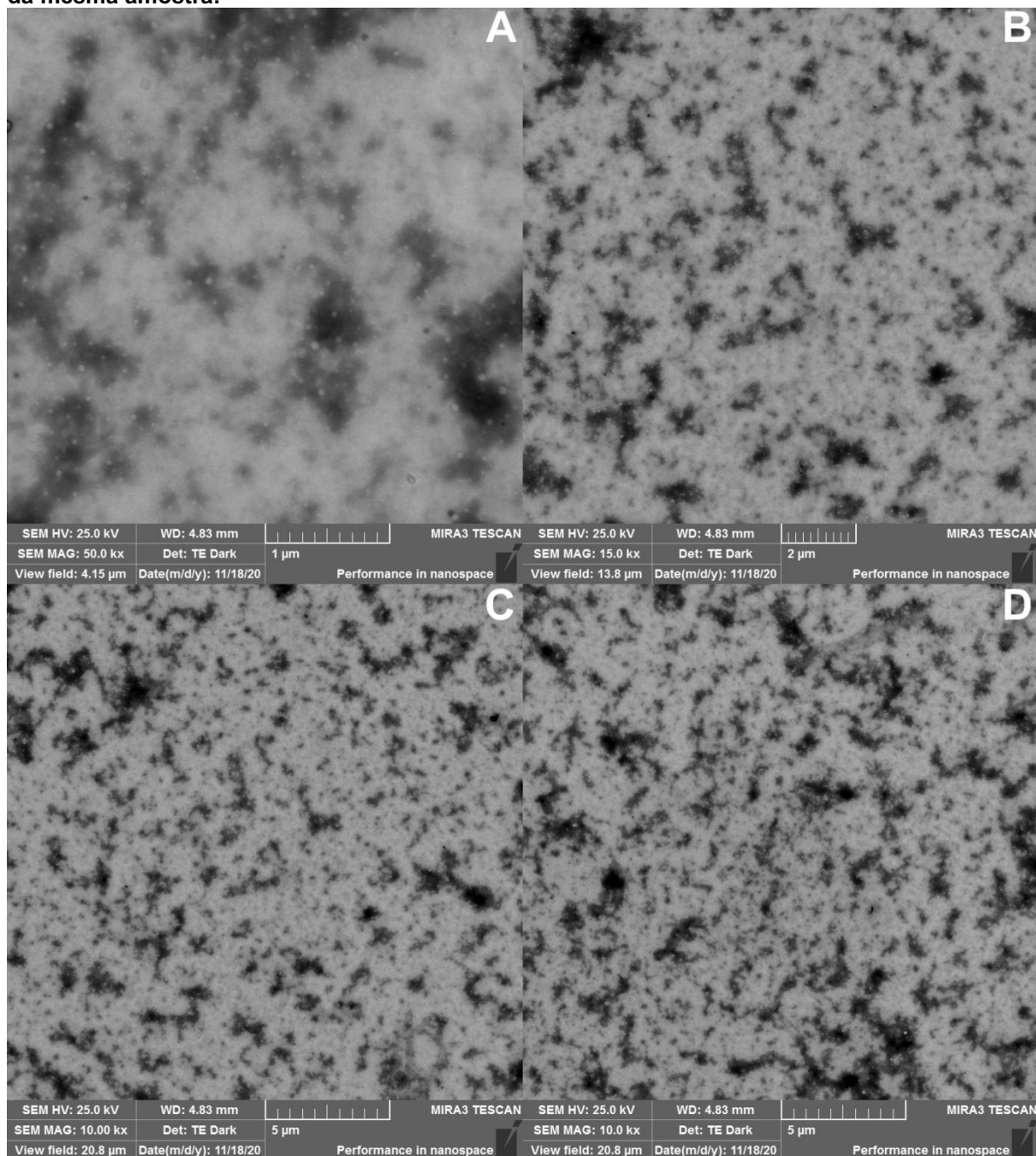
Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 20 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 15 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.



