



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LEVI RIBEIRO SILVA

SCREENING DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASE E
APRESENTAÇÃO DE UM PLANO DE NEGÓCIOS INICIAL PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO ACELERADOR DE COMPOSTAGEM
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

FORTALEZA-CE

2023

LEVI RIBEIRO SILVA

SCREENING DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASE E
APRESENTAÇÃO DE UM PLANO DE NEGÓCIOS INICIAL PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO ACELERADOR DE COMPOSTAGEM DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em
Biotecnologia

Orientadora: Professora Dra.
Denise Cavalcante Hissa

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581s Silva, Levi Ribeiro.

Screening de microrganismos produtores de celulase e apresentação de um plano de negócios inicial para o desenvolvimento de um produto acelerador de compostagem de resíduos agroindustriais. / Levi Ribeiro Silva. – 2023.

57 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia. 3. Empreendedorismo. 4. Gestão de resíduos. 5. Resíduos lignocelulósicos. I. Título.

CDD 661

LEVI RIBEIRO SILVA

SCREENING DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASE E
APRESENTAÇÃO DE UM PLANO DE NEGÓCIOS INICIAL PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO ACELERADOR DE COMPOSTAGEM DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biotecnologia do Centro de
Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.
Área de concentração: Microbiologia e
Empreendedorismo

Aprovada em: 07/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Denise Cavalcante Hissa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr.^a Bella Giselly Torres Alves
Biotech4Life

Prof.^a Dr.^a Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por ter me proporcionado todas as oportunidades que vivi até aqui, por ser o meu apoio e auxílio na tempestade, por estar comigo em todas as situações.

Agradeço a todos da minha família. À minha mãe, Rosângela, minha melhor amiga, conselheira, psicóloga, coach, minha maior fã, meu maior apoio, a pessoa que sempre abraçou meus sonhos e planos e sempre esteve comigo nas decisões mais importantes da minha vida, entre elas, a escolha do meu curso. Ao meu pai, uma das principais razões de eu amar a Biologia, agradeço por todas as conversas sobre ciências e por sempre estar disposto a me ajudar nas dificuldades, e a minha irmã, Isabel, presente de Deus em minha vida e meu auxílio nos momentos de ansiedade, obrigado por me trazer alegria nos dias difíceis.

Gostaria de agradecer a minha namorada, Maria Clara, que me ajudou muito com esse trabalho, obrigado pelo carinho, cuidado, apoio e por sempre sonhar comigo.

Gostaria de agradecer a toda banca examinadora por aceitarem esse desafio.

Prof.^a Dr.^a Denise Hissa, minha orientadora, muito obrigado pela confiança em minhas capacidades, pela paciência e por ter me dado a oportunidade de vir trabalhar na BiotechforLife, a sua escolha mudou minha vida.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Vânia Melo por acreditar no meu potencial, por sempre me motivar a participar de seleções e projetos e pelo conhecimento compartilhado.

À Dr.^a Maria Cristiane, minha dupla dinâmica, obrigado pelos conselhos, lanches e por ter me ensinado a usar todos os equipamentos do laboratório e a como fazer ciência.

Agradeço a Dr.^a Mirella Leite pelos conselhos, advertências e carinho. Agradeço também a Dr.^a Talita Camila, por ser um pessoa atenciosa, por todas as aulas sobre diferentes metodologias e por me mostrar o incrível mundo dos fungos.

Agradeço a essas três doutoras, Maria Cristiane, Mirella e Talita por me auxiliarem no planejamento dos experimentos e análise dos gráficos desse trabalho.

Agradeço a Dr.^a Bella Giselly, pela atenção, por enxergar em mim um ótimo profissional, pelos ensinamentos sobre organização e pelas conversas sobre música.

À Prof.^a Dr.^a Marjory Holanda, agradeço por ser um professora exemplar, suas aulas foram essenciais para eu me apaixonar por bioprocessos.

Gostaria de agradecer aos amigos da Iniciação Científica Caio Ícaro, Matheus Honorato, Matheus Henrique, Rhânia Maria, Paulo Roberto e Eric Marrocos, obrigado pela amizade, apoio e ajuda no laboratório e nas disciplinas. E também gostaria de agradecer aos meus colegas da Biotecnologia, Edu Sombra, Jonas Oliveira e Luana Lima, por toda a parceria em trabalhos e nos estudos.

Também queria agradecer a Luzia Gabrielle, Livia Pinheiro, João Victor, Saulo Gonçalves e Paulo Ricardo, pela amizade, apoio e por compartilharem seus conhecimentos comigo logo no começo da minha jornada como cientista.

Gostaria de agradecer ao seu Valdenor pelo incentivo e por sempre me receber com muita empolgação.

Agradeço a minha mentora, Jéssica Scherer, pelos conselhos, apoio e por me mostrar que a biotecnologia vai muito além da bancada.

A equipe do programa Empreende UFC, agradeço pelas mentorias, auxílio monetário e aulas sobre empreendedorismo e inovação, vocês abriram portas para que eu tivesse uma formação além do mundo da academia.

Por fim, gostaria de agradecer ao curso de Biotecnologia, em especial aos professores doutores Marjory Holanda, Nicholas Barroso, Cristina Paiva e Hermógenes David, vocês são professores incríveis, obrigado pelos ensinamentos e por sempre responderem, com prontidão, as dúvidas desse curioso aqui.

RESUMO

O aumento da demanda global de alimentos, impulsionado pelo crescimento da população, tem levado o Brasil a adotar o uso extensivo de fertilizantes minerais, resultando em impactos ambientais e riscos à saúde humana. A geração de resíduos agroindustriais é um problema para o Brasil, devido sua grande produção, já que esses resíduos oferecem risco ao meio ambiente e à saúde humana. Os biofertilizantes podem ser utilizados para aumentar a produtividade de culturas agrícolas, diminuindo a necessidade de aplicação de fertilizantes minerais. Resíduos lignocelulósicos representam uma grande parcela dos resíduos agroindustriais no Brasil, e o seu processo de compostagem é lento devido à complexidade desses compostos. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar a prospecção de fungos produtores de celulases para desenvolver um consórcio acelerador de compostagem de resíduos agroindustriais visando a elaboração de um produto, bem como a elaboração de um plano de negócios para um produto baseado nesse consórcio. Para isso, foi feito cultivo de isolados fúngicos em meios de cultura líquido com farelo de trigo como única fonte de carbono e a partir dos sobrenadantes dos cultivos foram feitas análises de atividade celulásica total. A partir dessas análises, foram escolhidos dois isolados, EIRA 2 e EIRA 6 que apresentaram atividade celulásica de 0,0541 U/mL e 0,0510 U/mL. Após isso, foram feitos ensaios de antagonismo *in vitro* com esses dois isolados, onde não foi observada atividade antagonista. Os isolados EIRA 2 e EIRA 6 se apresentaram como potenciais aceleradores de compostagem, porém é necessário verificar o seu potencial patogênico para plantas e para humanos. O plano de negócios elaborado comprovou a importância do produto por meio do estudo do mercado e o próximo passo será o desenvolvimento de um Mínimo Produto Viável.

Palavras-chave: Biotecnologia, Microbiologia, Empreendedorismo, Gestão de Resíduos, Resíduos lignocelulósicos.

ABSTRACT

The increase in global demand for food, driven by population growth, has led Brazil to adopt the extensive use of mineral fertilizers, resulting in environmental impacts and risks to human health. The generation of agro-industrial waste is a problem for Brazil due to its large production, as these residues pose a risk to the environment and human health. Biofertilizers can be used to increase the productivity of agricultural crops, reducing the need for mineral fertilizers. Lignocellulosic residues represent a significant portion of agro-industrial waste in Brazil, and their composting process is slow due to the complexity of these compounds. Within this context, the objective of this work was to prospect cellulase-producing fungi to develop a composting accelerator consortium for agro-industrial waste, aiming to create a product. Additionally, a business plan for a product based on this consortium was developed. For this purpose, fungal isolates were cultivated in liquid culture media with wheat bran as the sole carbon source. Analyses of total cellulase activity were performed on the culture supernatants. Based on these analyses, two isolates, EIRA 2 and EIRA 6, were selected, showing cellulase activity of 0.0541 U/mL and 0.0510 U/mL, respectively. Subsequently, an in vitro antagonism assay was conducted with these two isolates, where no antagonistic activity was observed. Isolates EIRA 2 and EIRA 6 appeared as potential composting accelerators, but it is necessary to assess their potential pathogenicity to plants and humans. The business plan confirmed the importance of the product through market research, and the next step will be the development of a Minimum Viable Product.

Keywords: Biotechnology, Microbiology, Entrepreneurship, Waste Management, Lignocellulosic waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Resultado da Balança Comercial Brasileira de 2010 a 2020 (em US\$ bilhões).....	15
Figura 2 - Relação entre a gestão de resíduos agroindustriais no Brasil e as ODS..	18
Figura 3 - estrutura molecular da celulose, formada por unidades de celobiose	22
Figura 4 - Infográfico explicando, de forma resumida, a metodologia de determinação de atividade celulolítica de GHOSE (1987)	29
Figura 5 - Cultivos dos isolados selecionados em meio de cultura indutor de produção de celulasas após o período de incubação de 96h	33
Figura 6 - Comparação dos valores das atividades celulasas totais dos Isolados cultivados em fermentação submersa por 96 h, 30 °C e 150 rpm.....	35
Figura 7 - Resultado do ensaio de antagonismo	36
Figura 8 - Logo e logotipo da marca.....	38
Figura 9 - Fonte Open Sans	38
Figura 10 - Paleta de cores da marca	39
Figura 11 - Publicações da Insecta Shoes, representando a paleta de cores da marca	39
Figura 12 - Logo da empresa Bioclone	40
Figura 13 - - Infográfico resumindo as funções dos integrantes da LeafLisex e seus currículos.....	40
Figura 14 - Uso de biofertilizantes no mundo	42
Figura 15 - Comparação entre o LeafLisex e concorrentes.....	43
Figura 16 - Comparação entre o LeafLisex e os concorrentes quanto a formulação .	44
Figura 17 - Protótipo da página de venda do LeafLisex	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre os fungos da Coleção de Microrganismos do Lembiotech e os gêneros de fungos relevantes na produção de celulasas encontrados na literatura	25
Tabela 2 - Atividades de solubilização de fosfato e produção de sideróforos detectadas nos isolados pré-selecionados.	26
Tabela 3 - Meio Mandels e Weber	28
Tabela 4 - Isolados cultivados em fermentação submersa por 96 h, 30 °C e 150 rpm e os valores das atividades celulolíticas totais em U/mL.....	34
Tabela 5- Valores das concentrações de proteínas totais e de atividade específica dos isolados cultivados em fermentação submersa por 96h, 30 °C e 150 rpm.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Resíduos Orgânicos	14
2.2	A agroindústria no Brasil	14
2.3	Uso de fertilizantes minerais no Brasil	15
2.4	A geração de resíduos do setor agroindustrial brasileiro	17
2.5	Compostagem	19
2.6	Resíduos Lignocelulósicos	20
2.6.1	<i>Celulose</i>	<i>21</i>
2.6.2	<i>Microrganismos produtores de celulasas e aceleração do processo de compostagem de resíduos celulósicos</i>	<i>22</i>
3	OBJETIVO.....	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	Pré-seleção de microrganismos	25
4.2	Ativação dos fungos selecionados	26
4.3	Cultivo de microrganismos em meio líquido indutor de produção de celulase	27
4.4	Determinação de atividade celulásica	28
4.4.1	<i>Determinação de concentração de açúcares redutores.....</i>	<i>29</i>
4.4.2	<i>Preparo da curva padrão de concentração.....</i>	<i>29</i>
4.4.3	<i>Determinação da atividade enzimática em papel filtro.....</i>	<i>30</i>
4.5	Determinação das concentrações de proteínas totais	31

4.6	Determinação de Atividade Antagonista in vitro	31
4.7	Plano de negócios	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Cultivo de microrganismos em meio indutor de produção de celulases	33
5.2	Determinação de atividade celulásica	34
5.3	Determinação das concentrações de proteínas totais	35
5.4	Determinação de Atividade Antagonista in vitro	36
5.5	Plano de Negócios.....	37
5.5.1	<i>Proposta de Valor.....</i>	37
5.5.2	<i>Nome da empresa, logo e cores da marca</i>	37
5.5.3	<i>Equipe.....</i>	40
5.5.4	<i>Mercado.....</i>	41
5.5.5	<i>Concorrentes</i>	42
5.5.6	<i>Parcerias.....</i>	44
5.5.7	<i>Segmento de Clientes.....</i>	44
5.5.8	<i>Modelo de monetização</i>	45
5.5.9	<i>Canais de venda e de canais de realacionamento com o cliente e promoção do produto</i>	45
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A demanda global por alimentos, impulsionada pelo crescimento populacional destaca a necessidade do aumento da produtividade agrícola. Para tanto, o Brasil tem feito o uso extensivo de fertilizantes minerais, resultando em graves impactos ambientais e riscos para saúde humana, incluindo eutrofização de rios e contaminação por metais pesados (CHANDRAJITH; DISSANAYAKE, 2009; FERNANDES, 2022; REETZ, 2016).

