



DESEMPENHO E ENGENHARIA DE CELULASES APLICADAS À CONVERSÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

DESEMPEÑO E INGENIERÍA DE CELULASAS APLICADAS A LA CONVERSIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA: UNA REVISIÓN INTEGRADORA

PERFORMANCE AND ENGINEERING OF CELLULASES APPLIED TO LIGNOCELLULOSIC BIOMASS CONVERSION: AN INTEGRATIVE REVIEW

Apresentação: Comunicação Oral

Emeson Farias Araujo Santos¹; Carlos Arthur Bertoldo de Araujo²; Isaac Matheus de Jesus Silva³ Beatriz do Nascimento Oliveira⁴; Aryanna Sany Pinto Nogueira Costa⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/VICIAGRO.0105>

RESUMO

A conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis, por meio da ação de celulases, tem sido amplamente considerada uma alternativa viável e sustentável para a produção de biocombustíveis de segunda geração. Esse processo apresenta grande potencial na substituição parcial de combustíveis fósseis, contribuindo para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa. No entanto, a estrutura altamente recalcitrante da parede celular vegetal, aliada à complexidade química da celulose, hemicelulose e lignina, e à baixa robustez das celulases sob condições industriais, impõe sérias limitações técnicas e econômicas à sua aplicação em larga escala. Diante desse cenário, este artigo teve como objetivo revisar criticamente as estratégias físico-químicas e biotecnológicas desenvolvidas para aprimorar o desempenho das celulases utilizadas na conversão de biomassas lignocelulósicas. A fundamentação teórica baseou-se em conceitos de hidrólise enzimática, engenharia de proteínas e tratamentos de pré-processamento da biomassa, considerando os avanços recentes na área. A metodologia adotada seguiu o modelo do Instituto Joanna Briggs (JBI) para revisões integrativas, com a seleção e análise sistemática de dez estudos científicos publicados entre 2020 e 2025. Os resultados evidenciaram que estratégias como pré-tratamento alcalino, ultrassonicação, oxidação mediada por TEMPO, moagem por bolas e utilização de solventes orgânicos são eficazes na desestruturação da parede celular, aumentando a acessibilidade da celulose às enzimas e, conseqüentemente, a eficiência da sacarificação. Do ponto de vista biotecnológico, técnicas como engenharia racional de enzimas, evolução dirigida e expressão heteróloga demonstraram avanços significativos na obtenção de celulases com maior estabilidade térmica, resistência ao pH e atividade catalítica. Além disso, a integração entre os processos de hidrólise e fermentação, como SSF (fermentação simultânea à sacarificação) e SSCF (fermentação simultânea com co-sacrifício), tem mostrado resultados promissores. Conclui-se que soluções integradas envolvendo tecnologias de pré-tratamento, bioengenharia de enzimas e processos fermentativos otimizados são fundamentais para viabilizar técnica e economicamente a produção de biocombustíveis lignocelulósicos em escala industrial.

Palavras-Chave: celulases, biomassa lignocelulósica, pré-tratamento, engenharia enzimática, biocombustíveis.

¹ Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, UFAL, emeson.santos@arapiraca.ufal.br

² Bacharelado em Química, UFAL, carthurbertoldo@gmail.com

³ Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, UFAL, isaac.silva@iqb.ufal.br

⁴ Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, UFAL, beatriz.oliveira@iqb.ufal.br

⁵ Doutora em Ciências, UFAL, aryannaspn@gmail.com

RESUMEN

La conversión de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables mediante la acción de celulasas ha sido ampliamente considerada una alternativa viable y sostenible para la producción de biocombustibles de segunda generación. Este proceso presenta un gran potencial para sustituir parcialmente a los combustibles fósiles, contribuyendo significativamente a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero. Sin embargo, la estructura altamente recalcitrante de la pared celular vegetal, junto con la complejidad química de la celulosa, hemicelulosa y lignina, y la limitada robustez de las celulasas bajo condiciones industriales, imponen barreras técnicas y económicas importantes para su aplicación a gran escala. Ante este escenario, el objetivo de este artículo fue revisar críticamente las estrategias fisicoquímicas y biotecnológicas desarrolladas para mejorar el rendimiento de las celulasas empleadas en la conversión de biomasa lignocelulósica. La fundamentación teórica se basó en principios de hidrólisis enzimática, ingeniería de proteínas y tratamientos de preprocesamiento de la biomasa, considerando los avances recientes en el área. La metodología empleada siguió el modelo del Instituto Joanna Briggs (JBI) para revisiones integrativas, mediante la selección y análisis sistemático de diez estudios científicos publicados entre 2020 y 2025. Los resultados mostraron que estrategias como el pretratamiento alcalino, la ultrasonificación, la oxidación mediada por TEMPO, la molienda de bolas y el uso de solventes orgánicos son efectivas en la desestructuración de la pared celular, aumentando la accesibilidad de la celulosa a las enzimas y mejorando la eficiencia de la sacarificación. Desde el punto de vista biotecnológico, técnicas como la ingeniería racional de enzimas, la evolución dirigida y la expresión heteróloga demostraron importantes avances en la obtención de celulasas más estables, resistentes y activas. Además, la integración entre los procesos de hidrólisis y fermentación, como SSF (fermentación simultánea con sacarificación) y SSCF (fermentación simultánea con co-sacarificación), ha mostrado resultados prometedores. Se concluye que las soluciones integradas, que combinan tecnologías de pretratamiento, bioingeniería de enzimas y procesos fermentativos optimizados, son esenciales para viabilizar la producción industrial de biocombustibles lignocelulósicos.

Palabras Clave: celulasas, biomasa lignocelulósica, pretratamiento, ingeniería enzimática, biocombustibles.

ABSTRACT

The conversion of lignocellulosic biomass into fermentable sugars through the action of cellulases has been widely regarded as a viable and sustainable alternative for second-generation biofuel production. This process holds great potential to partially replace fossil fuels and contribute to the reduction of greenhouse gas emissions. However, the highly recalcitrant structure of plant cell walls, combined with the chemical complexity of cellulose, hemicellulose, and lignin, and the limited robustness of cellulases under industrial conditions, presents significant technical and economic barriers to large-scale application. In this context, the objective of this article was to critically review the physicochemical and biotechnological strategies developed to enhance the performance of cellulases used in lignocellulosic biomass conversion. The theoretical framework was based on principles of enzymatic hydrolysis, protein engineering, and biomass pretreatment methods, taking into account recent advances in the field. The methodology followed the Joanna Briggs Institute (JBI) model for integrative reviews, involving the systematic selection and analysis of ten scientific studies published between 2020 and 2025. The results indicated that strategies such as alkaline pretreatment, ultrasonication, TEMPO-mediated oxidation, ball milling, and the use of organic solvents are effective in disrupting plant cell walls, increasing cellulose accessibility and improving saccharification efficiency. From a biotechnological perspective, techniques such as rational enzyme engineering, directed evolution, and heterologous expression showed significant progress in producing more stable, resistant, and catalytically active cellulases. Furthermore, the integration of hydrolysis and fermentation processes, such as SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) and SSCF (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation), has shown promising results. It is concluded that integrated solutions, combining pretreatment technologies, enzyme bioengineering, and optimized fermentation processes, are essential to make the industrial production of lignocellulosic biofuels technically feasible and economically viable.

Keywords: cellulases, lignocellulosic biomass, pretreatment, enzyme engineering, biofuels.

INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis vêm sendo amplamente explorados como alternativa sustentável aos

combustíveis fósseis, com potencial para mitigar as emissões de gases de efeito estufa e promover maior segurança energética (Sharmila; Shanmugavel; Banu, 2024). Entre eles, os biocombustíveis de primeira geração, produzidos a partir de matérias-primas ricas em amido ou sacarose, como milho, cana-de-açúcar e trigo, representam a tecnologia mais madura atualmente em uso industrial. A conversão desses substratos ocorre de forma eficiente devido ao alto desenvolvimento tecnológico associado à produção de enzimas amilolíticas, como as amilases, que apresentam elevada atividade catalítica, estabilidade e baixo custo de produção (Gasparatos; Stromberg; Takeuchi, 2013). No entanto, o uso de fontes alimentares como insumo energético levanta sérias questões éticas e socioeconômicas, relacionadas ao impacto sobre a segurança alimentar e o aumento de preços de commodities agrícolas (Ban et al., 2025).

Como alternativa a esse conflito entre produção de energia e alimentação, surgem os biocombustíveis de segunda e terceira geração, cujas matérias-primas são, respectivamente, biomassa lignocelulósica de resíduos agrícolas, florestais e industriais, além dos cultivos de microalgas (Mansy *et al.*, 2025). Essas fontes não competem diretamente com a cadeia alimentar e apresentam alta disponibilidade e renovabilidade. No entanto, a celulose, principal componente estrutural dessas biomassas, é um polímero recalcitrante, cuja estrutura altamente cristalina e sua associação com a lignina dificultam a degradação enzimática. Diferentemente das enzimas amilolíticas, as enzimas celulolíticas, como endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, ainda apresentam baixa maturidade tecnológica, sendo menos eficientes, mais instáveis e mais onerosas em termos de produção e aplicação industrial (Raman *et al.*, 2025).

Esse cenário representa um dos principais gargalos técnicos para a viabilização dos biocombustíveis avançados: a falta de enzimas celulolíticas robustas, capazes de atuar de forma eficiente na conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis sob condições industriais adversas, como variações de pH, altas temperaturas e presença de inibidores liberados durante o pré-tratamento da biomassa (Kululo *et al.*, 2025). Avanços em engenharia de enzimas, bioprospecção microbiana, fermentação otimizada e uso de tecnologias ômicas vêm sendo explorados para superar essas limitações, mas o custo e a escalabilidade da produção de celulases ainda são desafios significativos para a consolidação da 2ª e 3ª geração de biocombustíveis (Bonfá *et al.*, 2025).

Diante disso, esta revisão integrativa tem como objetivo analisar criticamente as estratégias biotecnológicas desenvolvidas nos últimos anos para otimizar o desempenho, a estabilidade e a viabilidade econômica das celulases aplicadas à conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Biocombustíveis de 1ª, 2ª e 3ª geração: maturidade tecnológica e desafios

Os biocombustíveis são definidos como combustíveis líquidos, gasosos ou sólidos produzidos a partir da biomassa de organismos vivos, como algas, bactérias e plantas, por meio de processos biológicos capazes de gerar compostos químicos com alto teor energético (Rodionova *et al.*, 2017). A biomassa pode ser convertida em diferentes tipos de biocombustíveis — como etanol a partir de substratos comestíveis, ou biodiesel derivado de resíduos vegetais e microalgas — por meio de rotas tecnológicas que caracterizam três gerações de desenvolvimento (Cherwoo *et al.*, 2023). Contudo, cada geração apresenta desafios específicos que limitam sua viabilidade em larga escala: a primeira geração é criticada por competir com a produção de alimentos e demandar grandes áreas agrícolas; a segunda, baseada em biomassa lignocelulósica, exige pré-tratamentos caros e complexos; e a terceira, que envolve o uso de microalgas e produção de bio-hidrogênio, enfrenta barreiras relacionadas aos altos custos de cultivo, captura e armazenamento, além de entraves tecnológicos para conversão eficiente (Malik *et al.*, 2024).

Biocombustíveis de Primeira Geração

A biomassa de primeira geração inclui principalmente culturas alimentares e, por isso, sua utilização em larga escala torna-se questionável devido às controvérsias envolvendo a competição entre alimentos e combustíveis. Essa categoria abrange materiais vegetais comestíveis e cultivos como milho, trigo, cana-de-açúcar e grãos alimentares (Nanda *et al.*, 2018). No caso do bioetanol, por exemplo, há conversão de sacarose ou amido; neste último caso, é necessário um processo inicial de hidrólise enzimática do amido em glicose, realizado em duas etapas catalisadas pelas enzimas α -amilase e glucoamilase (Sheldon, 2017). Esses métodos constituem processos industriais consolidados, realizados em escala massiva. Ainda assim, Villatoro Flores, Furubayashi e Nakata (2016) pontuam que, embora os biocombustíveis de primeira geração sejam tecnologicamente maduros e já estejam disponíveis no mercado, o fato de utilizarem biomassa comestível como matéria-prima gera um debate sobre os impactos que o uso de alimentos para a produção de combustível pode causar.

Biocombustíveis de Segunda Geração

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas, florestais e urbanos, sem competir com a produção de alimentos e valorizando resíduos, o que favorece a sustentabilidade. Contudo, a digestibilidade da celulose na biomassa lignocelulósica é dificultada principalmente pela presença da lignina, que limita fisicamente o acesso das enzimas aos carboidratos e promove interações não-produtivas com as enzimas por meio de ligações hidrofóbicas, eletrostáticas e de hidrogênio (Huang *et al.*, 2022). Embora enzimas específicas ou

coquetéis enzimáticos tenham sido desenvolvidos para hidrolisar essa biomassa em monossacarídeos, o processo é lento, complexo e economicamente desfavorável. Para contornar essas limitações, o pré-tratamento é essencial, pois modifica a estrutura e composição da lignina, promovendo alterações que aumentam a acessibilidade da biomassa à ação enzimática (Yang; Pan, 2015). Além disso, o processo enfrenta desafios técnicos e econômicos adicionais, como a produção eficiente de enzimas, a inibição por subprodutos formados durante o pré-tratamento e a necessidade de fermentar diferentes tipos de açúcares, como hexoses e pentoses. Segundo Sarwer *et al.* (2022), o custo da matéria-prima pode ser reduzido ao se adotar biomassa celulósica para a produção de biocombustíveis de segunda geração, uma vez que são utilizados resíduos e materiais residuais como fonte de matéria-prima, reforçando o caráter sustentável do processo.