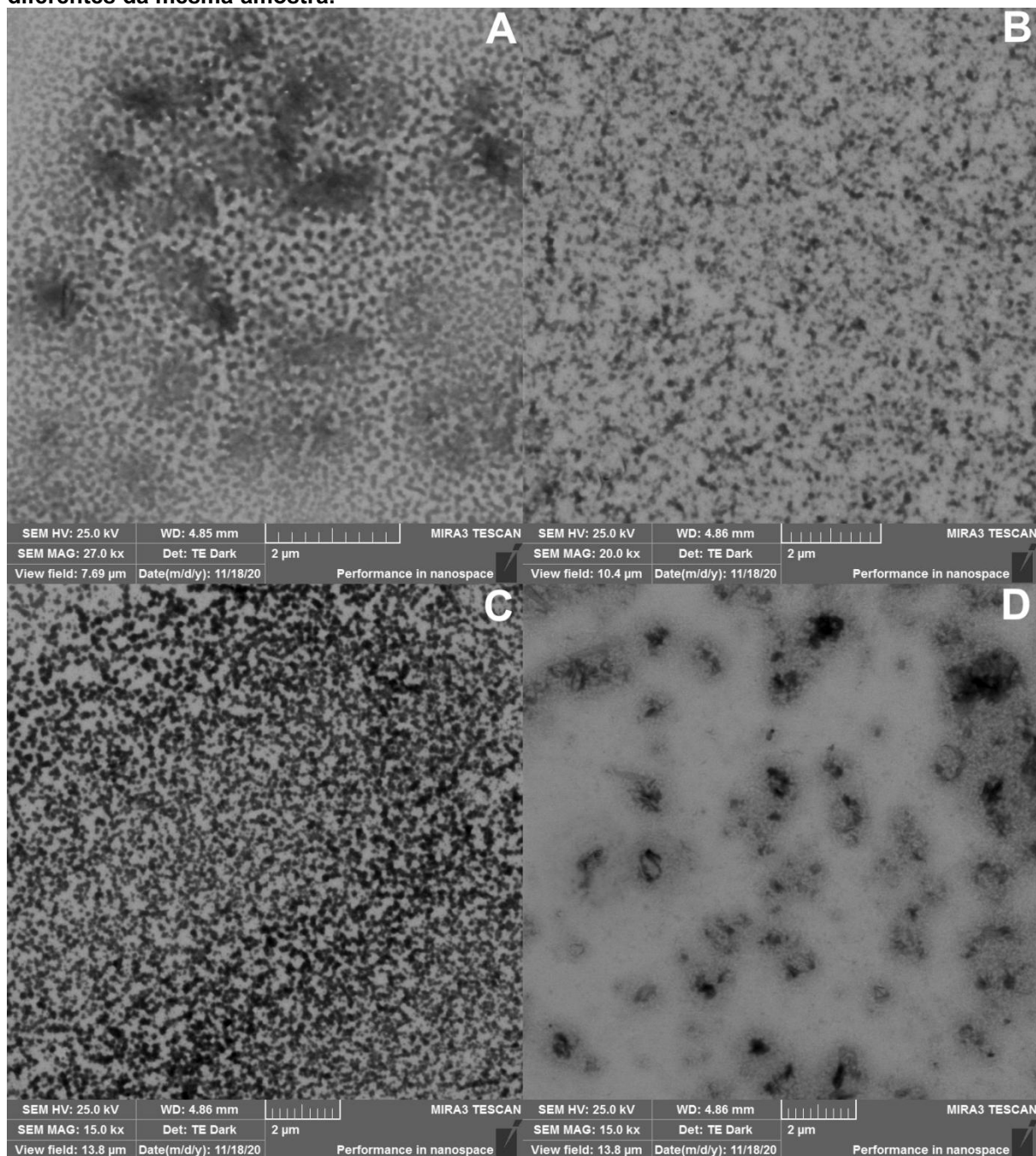
Fonte: Aatoria própria(2021).

Figura 21 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 20 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C e D correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.



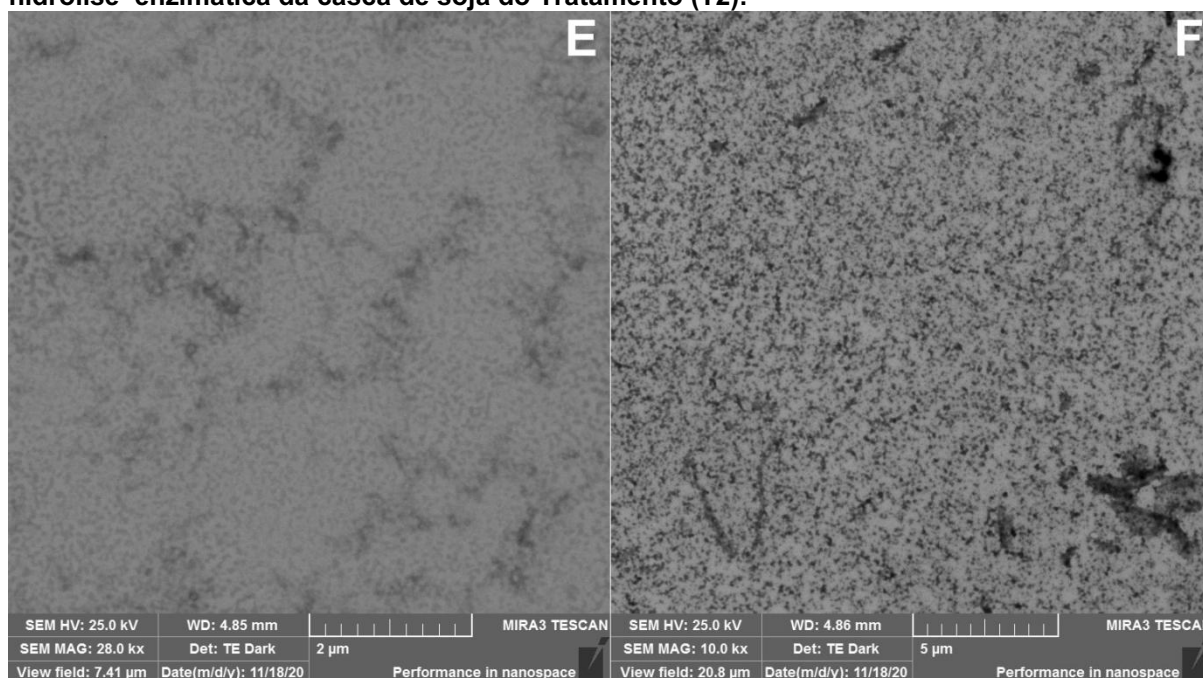
Fonte: Aatoria própria (2021).