Nesse contexto, os biofertilizantes surgem como uma alternativa sustentável, promovendo produtividade e saúde do solo de maneira menos prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana. O uso de resíduos como biofertilizantes mostrou-se eficaz na agricultura, dentre eles, os produtos do processo de compostagem (DU JARDIN, 2015; YAKHIN *et al.*, 2017).

O setor agroindustrial brasileiro, apesar de sua importância econômica, enfrenta desafios relacionados à gestão de resíduos, tais como cascas, bagaços e esterco, que são gerados em quantidades expressivas (OLIVEIRA, 2014; SCHNEIDER, *et al.*, 2012).

Desta forma, a gestão eficiente desses resíduos é indispensável para o enfrentamento dos desafios socioeconômicos e ambientais atrelados a essa problemática, visto que a incorreta disposição desses compostos está ligada a poluição de corpos de água e do solo, disseminação de doenças e geração de odores desagradáveis.

Além disso, a correta gestão desses resíduos está diretamente relacionada a legislações ambientais, tais como a Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei 12.305/2010 de 2 de agosto de 2010), que estabelece diretrizes ao gerenciamento de resíduos, e políticas internacionais, tais como os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS).

Diante desse cenário, a compostagem surge como uma valiosa alternativa na gestão de resíduos agroindustriais, sendo um método utilizado desde os tempos antigos. A compostagem permite a redução do volume de resíduos e fornece o composto, produto húmico adquirido após o processo de compostagem, rico em compostos orgânicos capazes de aumentar a produtividade do solo (DEBERNARDI-VAZQUEZ; AGUILAR-RIVERA; NUÑEZ-PASTRANA, 2020).

Os resíduos lignocelulósicos, como cascas, bagaços e folhas, representam uma grande parcela dos resíduos agroindustriais. Esses resíduos, compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, são extremamente abundantes na natureza. Entretanto a compostagem desses resíduos é lenta, devido a complexidade dos seus constituintes, criando assim um gargalo para a exploração comercial do tratamento desses resíduos. (GALINDO, 2016; ZHANG *et al.*, 2022).

A degradação da celulose, componente dominante dos resíduos lignocelulósicos é realizada por celulasas, enzimas que hidrolizam esse polímero. Os fungos tem um papel muito importante na produção dessas enzimas, podendo ser usados como inóculos, visando a bioaugmentação de microrganismos degradadores de celulasas e a consequente aceleração do processo de compostagem de resíduos lignocelulósicos (IMRAN *et al.*, 2016).

Dentro desse contexto, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de um consórcio de fungos acelerador de degradação de resíduos agroindustriais, por meio de um screening de microrganismos produtores de celulase. Além disso, foi elaborado um plano de negócios inicial para o desenvolvimento de um produto a partir desse consórcio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos Orgânicos

Resíduo se refere a qualquer material sólido, líquido ou gasoso que é rejeitado e eliminado pelo seu proprietário, pelo fato de ele ser considerado indesejável e/ ou desprezável (SEADON, 2006).

O Brasil, sendo uma das maiores nações do mundo, produz, anualmente, grandes volumes de material orgânico. Nas zonas urbanas, esses resíduos podem ser manifestados na forma de resíduo sólido ou em lodo de esgoto, além dos provenientes da manutenção de áreas verdes. Já os setores da agroindústria e da agropecuária produzem resíduos na forma de cama de frango, dejetos, sobras de ração, cascas, palhas, sabugos e etc (GOMES, 2021).

2.2 A agroindústria no Brasil

O setor agroindustrial tem como objetivo principal a obtenção de alimentos e fibras, sendo formado pela integração das atividades de criação de animais, cultivo agrário, beneficiamento desses produtos e suas transformações, além da produção de bens industriais destinados à agropecuária (OLIVEIRA, 2014).

O agronegócio é um componente crucial para o crescimento econômico brasileiro. Em 2020, o total de bens e serviços gerados pelo agronegócio chegou ao patamar de R\$ 1,98 trilhão, que representa 27% do Produto Interno Bruto do Brasil. Dentro desse cenário, o setor agrícola detém a maior fatia, representando 70% do PIB, o equivalente a R\$ 1,38 trilhão, enquanto a pecuária contribui com os outros 30%, ou seja, R\$ 602,3 bilhões (CNA, 2021a).

Grande parte das exportações brasileiras também são oriundas do agronegócio. Em 2020, os produtos do agronegócio representaram 48% das exportações brasileiras. Além disso, desde 2010, o agronegócio tem sido o responsável por assegurar sucessivos superávits para a balança comercial brasileira, pelo fato desse setor estar constantemente ultrapassando o déficit comercial de outros setores da economia nacional, como mostra na Figura 1 (CNA, 2021b).

Figura 1 - Resultado da Balança Comercial Brasileira de 2010 a 2020 (em US\$ bilhões)



Fonte: (CNA, 2021b)

2.3 Uso de fertilizantes minerais no Brasil

A população mundial continua a crescer de maneira constante, resultando em uma demanda cada vez mais crescente por alimentos. Projeções apontam que a população global atingirá 9 bilhões de habitantes até 2050. Dessa forma, a produção de alimentos precisará aumentar em 60%, comparada os patamares alcançados em 2005/2007, para atender a demanda alimentar dessa população mundial futura (REETZ, 2016).

A agricultura tem como base fundamental o solo, que oferece suporte para a produção de alimentos, já que é nele que quase todas as plantas produtoras de alimentos crescem. Estima-se que 95% da alimentação mundial seja produzida direta ou indiretamente nos solos e para que seja alcançado a produção desejada para sustentar a grande demanda global, frequentemente é necessário aplicar mais nutrientes do que o solo naturalmente oferece (REETZ, 2016; FAO, 2015). Entretanto, a crescente intensificação da atividade humana tem resultado em uma retirada de nutrientes do solo que não são devolvidos na mesma proporção, levando à perda de matéria orgânica, degradação do solo e esgotamento de seus nutrientes (DIACONO; MONTEMURRO, 2010; HERNANI; KURIHARA; SILVA, 1999; SHELDRIK; SYERS; LINGARD, 2002).

A maior parte dos solos usados para cultivo no Brasil apresentam características típicas das regiões tropicais, tais como: acidez, profundidade, alto grau

de intemperismo, baixa disponibilidade de nutrientes e elevada acidez trocável (MANZATTO; JUNIOR; PERES, 2002). Portanto, torna-se essencial o emprego de práticas de fertilização e correção desses solos para adequá-los ao desenvolvimento das culturas desejadas, garantindo, dessa forma, o fornecimento dos nutrientes necessários para o seu crescimento (GONCALVES *et al.*, 2014).

O uso de fertilizantes minerais tem sido usado pelo Brasil e por outras nações como alternativa para o aumento da produtividade agrícola, eles surgiram no período da Revolução Industrial e tem contribuído no atendimento da crescente demanda mundial por alimentos (ERISMAN *et al.*, 2008). O grupo formado pela China, Índia, Estados Unidos e Brasil lidera o consumo mundial de fertilizantes minerais, sendo responsáveis, juntos, por 58% do consumo global (FERNANDES, 2022).

Os fertilizantes minerais contribuem para uma maior produtividade, porém, eles estão relacionados a impactos ambientais como eutrofização de águas e degradação do solo, além de impactos para a saúde humana (CHANDRAJITH; DISSANAYAKE, 2009; CHEN, 2006).

Os fertilizantes nitrogenados, por exemplo, causam prejuízos ao meio ambiente quando o nitrogênio é perdido após sua aplicação. A conversão da amônia em nitrato e a perda do mesmo por lixiviação leva a eutrofização de águas marinhas e acidificação de solos. Esta acidificação leva a redução da disponibilidade de alguns nutrientes essenciais, provocando também a liberação de elementos tóxicos, tais como o alumínio, levando a diminuição da produtividade agrícola. Além disso, a amônia, quando volatilizada, resulta na formação de sulfato de amônio, que contribui para a acidificação do solo. Já as perdas de nitrogênio por desnitrificação podem contribuir para o aumento do efeito estufa, se o produto final do processo for o óxido nitroso (FERNANDES, 2022).

Os fertilizantes fosfatados, por sua vez, podem conter metais tóxicos, advindos de suas fontes e de seu processo de produção. Metais pesados encontrados em fertilizantes fosfatados, tais como o cádmio, urânio, mercúrio, chumbo e cromo, contaminam os solos, os lençóis freáticos e são absorvidos pelos tecidos vegetais. Dessa forma, esses metais pesados podem ser absorvidos pelo corpo humano, pela ingestão de água ou alimentos contaminados (CHANDRAJITH; DISSANAYAKE, 2009).

Nesse contexto, os biofertilizantes orgânicos são uma alternativa frente aos desafios de uma agricultura sustentável, pois reduzem significativamente a

necessidade de fertilizantes minerais, que são danosos ao meio ambiente (DU JARDIN, 2015).

2.4 A geração de resíduos do setor agroindustrial brasileiro

O Brasil destaca-se como um dos principais produtores agroindustriais do mundo, o que, por sua vez, implica em uma alta produção de resíduos. No setor agroindustrial, são gerados diversos resíduos tais como cascas, bagaços, palhas agrícolas, esterco bovinos, suínos e de aviário, além de lodos provenientes de estações de tratamento de efluentes (SCHNEIDER, *et al.* 2012).

A perda de produtos agrícolas é evidente em várias fases da cadeia produtiva, começando pela colheita (cerca de 10%), seguida pelos estágios de transporte e industrialização (totalizando 50%) e ainda durante o preparo de alimentos na zona doméstica (10% do desperdício). Em suma, estima-se que a eficiência no aproveitamento de matérias primas vegetais não ultrapasse 85%, resultando em resíduos na ordem de 30 a 40% (RORIZ, 2012).

Diante desse panorama, um dos grandes desafios da sociedade é a busca por alternativas de tratamento para os resíduos produzidos pela agroindústria. Esse esforço não apenas visa cumprir as normas ambientais vigentes, mas também promover a preservação dos ecossistemas. A acumulação desordenada de resíduos orgânicos no ambiente e o tratamento não adequado deles, pode resultar na poluição de corpos de água e do solo, além de contribuir para a disseminação de doenças e geração de odores desagradáveis (OLIVEIRA, 2014).

Os resíduos agroindustriais, quando gerenciados de maneira eficiente e correta, não apenas apresentam potencial de serem reutilizados e reaproveitados em diversos sistemas, mas também podem resultar na geração de receitas paralelas. O aumento do custo de fertilizantes comerciais e a crescente preocupação com a preservação dos solos, ecossistemas e fontes de água, fazem com que o uso desses resíduos seja considerado como uma alternativa atrativa, pelo fato desta prática proporcionar a destinação correta dos resíduos produzidos pelas agroindústrias e os mesmos conterem nutrientes importantes e que podem ser utilizados como fertilizantes (PARDINHO, 2018).

Desta forma, apesar de muitos resíduos agroindustriais possuírem potencial poluente, é essencial não categorizá-los simplesmente como lixo, pelo contrário,

devem ser valorizados devido ao seu potencial valor econômico agregado (SILVA, 2007).

A correta gestão e o aproveitamento de resíduos está associada a Lei 12.305/2010, a Política Nacional de Resíduos Sólidos, que preconiza a responsabilidade compartilhada, a logística reversa, a prevenção na geração de resíduos e a destinação ambientalmente adequada de resíduos.