Biocombustíveis de Terceira Geração

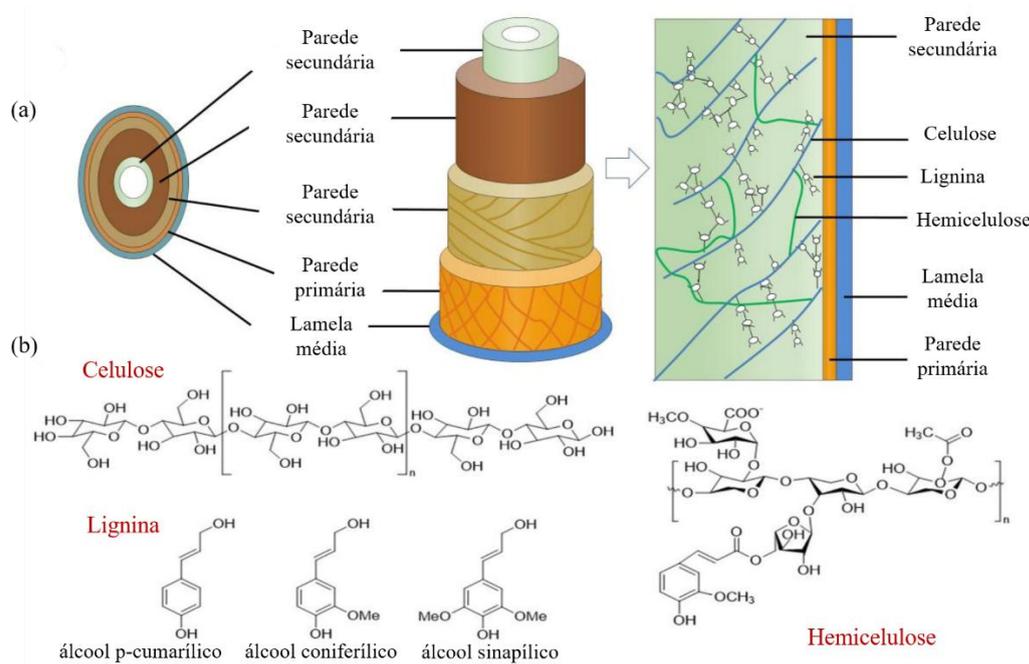
Os biocombustíveis de terceira geração são obtidos a partir de microalgas e cianobactérias, organismos capazes de alcançar produtividades lipídicas significativamente superiores às de plantas terrestres convencionais, além de poderem ser cultivados em áreas não agricultáveis (Breuer *et al.*, 2015). Além disso, microalgas e cianobactérias são capazes de capturar dióxido de carbono de fontes industriais e desempenham um papel importante na remoção de nutrientes de efluentes, favorecendo processos sustentáveis de bioenergia e tratamento ambiental (Bhattacharyya *et al.*, 2023). Na perspectiva de Chowdhury e Loganathan (2019), apesar do grande potencial, essa tecnologia ainda enfrenta desafios, especialmente relacionados aos altos custos de cultivo, colheita e conversão da biomassa. A conversão em biocombustíveis exige enzimas específicas, como as celulolíticas e hemicelulolíticas, responsáveis pela degradação da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis (Adsul *et al.*, 2020). Além disso, enzimas lipolíticas são empregadas na conversão de lipídios em biocombustíveis (Yadav *et al.*, 2021).

Estrutura da biomassa lignocelulósica e sua recalcitrância

A biomassa lignocelulósica é um recurso vegetal abundante e renovável, composto principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina, que juntos formam uma estrutura altamente complexa. De fato, as paredes celulares das plantas são majoritariamente compostas por biomassa lignocelulósica, que por sua vez consiste principalmente em feixes alinhados de fibrilas de celulose parcialmente cristalinas e parcialmente amorfas, imersas em uma matriz desordenada de hemicelulose e lignina, configuração esta que resulta em uma notável resistência à degradação (Cosgrove; Jarvis, 2012; Burton; Gidley; Fincher, 2010 apud Petridis; Smith, 2018). Tal resistência, conhecida como recalcitrância, decorre de uma combinação de fatores estruturais e químicos fortemente interconectados, como a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização, o tamanho dos poros e a proporção de lignina

e hemiceluloses presentes (Zoghiami; Paës, 2019). Um aspecto central dessa recalcitrância, e que interliga muitos desses fatores, é a inacessibilidade das ligações químicas passíveis de clivagem, resultante da autoassociação e cristalinidade da celulose, bem como da compactação e agregação da lignina e sua ligação à celulose e às enzimas hidrolíticas (Meng; Ragauskas, 2014 apud Petridis; Smith, 2018). A recalcitrância da lignina, em particular, dificulta a produção comercial de etanol celulósico, tornando-a cara e desafiadora (Broda; Yelle; Serwańska, 2022).

Figura 1 – Diagrama esquemático da lignocelulose: (a) estrutura da parede celular; (b) três componentes principais da lignocelulose.



Fonte: Adaptado de MENON; RAO, 2012.

Celulases: classes, mecanismos de ação e limitações industriais

Para efetivamente superar a intrínseca recalcitrância da celulose, principal polissacarídeo da biomassa lignocelulósica, e viabilizar sua conversão em produtos de valor, um conjunto de enzimas hidrolíticas específico, o complexo celulase, é de fundamental importância. De fato, as enzimas celulolíticas são catalisadoras indispensáveis na degradação da celulose, desempenhando um papel vital na utilização sustentável de materiais lignocelulósicos e no ciclo global do carbono (Verma; Kumar; Bansal, 2021). Estas biocatalisadoras atuam na hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas que unem as moléculas de D-glicose na estrutura da celulose, liberando assim os açúcares fermentáveis essenciais para subsequentes processos biotecnológicos, como a produção de biocombustíveis (Sharma *et al.*, 2016). Esse processo de hidrólise é realizado por um sistema multienzimático onde, por exemplo, endoglucanases clivam internamente as ligações β -1,4-glicosídicas da celulose, enquanto exoglucanases

atuam nas extremidades liberando dímeros de celulose, os quais são finalmente convertidos a açúcares fermentáveis, como a glicose, pela ação de β -glicosidasas, em um conjunto de reações que se beneficia de ações sinérgicas entre os componentes enzimáticos (Fauzi *et al.*, 2024).

A eficácia do complexo celulase advém da ação coordenada de suas classes enzimáticas. As endoglucanases (EGs, EC 3.2.1.4) clivam ligações β -1,4-glicosídicas internas em regiões amorfas da celulose, expondo novas extremidades e otimizando a acessibilidade do substrato. As exoglucanases, ou celobiohidrolases (CBHs, EC 3.2.1.91), atuam, então, processivamente a partir destas extremidades, liberando celobiose e degradando as porções cristalinas. Por fim, as β -glicosidasas (BGLs, EC 3.2.1.21) convertem a celobiose e celo-oligossacarídeos em D-glicose, etapa crucial que também alivia a inibição por produto sobre as demais celulases (Yoav *et al.*, 2019). Desta forma, o sinergismo entre estas distintas atividades é fundamental para a despolimerização completa e eficiente da celulose (Sharma *et al.*, 2016). As características dessas classes enzimáticas, incluindo suas funções principais, modos de ação e importância no processo hidrolítico, são detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Classes de celulases, suas características e funções. Fonte: Adaptado de Fauzi *et al.*, 2024; Yoav *et al.*, 2019.

Classe de Celulase	Código EC	Função Principal	Modo de Ação	Importância
Endoglucanases	EC 3.2.1.4	Rompem ligações β -1,4-glicosídicas internas da celulose	Atuam aleatoriamente nas cadeias de celulose, gerando oligossacarídeos	Desorganizam a estrutura da celulose e facilitam o acesso das outras enzimas
Exoglucanases (Celobiohidrolases)	EC 3.2.1.91	Removem unidades de celobiose das extremidades das cadeias	Atuam sequencialmente nas pontas das fibras de celulose	Continuam a degradação iniciada pelas endoglucanases, liberando celobiose
β-glicosidasas	EC 3.2.1.21	Hidrolisam celobiose em glicose	Quebram o dissacarídeo celobiose em moléculas de glicose	Evitam o acúmulo de celobiose, que pode inibir outras enzimas, e garantem a continuidade do processo

Fonte: Própria (2025).

Apesar do potencial intrínseco do sistema celulase, sua exploração industrial em larga escala para a produção de biocombustíveis e bioprodutos é restringida por obstáculos significativos. Entre estes, destacam-se o elevado custo de produção das enzimas (Shokrkar *et al.*, 2018) e sua acentuada suscetibilidade à inibição, seja por produtos da hidrólise, como glicose e celobiose, ou por diversos compostos derivados da lignina e do pré-tratamento da biomassa. Adicionalmente, a problemática da adsorção não produtiva à lignina residual, a baixa estabilidade operacional em condições industriais e a reduzida eficiência catalítica frente a substratos lignocelulósicos complexos comprometem severamente a viabilidade econômica dos processos (Xu *et al.*, 2023). Tais gargalos tecnológicos são o principal motor da pesquisa científica, que busca incessantemente o desenvolvimento de novas estratégias, com particular ênfase na engenharia de proteínas. Esta abordagem visa, por exemplo, modificar a química de superfície das celulases para minimizar interações indesejadas com a lignina e otimizar a afinidade pela celulose, resultando em biocatalisadores mais robustos, ativos e tolerantes, capazes de viabilizar uma

desconstrução mais eficiente da biomassa (Paul *et al.*, 2021).