Figura 22 - Micrografias de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2). A, B, C, D, E e F correspondem a pontos diferentes da mesma amostra.



Fonte: Autoria própria (2021).

Continuação das micrografias da Figura 22, de nanocristais de celulose e lignina de 25 dias de hidrólise enzimática da casca de soja do Tratamento (T2).



Fonte: Autoria própria (2021).

O uso de microrganismos altera a estrutura dos componentes e aumenta a hidrólise enzimática, ajudando no processo de transformação da celulose em glicose, a molécula energética consumida pelos microrganismos. Pois com o processo de pré-tratamento biológico, há a desagregação de microfibrilas de celulose, que antes limitava a acessibilidade de enzimas e, portanto, a decomposição física de agregados microfibrilares, necessária para permitir a ação enzimática em uma rede de fibrilas separadas (CARELI; DUARTE; PEREIRA, 2016).

5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Para estudar o efeito dos tratamentos na cristalinidade das nanopartículas, foram realizados difratogramas de Raios X, os quais foram registrados na faixa 2θ de 5° a 60° . Os difratogramas mostraram perfil diferentes nos tratamentos, onde a Figura 23 a largura do pico pode corresponder a uma estrutura amorfa (halo amorfo). Porém, a Figura 24 apresenta um comportamento do pico com amplitude mais intensa podendo sinalizar estrutura cristalina.

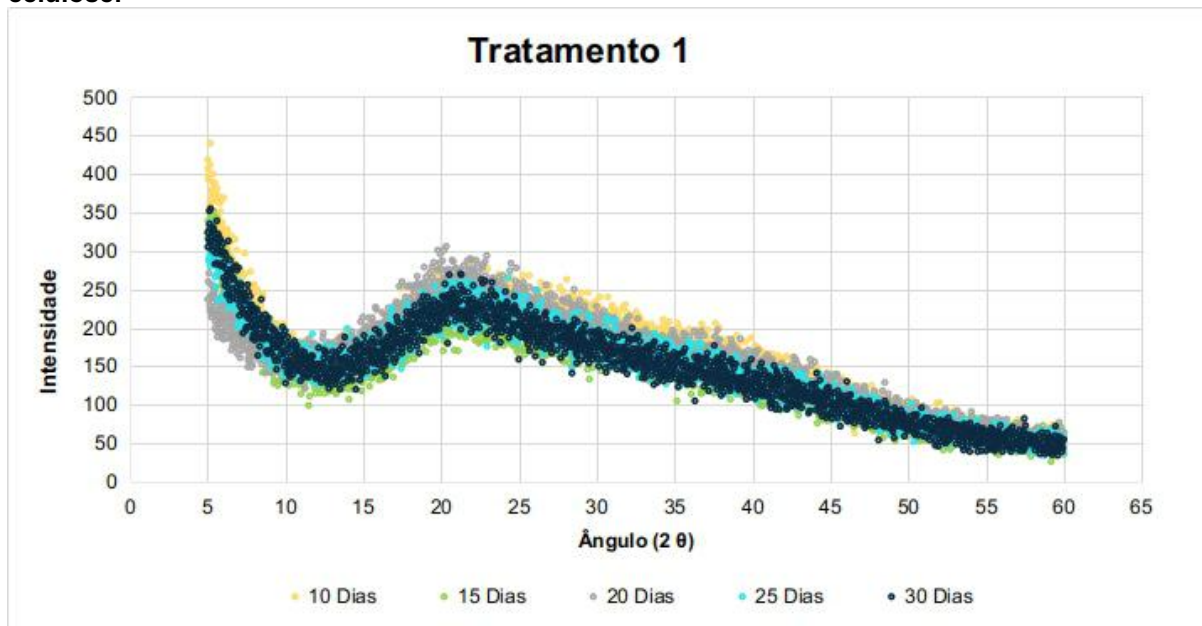
O tratamento 1 (Figura 23) não recebeu pré-tratamento antes da reação de hidrólise. As nanocargas formadas se formaram de acordo com a estrutura e

propriedades originais da casca do grão de soja. No difratograma, o pico é menos acentuado por causa da lignina que inibe a cristalinidade da celulose produzindo um halo amorfo extenso. As frações de lignina e hemicelulose da parede celular contribuem apenas para o perfil amorfo (não cristalino), pois esses componentes estruturais têm baixa estereorregularidade e são incapazes de se organizar em estruturas cristalinas repetidas (PEREIRA; ARANTES, 2020; IBBETT et al., 2013).

O tratamento 2 (Figura 24), recebeu um pré-tratamento com ácido orgânico antes da reação de hidrólise, para remover uma certa quantidade de lignina, cera e óleos que cobrem a superfície externa da parede celular da fibra, e que possuem característica amorfa. Rompendo as ligações α -aril éter e β -aril éter da macromolécula de lignina em fragmentos menores e solúveis nos meios aquoso e alcalino, permitindo o desmembramento do complexo lignina-celulose a partir do isolamento das fibras (SILVA et al., 2009; NIRMAL et al., 2020).