Além disso, a gestão dos resíduos agroindustriais no Brasil, um dos maiores produtores do setor no mundo, também está intrinsecamente vinculada a várias metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Abaixo, na Figura 2, está apresentado essa relação.

Figura 2 - Relação entre a gestão de resíduos agroindustriais no Brasil e as ODS



Fonte: Autor

Portanto, a reutilização dos resíduos sólidos agroindustriais emerge como uma alternativa viável e promissora para mitigar ou eliminar os consequentes impactos ambientais causados pela inadequada gestão desses compostos. Esta tendência, que está em expansão contínua, encontra suporte em diversas técnicas disponíveis para

a reciclagem ou transformação desses resíduos, entre elas, a compostagem (SILVA, 2007).

Diversos biofertilizantes derivados de resíduos ou matéria orgânica bruta mostram-se eficazes na agricultura, entre eles, os produtos da compostagem (YAKHIN *et al.*, 2017).

2.5 Compostagem

A compostagem não se trata de uma técnica nova, tendo sido aplicada ao longo da história como uma forma de retornar aos solos os nutrientes absorvidos pelas plantas cultivadas neles (OLIVEIRA, 2014).

Desde o estabelecimento dos primeiros assentamentos pelos humanos no período Neolítico, é praticado o armazenamento de resíduos orgânicos urbanos para posterior aplicação em campos agrícolas. As primeiras referências escritas sobre compostagem podem ser encontradas em documentos chineses escritos há mais 6000. As primeiras civilizações na América do Sul, Índia, China e Japão, já armazenavam resíduos da agricultura em poços ou amontoados por longos períodos, visando a correção das propriedades físicas e químicas do solo (DIAZ; DE BERTOLDI, 2007; STENTIFORD; SÁNCHEZ-MONEDERO, 2016).

No período da Idade Média já existia a prática do uso da compostagem para recuperação de solos pobres e degradados. No período das Cruzadas, quando os muçumanos ocuparam lugares sagrados na Palestina, os Templários se estabeleceram na Espanha e no sul da França. Eles alugavam fazendas que haviam sido devastadas pelos muçumanos durante sua retirada e que não eram cultivadas a muito tempo. Existem documentos dos Templários que mostram técnicas bem explicadas de como usar a compostagem para recuperar a fertilidade em solos áridos e esgotados. É interessante que mesmo com o pouco, ou nenhum, conhecimento científico sobre microbiologia e química naquela época já se entendia a aplicação da compostagem como forma de devolver matéria orgânica ao solo e recuperar zonas devastadas (DIAZ; DE BERTOLDI, 2007).

A compostagem representa uma técnica economicamente acessível de decomposição biológica, constituindo uma abordagem alternativa eficaz na gestão de resíduos agrícolas. Essa prática é reconhecida por sua sustentabilidade ambiental e alta adequação agronômica, uma vez que o composto resultante do processo não

apenas se configura como um fertilizante natural e orgânico, mas também possui até mesmo capacidade de recuperar e remediar solos pobres e contaminados (AL-ALAWI *et al.*, 2019; COGGER *et al.*, 2008; KARAK *et al.*, 2013).

Esse método compartilha semelhanças com os processos naturais presentes em diversos ecossistemas, tais como pântanos e pastagens, nos quais a matéria orgânica passa por um processo de degradação realizado por uma variedade de microrganismos (CARVALHO *et al.*, 2013).

Desta forma, a compostagem representa uma integração harmoniosa entre as forças naturais de decomposição com o manejo feito pelo homem, que mantém as condições controladas do processo, visando a conversão de resíduos orgânicos em um biofertilizante alternativo aos fertilizantes químicos. Esse processo implica na aceleração da degradação dos constituintes orgânicos presentes em subprodutos e rejeitos, conduzida por microrganismos termofílicos e mesofílicos. O desfecho desse processo é a obtenção de um produto final estabilizado, maduro, sem odor, higiênico e livre de patógenos, rico em substâncias húmicas com propriedades ideais para aumentar a capacidade produtiva, a fertilidade e a qualidade dos solos (CARVALHO *et al.*, 2013; DEBERNARDI-VAZQUEZ; AGUILAR-RIVERA; NUÑEZ-PASTRANA, 2020; RAZA; AHMAD, 2016).

A prática da compostagem de resíduos agroindustriais e a aplicação do composto no solo tem várias vantagens como a diminuição do peso e volume de resíduos, fornecimento de matéria orgânica humificada, minerais e consórcios microbianos benéficos associados ao saúde e crescimento de plantas, vigor vegetativo e produtividade do solo, diminuindo assim, o uso de fertilizantes sintéticos. Durante o processo de compostagem pode ocorrer também a morte de microrganismos patogênicos presentes nos resíduos. Além disso, a aplicação do composto nos cultivos pode aumentar os níveis de carbono orgânico e a capacidade de retenção de água do solos, revitalizar solos pobres e biorremediar solos contaminados por metais pesados (AZIM *et al.*, 2018; CORATO, 2020; KÜLCÜ; YALDIZ, 2014; NKWACHUKWU *et al.*, 2013).

2.6 Resíduos Lignocelulósicos

Os resíduos agroindustriais verdes, tais como bagaços, folhas e cascas, são um dos principais tipos de resíduos agroindustriais e são compostos por três

polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, sendo a celulose o polímero presente em maior quantidade nos tecidos vegetais (GALINDO, 2016; PEREIRA, 2016).

As matérias primas lignocelulásicas, assim como os celulósicos, merecem destaque dentre os resíduos orgânicos, pois são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza, sendo compreendidas, principalmente, pelos resíduos agroindustriais e urbanos. Os resíduos agroindustriais são obtidos após o processamento de matérias-primas e embora sejam vistos, muitas vezes como lixo, eles são materiais com valor agregado e o Brasil é um dos grandes geradores desse tipo de resíduo (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; LEAL; WALTER; SEABRA, 2020).

Embora a compostagem seja uma ótima opção para fertilização e tratamento de resíduos verdes, ela possui uma grande limitação, que é o tempo necessário para obter um composto orgânico seguro para aplicação no solo, sem causar danos às plantas, podendo durar, em média 60 dias. Isso se deve à abundância de lignocelulose presente nesses resíduos, fazendo com que o processo de compostagem demande longo período, criando um gargalo e resultando no não aproveitamento de parte do resíduo (ZHANG *et al.*, 2022; ZAINUDIN *et al.*, 2022). Nesse sentido, a aceleração da conversão da lignocelulose em húmus revela-se como o elemento-chave para a completa maturação do composto. Para tal, a degradação da lignocelulose durante a compostagem de resíduos verdes requer a colaboração sinérgica de microorganismos (ZHANG *et al.*, 2022).

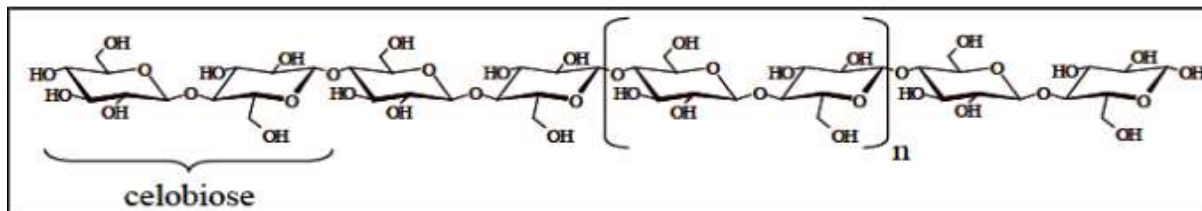
2.6.1 Celulose

A parede celular primária das células vegetais é formada por microfibrilas de celulose, que vai sendo depositada à medida que a parede vai crescendo, já a parede celular secundária é composta, principalmente por celulose e lignina. Dessa forma, dentro da parede celular, o composto mais abundante é a celulose, correspondendo a 40 a 45% do peso seco de plantas (FENGEL; WEGENER, 1989; PEREIRA, 2016).

A composição da celulose é caracterizada por uma estrutura linear e não ramificada, esse homo polissacarídeo é formado pela polimerização de 4000 a 15000 unidades de glicose interligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Cada par de glicose é definida como celobiose, dessa forma, pode-se dizer que o polímero conhecido como celulose é composto por unidades de celobiose que se repetem de forma consistente, como mostra na Figura 3 (HARGREAVES, 2008;

PEREIRA, 2016).

Figura 3 - estrutura molecular da celulose, formada por unidades de celobiose



Fonte: (HARGREAVES, 2008)

A degradação da celulose pode ser realizada por enzimas celulolíticas e a capacidade do substrato de resistir a essa degradação, ou hidrólise, é determinada pela combinação do grau de polimerização e do índice de cristalinidade de cada fibra de celulose. Além disso, a resistência da celulose é mantida por meio de incontáveis pontes de hidrogênio, de forma intra e extramolecular (HARGREAVES, 2008).

2.6.2 Microrganismos produtores de celulasas e aceleração do processo de compostagem de resíduos celulósicos

Por meio da compostagem, resíduos orgânicos são degradados por meio da atividade de diversos microrganismos, como bactérias, actinobactérias e fungos, desta forma, a inoculação de microrganismos, visando a bioaugmentação de espécies eficazes na degradação de resíduos se apresenta uma alternativa para a aceleração do processo de compostagem (GOMES, 2021; RESSETTI; CAMPOS, 2020).

A inoculação de microrganismos em processos de compostagem pode acelerar o processo, como observado no trabalho de YEOH *et. al.* (2011), onde foi usado um inóculo de isolados dos gêneros *Agromonas*, *Aspergillus*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chaetomium*, *Clostridium*, *Coprinus*, *Microbispora*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Thermoactinomyces*, *Trichoderma* e *Trichurus* para aceleração do processo de compostagem de resíduos do processamento de óleo de palma. Os inóculos foram capazes de reduzir o processo em cinco semanas, já no caso do grupo que não recebeu inóculo, o processo durou nove semanas.

As celulasas são um grupo de enzimas capazes de hidrolizar a celulose, essas enzimas são produzidas, principalmente por fungos e bactérias. Para a quebra da

celulose, é necessário várias enzimas do tipo celulase, ou seja, um complexo enzimático desse grupo. No caso dos fungos filamentosos, esse processo é composto por três grupos: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases (HARGREAVES, 2008).

Diante do cenário de aceleração de compostagem de resíduos verdes, os fungos têm um papel crucial, podendo até mesmo ser mais importantes do que as bactérias. Dentre os microrganismos produtores de celulasas, os fungos são os mais estudados, se destacando como aqueles com a maior capacidade de produzir quantidades elevadas de celulasas em comparação com outros microrganismos. Além disso, os fungos filamentosos tem a capacidade de produzir esporos prolificamente, que podem se dispersar de forma fácil e rápida sobre os substratos (IMRAN et al., 2016; IRAWAN et al., 2023; KAUSAR *et al.*, 2010).

Desta forma, a seleção de fungos produtores de celulasas se apresenta como uma oportunidade para o desenvolvimento de aceleradores de compostagem, se inserindo como uma possibilidade para resolver o desafio da gestão de resíduos verdes, e concomitantemente, oferecendo uma opção aos fertilizantes comerciais, em especial, os minerais.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade celulolítica de fungos regionais objetivando o desenvolvimento de um consórcio para a criação de um produto biotecnológico capaz de acelerar o processo de compostagem de resíduos, em especial, os lignocelulásicos, bem como, a elaboração do plano de negócios desse produto. Nesse trabalho, o foco inicial foi em identificar fungos capazes de degradar a fração celulósica do resíduos lignocelulásicos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação da atividade celulolítica de fungos isolados da caatinga obtidos da coleção de fungos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará;
- Seleção dos isolados com maior atividade celulolítica;
- Avaliação de compatibilidade entre os fungos selecionados para a montagem de um consórcio;
- Desenvolvimento de um plano de negócios inicial de um produto acelerador de compostagem formado pelo consórcio selecionado.

4 METODOLOGIA

4.1 Pré-seleção de microrganismos

Inicialmente, foi realizado uma revisão bibliográfica buscando identificar gêneros fúngicos relevantes na produção de celulases e estabelecer uma conexão entre os dados encontrados na literatura e os fungos presentes na coleção de fungos da caatinga cearense do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) da Universidade Federal do Ceará.