METODOLOGIA

Este estudo configura-se como uma pesquisa qualitativa, do tipo revisão integrativa da literatura, conduzida conforme as diretrizes do Instituto Joanna Briggs (JBI). O objetivo foi reunir, analisar e sintetizar os conhecimentos científicos sobre o desempenho e as estratégias biotecnológicas para otimização de celulases aplicadas à conversão de biomassa lignocelulósica. A questão norteadora, formulada pela estratégia População-Conceito-Contexto (PCC) – "*Quais as estratégias biotecnológicas mais eficazes para otimização do desempenho de celulases na conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis?*" – orientou a busca nas bases de dados Scopus, Web of Science, ScienceDirect e SciELO, abrangendo o campo da bioquímica, biotecnologia, engenharias e ciências agrárias.

Os instrumentos de seleção dos estudos (os sujeitos da pesquisa) incluíram descritores específicos (como *cellulase*, *enzyme engineering*, *lignocellulosic biomass*, *bioconversion*), operadores booleanos, e critérios de inclusão (artigos publicados entre 2015-2025; em inglês, português ou espanhol; abordando produção, aplicação ou engenharia de celulases na degradação de biomassa lignocelulósica) e exclusão (estudos sem dados experimentais, revisões puramente teóricas, foco exclusivo em biocombustíveis de primeira geração). O procedimento de seleção seguiu etapas sistemáticas de busca, triagem de títulos e resumos, seguida da leitura na íntegra dos artigos elegíveis por dois revisores independentes, com divergências resolvidas por consenso ou por um terceiro revisor. Os dados dos estudos incluídos foram organizados em uma planilha para extração e síntese das informações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características Gerais dos Estudos Incluídos

A análise dos 12 estudos selecionados revelou uma diversidade metodológica e geográfica significativa. A maioria dos trabalhos foi publicada entre 2020 e 2025 e concentra-se na otimização da sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol ou nanocelulose, com uso de resíduos como bagaço de cana, palha de arroz, milho, casca de batata, folhas de abacaxi e gramíneas como *Pennisetum hohenackeri*. Os principais microrganismos utilizados na produção de celulases foram fungos filamentosos (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*) e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis*.

Autor/Ano	Título	Tipo de Biomassa	Técnica(s) de Extração/Processamento	Produto(s) Final(is)
Hernández-Becerra et al., 2023	Isolation of cellulose microfibrils and nanofibers by mechanical fibrillation in a water-free solvent	Não especificado	Fibrilação mecânica em solvente sem água	Microfibras e nanofibras de celulose
Jadaun et al., 2025	Isolation and characterization of cellulose nanofibers from rice straw using ultrasonication-assisted extraction technique coupled with high shear dispersion	Palha de arroz	Ultrassonicação + dispersão de alto cisalhamento	Nanofibras de celulose
Liu & Qu, 2021	Integrated engineering of enzymes and microorganisms for improving the efficiency of industrial lignocellulose deconstruction	Lignocelulose (geral)	Engenharia enzimática e microbiana	Açúcares fermentáveis
Oliva et al., 2025	Inoculum dependence of methane formation from lignocellulosic biowastes	Resíduos lignocelulósicos	Digestão anaeróbia	Metano
Rajanna et al., 2022	A facile synthesis of cellulose nanofibers from corn cob and rice straw by acid hydrolysis method	Sabugo de milho e palha de arroz	Hidrólise ácida	Nanofibras de celulose
Sadeghi-Shapourabadi et al., 2023	Microwave-Assisted Chemical Purification and Ultrasonication for Extraction of Nano-Fibrillated Cellulose from Potato Peel Waste	Casca de batata	Purificação química assistida por micro-ondas + ultrassom	Nanofibras de celulose
Swantom et al., 2024	Chemical Hydrolysis-Gamma Irradiation Processes for Cellulose Nanofibers Isolation from Rice Straw	Palha de arroz	Hidrólise química + irradiação gama	Nanofibras de celulose
Sureshkumar et al., 2025	Low energy synthesis of crystalline cellulose nanofibers from <i>Pennisetum hohenackeri</i> by planetary ball milling	<i>Pennisetum hohenackeri</i>	Moagem por moinho planetário	Nanofibras de celulose cristalina
Do et al., 2022	Novel recycling of pineapple leaves into cellulose microfibrils by two-step grinding of ball milling and high-speed rotor-stator homogenization	Folhas de abacaxi	Moagem (bola) + rotor-estator	Microfibras de celulose
Wu et al., 2023	Understanding the dynamics of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Scheffersomyces stipitis</i> abundance in co-culturing process for bioethanol production from corn stover	Bagaço de milho	Co-cultivo microbiano para produção de etanol	Etanol
Mukasekuru et al., 2020	Fed-batch high-solids enzymatic saccharification of lignocellulosic substrates with a combination of additives and accessory enzymes	Substratos lignocelulósicos	Sacarificação enzimática com aditivos	Açúcares redutores
Mithra & Padmaja, 2020	Improvement in Ethanol Yield from Lignocellulose Starch Biomass using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> alone or its Co-culture with <i>Scheffersomyces stipitis</i>	Biomassa lignocelulósico-amilácea	Co-cultivo microbiano	Etanol

Fonte: Própria (2025).

Estratégias Físico-Químicas para Modificação da Celulose

A recalcitrância da biomassa lignocelulósica é amplamente reconhecida como um dos principais desafios na conversão eficiente de celulose em açúcares fermentáveis. Nesse contexto, os métodos físico-químicos de pré-tratamento exercem papel central ao promover a delignificação, a despolimerização parcial da hemicelulose e a exposição da estrutura celulósica à ação enzimática.

Tabela 3 – Efeitos de estratégias de pré-tratamento na cristalinidade da celulose. Fonte: Autores, 2025.

Estratégia de Pré-tratamento	Biomassa Estudada	Cristalinidade (%)	Artigo
Sem tratamento	Controle base comparativo	45% (estimado)	Referência geral
Alcalino com NaOH (1–5%)	Folhas de abacaxi	58%	Do et al., 2022
Ácido diluído + branqueamento com H ₂ O ₂	Sabugo de milho, palha de arroz	63%	Rajanna et al., 2022

Ultrassom + oxidação TEMPO	Cascas de batata	70%	Sadeghi-Shapourabadi et al., 2023
Moagem por bolas (ball milling)	<i>Pennisetum hohenackeri</i>	76%	Sureshkumar et al., 2025
Organossolve alcalino (al-AGO)	Bagaço de cana	80%	Mukasekuru et al., 2020

Fonte: Própria (2025).

Dentre os métodos mais eficazes, destaca-se o uso de solventes orgânicos catalisados, como o glicerol organossolve alcalino (al-AGO), capaz de desestruturar a parede celular de forma seletiva e promover elevado grau de acessibilidade enzimática. Mukasekuru et al. (2020) demonstraram que a aplicação do al-AGO em bagaço de cana possibilitou alcançar 90% de rendimento enzimático em 72 horas, mesmo com baixa carga enzimática, o que evidencia a eficácia desse pré-tratamento em ambientes industriais com alto teor de sólidos. A ultrassonicação e a aplicação de micro-ondas também têm se mostrado promissoras, especialmente quando combinadas com etapas químicas. No estudo de Sadeghi-Shapourabadi et al. (2023), cascas de batata foram submetidas a purificação alcalina e branqueamento com peróxido de hidrogênio, seguidos de ultrassonicação após oxidação mediada por TEMPO. Essa estratégia permitiu a obtenção de nanofibras de celulose com diâmetro entre 4 e 22 nm e aumento da cristalinidade para 70%, revelando não apenas eficiência no isolamento, mas também melhora nas propriedades estruturais do material. A moagem por bolas (*ball milling*) desponta como técnica mecânica altamente eficaz e de baixo consumo energético. Sureshkumar et al. (2025) utilizaram essa abordagem para processar *Pennisetum hohenackeri*, gramínea com baixo teor de lignina e alto teor de hemicelulose, obtendo nanofibras com diâmetro médio de 13 nm e índice de cristalinidade de 76%. A energia de fibrilação foi de apenas 2,95 kWh/kg, o menor valor reportado até então, demonstrando que a escolha da biomassa e o ajuste da moagem são cruciais para reduzir custos e ampliar a escalabilidade.