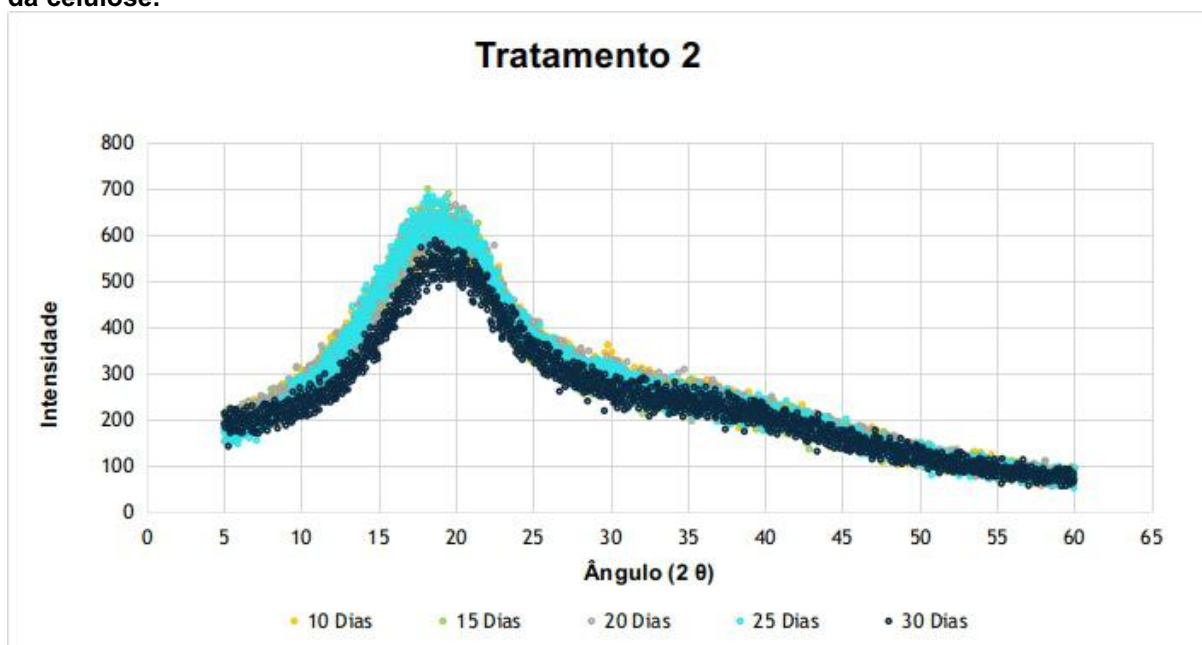
Por isso o pico é mais intenso e estreito, pois não está presente a lignina ou em quantidade muito pequena. Neste processo permanece a celulose e são removidos extrativos com estrutura amorfa. Deste modo, gera a liberação da região cristalina da celulose, mais resistente à hidrólise devido à presença de fortes ligações de hidrogênio, e a degradação ocorre apenas na superfície da fibra para que as nanofibras intactas possam ser extraídas (ISLAM et al., 2014).

Figura 23 - Difratoograma da hidrólise enzimática da casca de soja referente ao tratamento 1. Correspondente de 10 até 30 dias. O pico em torno de 20° no eixo 2θ indica a estrutura da celulose.



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 24 - Difratoograma da hidrólise enzimática da casca de soja referente ao tratamento 2. Correspondente de 10 até 30 dias. O pico em torno de 18 e 20° no eixo 2θ indica a estrutura da celulose.



Fonte: Autoria própria (2021).

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que nanoestruturas de celulose e lignina podem ser extraídas a partir de casca do grão de soja. Os tratamentos empregados foram eficazes e permitiram a obtenção de nanolignina e nanofibra de celulose para futuras aplicações.

O resíduo agroindustrial utilizado serviu como fonte de nutrientes para os microrganismos agirem no processo fermentativo, degradando as fibras de celulose e lignina. As condições de hidrólise utilizadas no trabalho facilitam a utilização desse tipo de resíduo, servindo como alternativa e ajuda na solução de problemas de poluição que poderiam causar com o seu descarte incorreto (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Os microrganismos isolados do grão da casca de soja tiveram grande importância nos procedimentos, onde os estudos realizados para ampliar o conhecimento sobre esses organismos auxiliaram tanto na obtenção das nanoestruturas quanto em como bioprospectar indivíduos de interesse biotecnológico na degradação de celulose e lignina, sem gerar mais resíduos.

À partir das micrografias foram registradas a presença das nanoestruturas de celulose e lignina, em paralelo com os resultados de concentração e Raio X, onde nas análises os períodos de 20 e 25 dias foram os melhor nos três parâmetros. Comparando os difratogramas (Figuras 23 e 24) com as Figuras 17, 18 e 22, há complementaridade de informações, pela existência de um pico correspondente às nanoestruturas de nanocelulose e nanolignina.

Assim, ficou claro a importância do uso do resíduo agroindustrial como substrato para o processo fermentativo, pois na maioria das vezes, fontes primárias têm sido usadas para a produção de nanocelulose e nanolignina, e apenas muito recentemente novos artigos científicos lidam com a exploração das fontes secundárias e terciárias. Realçando assim, o interesse em trabalhar com a casca do grão de soja, que a partir dos resultados obtidos demonstraram o enorme potencial de aplicação das nanoestruturas produzidas pelos fungos isolados e assim gerar avanços tecnológicos necessários para o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal.