A partir da análise da literatura existente a cerca do tema, foram selecionados sete isolados, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação entre os fungos da Coleção de Microrganismos do Lembiotech e os gêneros de fungos relevantes na produção de celulases encontrados na literatura

Isolado	Identificação	Referências
EIRA 1, EIRA 2, EIRA 5, EIRA 6, NIRA 2 E DIRA 9	<i>Aspergillus</i> spp.	(GAO et al., 2008; KUHAD et al., 2016; SINGHANIA et al., 2013; YADAV et al., 2022)
DIRA 5	<i>Penicillium</i> spp.	(KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; VAISHNAV et al., 2018)

Fonte: Autor

Os isolados selecionados foram adquiridas a partir de amostras coletadas, em maio de 2018, em áreas da fazenda Aroeira, localizada na cidade de Irauçuba, Ceará, Brasil (3.7476° S, 39.7827° O). Segundo dados de 2016 do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), a zona de Irauçuba é considerada um dos núcleos de desertificação mais graves do país. A coleção DIRA é composta por fungos isolados de zona de desertificação, a coleção EIRA por fungos isolados de zona de exclusão e a coleção NIRA é composta por fungos isolados de zona de vegetação natural. (COSTA, 2021).

O ambiente de uma composteira é adverso, podendo atingir altas temperaturas (45 a 85 °C, na fase termofílica) (OLIVEIRA, 2014). Desta forma, para esse trabalho, se faz necessário o uso de microrganismos adaptados a condições extremas, que é o caso dos microrganismos encontrados em ambientes semiáridos, que estão adaptados

a condições de altas temperaturas, que é o caso dos isolados pré selecionados nesse trabalho (FRANCO, 2022).

Nesse trabalho não houve apenas a preocupação em selecionar microrganismos eficazes na produção de enzimas celulolíticas, pois o produto final pretendido deve possuir microrgismos capazes de melhorar a qualidade do solo. Os fungos pré-selecionados apresentaram, no trabalho de COSTA (2021), atividade de solubilização de fosfato e/ou de produção de sideróforos, como mostra na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividades de solubilização de fosfato e produção de sideróforos detectadas nos isolados pré-selecionados.

Isolado	Solubilização de fosfato	Produção de sideróforo
EIRA 1	+	+
EIRA 2	+	+
EIRA 5	+	+
EIRA 6	+	+
NIRA 2	+	+
DIRA 5	-	+
DIRA 9	-	+

Fonte: Costa (2021). Os quadros preenchidos com (+) indicam a positividade do isolado no teste realizado, já os quadros preenchidos com (-) indicam a negatividade do isolado no teste realizado.

4.2 Ativação dos fungos selecionados

Os isolados selecionados estavam armazenados em culturas realizadas pelo método de *Castellani* em tubos falcon de 15 mL, mantidos em geladeira a 4°C.

Para a ativação dos isolados foi usado o protocolo descrito a seguir. Utilizaram-se erlenmeyers de 125/150 mL, contendo o meio de cultivo líquido Saboraud(dextrose 20 g/L e mistura de digestão péptica de tecido animal e digestão pancreática de caseína (1:1) g/L), ajustados para pH de 5,6 com auxílio de um potenciômetro previamente calibrado. Em seguida, as soluções foram esterilizadas em autoclave a 120 °C por 15 min. Após a esterilização, os meios de cultura foram mantidos em temperatura ambiente por 24 h, para avaliar sua esterilidade.

Para a inoculação, com o auxílio de alças de inoculação estéreis, foi transferido um pellet de cada cultura em Castellani dos isolados selecionados para os meios de

cultura nos erlenmeyer.

Os meios de cultura foram incubados em um agitador orbital a uma temperatura de 30 °C e uma agitação constante de 150 rpm por um período de 96 horas.

Após o período de incubação, foi feita a inoculação dessas culturas em meios sólidos de ágar Saboraud, com pH ajustado para 5,6, em placas de petri. As culturas em meio de sólidos foram incubadas a uma temperatura de 35 °C, por um período de 5 a 7 dias, para verificar o crescimento dos fungos e a pureza das culturas.

4.3 Cultivo de microrganismos em meio líquido indutor de produção de celulase

O meio de cultivo utilizado para avaliar a capacidade dos isolados fúngicos de utilizar a celulase como fonte de carbono foi baseado no meio suplementar descrito por Mandels e Weber (1969) (Tabela 3). Em erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 50 ml do meio suplementar, previamente ajustado para o pH 5,6, juntamente com 1% de farelo de trigo como fonte de carbono. Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos para assegurar a completa esterilização do meio interno.

Os cultivos foram realizados em duplicata e deixados sob agitação constante de 150 rpm, a 30 °C, por 96 h.

Decorrido o tempo de incubação, foi observado o crescimento dos micélios nos meios de cultura e foi feita a obtenção dos sobrenadantes dos cultivos, com o auxílio de papéis de filtro.

Os sobrenadantes foram cuidadosamente armazenados e congelados a -15°C para análise posterior.

Tabela 3 - Meio Mandels e Weber

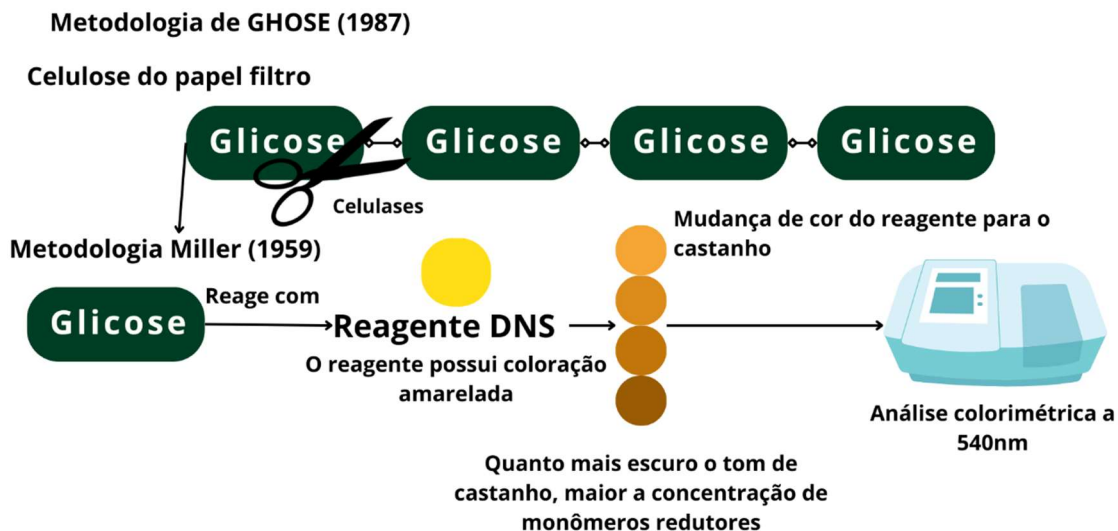
Componentes	Unidade	Concentração
KH_2PO_4	g/L	2,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	g/L	1,4
Ureia	g/L	0,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	g/L	0,3
CaCl_2	g/L	0,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	mg/L	5,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	mg/L	1,56
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	mg/L	1,4
CoCl_2	mg/L	2,0
Tween 80	mL/L	1,0

Fonte: Mandels e Weber (1969).

4.4 Determinação de atividade celulolítica

Para a escolha dos melhores isolados em relação a produção de celulasas, foi usado uma adaptação do método de determinação da atividade celulolítica, usando papel de filtro como substrato (FPase), metodologia criada por (GHOSE, 1987), que se baseia na mensuração da capacidade de endoglucanases e exoglucanases presentes no meio de degradar a celulose presente no papel. Essa mensuração é feita por meio determinação da concentração dos monômeros redutores produzidos na quebra da celulose presente no papel filtro, feita pelo método de DNS (MILLER, 1959). O método é explicado de forma resumida na Figura 4.

Figura 4 - Infográfico explicando, de forma resumida, a metodologia de determinação de atividade celulolítica de GHOSE (1987)



Fonte: Autor

4.4.1 Determinação de concentração de açúcares redutores

Foi usada uma versão adaptada do método de DNS, feito por DE VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO (2013). O ácido 3,5-dinitrosalicílico, na quantidade de 5 g, foi medido e adicionado a 100 mL de uma solução 2 M de hidróxido de sódio previamente preparada (solução A). Os dois reagentes foram misturados até a sua completa dissolução. Em paralelo, 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos em 250 mL de água destilada (solução B), sob aquecimento e agitação contínuos.

A solução A foi adicionada à solução B até que o ácido 3,5-dinitrosalicílico estivesse completamente dissolvido. Após a dissolução completa, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi transferida para um balão volumétrico e completado com água destilada para um volume final de 500 mL. A solução final foi armazenada protegida da luz.

4.4.2 Preparo da curva padrão de concentração

A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3 e 1,5 g/L.

Para análise, 500 µL de reagente DNS foram adicionados a 500 µL de amostra

em tubo de ensaio rosqueado. Em seguida, os tubos seguiram para reação em banho maria em água fervente por 15 min. Após esse período, os tubos foram resfriados em banho de gelo para finalizar a reação. Após resfriados, foram adicionados aos tubos 4000 µL de água de destilada. Após correta homogenização em vortex, as amostras passaram pela análise colorimétrica em espectrofotômetro a 540 nm.

A partir dos valores obtidos, foi possível estabelecer a curva padrão e a equação da reta, que foi usada nos ensaios posteriores.

4.4.3 Determinação da atividade enzimática usando papel filtro como substrato

Foi colocado uma tira de papel filtro de aproximadamente 1,0 x 6,0 cm em tubos. Após isso, foi adicionado 0,5 mL do sobrenadante obtido no teste de produção de celulasas e 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8. O “branco” conteve 0,5 mL de tampão citrato de sódio no lugar da alíquota de sobrenadante. Após esse processo, os tubos foram aquecidos a 50 °C, em banho maria por 60 min.

Após o período da reação em banho maria, 500 µL das amostras foram transferidas para tubos rosqueados e adicionados 500 µL do reagente DNS. Em seguida, os tubos foram aquecidos em água fervente por 15 min, e depois resfriados em banho de gelo e adicionados de 4000 µL de água destilada. Após homogenização das soluções em vortex, as amostras foram submetidas à análise colorimétrica em espectrofotômetro a 540 nm. Desta forma, foi possível obter a concentração de açúcares redutores das misturas reacionais dos tubos para o posterior cálculo das concentrações enzimáticas.

Para evitar a superestimação da atividade FPase, foi feita a análise da concentração de açúcares redutores que já estavam presentes no sobrenadante, para tal, foi feito um ensaio semelhante ao anterior, em triplicata. As misturas reacionais passaram pelas mesmas condições, porém, não foi adicionado papel filtro nos tubos de ensaio. Os valores obtidos foram usados para serem subtraídos dos valores obtidos no ensaio com o papel filtro.

Após as determinações analíticas obtidas, as atividades enzimáticas foram calculadas por meio da Equação 1 (GALINDO, 2016).

$$[\text{enzima}] = \frac{[\text{AR}] \cdot V}{T_{\text{reação}}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

[AR] = concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol}.\text{mL}^{-1}$);

V = volume da mistura reacional (mL);

Treação = tempo de reação enzimática (min).

Dessa forma, a unidade de atividade enzimática (U) foi estabelecida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 micromol (μmol) de açúcares redutores por minuto a 50 °C. Sendo assim, a expressão da atividade enzimática é representada por U por mililitro de substrato (U/mL) (GALINDO, 2016).

4.5 Determinação das concentrações de proteínas totais

Para a determinação da concentração de proteínas totais presentes nos sobrenadantes obtidos no teste de produção de celulasas foi utilizado o método de BRADFORD (1976).

Para a curva padrão, foi preparada uma solução mãe de 1 mg/mL de BSA, e a partir dela, foram preparadas soluções em microtubos limpos e novos com as seguintes concentrações de BSA: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 $\mu\text{g}/1000 \mu\text{L}$.