Outros estudos reforçam a eficiência do uso de resíduos agrícolas como matéria-prima. Rajanna et al. (2022) investigaram a conversão de sabugo de milho e palha de arroz em nanocelulose utilizando tratamento alcalino, branqueamento e hidrólise ácida, seguida de ultrassonicação. O protocolo permitiu a extração de nanofibras com estabilidade térmica e estrutura fibrosa satisfatória, demonstrando que resíduos regionais com elevado teor de celulose são fontes economicamente viáveis para extração de nanofibras. A combinação de técnicas mecânicas foi também destacada por Do et al. (2022), que desenvolveram uma abordagem em duas etapas para a reciclagem de folhas de abacaxi, utilizando moagem por bolas e homogeneização em rotor-estator. Esse processo possibilitou a redução de 91,24% no tamanho médio das microfibras em comparação com métodos convencionais, atingindo dimensões inferiores a 9 µm. O estudo reforça que a combinação de métodos pode potencializar os efeitos sinérgicos no fracionamento da biomassa.

Por fim, avanços recentes propuseram a fibrilação mecânica em solventes anidros, como o propilenoglicol, como alternativa à hidrólise aquosa. Hernández-Becerra et al. (2023) demonstraram que

a fibrilação direta da celulose em propilenoglicol manteve elevada cristalinidade (até 80%) e integridade térmica, além de conferir comportamento reológico tipo *shear-thinning* às suspensões. Essa abordagem amplia as possibilidades de aplicação da celulose fibrilada em matrizes hidrofóbicas, superando limitações associadas ao uso de água como meio dispersante.

Desenvolvimento e Aplicação de Celulases

As celulases representam o grupo central de enzimas envolvidas na conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis. Compostas principalmente por endoglucanases, exoglucanases (ou celobiohidrolases) e β -glicosidases, essas enzimas atuam sinergicamente na hidrólise das cadeias de celulose, rompendo ligações β -1,4-glicosídicas. Diversos estudos incluídos na presente revisão demonstram que o desempenho dessas enzimas pode ser substancialmente influenciado por fatores como fonte microbiana, modo de aplicação (isoladas ou em coquetéis) e a natureza do substrato lignocelulósico tratado.

Tabela 4 – Desenvolvimento e aplicação de celulases — estratégias, enzimas e desempenho. Fonte: Autores, 2025.

Microrganismo / Sistema Enzimático	Tipo(s) de Celulase(s)	Estratégia Aplicada	Substrato / Contexto	Resultado / Eficiência	Referência
<i>Trichoderma reesei</i>	Endoglucanase, exoglucanase	Coquetel enzimático + aditivos (BSA, Tween 80)	Bagaço de cana – alta carga sólida (30%)	Conversão de glicose: 70%	Mukasekuru et al., 2020
<i>Aspergillus niger</i>	β -Glicosidase, xilanase	Aplicação sequencial em consórcio	Resíduos lignoceluloamiláceos (cascas)	Aumento na liberação de açúcares	Mithra & Padmaja, 2020
<i>Trichoderma reesei</i> + enzimas acessórias	Celulase + xilanase + AA9	Pré-tratamento alcalino + mistura enzimática	Palha de arroz / sabugo de milho	Rendimento de sacarificação: 63%	Rajanna et al., 2022
Enzimas recombinantes em <i>Pichia pastoris</i>	Endoglucanase (recombinante)	Expressão heteróloga	Produção controlada em biorreator	Estabilidade aumentada, porém menor glicosilação	Liu & Qu, 2021
Consórcio microbiano (<i>S. cerevisiae</i> + <i>S. stipitis</i>)	–	Fermentação simultânea (hexose + pentose)	Hidrolisado de palha de milho	Rendimento etanol: 0,39 g/g	Wu et al., 2023
<i>Aspergillus niger</i>	β -Glicosidase	Ultrassom + oxidação TEMPO prévia	Cascas de batata	Nanofibras de celulose com elevada reatividade	Sadeghi-Shapourabadi et al., 2023

Fonte: Própria (2025).

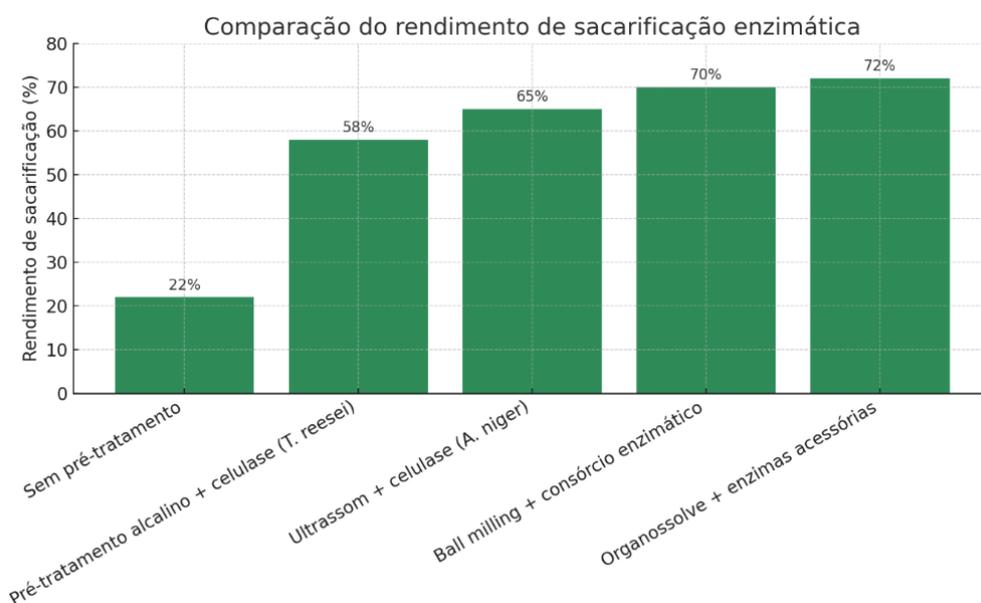
A produção de celulases ainda é dominada por fungos filamentosos, especialmente *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, reconhecidos por sua alta capacidade secretora e adaptabilidade metabólica. No entanto, esses microrganismos apresentam limitações quanto à composição do coquetel enzimático — com deficiências, por exemplo, na produção de β -glicosidase por *T. reesei*. Liu e Qu (2021) destacam a importância da engenharia microbiana integrada à engenharia de proteínas para superar tais gargalos, promovendo melhorias na eficiência catalítica, estabilidade térmica e tolerância a inibidores liberados

no pré-tratamento. Aplicações industriais simuladas em alta carga de sólidos demonstraram que o desempenho das celulases pode ser maximizado com o uso de consórcios enzimáticos sinérgicos. Mukasekuru et al. (2020) mostraram que a formulação de coquetéis enzimáticos contendo endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e aditivos (como surfactantes e enzimas acessórias) aumentou a conversão de glicose a 70% com apenas 2,5 FPU/g de celulose, mesmo em cargas de 30% de sólidos.

Além das formulações, a expressão heteróloga de celulases em sistemas hospedeiros como *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* tem sido amplamente explorada. No entanto, limitações associadas à glicosilação inadequada, baixa estabilidade proteica e rendimento reduzido ainda restringem sua aplicabilidade em escala industrial. Liu e colaboradores (2021) sugerem que o uso de engenharia genética para modificar vias secretoras e morfogênese celular pode resultar em sistemas mais eficientes e econômicos para a produção de celulases recombinantes.

No campo da aplicação direta, diversos estudos reportaram o uso eficiente de celulases em processos fermentativos integrados para produção de bioetanol. Mithra e Padmaja (2020) compararam diferentes configurações de sacarificação e fermentação a partir de resíduos lignoceluloamiláceos, como cascas de tubérculos, demonstrando que a aplicação sequencial de pré-hidrólise seguida por fermentação com leveduras em co-cultura (como *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis*) aumenta significativamente o rendimento etanólico, conforme gráfico 01.

Gráfico 1: Comparativo, a partir de dados da literatura, dos rendimentos de sacarificação enzimática (%) da biomassa lignocelulósica sob diferentes estratégias de pré-tratamento e enzimáticas.



Fonte: Própria (2025).

Por fim, a adoção de celulases em sistemas híbridos de fermentação tem permitido não apenas a

conversão de hexoses, mas também a fermentação de pentoses derivadas da hemicelulose. Wu et al. (2023) relataram a co-cultura eficiente entre *S. cerevisiae* e *S. stipitis* utilizando hidrolisado de palha de milho, com rendimento máximo de 0,39 g de etanol/g de monossacarídeos, validando o papel essencial das celulasas em tornar os açúcares acessíveis ao metabolismo fermentativo.

Os dados apresentados no gráfico evidenciam a importância das estratégias físico-químicas no aumento da eficiência da sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica. Observa-se que o uso isolado de celulasas, sem pré-tratamento da biomassa, resulta em um rendimento significativamente baixo (22%), evidenciando a recalcitrância da estrutura vegetal. A aplicação de pré-tratamento alcalino seguido da ação de celulasas produzidas por *Trichoderma reesei* já proporciona um aumento expressivo no rendimento (58%), conforme demonstrado por Rajanna et al. (2022). Estratégias mais avançadas, como a ultrassonicação combinada com enzimas de *Aspergillus niger* (65%) e o uso de moagem por bolas com consórcios enzimáticos (70%), mostraram ganhos substanciais, indicando sinergismo entre tratamentos físicos e sistemas enzimáticos complexos. O maior rendimento foi observado com a aplicação do método organossolve alcalino e adição de enzimas acessórias, atingindo 72%, de acordo com Mukasekuru et al. (2020), o que reforça a eficácia de abordagens integradas na quebra das barreiras estruturais da lignocelulose e no aumento da disponibilidade de substrato para hidrólise enzimática. Esses resultados apontam caminhos promissores para a viabilização econômica da produção de açúcares fermentáveis em escala industrial.

Abordagens Biotecnológicas para Otimização Enzimática

A baixa eficiência, estabilidade e robustez das celulasas sob condições industriais extremas continuam sendo barreiras críticas para a produção econômica de biocombustíveis de segunda e terceira geração. Nesse cenário, abordagens biotecnológicas têm sido intensamente exploradas para otimizar o desempenho enzimático, incluindo engenharia de proteínas, expressão heteróloga, tecnologias ômicas e consórcios microbianos (Tabela 5).

Tabela 5 –Estratégias biotecnológicas para otimização de celulasas. Fonte: Autores, 2025

Estratégia Biotecnológica	Benefícios Principais	Estudos que respaldam
Engenharia racional de proteínas	Melhora da atividade e estabilidade por mutações específicas em domínios catalíticos ou CBMs	Liu & Qu, 2021
Evolução dirigida	Geração de variantes com propriedades adaptadas a pH, temperatura e inibidores	Liu & Qu, 2021
Expressão heteróloga de celulasas	Aumento da produção de celulasas recombinantes em hospedeiros otimizados	Mukasekuru et al., 2020; Liu & Qu, 202
Bioprospecção por metagenômica	Descoberta de celulasas termoestáveis e resistentes a solventes de ambientes extremos	Do et al., 2022; Hernández-Becerra et al., 2023
Modificação química da celulose	Aumento da funcionalidade do substrato, facilitando a ação enzimática	Sadeghi-Shapourabadi et al., 2023
Consórcios microbianos fermentativos	Conversão eficiente de açúcares C5 e C6 em etanol por co-culturas adaptadas	Wu et al., 2023; Mithra & Padmaja, 2020

Fonte: Própria (2025).

Liu e Qu (2021) propõem um modelo integrado baseado na filosofia *Design-Build-Test-Learn*, onde dados de modelagem molecular e experimentação racional são usados para orientar mutações benéficas em regiões catalíticas das celulasas. Além disso, a engenharia racional de celulasas tem possibilitado a modificação de domínios catalíticos e de ligação, como os módulos de ligação à celulose (CBMs), resultando em enzimas com maior afinidade ao substrato, maior atividade específica e maior tolerância a condições adversas de pH e temperatura. Essas modificações são particularmente relevantes para biomassas altamente cristalinas, como cascas de batata e sabugo de milho, onde o acesso da enzima ao substrato é limitado. Sadeghi-Shapourabadi et al. (2023) também mostraram que a introdução de grupos carboxílicos via oxidação TEMPO promove maior reatividade e funcionalidade da celulose, o que impacta diretamente na eficácia da ação enzimática subsequente.

Já a evolução dirigida tem sido uma alternativa complementar, promovendo variações aleatórias nas sequências gênicas de celulasas e permitindo a triagem de variantes com propriedades melhoradas. Liu e Qu (2021) relatam que, ao combinar evolução dirigida com simulações de docking molecular e dinâmica molecular, é possível acelerar a identificação de variantes mais eficientes em ambientes industriais hostis, como os ricos em compostos inibidores gerados no pré-tratamento alcalino ou ácido da biomassa. Além disso, estratégias de expressão heteróloga em microrganismos como *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* e *Pichia pastoris* têm sido amplamente aplicadas para otimizar a produção de celulasas recombinantes. Mukasekuru et al. (2020) demonstraram que a adaptação de linhagens fúngicas para expressar celulasas com domínios de ligação específicos e maior resistência a compostos fenólicos resultou em ganhos de rendimento na sacarificação de bagaço de cana sob alta carga sólida. No entanto, desafios como glicosilação inadequada e baixa secreção ainda limitam a eficiência total dessas plataformas.

A bioprospecção de novos genes celulolíticos por metagenômica tem sido outro campo em expansão. Ambientes extremos, como resíduos lignocelulósicos em decomposição, têm fornecido cepas com celulasas termoestáveis e resistentes a solventes orgânicos, como demonstrado nos estudos de Do et al. (2022) e Hernández-Becerra et al. (2023), que utilizaram resíduos de folhas de abacaxi e celulose vegetal em solventes anidros, respectivamente. Tais enzimas são candidatas ideais para aplicações industriais, dada sua estabilidade em condições extremas e compatibilidade com sistemas hidrofóbicos.

Por fim, o uso de consórcios microbianos contendo leveduras especializadas, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis*, vem se destacando na fermentação simultânea de hexoses e pentoses em hidrolisados lignocelulósicos. Wu et al. (2023) demonstraram que, sob condições otimizadas de co-inoculação e ventilação, esses consórcios alcançaram rendimentos de até 0,39 g/g de etanol por açúcar monomérico em hidrolisado de palha de milho. De forma semelhante, Mithra e

Padmaja (2020) relataram que a inserção de uma etapa de pré-hidrólise antes da sacarificação aumentou significativamente a liberação de açúcares fermentáveis e o desempenho da co-cultura em resíduos vegetais amiláceos.

Tendências, Lacunas e Perspectivas Tecnológicas

A conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis por meio de celulasas tem avançado significativamente nos últimos anos, impulsionada por novas abordagens tecnológicas e biotecnológicas. A tendência mais evidente observada nos estudos recentes é a integração de múltiplas estratégias, físico-químicas, enzimáticas e computacionais, para superar as barreiras estruturais da biomassa e otimizar a eficiência do processo de hidrólise. A combinação de pré-tratamentos eficientes, como os baseados em solventes organossolve, com consórcios enzimáticos formulados sob princípios de sinergismo funcional, foi particularmente destacada por Mukasekuru et al. (2020), que obteve até 90% de conversão com baixa carga enzimática. Outra tendência crescente é a aplicação de tecnologias ômicas e inteligência artificial no desenvolvimento e aprimoramento de celulasas. Estudos como os de Liu e Qu (2021) propõem abordagens integradas baseadas em dados genômicos, modelagem molecular, dinâmica molecular e aprendizado de máquina para prever estruturas funcionais e projetar mutações direcionadas com potencial de alto desempenho. Essa integração entre bioinformática e engenharia enzimática é apontada como fundamental para acelerar o ciclo de inovação no desenvolvimento de enzimas industriais robustas.

No entanto, a revisão revelou lacunas importantes na literatura, especialmente quanto à padronização metodológica. Muitos estudos utilizam substratos diferentes, unidades distintas para reportar atividade enzimática e condições experimentais não comparáveis, o que dificulta a avaliação entre resultados. Além disso, a maioria das pesquisas permanece restrita ao nível laboratorial. Poucos estudos, como os de Sureshkumar et al. (2025), realizaram simulações de condições industriais com alta carga sólida (30%), e ainda menos realizaram validações em escala piloto. A viabilidade econômica e escalabilidade também aparecem como gargalos recorrentes. Embora métodos como ultrassonicação, moagem por bolas e pré-tratamento ácido-alcalino tenham mostrado alta eficiência, o custo energético e a complexidade operacional limitam sua adoção industrial ampla. A proposta de novas rotas, como a fibrilação mecânica em solventes anidros (Hernández-Becerra et al., 2023), surge como alternativa para aplicações em sistemas específicos, mas ainda carece de estudos de custo-benefício em larga escala.

Em termos de perspectivas futuras, a consolidação de biocatalisadores multienzimáticos robustos, produzidos por sistemas microbianos modificados geneticamente ou consórcios sintéticos, é vista como promissora. Estudos como os de Wu et al. (2023) e Mithra e Padmaja (2020) demonstraram que co-cultivos otimizados permitem a fermentação simultânea de açúcares hexose e pentose, reduzindo

etapas e aumentando a eficiência global da conversão. A aplicação de sistemas de produção "on-site" de celulasas em reatores integrados também tem sido proposta para reduzir custos com enzimas comerciais. Adicionalmente, o desenvolvimento de políticas públicas e incentivos à bioeconomia baseada em resíduos lignocelulósicos pode impulsionar a transição das soluções laboratoriais para o ambiente industrial. A integração entre universidades, centros de pesquisa e setor privado será essencial para consolidar rotas tecnológicas viáveis, ambientalmente sustentáveis e alinhadas às metas de descarbonização energética.

CONCLUSÕES

A presente revisão integrativa demonstrou que os avanços na engenharia e aplicação de celulasas têm potencial significativo para transformar a biomassa lignocelulósica em uma fonte viável de biocombustíveis sustentáveis. Os dados analisados evidenciam que estratégias físico-químicas como pré-tratamentos alcalinos, processos organossolve, ultrassonicação e moagem mecânica são eficazes na remoção de lignina e na redução da cristalinidade da celulose, fatores essenciais para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática. Paralelamente, o desenvolvimento de celulasas por meio de engenharia racional, evolução dirigida, expressão heteróloga e bioprospecção de microrganismos tem ampliado o desempenho catalítico, a estabilidade e a adaptação a condições industriais adversas. Um dos caminhos mais promissores identificados é a integração da etapa de sacarificação com a fermentação em processos simultâneos, como a sacarificação e fermentação simultânea (SSF) ou a sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF). Essas abordagens otimizam a utilização dos açúcares liberados e reduzem o tempo de processamento e os custos operacionais.

Outro aspecto crucial para a consolidação tecnológica é a análise econômica e a sustentabilidade da produção de celulasas. A viabilidade comercial ainda esbarra em altos custos de produção, purificação e aplicação das enzimas. A adoção de estratégias como a produção "on-site", o uso de resíduos como substrato para fermentação e o desenvolvimento de sistemas de produção de baixo custo são fundamentais para superar esse desafio. Dessa forma, o futuro da aplicação de celulasas na conversão da biomassa lignocelulósica dependerá de abordagens integradas e interdisciplinares, que envolvam engenharia biotecnológica, inovação em processos, análise econômica e comprometimento ambiental. A transição para biorrefinarias eficientes e sustentáveis exige não apenas avanços científicos, mas também soluções tecnológicas que sejam aplicáveis em larga escala e economicamente viáveis.

REFERÊNCIAS

ADSUL, M.; SANDHU, S. K.; SINGHANIA, R. R.; GUPTA, R.; PURI, S. K.; MATHUR, A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to

biofuels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109442, 2020. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2019.109442.

BAN, L. et al. Sustainable production of biofuels from biomass feedstocks using modified montmorillonite catalysis. **ChemSusChem**, v. 18, n. 1, p. e202401025, 2025.

BHATTACHARYYA, S.; MOHARANA, S.; SATPATHY, S. K.; SAHU, B. B. Photosynthetic Efficiency of Microalgae and Cyanobacteria on Reduced Graphene Oxide (RGO) Anode Surface for Utilization in Bio-Photovoltaics (BPV). **Journal of Advanced Zoology**, v. 44, S-5, p. 1392–1401, 2023. DOI: 10.17762/jaz.v44is-5.1275.

BONFÁ, M. R. L et al. Bioprospecting of Microbial Enzymes with Application in Environmental Biotechnology: An Omic Approach. *Microbial Enzymes: Production, Purification and Industrial Applications*, v. 1, p. 345-381, 2025.

BREUER, G.; LAMERS, P. P.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H.; MARTENS, D. E. Opportunities to improve the areal oil productivity of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 294–302, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.085.

BRODA, M.; YELLE, D. J.; SERWAŃSKA, K. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass—Challenges and Solutions. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8717, 2022. DOI: 10.3390/molecules27248717.

CHERWOO, L. et al. Biofuels an alternative to traditional fossil fuels: A comprehensive review. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 60, p. 103503, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seta.2023.103503>.

CHOWDHURY, H.; LOGANATHAN, B. Third-generation biofuels from microalgae: a review. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 20, p. 39-44, 2019. DOI: 10.1016/j.cogsc.2019.09.003.

DO, Nga HN et al. Novel recycling of pineapple leaves into cellulose microfibrils by two-step grinding of ball milling and high-speed rotor–stator homogenization. **Journal of Polymer Research**, v. 29, n. 6, p. 225, 2022.

FAUZI, A. Z. I.; MUHAMMAD, G.; AWG ZAIDAN, A. S. H.; AZMI, A. S.; MOHAMAD, S. N. H.; ABDUL, P. M. Enzymatic Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Bioenergy Conversion: A Mini-Review. **Malaysian Journal of Bioengineering and Technology**, v. 1, n. 2, p. 161-169, 2024. ISSN: 3036-017X.

GASPARATOS, A.; STROMBERG, P.; TAKEUCHI, K. Sustainability impacts of first-generation biofuels. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 2, p. 12-26, 2013.

HERNÁNDEZ-BECERRA, E. et al. Isolation of cellulose microfibrils and nanofibrils by mechanical fibrillation in a water-free solvent. **Cellulose**, v. 30, n. 8, p. 4905-4923, 2023.

HUANG, C., Jiang, X., Shen, X., Hu, J., Tang, W., Wu, X., Ragauskas, A., Jameel, H., Meng, X., & Yong, Q. (2022). Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 154, 111822. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111822>

JADAUN, Sadhana; UPADHYAY, Neelam; SIDDIQUI, Saleem. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from rice straw using ultrasonication-assisted extraction technique coupled with high shear dispersion. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-17, 2025.

KIRAN, B.; KUMAR, R.; DESHMUKH, D. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1228–1244, 2014. DOI: 10.1016/j.enconman.2014.06.022.

KULULO, W. W. et al. Recent advances in biochemical, thermochemical, and hybrid conversion approaches for biofuel production from lignocellulosic biomass: a review. *Sustainable development research in materials and renewable energy engineering: advancements of science and technology*, p. 297-330, 2025.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009. DOI: 10.1021/ie801542g.

LIU, Guodong; QU, Yinbo. Integrated engineering of enzymes and microorganisms for improving the efficiency of industrial lignocellulose deconstruction. **Engineering Microbiology**, v. 1, p. 100005, 2021.

MADHAVAN A, Srivastava A, Kondo A, Bisaria VS. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Crit Rev Biotechnol**. 2012;32(1):22-48. doi:10.3109/07388551.2010.539551

MALIK, K., Capareda, S. C., Kamboj, B. R., Malik, S., Singh, K., Arya, S., & Bishnoi, D. K. (2024). Biofuels Production: A Review on Sustainable Alternatives to Traditional Fuels and Energy Sources. **Fuels**, 5(2), 157–175. <https://doi.org/10.3390/fuels5020010>

MANSY, A. E. et al. Catalytic production of aviation jet biofuels from biomass: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-43, 2025.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, ago. 2012. DOI: 10.1016/j.pecs.2012.02.002.

MITHRA, Madhanamohanan G.; PADMAJA, Gouri. Improvement in Ethanol Yield from Lignocellulose-Starch Biomass using *Saccharomyces cerevisiae* alone or its Co-culture with *Scheffersomyces stipitis*. **Current Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 57-76, 2020.

MUKASEKURU, M. R. et al. Fed-batch high-solids enzymatic saccharification of lignocellulosic substrates with a combination of additives and accessory enzymes. **Industrial Crops and Products**, v. 146, p. 112156, 2020.

NANDA, S., Rana, R., Sarangi, P.K., Dalai, A.K., Kozinski, J.A. (2018). A Broad Introduction to First-, Second-, and Third-Generation Biofuels. In: Sarangi, P., Nanda, S. (eds) *Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1–25.

OLIVA, Armando et al. Inoculum dependence of methane formation from lignocellulosic biowastes. **Renewable Energy**, v. 245, p. 122777, 2025.

PAUL, M.; BHARTI, R.; KUMAR, A.; THATOI, H. Surface chemistry and cellulase engineering for lignocellulosic biomass deconstruction: A review. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125710, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125710.

PETRIDIS, L.; SMITH, J. C. Molecular-level driving forces in lignocellulosic biomass deconstruction for bioenergy. **Nature Reviews Chemistry**, v. 2, n. 11, p. 382–389, 2018. DOI: 10.1038/s41570-018-0050-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0050-6>.

RAJANNA, Madhuri et al. A facile synthesis of cellulose nanofibers from corn cob and rice straw by acid hydrolysis method. **Polymers**, v. 14, n. 20, p. 4383, 2022.

RAMAN, R. et al. Analyzing the contributions of biofuels, biomass, and bioenergy to sustainable development goals. **iScience**, v. 28, n. 4, 2025.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; de Lasa, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing — A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013. DOI: 10.1016/j.rser.2013.05.063

RODIONOVA, M.V., Poudyal, R.S., Tiwari, I., Voloshin, R.A., Zharmukhamedov, S.K., Nam, H.G., Zayadan, B.K., Bruce, B.D., Hou, H.J.M., Allakhverdiev, S.I. (2017). Biofuel production: Challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy**, Volume 42, Issue 12, Pages 8450-8461, ISSN 0360-3199, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.125>.

SADEGHI-SHAPOURABADI, Mohsen; ELKOUN, Said; ROBERT, Mathieu. Microwave-Assisted Chemical Purification and Ultrasonication for Extraction of Nano-Fibrillated Cellulose from Potato Peel Waste. **Macromol**, v. 3, n. 4, p. 766-781, 2023.

SARWER, A. et al. Suitability of biofuels production on commercial scale from various feedstocks: a critical review. **ChemBioEng Reviews**, v. 9, n. 5, p. 423–441, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cben.202100049>.

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S. S.; SONI, R.; SONI, S. K. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 179, n. 8, p. 1346–1380, ago. 2016. DOI: 10.1007/s12010-016-2070-3.

SHARMILA, V. G.; SHANMUGAVEL, S. P.; BANU, J. R. A review on emerging technologies and machine learning approaches for sustainable production of biofuel from biomass waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 180, p. 106997, 2024.

SHELDON, R. A. Enzymatic conversion of first- and second-generation sugars. In: DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. (Org.). *Biomass and green chemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 169–189. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-66736-2_7.

SHIRKAVAND, E.; BAROUTIAN, S.; GAPES, D. J.; YOUNG, B. R. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment – a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 54, p. 217–234, fev. 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2015.10.003.

Shokrkar, H., Ebrahimi, S., & Zamani, M. (2018). A review of bioreactor technology used for enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. **Cellulose**, 25(11), 6279–6304. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2028-4>

SURESHKUMAR, Susithra; PATEL, Dhruvkumar Bharatbhai; VARANASI, Swambabu. Low energy synthesis of crystalline cellulose nanofibers from Pennisetum hohenackeri by planetary ball milling. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 10, p. 100799, 2025. DOI: 10.1016/j.carpta.2025.100799.

SWANTOMO, D. et al. Chemical Hydrolysis-Gamma Irradiation Processes for Cellulose Nanofibers Isolation from Rice Straw. **International Journal of Integrated Engineering**, v. 16, n. 1, p. 14-25, 2024.

VERMA, N.; KUMAR, V.; BANSAL, M. C. Valorization of Waste Biomass in Fermentative Production of Cellulases: A Review. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 613–640, fev. 2021. DOI: 10.1007/s12649-020-01048-8.

VILLATORO FLORES, H.F., Furubayashi, T. & Nakata, T. Analysis of Trade-offs Between First-generation Biofuels and Food Production for Japan Using CGE Modelling. **IJEPS** 11, 1–24 (2016). <https://doi.org/10.1007/BF03405763>

WU, Yilu et al. Understanding the dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* abundance in co-culturing process for bioethanol production from corn stover. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 1, p. 43-55, 2023.

Xu, C., Tong, S., Sun, L., & Gu, X. (2023). Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: An all-inclusive review. **Carbohydrate Polymers**, 321, 121319. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121319>

YADAV, A. K.; PANDEY, S.; TRIPATHI, A. D.; PAUL, V. Role of enzymes in biofuel production. In: SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M. (Ed.). *Bioenergy research*. Hoboken: Wiley, 2021. p. 1–18. DOI: 10.1002/9781119772125.ch1.

YANG, Q., & Pan, X. (2015). Correlation between lignin physicochemical properties and inhibition to enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, 113(6), 1213–1224. <https://doi.org/10.1002/bit.25903>

YOAV, S.; STERN, J.; SALAMA-ALBER, O.; FROLOW, F.; ANBAR, M.; KARPOL, A.; HADAR, Y.; MORAG, E.; BAYER, E. A. Directed Evolution of *Clostridium thermocellum* β -Glucosidase A Towards Enhanced Thermostability. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 19, p. 4701, 2019. DOI: 10.3390/ijms20194701.

ZOGLAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 874, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>.