REFERÊNCIAS

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; HOFFMANN, K.; DE HOOG, G. S.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; VOIGT, K.; BIBASHI, E.; WALTHER, G. Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* pro parte, *Mycocladius*). **Journal of Clinical Microbiology**, Utrecht, (NL), v. 48, n. 6, p. 2154-2170, 2010.

AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual review of phytopathology**, Madison (EUA), v. 49, p. 107-133, 2011.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa-UFV, 2006. Cap. 2, p. 32-58.

BALLESTEROS, M. **Book Bioalcohol Production**. Ciemat (ES), 2010. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. A volume in Woodhead Publishing Series in Energy, Cap. 6, p. 159-177.

BARRAGÁN, E. U. P.; GUERRERO, C. F. C.; ZAMUDIO, A. M.; CEPEDA, A. B. M.; HEINZE, T.; KOSCHELLA, A. Isolation of cellulose nanocrystals from *Typha domingensis* named southern cattail using a batch reactor. **Fibers and Polymers**, Altamira (MEX), v. 20, n. 6, p. 1136-1144, 2019.

BELMONT-MONTEFUSCO, E. L.; OLIVEIRA, J. B. de; MAR, H. B.; SANTA-ROSA, P. S.; HAMADA, N.; NUNES-SILVA, C. G. Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus kieffer* (Insecta: Diptera: Chironomidae). **Brazilian Journal of Development**, Curitiba (PR), v. 6, n. 5, p. 28644-28651, 2020.

BHANDARI, K. B.; LONGING, S. D.; WEST, C. P. Bees occurring in corn production fields treated with atoxigenic *Aspergillus flavus*. **Agronomy**, Texas (USA), v. 10, n. 4, p. 571, 2020.

BRUIJNINCX, P. C. A.; RINALDI, R.; WECKHUYSEN, B. M. Unlocking the potential of a sleeping giant: lignins as sustainable raw materials for renewable fuels, chemicals and materials. **Green Chemistry**, London (UK), v. 17, n. 11, p. 4860-4861, 2015.

BUGG, T. H; AHMAD, M.; HARDIMAN, E. M.; SINGH, R. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 394-400, 2011.

CARELI, R. T.; DUARTE, E. R.; PEREIRA, A. L. A. Metabolismo microbiano. **Microbiologia Básica para Ciências Agrárias**, Ed. Eduardo Robson Duarte, cap. 5, p. 61. Montes Claros: Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, 2011.

CHANG, C. C.; NG, C. C.; WANG, C. Y.; SHYU, Y. T. Activity of cellulase from Thermoactinomyces and Bacillus spp. isolated from Brassica waste compost. **Scientia Agricola**, Taiwan (TWN), v. 66, n. 3, p. 304-308, 2009.

CHEN, Y.; GONG, X.; YANG, G.; LI, Q.; ZHOU, N. Preparation and characterization of a nanolignin phenol formaldehyde resin by replacing phenol partially with lignin nanoparticles. **RSC Advances**, Xinjiang (CN), v. 9, n. 50, p. 29255-29262, 2019.

CRUZ, L. P. R. **Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida e enzimática de fibras de algodão de resíduo de tecido tingido com corante índigo**. 2017. 126 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal (RN), 2017.

CONAB. Informações Agropecuárias. **Acompanhamento da Safra Brasileira**. 11 fev. 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em: 12 fev. 2020.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - a review. **Journal of Food Engineering**, Vigo (ES), v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

COURI, S.; DA COSTA TERZI, S.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; DA COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

DA SILVA, L. C. E.; CASSAGO, A.; BATTIROLA, L. C.; DO CARMO GONÇALVES, M.; PORTUGAL, R. V. Specimen preparation optimization for size and morphology characterization of nanocellulose by TEM. **Cellulose**, v. 27, n. 9, p. 5435-5444, 2020.

DATTA, R. Acidogenic fermentation of lignocellulose—acid yield and conversion of components. **Biotechnology and Bioengineering**, Linden (EUA), v. 23, n. 9, p. 2167-2170, 1981.

DE ANDRADE SILVA, C. A.; DA SILVA, P. G. P.; DA SILVA, G. F. A.; DANTAS, D. P.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Biotransformation of fruit residues via solid state bioprocess using *Lichtheimia ramosa*. **SN Applied Sciences**, Dourados (MS), v. 2, p. 1-10, 2020.

DE PRETTO, C.; GIORDANO, R. D. L. C.; TARDIOLI, P. W.; COSTA, C. B. B. Possibilities for producing energy, fuels, and chemicals from soybean: a biorefinery concept. **Waste and Biomass Valorization**, Maringá (PR), v. 9, n. 10, p. 1703-1730, 2018.

DERBALAH, A.; KHATTAB, I.; ALLAH, M. S. Isolation and molecular identification of *Aspergillus flavus* and the study of its potential for malathion biodegradation in water. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Kafrelsheikh (EGY), v. 36, n. 7, p. 1-11, 2020.

DOS SANTOS, B. V.; RODRIGUES, P. O.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Use of an (Hemi) Cellulolytic Enzymatic extract produced by *Aspergilli* species consortium in the saccharification of Biomass Sorghum. **Applied biochemistry and biotechnology**, Uberlândia (MG), v. 189, n. 1, p. 37-48, 2019.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials today**, v. 16, n. 6, p. 220-227, 2013.