Foi misturado 2,5 mL do reagente Bradford com 100 μL de cada diluição preparada em tubos de ensaio de vidro em triplicata. Para o branco, foi usado 100 μL de água destilada. Foi esperado 10 min, para a condução correta da reação e após isso, as amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Desta forma, foi possível encontrar a equação da reta de concentração de proteínas totais.

Para a avaliação do teor de proteínas totais dos sobrenadantes foi misturado 2,5 mL do reagente Bradford com 100 μL dos caldos enzimáticos em tubos de ensaio de vidro, seguindo os mesmos procedimentos mencionados anteriormente, o ensaio foi feito em triplicata.

4.6 Determinação de atividade antagonista *in vitro*

Foram selecionados os dois isolados que obtiveram os melhores resultados na análise de atividade celulolítica para o ensaio de atividade antagonista *in vitro*, afim de saber se os isolados podem ser cultivados de forma pareada, desta forma, tornando possível a montagem de um consórcio.

Para o teste, foi utilizado discos obtidos com o auxílio de ponteiras de 1000 μL

de colônias crescidas a 30 °C, durante 4 dias, em meio Saboraud.

Os discos obtidos dos fungos escolhidos foram colocados em pontos equidistantes (4 cm de distância) da placa de Petri com meio de cultura Saboraud, o ensaio foi feito em triplicata. O cultivo pareado foi mantido a 30°C, durante 3 dias. Para o controle negativo, foi inoculado somente um dos fungos em um polo da placa.

4.7 Plano de negócios

Para elaboração de um plano de negócios foi realizado estudo de mercado, desenvolvimento de proposta de valor do produto, desenvolvimento de logo, entre outros processos. Essas atividades ligadas à área de empreendedorismo foram realizadas durante as mentorias do Programa de Empreendedorismo da Universidade Federal do Ceará.

5 RESULTADOS

5.1 Cultivo de microrganismos em meio indutor de produção de celulases

Após o processo de fermentação submersa em meio de cultura com farelo de trigo como única fonte de carbono, foi possível observar o crescimento de todos os sete isolados testados, como mostra na Figura 5. Evidenciando, mesmo que visualmente, a capacidade dos fungos da caatinga em produzir celulases para o seu crescimento.

Figura 5 - Cultivos dos isolados selecionados em meio de cultura indutor de produção de celulases após o período de incubação de 96h



Fonte: Autor

5.2 Determinação de atividade celulásica

Os sete isolados fúngicos testados foram submetidos a cultivos em erlenmeyeres agitados a fim de determinar a sua capacidade de produção de enzimas celulolíticas.

A atividade de celulasas totais (FPase) foi detectada em todos os 7 isolados escolhidos nas condições de fermentação enzimática de 96 horas a 30 °C. Na tabela 4 estão expressos os resultados das atividades em U/mL

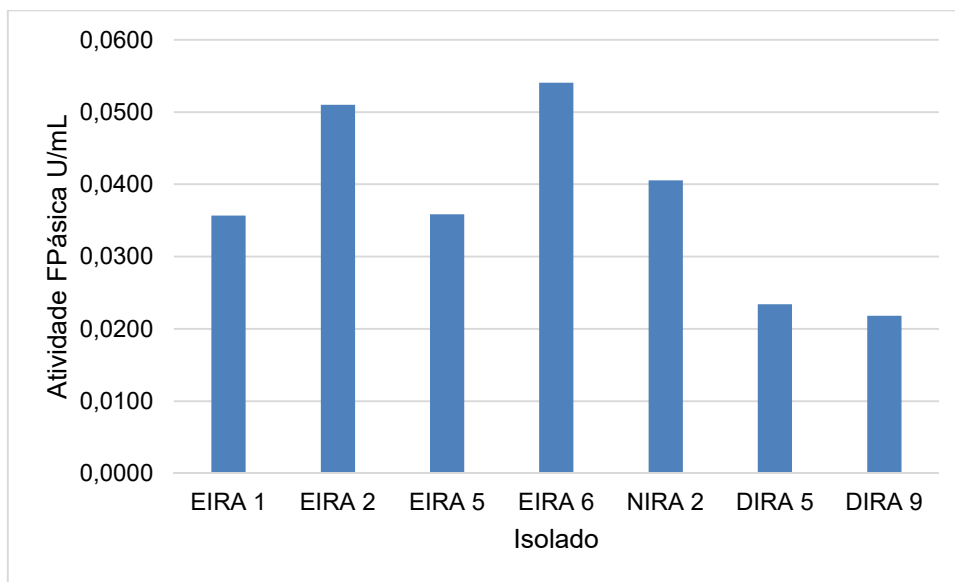
Tabela 4 - Isolados cultivados em fermentação submersa por 96 h, 30 °C e 150 rpm e os valores das atividades celulolíticas totais em U/mL

Isolado	Identificação	Atividade (U/mL)
EIRA 1	<i>Aspergillus</i> sp	0,0357 ± 0,0055
EIRA 2	<i>Aspergillus</i> sp	0,0510 ± 0,0029
EIRA 5	<i>Aspergillus</i> sp	0,0358 ± 0,0002
EIRA 6	<i>Aspergillus</i> sp	0,0541 ± 0,0087
NIRA 2	<i>Aspergillus</i> sp	0,0406 ± 0,0000
DIRA 5	<i>Penicillium</i> sp	0,0234 ± 0,0024
DIRA 9	<i>Aspergillus</i> sp	0,0218 ± 0,0012

Fonte: Autor

Para proporcionar uma visualização mais clara das diferenças nas atividades de FPase dos fungos testados, foi elaborado um gráfico (Figura 6) de barras utilizando os dados da Tabela 4.

Figura 6 - Comparação dos valores das atividades celulases totais dos Isolados cultivados em fermentação submersa por 96 h, 30 °C e 150 rpm



Fonte: Autor

Ao considerar os dados dos testes de atividade FPásica, foi observado que os isolados EIRA 6 e EIRA 2, destacaram-se com os melhores resultados, registrando os valores de atividade de 0,0541 U/mL e 0,0510 U/mL, respectivamente. Esses isolados foram escolhidos para avaliação de atividade antagonista, visando verificar a possibilidade de montar um consórcio de microrganismos com eles.

5.3 Determinação das concentrações de proteínas totais

Por meio do ensaio de determinação das concentrações de proteínas totais, foi possível observar o comportamento dos isolados em um meio de cultura pobre em nutrientes. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos no ensaio.

Tabela 5- Valores das concentrações de proteínas totais e de atividade específica dos isolados cultivados em fermentação submersa por 96h, 30 °C e 150 rpm

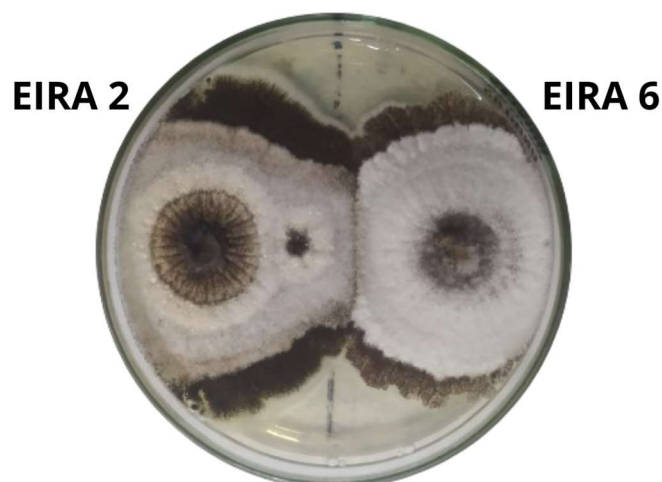
Isolado	Proteínas totais (mg/ml)	Atividade específica (U/mg)
EIRA 1	0,04 ± 0,01	0,81
EIRA 2	0,03 ± 0,00	1,70
EIRA 5	0,03 ± 0,00	1,29
EIRA 6	0,06 ± 0,01	0,92
NIRA 2	0,06 ± 0,01	0,65
DIRA 5	0,06 ± 0,00	0,42
DIRA 9	0,05 ± 0,00	0,45

Fonte: Autor

5.4 Avaliação de atividade antagonista *in vitro*

A partir desse ensaio, após o período de co-cultivo de 120 h, que os isolados EIRA 2 e EIRA 6 não apresentam atividade antagonista entre si, como mostra na Figura 7, o que evidencia a possibilidade de montar um consórcio com esses dois microrganismos.

Figura 7 - Resultado do ensaio de antagonismo



Fonte: Autor

5.5 Plano de Negócios

O projeto de negócio, que veio a partir da pesquisa presente nesse trabalho, foi aprovado no programa de pré aceleração de startups Empreende UFC. Os integrantes dos projetos aprovados nesse programa passam por um longo processo de aulas e mentorias e atividades nas áreas de empreendedorismo, gestão e inovação. O seguinte plano de negócios é resultado das atividades desempenhadas nesse programa e o nome escolhido para o produto fruto desse projeto é LeafLisex.

5.5.1 Proposta de Valor

A proposta do Leaflisex é oferecer um produto inovador acelerador de compostagem de resíduos agroindustriais. Sua missão primordial é acelerar a obtenção do composto, produto final da compostagem, que se trata de um biofertilizante natural e uma alternativa frente aos fertilizantes comerciais, em especial, os minerais. Além disso, o produto visa cooperar com a gestão de resíduos agroindustriais, dando uma destinação final sustentável e rentável a esses compostos. O ineditismo do produto se caracteriza por ser constituído de um consórcio de microrganismos nativos e ambientados às condições ambientais do semiárido, cautelosamente selecionados, e que apresentam sinergismo quanto suas capacidades de degradação de resíduos lignocelulósicos, além de serem fungos que atuam provovendo uma microvida saudável do solo.

5.5.2 Nome da empresa, logo e cores da marca

O nome escolhido para a empresa foi Leaflisex, o nome *Leaf*, que significa folha em inglês, faz uma relação com os resíduos agroindustriais, o nome Lise, que vem da ação de quebra efetuada por enzimas, fazendo ligação com o conceito de degradação de compostos e por fim, o x no final do nome, que segue o padrão dos produtos da empresa parceira do Leaflisex, a Biotech4Life.

A logo do produto, mostrada na Figura 8 foi feita com o auxílio da ferramenta Photoshop, da Adobe. A ideia foi juntar as iniciais de *Leaf* e a última letra de Lisex, tornando-as uma só. O “X” sobre o “L” busca passar o conceito de um objeto sendo

cortado, devido a ideia de quebra ou corte relacionado a palavra lise. Além disso, foi decidido a adição de um desenho representando uma folha, remetendo ao setor agroindustrial.

Figura 8 - Logo e logotipo da marca



Fonte: Autor

A fonte tipográfica selecionada para compor a identidade visual foi a Open Sans (Figura 9), uma fonte serifada simples, bem legível, adaptada para as plataformas digitais e interfaces *mobile*, e que harmoniza bem com a estética da marca. Além disso a Open Sans é uma fonte livre para uso comercial.

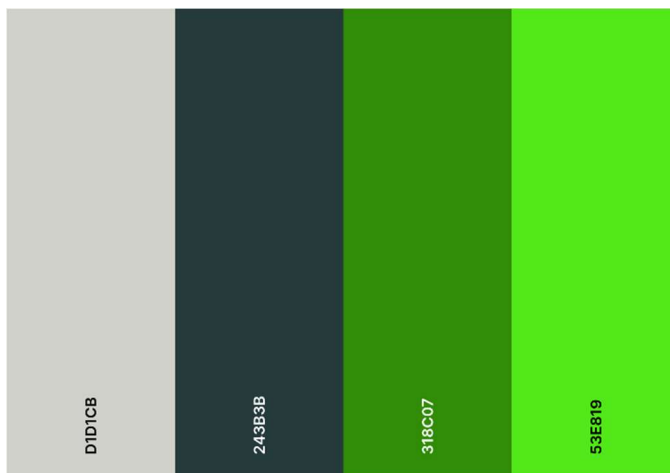
Figura 9 - Fonte Open Sans

A B C D E F G H I J K L M N O
P Q R S T U V W X Y Z
a b c d e f g h i j k l m n o p
q r s t u v w x y z

Fonte: Autor

As cores para a identidade visual buscada foram de elementos que relembressem o campo e a sua simplicidade, além do conceito de sustentabilidade e a reciclagem. Tendo isso em vista, optou-se por seguir dois padrões de degradê, um seguindo diferentes tons de verde, e outro de tons de cinza, como mostra na Figura 9.