FORTUNATI, E.; PUGLIA, D.; LUZI, F.; SANTULLI, C.; KENNY, J. M.; TORRE, L. Binary PVA bio-nanocomposites containing cellulose nanocrystals extracted from different natural sources: Part I. **Carbohydrate polymers**, Terni (IT) v. 97, n. 2, p. 825-836, 2013.

GARCÍA, A.; GANDINI, A.; LABIDI, J.; BELGACEM, N.; BRAS, J. Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. **Industrial Crops and Products**, Saint-Martin-d'Hères (FR), v. 93, p. 26-38, 2016.

GIRALDO, L. R. D. **Cultivo de Lentinus crinitus (L.)Fr sobre residuos agroindustriales y evaluación de la bioactividad de sus extractos**. 2017. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias Bogotá. Colombia, 2017.

GRASSO, G.; ZANE, D.; DRAGONE, R. Microbial nanotechnology: challenges and prospects for green biocatalytic synthesis of nanoscale materials for sensoristic and biomedical applications. **Nanomaterials**, Roma (IT), v. 10, n. 1, p. 11-31, 2020.

GUERRA, A. F. Microbiologia Geral. **Fatores do crescimento microbiano**. 1ª ed. Editora Valença, 2016, 13 p.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New Haven (CT), v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HEINZ, H.; PRAMANIK, C.; HEINZ, O.; DING, Y.; MISHRA, R., K.; MARCHON, D.; FLATT, R., J.; ESTRELA-LOPIS, I.; LLOP, J.; MOYA, S.; ZIOLO, R. F. Nanoparticle decoration with surfactants: molecular interactions, assembly, and applications. **Surface Science Reports**, Colorado (USA), v. 72, n. 1, p. 1-58, 2017.

HENRIQUES, S. When Tiny Things Have a Huge Impact. Ionizing Radiation as a Tool for Nanoscale Engineering. **Internacional Atomic Energy Agency (IAEA)** (Online), Vienna (AU), v. 56, n. 3, p. 26-27.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 23-63, 1990.

HORN, B. W. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section Flavi. **Mycologia**, Dawson (GA), v. 97, n. 1, p. 202-217, 2005.

IBBETT, R.; GADDIPATI, S.; HILL, S.; TUCKER, G. Structural reorganisation of cellulose fibrils in hydrothermally deconstructed lignocellulosic biomass and relationships with enzyme digestibility. **Biotechnology for biofuels**, Nottingham (UK), v. 6, n. 1, p. 33, 2013.

ILYAS, R. A.; SAPUAN, S. M.; ISHAK, M. R.; ZAINUDIN, E. S.; ATIKAH, M. S. N. Nanocellulose reinforced starch polymer composites: A review of preparation, properties and application. In: 5TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON APPLIED SCIENCES AND ENGINEERING (ICASEA). 2018. **Anais...** Cameron Highlands: MYS, 2018. p. 325-341.

INDU, R. V. M.; PAPPA, P. V. Characterization of Keratinase Enzyme Produced by a Novel Strain of Keratinolytic Fungi *Aspergillus flavus*. **Studies in Indian Place Names**, Tamil Nadu (IND), v. 40, n. 71, p. 906-911, 2020.

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

ISLAM, M. T.; ALAM, M. M.; PATRUCCO, A.; MONTARSOLO, A.; ZOCCOLA, M. Preparation of nanocellulose: A review. **AATCC Journal of Research**, Turim (IT), v. 1, n. 5, p. 17-23, 2014.

ISLAM, S. M.; LI, Q.; AL LOMAN, A.; JU, L. K. CO₂-H₂O based pretreatment and enzyme hydrolysis of soybean hulls. **Enzyme and microbial technology**, Akron (USA), v. 106, p. 18-27, 2017.

JUIKAR, S. J.; VIGNESHWARAN, N. Extraction of nanolignin from coconut fibers by controlled microbial hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, Mumbai (IND), v. 109, p. 420 – 425, 2017.

KAMUHA, T. M. **Caracterização do crescimento de fungos filamentosos isolados da caatinga do nordeste brasileiro**. 2013. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2013.

KAUR, R.; BALA, K.; AHUJA, R. B.; SRIVASTAV, P.; BANSAL, U. Primary cutaneous mucormycosis in a patient with burn wounds due to *Lichtheimia ramosa*. **Mycopathologia**, New Delhi (IN), v. 178, n. 3 - 4, p. 291-295, 2014.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular plant pathology**, New Orleans (USA), v. 8, n. 6, p. 713-722, 2007.

KUMAR, N.; KAUR, P.; BHATIA, S. Advances in bio-nanocomposite materials for food packaging: a review. **Nutrition & Food Science**, Ludhiana (IND), v. 47, n. 4, p. 591-606, 2017.

LAHOUAR, A.; MARIN, S.; CRESPO-SEMPERE, A.; SAÏD, S.; SANCHIS, V. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. **Revista Argentina de microbiologia**, Lérida (ES), v. 48, n. 1, p. 78-85, 2016.