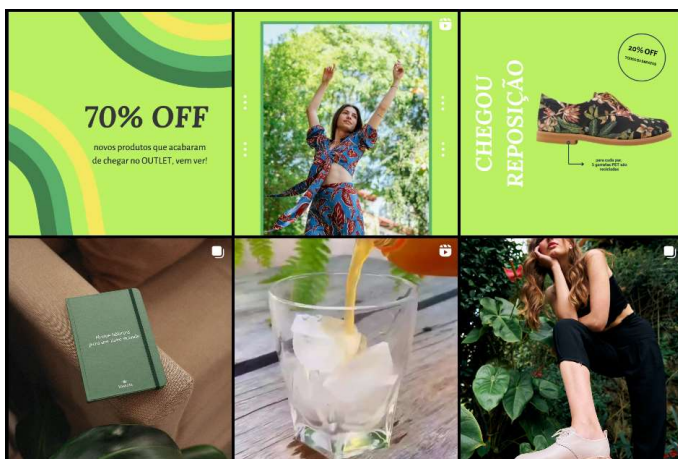
Figura 10 - Paleta de cores da marca



Fonte: Autor

A escolha das cores foi baseada em cores comuns de marcas de empresas e organizações com os conceitos de soluções sustentáveis, como a insecta shoes, marca de sapatos veganos (Figura 11), e de empresas relacionadas a agroindústria, como a BioCLone (Figura 12), empresa produtora de mudas por meio de micropropagação *in vitro*.

Figura 11 - Publicações da Insecta Shoes, representando a paleta de cores da marca



Fonte: Autor

Figura 12 - Logo da empresa Bioclone



Fonte: Google

5.5.3 Equipe

A equipe do LeafLisex é composta atualmente por dois membros, ambos estudantes do curso de Biotecnologia da UFC, e uma orientadora. As funções e o currículo resumido dos integrantes é apresentado na Figura 13.

Figura 13 - - Infográfico resumindo as funções dos integrantes da LeafLisex e seus currículos

	<p>Levi Ribeiro - Estudante de Biotecnologia CEO e Responsável Técnico-científico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Experiência e know-how técnico-científico em microbiologia e bioquímica. • Experiência em P&D na startup Biotech4Life. • Participou de capacitações e possui prêmios em programas de aceleração e mentoria como o Startup Ce, do Sebrae CE e o Programa Taq, do Profissão Biotech. • Já atuou como Jovem Embaixador da Sociedade Brasileira de Microbiologia.
	<p>Maria Clara - Estudante de Biotecnologia Gerencial / administrativo-financeira e comunicação</p> <ul style="list-style-type: none"> • Membro da Comissão Setorial de Avaliação do Centro de Ciências. • ex-bolsista do PAIP. • designer gráfica. • possui experiência e conhecimentos em gestão, comunicação e em mídias digitais.
	<p>Denise Hissa - Professora Adjunta da UFC Orientadora</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mais de 10 anos de experiência em pesquisas envolvendo microbiologia, biologia molecular e bioquímica. • Sócia e co-fundadora da empresa Biotech4life, empresa incubada no PADETEC. • Possui co-autoria em três patentes depositadas, sendo uma delas realizada em parceria com a empresa Petrobras. • Recebeu prêmio inventor em 2020 da empresa Petrobras.

Fonte: Autor

5.5.4 Mercado

Estima-se que o mercado global de biofertilizantes atinja um valor de 3,1 bilhões de dólares em 2023 e 5,2 bilhões de dólares em 2028. Esses números são resultado principalmente da crescente demanda do mercado por produtos certificados como orgânicos, da necessidade de aumentar a produtividade em áreas de cultivo limitadas e a busca por uma gricultura mais sustentável e menos danosa para o meio ambiente. (MARKETS AND MARKETS, 2023).

Diversos biofertilizantes derivados de resíduos ou matéria orgânica bruta mostraram-se eficazes na agricultura, tais como os produtos da compostagem (YAKHIN *et al.*, 2017).

A alta produção da agroindústria no Brasil, resulta na geração de grandes volumes de resíduos, tais como cascas, palhas e bagaços (SCHNEIDER *et al.*, 2012). A Lei nº 12.305, promulgada em 2 de agosto de 2010, instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos, estabelecendo diretrizes para a gestão adequada dos resíduos sólidos. Essas diretrizes incluem medidas para a destinação final dos resíduos de forma ambientalmente adequada, como a reutilização, a reciclagem, a compostagem, a recuperação e a geração de energia a partir dos resíduos.

Desta forma, a compostagem se apresenta como uma forma de reaproveitamento desses resíduos orgânicos produzidos. O resultado final desse processo é o composto orgânico com várias aplicações, tais como, promoção do crescimento de plantas, recuperação de solos degradados e remoção de metais pesados no solo (AL-ALAWI *et al.*, 2019; COGGER *et al.*, 2008; KARAK *et al.*, 2013).

Embora a compostagem seja uma ótima opção para fertilização e tratamento de resíduos, ela possui uma grande limitação, que é o tempo necessário para obter um composto orgânico seguro para aplicação no solo, sem causar danos às plantas (ZHANG *et al.*, 2022).

A compostagem apresenta-se como uma solução economicamente viável e eficiente para o aproveitamento de resíduos agroindustriais, mas devido ao tempo necessário para o processo, essa técnica acaba criando um gargalo, principalmente no caso dos compostos lignocelulósicos, que são a maior parcela desses resíduos (ZHANG *et al.*, 2022).

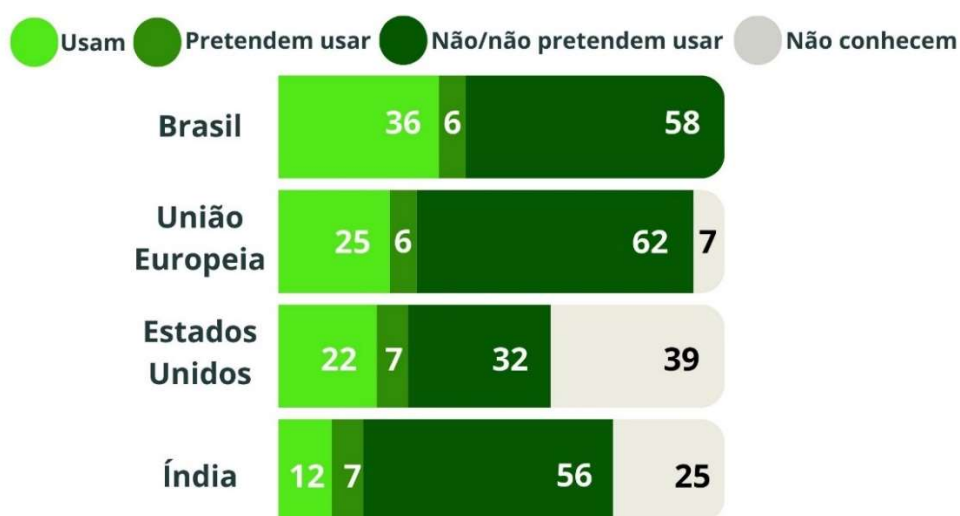
Desta forma um produto acelerador do processo de compostagem seria essencial, principalmente, se ele fosse especializado na degradação de resíduos

lignocelulósicos.

O público pretendido a ser atingido pelo Leaflixex é o de produtores pequenos e médios do setor agroindustrial do Brasil, dessa forma esse produto estará atuando como participante do mercado brasileiro de biofertilizantes, que está em plena expansão.

O mercado brasileiro de biofertilizantes cresceu a taxas anuais próximas a 20% nos últimos anos (MILKPOINT, 2023). A agricultura brasileira é líder mundial em práticas sustentáveis, sendo líder na adoção do plantio direto, no uso de controle biológico de pragas de biofertilizantes, em substituição a fontes químicas e minerais (FILHO, 2023). A adoção de práticas sustentáveis tem aumentado cada vez mais no Brasil, 36% dos agricultores brasileiros fazem uso de biofertilizantes, como mostra na Figura 14.

Figura 14 - Uso de biofertilizantes no mundo



Fonte: adaptado de Ferreira *et al.* (2022)

O mercado brasileiro está favorável para negócios que atuam no setor dos bioestimulantes e biofertilizantes. Cada vez, se aumenta a busca por estratégias sustentáveis de aumentar a produção agrícola, tais como o uso da compostagem, desta forma, essa é uma ótima oportunidade para a entrada do Leaflixex

5.5.5 Concorrentes

Por meio de pesquisas em lojas online de produtos de jardinagem e agrícolas, foram encontrados 3 concorrentes diretos do Leaflixex: o Biocompost, o Embiotic e o

Nutripirol. A Figura 15 e a Figura 16 mostram as vantagens pretendidas do LeafLisex frente a esses produtos.

O foco na degradação de resíduos lignocelulósicos se apresenta como uma vantagem pelo fato de permitir o LeafLisex entrar em um nicho mais isolado e disruptivo. Já o oferecimento de cursos e mentorias na área de gestão de resíduos e compostagem auxilia no aumento da autoridade da marca, além de ser uma fonte secundária de recursos.

Figura 15 - Comparação entre o LeafLisex e concorrentes

Marca	Microrganismos aceleradores de compostagem	Foco na degradação de resíduos celulolíticos	Oferecimento de cursos e mentoria
Leaflisex	✓	✓	✓
Embiotic	✓	✗	✗
Biocompost	✓	✗	✗
Nutripirol	✗	✗	✗

Fonte: Autor

Figura 16 - Comparação entre o Leaflixex e os concorrentes quanto a formulação



Fonte: Autor

5.5.6 Parcerias

A empresa conta com o apoio da empresa Biotech4Life, do Laboratório de Recursos Genéticos (Largen) e o Lembiotech, que disponibilizam equipamentos, insumos e espaço para o desenvolvimento das pesquisas e testes do produto. Além disso, a empresa também conta com o apoio do Empreende UFC, projeto de pré-aceleração de empresas da UFC, que disponibiliza formação na área de empreendedorismo e inovação, mentorias de negócios e espaço para coworking.

5.5.7 Segmento de clientes

A empresa visa atingir o mercado *Business to Business* (B2B) e depois expandir para o *Business to Customer* (B2C). O segmento de clientes do mercado B2B compreende as empresas da Agroindústria, em especial as empresas relacionadas a Agricultura e o processamento de seus produtos. Já o segmento de

clientes do mercado B2C compreende a pessoas com hobbie de jardinagem e pessoas que possuem plantações para consumo próprio.

5.5.8 Modelo de monetização

A empresa visa lucrar não apenas por meio da venda do produto em si, mas também pela venda de cursos na área de gestão de resíduos e de serviços de consultoria de gestão de resíduos

5.5.9 Canais de venda e canais de relacionamento com o cliente e promoção do produto

Os canais de venda para o produto escolhidos foram o site da própria empresa (Figura 17) e marketplaces, como Mercado Livre e Shopee.

Para canais de relacionamento com o cliente e promoção do produto, foram escolhidos o Instagram, site da empresa e contato direto por whatsapp, email e presencial. No instagram e no site da empresa serão publicados pesquisas realizadas pela empresa, informações sobre gestão de resíduos e compostagem, promoções e registros de serviços realizados.

Figura 17 - Protótipo da página de venda do LeafLisex



Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

As celulases microbianas tornaram-se os principais biocatalizadores da conversão de biomassa celulósica, devido a sua complexa natureza. As celulases são sintetizadas por uma diversidade ampla de microrganismos, entre eles, fungos e bactérias (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011).

O farelo de trigo possui uma complexa composição química, sendo composto especialmente por celulose e polímeros a base de xilose e arabinose associados fortemente a proteínas (pentosanas) (ŠRAMKOVÁ; GREGOVÁ; ŠTURDÍK, 2009).

Análises do conteúdo nutricional revelaram que o farelo trigo contém entre 30 a 40% de hemicelulose, 15 a 35% de celulose e 5 a 25% de lignina, tornando-o um ótimo substrato para o teste de produção de celulase realizado (CANTERO et al., 2015).

Neste estudo, a partir das fermentações submersas suplementadas com farelo de trigo, foi possível observar um amplo crescimento de todas as culturas dos isolados fúngicos usando celulose como fonte de carbono, reforçando a escolha desses microrganismos para a formulação de um produto acelerador de compostagem de resíduos celulósicos. No entanto, ainda se fazia necessário, testes enzimáticos, para quantificar as capacidades desses isolados na produção de enzimas celulolíticas.

Resíduos celulósicos necessitam de microrganismos altamente eficazes na produção de enzimas celulolíticas. Entre esses microrganismos, os mais relevantes são os fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, representando mais de 50% dos estudos relacionados a celulases (PASSOS; PEREIRA; CASTRO, 2018). Os testes de produção de celulases foram conduzidos com fungos selecionados pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Conforme observado na Tabela 3, todos os fungos selecionados demonstraram atividade celulásica, corroborando com o que foi encontrado na literatura.

Os isolados que apresentaram os melhores resultados nos testes de atividade FPásica, foram o EIRA 6 e o EIRA 2, ambos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Esses isolados destacaram-se com os melhores resultados, registrando os valores de 0,0541 U/mL e 0,0510 U/mL, respectivamente.

No trabalho de Oliveira (2020), foram obtidos resultados semelhantes aos desse trabalho. O isolado selecionado por Oliveira (2020) que obteve o melhor resultado apresentou uma atividade FPásica de 0,0520 U/mL, valor menor do que o

obtido pelo EIRA 6. Esse resultado foi obtido a partir de uma fermentação submersa com condições semelhantes ao teste realizado nesse trabalho, porém, houve a adição de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,6.

Já Galindo (2016), obteve resultados mais expressivos, o melhor resultado obtido foi de 0,105 U/mL, porém ele fez uso de uma fermentação sólida a 35°C e 96h. A escolha do cultivo em estado sólido foi um fator determinante para os resultados superiores obtidos por Galindo (2016), contrastando com os obtidos no presente trabalho e no estudo de Oliveira (2020).

A fermentação em estado sólido apresenta certas vantagens em relação a submersa, assemelhando-se ao ambiente natural dos fungos, o que influencia na atividade enzimática. Além disso, nesse tipo de fermentação, as enzimas produzidas são menos suscetíveis a inibição do substrato (GALINDO, 2016).

Resíduos vegetais são de difícil degradação, isso está relacionado a complexidade da parede celular dos tecidos vegetais. A conversão biotecnológica de biomassa celulósica se apresenta como uma abordagem sustentável para desenvolver novos processos e produtos. Dentro desse cenário, o uso de fungos, devido as suas várias adaptações, se apresenta como uma alternativa para o problema da degradação desse tipo de resíduo (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011). Desta forma, foram escolhidos os isolados que apresentaram os melhores resultados nas análises feitas, o EIRA 6 e o EIRA 2, ambos identificados como membros do gênero *Aspergillus*.

Para o desenvolvimento de culturas mistas, o determinante mais importante é a compatibilidade entre as cepas e visando o desenvolvimento de um consórcio de microrganismos eficazes na produção de celulases, foi feito um ensaio de antagonismo *in vitro* entre os isolados EIRA 6 e EIRA 2. Na literatura, existem casos de fungos do mesmo gênero apresentando inibição um contra o outro, como mostrado no trabalho de Wang (2015), por isso, foi feito esse ensaio, mesmo os dois isolados sendo pertencentes ao mesmo gênero.

O ensaio de antagonismo *in vitro* negou a presença de atividade de inibição entre o EIRA 6 e o EIRA 2, permitindo assim, a possibilidade de novos ensaios para analisar as interações desses dois isolados em um consórcio e posterior formulação de um produto.

No desenvolvimento de um consórcio acelerador de compostagem, é interessante saber se os microrganismos presentes nesse produto irão sobreviver

durante as diferentes fases da compostagem e se terão um papel importante nesse processo. Zhang *et al.* (2022), acompanhou, por meio de extração de DNA de amostras retiradas das diferentes fases do processo de compostagem e sequenciamento do gene *Internal Transcribed Spacer* (ITS), as dinâmicas das diferentes composições das comunidades fúngicas durante as diferentes fases do processo de compostagem. Nesse trabalho, Zhang *et al.* (2022) observou que o gênero *Aspergillus* se manteve presente em todas as fases do processo de compostagem de folhas e galhos, até mesmo na fase termofílica. Esse resultado obtido por Zhang *et al.* (2022) é de extrema importância para o desenvolvimento do Leaflixex, visto que os isolados escolhidos para o desenvolvimento do consórcio foram o EIRA 6 e EIRA 2, ambos pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

O composto húmico do processo de compostagem, além de ser um produto rico em nutrientes, ele também apresenta microrganismos e se faz importante analisar a importância deles quanto ao aumento da fertilidade do solo e promoção de crescimento de plantas, como também a sua patogenicidade, tanto para plantas, quanto para humanos. Desta forma, pelo fato do Leaflixex se tratar de um bionoculante, é necessário analisar as propriedades e características dos fungos que estarão sendo usados em sua formulação.

O gênero *Aspergillus* é diverso, compreendendo a 344 espécies, que possui grande importância econômica, pois várias espécies desse gênero são usadas na biotecnologia para produção de antibióticos, enzimas e fermentação de alimentos (SAMSON *et al.*, 2014).

Esse gênero é conhecido por possuir representantes fitopatogênicos, tais como as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, que são as mais estudadas (HUNG; RUTGERS, 2016). Porém, embora espécies do gênero *Aspergillus* tenham potencial de causar doenças em plantas por meio da produção de micotoxinas, elas são consideradas patógenos fracos (MCLAUGHLIN; MCLAUGHLIN; LEMKE, 2001).

Além da fitopatogenicidade, algumas espécies de *Aspergillus* são documentadas como patogênicas aos seres humanos, tais como os *Aspergillus fumigatus* e *A. Flavus*. Essas espécies patogênicas oferecem risco para indivíduos imunodeprimidos, mas são raras as infecções em indivíduos imunocompetentes (KRISHNAN; MANAVATHU; CHANDRASEKAR, 2009).

Embora, o gênero *Aspergillus* possua representantes patogênicos a plantas e humanos, na literatura são encontradas evidências de que espécies desse gênero

podem ser usadas como promotores de crescimento de plantas e de aumento da fertilidade, bioremediação e correção do solo (HUNG; RUTGERS, 2016).

Costa (2021) observou atividade de solubilização de fosfato e/ou produção de sideróforos pelos fungos pré-selecionados para os testes de produção de celulases nesse trabalho. No trabalho de Costa (2021) foram feitos testes com 22 isolados da caatinga e dentre eles, os isolados EIRA 2 e o EIRA 3 apresentaram-se como os mais fortes solubilizadores de fosfato e o isolado EIRA 6 se revelou como o mais promissor na produção de sideróforos.

A solubilização de fosfato representa a conversão do fosfato insolúvel em uma forma solúvel, tornando-o mais facilmente assimilável pelas plantas. Já os sideróforos são moléculas que quelam o ferro, o quelato formado é um produto assimilável por outros organismos vivos (COSTA, 2021).

Como já mencionado, fungos do gênero *Aspergillus* podem ser usados como biorremediares, recuperando solos degradados e auxiliando no crescimento de plantas, por meio da correção do solo e acumulação ou degradação de substâncias tóxicas, como é apresentado nos trabalhos de KRISHNA, REDDY e PATNAIK (2005) e ABD e AI-JAWHARI (2023).

KRISHNA, REDDY e PATNAIK (2005) apresentou em seu trabalho a possibilidade de aplicação de *Aspergillus turbingensis* na correção e tratamento de solos contaminados. Nesse caso, foi estudado a possibilidade desse fungo ser usado no tratamento de solos contaminados com resíduos de bauxita (lama vermelha), um derivado das atividades de mineração e processamento de alumínio. Por meio de testes *in vitro*, foi testado a habilidade do *A. turbingensis* em se desenvolver em diferentes pH e em meios com diferentes concentrações de lama vermelha e de metais (alumínio, sódio e ferro), dessa forma foi observado a resistência desse fungo a pHs altos, a capacidade reduzir a alcalinidade do meio e acumular diferentes metais em seus micélios.

ABD e AI-JAWHARI (2023) analisaram a capacidade de um isolado da espécie *A. flavus* em biodegradar clodinafop-propargyl, princípio ativo do herbicida Tropic EC 100. O fungo testado foi isolado a partir de amostras de solos tratados com o herbicida em questão. O percentual de *A. flavus* presente nas amostras foi de 86%. Foram feitos cultivos desse fungo em meio líquido contendo clodinafop-propargyl. Após análise das amostras desses cultivos, por meio da técnica de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), foi observado um percentual de

degradação do clodinafop-propargyl (concentração de 0,01 ppm) de 80%.

Fungos, dentre eles, os do gênero *Aspergillus*, podem promover o crescimento de plantas por meio da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, como o fósforo, produção de enzimas promotoras de crescimento, indução de genes de resistência e produção fitohormônios. Por exemplo, ESCOBAR DIAZ *et al.* (2021) observou que os fungos das espécies *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus sydowii* promoveram a absorção de nitrogênio em plantas do gênero *Gossypium*. Em seu trabalho, foi evidenciado a absorção de fósforo pela diminuição de nutrientes presentes no solo do grupo tratado (7,10 e 16,96 g P/dm³ de solo) em comparação com o grupo controle (26,91 g P/dm³ de solo), já em relação a absorção de nitrogênio, foi observado mais do que dobro de absorção pelas plantas tratadas com *A. brasiliensis* (953,33 mg N/kg de matéria seca) em relação ao grupo controle (459,31 mg N/kg de matéria seca).

AZIZ *et al.* (2021), avaliou o efeito da inoculação de *A. niger* em tomate (*Solanum lycopersicum*) exposto a cádmio e crômio. Nesse trabalho foi observado que o fungo inoculado facilitou a indução de genes de resposta ao estresse. Esses genes, SIGSH1 e SIPCS1, ajudaram o tomate a quelar o cádmio e o crômio, mitigando a sua toxicidade.

No trabalho de YADAV, VERNA e TIWARI (2011) evidenciou-se a indução de crescimento de plantas feita por uma cepa de *A. niger*. Primeiramente, foi avaliado a produção de ácido indolacético (IAA), por meio do cultivo de fungos em meio de cultura líquido suplementado com L-triptofano. Nesse ensaio foi observado uma produção superior de IAA por parte da cepa de *A. niger*, em comparação com os outros fungos testados (*Penicillium citrinum* strain BHUPC01 e *Trichoderma harzianum*). Após essa análise, foi avaliado os efeitos da co-inoculação da cepa de *A. niger* e o fungo *T. harzianum* em *Cicer arietinum* L., por meio desses ensaios, foi possível observar o dobro de comprimento das raízes e da parte aérea das plantas tratadas com esses fungos em relação aos grupos controle.

Já GALEANO *et al.* (2021), por meio de análises *in vitro*, evidenciou a produção de de IAA, sideróforos, amônia e alta atividade de solubilização de fósforo, além de produção de enzimas como ACC deaminase e hidrolases por uma cepa de *Aspergillus niger* isolada de grama forrageira nativa do pantanal brasileiro. Além disso, foi feito um experimento, em casa de vegetação, de inoculação dessa cepa em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A parte aérea das plantas do grupo tratamento obtiveram um

crescimento 44,34% maior que o grupo controle. Já o peso seco da parte aérea e das raízes do grupo tratamento foi 54,1% e 94,7% maior que os grupos controle, respectivamente.

Diante disso, é evidente que fungos do gênero *Aspergillus* possuem várias aplicações na agricultura e na recuperação de solos degradados e pobres, porém, ainda é necessário analisar a patogenicidade dos fungos selecionados nesse presente trabalho, a fim de desenvolver um produto seguro para humanos e para as plantas, visto que, embora o gênero *Aspergillus*, possua potenciais promotores de crescimento de plantas e fertilidade do solo, ele também apresenta representantes patogênicos.

Além disso, é necessário avaliar, por meio de análises de biologia molecular a presença dos fungos integrantes do consórcio nas diferentes fases do processo de compostagem, já que, durante o processo, ocorrem diversas dinâmicas de sucessão ecológica nesse microbioma (ZHANG *et al.*, 2022).