LAMSAL, B. P.; SRESTHA, P.; KHANAL, S. K. **Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass**. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, cap.10, p. 201-224. Environmental and Water Resources Institute (EWRI) of the American Society of Civil Engineers, Reston (EUA), 2010.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LIMA, M. C. A.; ALMEIDA, M. J. P.M. de. Articulação de textos sobre nanociência e nanotecnologia para a formação inicial de professores de física. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, Campinas (SP), v. 34, n. 4, out/dez. 2012.

LIN, L. et al., In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8217-8223, 2010.

LINDE, J.; SCHWARTZE, V.; BINDER, U.; LASS-FLÖRL, C.; VOIGT, K.; HORN, F. De novo whole-genome sequence and genome annotation of *Lichtheimia ramosa*. **Genome announcements**, Jena (DE), v. 2, n. 5, p. 1-2, 2014.

MARIM, R. A.; AVELINO, K. V.; HALABURA, M. I. W.; ARAÚJO, N. L.; SANTANA, T. T.; LINDE, G. A.; DO VALLE, J. S. *Lentinus crinitus* response to blue light on carbohydrate-active enzymes. **Bioscience Journal**, Uberlândia (MG), v. 36, n. 3, p. 924-931, 2020.

MISHRA, R. K.; SABU, A.; TIWARI, S. K. Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. **Journal of Saudi Chemical Society**, Kerala (IND), v. 22, n. 8, p. 949-978, 2018.

MURILLO, W.; SUÁREZ, H. Evaluation of nutritional values of wild mushrooms and spent substrate of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. **Heliyon**, Ibagué (CO), v. 6, n. 3, p. e03502-03506, 2020.

NASCIMENTO, D. M.; ALMEIDA, J. S.; DIAS, A. F.; FIGUEIRÊDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; FEITOSA, J. P.; ROSA, M. D. F. A novel green approach for the preparation of cellulose nanowhiskers from white coir. **Carbohydrate polymers**, Fortaleza (CE), v. 110, p. 456-463, 2014.

NIRMAL, N.; PILLAY, M. N.; MARIOLA, M.; PETRUCCIONE, F.; VAN ZYL, W. E. Formation of dialysis-free Kombucha-based bacterial nanocellulose embedded in a polypyrrole/PVA composite for bulk conductivity measurements. **RSC Advances**, Durban (ZA), v. 10, n. 46, p. 27585-27597, 2020.

NSA, I. Y.; KAREEM, R. O.; AINA, O. T.; AKINYEMI, B. T. Isolation of an emerging thermotolerant medically important Fungus, *Lichtheimia ramosa* from soil. **African Journal of Microbiology Research**, Nigeria (ZA), v. 14, n. 6, p. 237-241, 2020.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Ireland (UK), v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresources Technology**, Curitiba (PR), v. 74, p. 69–80, 2000.

PENTTILÄ, P. A.; VÁRNAI, A.; FERNÁNDEZ, M.; KONTRO, I.; LILJESTRÖM, V.; LINDNER, P.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L.; SERIMAA, R. Small-angle scattering study of structural changes in the microfibril network of nanocellulose during enzymatic hydrolysis. **Cellulose**, Helsinki (FIN), v. 20, n. 3, p. 1031-1040, 2013.

PEREIRA, B.; ARANTES, V. Production of cellulose nanocrystals integrated into a biochemical sugar platform process via enzymatic hydrolysis at high solid loading. **Industrial Crops and Products**, v. 152, p. 112377, 2020.

PEREIRA, C. B. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do cerrado, costa marinha brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato**. 2016. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

PIELHOP, T.; LARRAZÁBAL, G. O.; STUDER, M. H.; BRETHAUER, S.; SEIDEL, C. M.; VON ROHR, P. R. Lignin repolymerisation in spruce autohydrolysis pretreatment increases cellulase deactivation. **Green Chemistry**, Zurich (SWZ), v. 17, n. 6, p. 3521-3532, 2015.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M., DELABONA, P. D. S., TREMACOLDI, C. R., FARINAS, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, São Carlos (SP), v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, Campinas (SP), v. 144, p. 696-703, 2015.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS–II SIGERA. 1, 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu (PR), 2011. p. 98-105.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, Viçosa (MG), v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, M. M. F. do; BITTENCOURT, J. V. M. Taxonomia de microrganismos por sequenciamento. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/>>. Acesso em: 10 Jul 2019.

SERBENT, M. P.; GUIMARÃES, D. K. S.; DRECHSLER-SANTOS, E. R.; HELM, C. V.; GIONGO, A.; TAVARES, L. B. B. Growth, enzymatic production and morphology of the white-rot fungi *Lentinus crinitus* (L.) Fr. upon 2, 4-D herbicide exposition. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Ibirama (SC), v. 17, p. 2995–3012, 2020.

SILVA, D. C. V. D.; TIAGO, P. V.; MATTOS, J. L. S. D.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. D. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 4, p. 607-610, 2011.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e compósitos. **Química Nova**, vol. 32, p. 661-671, 2009.

SILVA, R. R.; CORSO, C. R.; MATHEUS, D. R. Effect of culture conditions on the biomass determination by ergosterol of *Lentinus crinitus* and *Psilocybe castanella*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 841-846, 2010.

SCOTT, H. W.; DEHORITY, B. A. Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria. **Journal of Bacteriology**, Ohio (EUA), v. 89, n. 5, p. 1169-1175, 1965.