Em relação ao plano de negócio, a partir dele, foi possível comprovar que o mercado de bioinoculantes, biofertilizantes e o mercado agroindustrial brasileiro estão em ascensão e que a busca por soluções sustentáveis é um assunto em voga, fazendo com que a solução proposta pelo LeafLisex se apresente como uma solução aplicável e com potencial sucesso no ramo.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram a produção de celulasas dos sete isolados selecionados. Os resultados negativos de antagonismo *in vitro* entre os isolados EIRA 6 e EIRA 6, permite a abertura de novas fases de formulação do produto baseado em consórcio. É essencial que mais estudos sejam realizados para validar a capacidade do consórcio dos dois isolados selecionados em acelerar o processo de compostagem de resíduos agroindustriais em escala de bancada e em composteiras.

Em relação ao plano de negócios, pode-se concluir que a seguinte solução se faz necessária, e tem-se como próximo passo o desenvolver de um Mínimo Produto Viável.

REFERÊNCIAS

- ABD, F. A. A.; AL- JAWHARI, I. F. H. Ability of *Aspergillus flavus* to degradation of herbicide Topik EC 100 (Clodinafop-propargyl). **GSC Advanced Research and Reviews**, v. 14, n. 3, p. 021–026, 2023.
- AL-ALAWI, M. *et. al.* Investigate biotransformation of green waste during composting by aerated static windrow with GORE(R) cover membrane technology. *Jordanian Journal of Engineering and Chemical Industries*, v. 2, n. 2, p. 32-40, 2019.
- AZIM, K. *et. al.* Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*, v. 8, n. 2, p. 141–158, 2018.
- AZIZ, L. *et. al.* Endophytic *Aspergillus niger* reprograms the physicochemical traits of tomato under cadmium and chromium stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 186, p. 104456, 2021.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, J. C. D. *et al.* Compostagem de Resíduos Agroindustriais. In: BICAS, J. L. *et al.* **Biotecnologia de Alimentos**. 1. ed. Editora Atheneu, 2013. p. 91-118
- CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.
- CHANDRAJITH, R.; DISSANAYAKE, C. B. Phosphate mineral fertilizers, trace metals and human health. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, v. 37, n. 3, p. 153, 2009.
- CHEN, J. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. In: **Internetworkal Workshop on Sustained Mangement of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizaer Use**, Bangucoque, 2006.
- CNA: Panorama do Agro. **CNA**. Brasil, 2023. Disponível em: <https://cnabrasil.org.br/>. Acesso em: 20 nov.
- CNA: PIB do Agronegócio avança no trimestre e acumula alta de 9,81% no primeiro semestre de 2021. **CNA**. Brasil, 2023. Disponível em: <https://www.cnabrasil.org.br/>. Acesso em: 20 nov. 2023a.
- COGGER, C. *et. al.* Soil and Redosier Dogwood Response to Incorporated and Surface-applied Compost. *HortScience*, v. 43, n. 7, p. 2143–2150, 2008.
- CORATO, U; D. Agricultural waste recycling in horticultural intensive farming systems by on-farm composting and compost-based tea application improves soil quality and plant health: A review under the perspective of a circular economy. **Science of The Total Environment**, v. 738, [s.n], p. 139840-139861, 2020. VASCONCELOS, N. M.

DEBERNARDI-VAZQUEZ, T. D. J.; AGUILAR-RIVERA, N.; NUÑEZ-PASTRANA, R. Composting of byproducts from the orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) agroindustries. *Ingeniería e Investigación*, v. 40, n. 3, p. 81–88, 2020.

COSTA, V. A. S. D. **Fungos da caatinga e seu potencial na promoção da fertilidade do solo de áreas em processo de desertificação**. 2016. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

DIACONO, M.; MONTEMURRO, F. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 30, n. 2, p. 401–422, 2010.

DIAZ, L. F.; DE BERTOLDI, M. History of composting. In: Diaz, L. F. et al. *Compost Science and Technology*. Elsevier, 2007. v. 8. p. 7–24.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 3–14, 2015.

DUXBURY, J. M. The significance of agricultural sources of greenhouse gases. *Fertilizer Research*, v. 38, n. 2, p. 151–163, 1994.

ERISMAN, J. W. et al. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, v. 1, n. 10, p. 636–639, 2008.

ESCOBAR DIAZ, P. et al. *Aspergillus* spp. and *Bacillus* spp. as Growth Promoters in Cotton Plants Under Greenhouse Conditions. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 709267, 2021.

FAO. Healthy soils are the basis for healthy food production. Itália: FAO, 2015.

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERNANDES, M. C. S. **Estudo da indústria de fertilizantes nitrogenados: fontes, produção, mercado e impacto ambiental**. 2022. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

FERREIRA, N. et al.: Global Farmer Insights 2022. **MC KINSEY & COMPANY**. 2023. Disponível em: <https://globalfarmerinsights2022.mckinsey.com/#intro>. Acesso em: 30 nov 2023.

FILHO, L. F: Mercado de biofertilizantes tende a manter crescimento de dois dígitos. **O Hoje**. Brasil, 2023. Coluna foco econômico. Disponível em: <https://ohoje.com/coluna/mercado-de-biofertilizantes-tende-a-manter-crescimento-de-dois-digitos/>. Acesso em: 30 nov. 2023.

FRANCO, M. A. T. **Influência da temperatura, salinidade e pH no crescimento de**

fungos da caatinga com potencial para promoção de crescimento vegetal.

2022. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

GALEANO, R. M. S. *et. al.* Plant growth promoting potential of endophytic *Aspergillus niger* 9-p isolated from native forage grass in Pantanal of Nhecolândia region, Brazil. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100332, 2021.

GALINDO, H. M. **Produção e caracterização de exoglucanases e endoglucanases de mucorales utilizando fermentação sólida.** 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

GAO, J. *et. al.* Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 16, p. 7623–7629, 2008.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOMES, D. J. S. **Aceleração da compostagem em resposta à inoculação bacteriana.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, Universidade Federal de Viçosa, Florestal 2021.

GONCALVES, A. C. *et. al.* Heavy Metal Contamination in Brazilian Agricultural Soils due to Application of Fertilizers. In: HERNANDEZ-SORIANO, M. C. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. [s.l.]: InTech, 2014.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

HERNANI, L. C.; KURIHARA, C. H.; SILVA, W. M. Sistemas de manejo de solo e perdas de nutrientes e matéria orgânica por erosão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 1, p. 145–154, 1999.

HUNG, R.; RUTGERS, S. L. Applications of *Aspergillus* in Plant Growth Promotion. In: G; V. G (ed.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.n.]: Elsevier, 2016. p. 223–227.

IMRAN, M. *et. al.* Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review. *Advances in Enzyme Research*, v. 04, n. 02, p. 44–55, 2016.

IRAWAN, B. *et. al.* The use of cellulolytic *Aspergillus* sp. inoculum to improve the quality of Pineapple compost. *AIMS Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 41–54, 2023.

JUWARKAR, A. A.; JAMBHULKAR, H. P. Phytoremediation of coal mine spoil dump

through integrated biotechnological approach. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 11, p. 4732–4741, 2008.

KARAK, T. *et. al.* Evaluation of Composts from Agricultural Wastes with Fish Pond Sediment as Bulking Agent to Improve Compost Quality. *CLEAN – Soil, Air, Water*, v. 41, n. 7, p. 711–723, 2013.

KAUSAR, H. *et. al.* Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 64, n. 7, p. 594–600, 2010.

KRISHNA, P.; REDDY, M. S.; PATNAIK, S. K. *Aspergillus Tubingensis* Reduces the pH of the Bauxite Residue (Red Mud) Amended Soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, n. 1–4, p. 201–209, 2005.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E. K.; CHANDRASEKAR, P. H. *Aspergillus flavus* : an emerging non- *fumigatus* *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 206–222, 2009.

KUHAD, R. C. *et. al.* Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 55, p. 249–272, 2016.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1–10, 2011.
KÜLCÜ, R.; YALDIZ, O. The composting of agricultural wastes and the new parameter for the assessment of the process. *Ecological Engineering*, v. 69, p. 220–225, 2014.

LEAL, M. R. L. V.; WALTER, A. S.; SEABRA, J. E. A. Sugarcane as an energy source. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 3, n. 1, p. 17–26, 2020.

MANZATTO, C. V.; JUNIOR, E. DE F.; PERES, J. R. R. **Uso Agrícola dos Solos Brasileiros**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2002.

MARKETS AND MARKETS: Biofertilizers Market, Global Industry Size Forecast. **MAM**. 2023 Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/compound-biofertilizers-customized-fertilizers-market-856.html>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MCLAUGHLIN, D. J.; MCLAUGHLIN, E. G.; LEMKE, P. A. (EDS.). **Systematics and Evolution: Part A**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2001.

MILKPOINT: Uso de biofertilizantes deve crescer 20%. **MILKPOINT**. Brasil, 2023. Giro de notícias. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/uso-de-biofertilizantes-deve-crescer-20-233605/#>. Acesso em: 30 nov. 2023.

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

NKWACHUKWU, O. I. et al. Focus on potential environmental issues on plastic world towards a sustainable plastic recycling in developing countries. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 34-46, 2013.

OLIVEIRA, P. D. D. C. **Compostagem de resíduos agroindustriais em leiras com diferentes fontes de carbono**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) - Departamento Acadêmico de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

OLIVEIRA, T. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas por fungos isolados da região dos campos gerais**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

PARDINHO, L. D. S. **Aproveitamento de coprodutos de processo agroindustrial para a produção de composto orgânico**. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Centro de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

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. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

RAZA, S.; AHMAD, J. Composting process: a review. *International Journal of Biological Research*, v. 4, n. 2, p. 102, 2016.

REETZ, H. F. *Fertilizers and their efficient use*. 1 e.d. Paris: International Fertilizer industry Association, 2016.

RESSETTI, R. R.; CAMPOS, S. X. Aceleração do Processo de Compostagem: Uma revisão. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 1–12, 2020.

RORIZ, R. F. C. **Aproveitamento dos resíduos alimentícios obtidos das centrais de abastecimento do estado de goiás s/a para alimentação humana**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

SAMSON, R. A. *et. al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014.

SCHNEIDER, V. E. *et. al.* **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2012.

SEADON, J. K. Integrated waste management – Looking beyond the solid waste horizon. **Waste Management**, v. 26, n. 12, p. 1327–1336, 2006.

SHELDRIK, W. F.; SYERS, J. K.; LINGARD, J. A conceptual model for conducting nutrient audits at national, regional, and global scales. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, n. 62, p. 61-72, 2002.

SILVA, L. N. D. **Processo de compostagem com diferentes porcentagens de resíduos sólidos agroindustriais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2007.

SINGHANIA, R. R. *et. al.* Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

STENTIFORD, E.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A. Past, present and future of composting research. **Acta Horticulturae**, n. 1146, p. 1–10, nov. 2016.

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

VASCONCELOS, N. M. D.; PINTO, G. A. S.; ARAGAO, F. A. D. S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. Ceará: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

WAING, K. G. D. Antagonistic interactions among different species of leaf litter fungi of Central Luzon State University. **Plant Pathology & Quarantine**, v. 5, n. 2, p. 122–130, 2015.

YADAV, P. *et. al.* Sugarcane bagasse: an important lignocellulosic substrate for production of enzymes and biofuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022.

YADAV, J.; VERNA, J. P.; TIWARI, K. N. Plant Growth Promotin Activities of Fungi and their Effect on Chickpea Plant Growth. **Asia Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 291-299, 2011.

YAKHIN, O. I. *et. al.* Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2017.

YEOH, C. Y. *et. al.* Acceleration Effects of Microbial Inoculum on Palm Oil Mill Organic Waste Composting. **Compost Science & Utilization**, v. 19, n. 2, p. 135-142, 2011

ZAINUDIN, M.H.M. *et. al.* Enhancement of Agro-Industrial Waste Composting Process via the Microbial Inoculation: A Brief Review. **Agronomy**, v. 12, p. 198-217, 2022.

ZHANG, Y. *et. al.* Study on dynamic changes of microbial community and lignocellulose transformation mechanism during green waste composting. **Engineering in Life Sciences**, v. 22, n. 5, p. 376–390, 2022