SOUZA, N. F. **Processos de obtenção de nanocelulose a partir das fibras de prensagem do mesocarpo do dendê**. 2014. 104 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2014.

SOUZA, N. F.; SOUSA, M. DE S. M.; ROSA, M. DE F.; MORAIS, J. P. S.; NASCIMENTO, D. M. DO; NORÕES, A. K. M. Caracterização das fibras da prensagem do mesocarpo do dendê para posterior utilização em nanomateriais. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 5., 2010, Maceió. **Anais...** Maceió: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2010.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife (PE), v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V. DE; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina (PR), v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUCINDA, E. F.; MAJID, M. A.; RIDZUAN, M. J. M.; SULTAN, M. T. H.; GIBSON, A. G. Analysis and physicochemical properties of cellulose nanowhiskers from *Pennisetum purpureum* via different acid hydrolysis reaction time. **International Journal of Biological Macromolecules**, Perlis (MAS), v. 155, p. 241-248, 2020.

SUMARDIONO, S.; WN, A. D.; PUDJIHASTUTI, I. Livestock Feed Production from Sago Solid Waste by Pretreatment and Anaerobic Fermentation Process. In: **MATEC Web of Conferences**. EDP Sciences. Semarang (INA), v. 156, p. 3044, 2018.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Curitiba (PR), v. 13, n. 2-3, p. 205–218, 2003.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in enzymology**, v. 161, p. 238-249, 1988.

TOLEDO, A. M. N.; SOARES, L. A. S. Bionanopartículas: principais aspectos e aplicações da matéria orgânica em escala nanométrica. **Holos**, Rio Grande do Sul (RS), v. 1, p. 340-349, 2016.

TOMÁS-PEJÓ, E.; ALVIRA, P.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In: **Biofuels**. Academic press, Madrid (ES), p. 149-176, 2011.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Elsevier, 780 p. 2005.

VAZQUEZ, G.; ANTORRENA, G.; GONZALEZ, J.; FREIRE, S.; CRESPO, I. The influence of acetosolv pulping conditions on the enzymatic hydrolysis of Eucalyptus pulps. *Wood Science and Technology*, Santiago de Compostela (ES), v. 4, n. 34, p. 345–354, 2000.

WADA, M.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. **Polymer Degradation and Stability**, Japan (JP), v. 95, n. 4, p. 543-548, 2010.

WURM, F. R.; WEISS, C. K. Nanoparticles from renewable polymers. **Frontiers in chemistry**, Bingen (DE), v. 2, p. 49, 2014.

XIONG, K.; JIN, C.; LIU, G.; WU, G.; CHEN, J.; KONG, Z.. Preparation and characterization of lignin nanoparticles with controllable size by nanoprecipitation method. **Chemistry and Industry of Forest Products**, Nanjing (CN), v. 35, n. 5, p. 85-92, 2015.

ZAMBOM, M. A.; DOS SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; DA SILVA, D. C.; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences, v. 23, p. 937-943, 2001.

ANEXO A - Sequência de consenso de *Aspergillus flavus*

5'_GCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCAC
CCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCG
GGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCT
GATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATG
GATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGT
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG
GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGC
TTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAG
CGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGT
AGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT_3'

ANEXO B - Sequência de consenso de *Lichteima ramosa*

5'_TAGTAGTTCCTCACAGTTTTGTGCAAAGTCGGGTCAACTTGGTTGGCTCTGC
CTTGTGCTGTAGATCTGGTTGTTGGCATAGAGACCCTCCTTTTAGGAGACTTGT
GCCACTACTAAGATCTAGGCTGCTTGAAAAGAGACGTATGGACCCTTCTTTCAG
GAGACCTATGTCTCGAGTCAAAGCAAGCAAGGCAAGCCTTTGGGGCTCTAGTAC
TAACTATCCCCAAAGGTGTTTATTCTTCTCGTGTAACCATGATGTACGAAAAAG
TTAGTTGTTAACTTAAAAACAACCTCTTGGCAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG
ATGAAGAGCGTAGCAAAGTGCGATAATTATTGCGACTTGCATTCATAGCGAATC
ATCGAGTTCTCGAACGCATCTTGCGCCTAGTAGTCAATCTACTAGGCACAGTTG
TTTCAGTATCTGCAACTACCAATCAGTTCAACTTGGTTCTTTGAACCTAAGCGAG
CTGGAAATGGGCTTGTGTTGATGGCATTCAAGTTGCTGTCATGGCCTTAAATACAT
TTAGTCCTAGGCAATTGGCTTTAGTCATTTGCCGGATGTAGACTCTAGAGTGCCT
GAGGAGCAACGACTTGGTTAGTGAGTTCATAATCCAAGTCAATCAGTCTCTTCT
TGAAGTAGGTCTTAATCTTTACGGACTAGCGAGAGGATCTAA_3'

ANEXO C - Sequência de consenso de *Lentinus crinitus*

5'_CATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGCTT
TCGGGAGCTTCGAAAGCAGAGGGGNCTGGCCTTCACAAGCCGGTCTCTAATGC
CTGTAGTTGTGACCGGGGCTTACGTCTTACCACAACTCTTACAAGTATCAGAAT
GTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCT
CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGA
GCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATTCTCAACCTAACGGGTTCTTAACCGGACT
NGCTTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCGGCTTTGCTTCTGGCA_3'