



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

**Caracterização enzimática e proteômica do secretoma
de cocultivo entre *Trichoderma reesei* RutC30 e
Pleurotus citrinopileatus em bagaço de cana-de-açúcar
com avaliação do potencial lignocelulolítico**

Alencar da Silva Peixoto

Brasília, fevereiro de 2026

Alencar da Silva Peixoto

Caracterização enzimática e proteômica do secretoma de cocultivo entre *Trichoderma reesei* rut-c30 e *Pleurotus citrinopileatus* em bagaço de cana-de-açúcar com avaliação do potencial lignocelulolítico

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como
requisito para a obtenção do título de
mestre em biologia microbiana pelo
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Microbiana

Orientador

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Brasília – DF

fevereiro de 2026

Caracterização enzimática e proteômica do secretoma de cocultivo entre *Trichoderma reesei* rut-c30 e *Pleurotus citrinopileatus* em bagaço de cana-de-açúcar com avaliação do potencial lignocelulolítico

Alencar da Silva Peixoto

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de mestre em biologia microbiana pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho - PPG Biologia Microbiana – UnB

(Orientador e Presidente da banca)

Banca Avaliadora

Dr. Luís Henrique Ferreira do Vale - PPG Biologia Microbiana - UnB

(Avaliador interno)

Dr. Felix Goncalves de Siqueira - Embrapa Agroenergia - DF

(Avaliador externo)

Dr. Ricardo Henrique Kruger - PPG Biologia Microbiana - UnB

(Membro suplente)

“No fim, não devemos perguntar qual é o sentido da nossa vida, mas compreender que é a própria vida que nos interpela.”

— Viktor E. Frankl

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha família: meu pai Janio, minha mãe Maria e meu irmão Allan, pelo apoio incondicional e por aceitarem minhas decisões, mesmo sem compreenderem completamente os caminhos que escolhi trilhar. Mesmo com a distância e saudade sempre foram minha base e a razão que me faz persistir diante das dificuldades e acreditar que todo o esforço vale a pena. Agradeço à minha namorada Isabela, que fortalece minha jornada e caminha ao meu lado na mesma direção. Sua presença, apoio e companheirismo tornaram os desafios mais leves e as conquistas mais significativas.

Agradeço ao professor Edivaldo pela oportunidade de tê-lo como orientador desde a graduação, pela confiança depositada, pelo apoio constante e pelo conhecimento compartilhado ao longo dessa trajetória. Um agradecimento especial ao professor Robert, pelo compromisso, profissionalismo e pelo exemplo de pesquisador e ser humano. Sua postura científica e ética contribuiu profundamente para minha formação, não apenas como cientista, mas também como pessoa. Agradeço aos professores Eliane Noronha, Carlos André e Wagner Fontes pelo apoio em momentos decisivos do desenvolvimento deste projeto, sendo um privilégio contar com sua experiência e orientação.

Aos pós-doutorandos Taísa, Érica, Brenda e Pedro, agradeço a disposição constante em compartilhar conhecimento e pelas discussões que contribuíram significativamente para o amadurecimento deste trabalho. Aos técnicos e profissionais do Departamento de Biologia Celular Jaques, Nuno, Chiquinho e demais profissionais fica registrado o sincero agradecimento pelo suporte essencial às atividades laboratoriais.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, Gasparotto, Natan, João, Rosa e Vinícius e do LBPQ, Cezar e Maria Júlia agradeço a convivência, parceria e aprendizado compartilhado. Um agradecimento especial aos colegas “musos e mofos” do LIPP, Rafael, Lucas, Maquir, Rutiane, Carol, Angela, Clara, Mateus e Iasmin e a todos os demais colegas que fizeram parte dessa caminhada. Pelas discussões diárias, pelo apoio mútuo, pelos momentos de descontração e pelas memórias construídas, que levarei para sempre comigo.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta trajetória. Esta conquista é fruto de um esforço coletivo, construído com a colaboração, o incentivo e a confiança de muitas pessoas.

Apoio Financeiro

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio da concessão de bolsa de mestrado; da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) processo 00193-00002388/2023-21 - Biorrefinaria 2G: bioconversão de biomassa lignocelulósica em sistema de cocultivo fúngico, pelo financiamento do projeto; do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio institucional; e da Diretoria de Desenvolvimento Social (DDS) da Universidade de Brasília, pelo suporte com alimentação e moradia estudantil, fundamentais para a permanência e o desenvolvimento acadêmico de pessoas de baixa renda.

Sumário

1	Introdução.....	16
2	Revisão Bibliográfica	18
3	Justificativa	36
4	Materiais e Métodos.....	37
4.1	Microrganismos e condições gerais de cultivo	38
4.2	<i>Screening</i> de interações fúngicas em meio sólido	41
4.3	Estabelecimento de condições padrão de cultivo e análises funcionais	43
4.4	Procedimentos gerais para quantificação enzimática e análise estatística.....	48
4.5	<i>Screening</i> funcional em meio líquido	58
4.6	Consolidação e caracterização cinética do sistema modelo (9 dias).....	59
4.7	Robustez e reprodutibilidade do sistema modelo (15 dias)	60
4.8	Eleição do ponto temporal para hidrólise e análises ômicas	61
4.9	Modulação do desempenho enzimático sob diferentes condições.....	63
4.10	Ensaio de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	64
4.11	Caracterização e padronização do EB para análise proteômica.....	66
4.12	LC-MS/MS.....	77
4.13	Considerações metodológicas finais	81
5	Resultados.....	82
5.1	<i>Screening</i> de interações fúngicas em meio sólido	82
5.2	<i>Screening</i> funcional em meio líquido	93
5.3	Consolidação e caracterização cinética do sistema modelo (9 dias).....	97
5.4	Robustez e reprodutibilidade do sistema modelo (15 dias)	103

5.5	Eleição do ponto temporal para análises ômicas subsequentes	108
5.6	Modulação do desempenho enzimático do sistema modelo em diferentes pH... ..	109
5.7	Síntese da caracterização funcional enzimática do sistema modelo	111
5.9	Caracterização e padronização do EB para análise proteômica	116
5.10	Desempenho analítico da LC–MS/MS e identificação global de proteínas.....	123
6	Discussão.....	131
6.1	Biomassa lignocelulósica, biorrefinarias e cocultivo fúngico.....	131
6.2	Interação ecológica inicial.....	132
6.3	<i>Screening</i> inicial em meio líquido: sinais de modulação.....	134
6.4	Leitura integrada do <i>screening</i> : crescimento, nicho e desempenho funcional	136
6.5	Dinâmica temporal do secretoma: sucessão funcional.....	138
6.6	Assinatura pectinolítica do cocultivo: modulação setorial	140
6.7	Definição do ponto temporal com base na dinâmica funcional do secretoma.....	143
6.8	pH como modulador fisiológico do secretoma: efeito integrado.....	144
6.9	Manutenção do desempenho hidrolítico em sistema de cocultivo	146
6.10	Proteômica global: leitura qualitativa, e plausibilidade	147
6.11	Produção intelectual decorrente do estudo	150
6.12	Limitações do estudo	150
6.13	Perspectivas e direções futuras	153
7	Conclusão.....	156
8	Referencias:	158

Lista de Figuras

Figura 1 Modelo simplificado de degradação enzimática.....	22
Figura 2 Representação esquemática cocultivo fúngico	31
Figura 3: Esquema ilustrativo da padronização cromática utilizada	57
Figura 4: Caracterização macroscópica do crescimento micelial em monocultivo;	83
Figura 5: Caracterização macroscópica em cocultivo.	89
Figura 6: Atividades após sete dias de cultivo em meio líquido	94
Figura 7: Boxplots representando a variação das atividades	98
Figura 8: Perfil cinético das atividades ao longo de nove dias.	100
Figura 9: Perfil cinético ampliado das enzimas hidrolíticas	104
Figura 10: (A) β -glicosidase; (B) β -xilosidase. As atividades enzimáticas.	105
Figura 11: (A) Lacase; (B) Proteases (azocaseína)..	106
Figura 12: Atividade sob diferentes pHs.	110
Figura 13: Concentração de açúcares redutores (mg/mL) a	112
Figura 14: Área sob a curva de liberação de açúcares redutores.	114
Figura 15: SDS-PAGE (12% bisacrilamida) do EB fúngico diferentes métodos	116
Figura 16: Eficiência de recuperação proteica (%).	118
Figura 17: SDS-PAGE (12%) do EB fúngico.....	121
Figura 18: Distribuição taxonômica do conjunto proteico global	125
Figura 19: Classificação funcional refinada e distribuição das proteínas.	126
Figura 20: Perfil de enzimas carboidrato-ativas (CAZy)	127
Figura 21: teste de Fisher aplicado às classes funcionais.	129

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies fúngicas utilizadas no estudo.....	38
Tabela 2: Enzimas extracelulares avaliadas, respectivos substratos e métodos analíticos utilizados no estudo.....	45
Tabela 3 - Caracterização macroscópica do crescimento micelial dos isolados em monocultivo em meio BDA após 7 dias de incubação.....	87
Tabela 4: Caracterização macroscópica das interações em cocultivo entre <i>T. reesei</i> RUT-C30 e os demais isolados.	88
Tabela 5: Condições em que o cocultivo apresentou atividade enzimática numericamente superior ao cultivo contendo <i>T. reesei</i> RUT-C30 após sete dias.....	95
Tabela 6: Pontos temporais em que o cocultivo apresentou atividade enzimática superior ao monocultivo de <i>T. reesei</i> RUT-C30 ao longo do cultivo.	101
Tabela 7: Pontos temporais em que o cocultivo apresentou atividade superior ao monocultivo de <i>T. reesei</i>	107
Tabela 8 Desempenho final da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento, após 48 h sob carga padronizada de 0,5 U/mL (3 U totais).....	115
Tabela 9: Concentração proteica (µg/mL) do EB após aplicação dos métodos de diálise, precipitação e ultrafiltração.....	117
Tabela 10 Concentração proteica (µg/mL) do EB após diálise definitiva em membrana <i>SnakeSkin</i> TM	119
Tabela 11: Concentração peptídica (µg/mL) obtida após digestão proteolítica, com base na carga inicial de 100 µg de proteína total antes da digestão.	122

Índice de Siglas

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Analysis of Variance (Análise de Variância)

BCA – Bagaço de Cana-de-Açúcar

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

CAZy – Carbohydrate-Active enZymes database

CAZymes – Carbohydrate-Active enZymes

CMC – Carboximetilcelulose

DDA – Data-Dependent Acquisition

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DTT – Ditioneitol

EB – Extrato Bruto

EMMs – Estimated Marginal Means (Médias Marginais Estimadas)

FDR – False Discovery Rate (Taxa de Falsos Descobrimientos)

FPase – Filter Paper Activity (Atividade em Papel Filtro)

HCD – Higher-energy Collisional Dissociation

IAA – Iodoacetamida

InterPro – Base de dados de domínios e funções proteicas

IQR – Intervalo Interquartil

ITS – Internal Transcribed Spacer

KOH – Hidróxido de Potássio

LBQP – Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

LIPP – Laboratório de Interação Planta-Praga

LSU – Large Subunit

MnP – Manganês-peroxidase

MS1 – Espectro de massas de precursores

MS/MS (MS2) – Espectro de fragmentação

m/z – Razão massa/carga

MWCO – Molecular Weight Cut-Off

MWM – Marcador de Peso Molecular

NaOH – Hidróxido de Sódio

nano-UHPLC – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência em nanoescala

NCE – Normalized Collision Energy

OR – Odds Ratio (Razão de Chances)

PFAM – Protein Families Database

pNP – p-nitrofenol

pNPG – p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo

pNPX – p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo

PSM – Peptide Spectrum Match

R – Linguagem e ambiente estatístico R

rep_ens – Identificação de ensaio independente (replicação interensaio)

RStudio – Ambiente de desenvolvimento integrado para R

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SE – Standard Error (Erro Padrão)

SPE – Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)

TCA – Ácido tricloroacético

TEAB – Triethylammonium bicarbonate

TFA – Ácido trifluoroacético

Resumo

A biomassa lignocelulósica derivada de resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, representa uma matéria-prima abundante e estratégica para biorrefinarias de segunda geração, com potencial para a produção de biocombustíveis e bioprodutos de alto valor agregado. Entretanto, a recalcitrância estrutural da parede celular vegetal, composta por uma matriz complexa de celulose, hemicelulose, lignina e pectina, impõe barreiras físico-químicas à sua bioconversão eficiente. A pectina, embora frequentemente subestimada em biomassas herbáceas, desempenha um papel estrutural relevante na organização e acessibilidade da parede celular, influenciando a exposição dos polímeros estruturais ao ataque enzimático. Nesse contexto, fungos lignocelulolíticos se destacam por sua capacidade de secretar sistemas enzimáticos coordenados; contudo, a produção enzimática em monocultivo pode limitar a diversidade funcional do secretoma. O presente estudo investigou se interações interespecíficas em um modelo de cocultivo fúngico poderiam modular o perfil secretório e impactar o desempenho hidrolítico sobre o bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente, foi realizado um screening morfológico em meio sólido envolvendo *Trichoderma reesei* RUT-C30 e diferentes fungos saprofitos, seguido de um screening funcional em meio líquido por meio da determinação das atividades de CMCase, mananase, pectinase e xilanase. O sistema composto por *Trichoderma reesei* RUT-C30 e *Pleurotus citrinopileatus* foi selecionado como modelo para caracterização cinética estendida (9 e 15 dias), avaliação da influência do pH, ensaios de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e análise proteômica global por LC-MS/MS. No screening funcional, as atividades celulolítica (CMCase), xilanolítica e mananolítica no cocultivo apresentaram perfis comparáveis ao monocultivo de *T. reesei*, sem evidência de amplificação global das enzimas hidrolíticas clássicas. Em contraste, foi observado aumento consistente da atividade pectinolítica no cocultivo, confirmado sob maior robustez experimental no ensaio de 15 dias, com diferença estatisticamente significativa no dia 12. A dinâmica temporal revelou sucessão funcional no secretoma, caracterizada por atividade xilanolítica precoce e intensificação tardia das atividades celulolítica e mananolítica. O pH 6 proporcionou o maior desempenho enzimático global. Nos ensaios de hidrólise

do bagaço de cana-de-açúcar, o sistema de cocultivo apresentou desempenho comparável ao monocultivo de *T. reesei*, sem redução da eficiência de sacarificação, indicando que a modulação observada não comprometeu a capacidade global de conversão do substrato. A proteômica qualitativa identificou 305 proteínas de alta confiança, incluindo um repertório diverso de enzimas ativas em carboidratos (CAZymes), como hidrolases de glicosídeos associadas à degradação de celulose e hemicelulose, enzimas pectinolíticas e proteínas acessórias envolvidas na modificação da matriz da parede celular. A atribuição taxonômica revelou contribuição diferencial dos organismos, com maior densidade relativa de CAZymes associadas a *P. citrinopileatus*, particularmente enzimas relacionadas à degradação e remodelamento de polissacarídeos pécticos. Embora a abordagem agregada não permita inferência quantitativa por tratamento, o perfil funcional identificado fornece plausibilidade mecanística para a assinatura pectinolítica observada experimentalmente. Em conjunto, os resultados indicam que o cocultivo não promove amplificação indiscriminada das atividades hidrolíticas, mas sim uma reorganização seletiva do secretoma, com modulação setorial consistente ao longo do eixo pectinolítico. As evidências sugerem que a modulação da fração péctica pode representar uma estratégia relevante para otimizar a acessibilidade estrutural da biomassa lignocelulósica. Este estudo estabelece uma estrutura experimental robusta para futuras abordagens de proteômica quantitativa e integração multiômica, com vistas à elucidação dos mecanismos regulatórios subjacentes à bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar e ao suporte ao desenho racional de consórcios fúngicos para aplicações em biorrefinarias lignocelulósicas.

Palavras-chave: pectina; modulação secretória; triagem de fungos; CAZymes; consórcios microbianos.

Abstract

Lignocellulosic biomass from agroindustrial residues, such as sugarcane bagasse, is an abundant feedstock for second-generation biorefineries and has potential for biofuels and bioproducts. The complex matrix of cellulose, hemicellulose, lignin, and pectin in plant cell walls, however, presents physicochemical barriers to bioconversion. Notably, this study highlights the underrated role of pectin in cell wall organization and accessibility, which affects enzymatic exposure to structural polymers. In contrast to previous research efforts, this study explored whether interspecific fungal coculture could uniquely modulate the secretome and enhance hydrolytic performance on sugarcane bagasse. Based on an initial screening of *Trichoderma reesei* RUT-C30 with other saprotrophic fungi, with each fungal combination functionally characterized for CMCase, mannanase, pectinase, and xylanase activities, the *T. reesei* RUT-C30 and *Pleurotus citrinopileatus* coculture was selected, based on promising enzyme activities, for extended characterization. Novel parameters included assessment of pH influence, bagasse hydrolysis, and proteomic analysis by LC–MS/MS. Importantly, while coculture cellulolytic, xylanolytic, and mannanolytic activities matched those of *T. reesei* monoculture, pectinolytic activity was consistently elevated in coculture, as confirmed in 15-day assays, with significant differences by day 12. We observed new temporal activity patterns: early xylanolytic followed by later cellulolytic and mannanolytic increases. Coculture at pH 6 yielded peak enzyme performance, with bagasse hydrolysis maintained. Proteomics revealed 305 proteins, including diverse CAZymes, and identified a large abundance of pectinolytic enzymes and accessory proteins from *P. citrinopileatus* targeting pectic polysaccharides. Although quantitative comparisons of treatments are unavailable, these findings provide the first mechanistic insights into pectinolytic profiles driven by coculture. Overall, our study uniquely demonstrates selective secretome reorganization along the pectinolytic axis, suggesting that targeting pectin can optimize biomass accessibility. This framework opens up opportunities for quantitative proteomics and multi-omics, guiding the design of fungal consortia for biorefineries.

Keywords: pectin; secretory modulation; fungal screening; CAZymes; microbial consortia.

1 Introdução

Com o crescimento contínuo da população mundial e a crescente demanda por energia, a atual estrutura da economia global, fortemente dependente de fontes não renováveis e altamente poluentes, configura-se como um dos maiores desafios enfrentados pela sociedade contemporânea. Nesse cenário, a transição para fontes de energia renováveis e sustentáveis surge como uma alternativa promissora para mitigar os impactos ambientais decorrentes da atividade humana. Para isso, torna-se fundamental o desenvolvimento de um modelo de economia circular, baseado na redução do uso de terras, na otimização dos processos produtivos, na minimização de desperdícios e na priorização de recursos renováveis (LIGUORI & FARACO, 2016; GHISELLINI et al., 2016).

Dentro dessa perspectiva, a bioeconomia destaca-se como uma estratégia sustentável ao propor a substituição de insumos industriais por recursos biológicos renováveis. Associada à pesquisa e à inovação tecnológica, a bioeconomia busca otimizar processos de bioprodução, promovendo a integração entre objetivos econômicos, sociais e ambientais (BUGGE et al., 2016; KLEINSCHMIT et al., 2014; PFAU et al., 2014; D'AMATO et al., 2016).

Um dos pilares da bioeconomia é a bioenergia de segunda geração (2G), que se apresenta como solução tecnológica estratégica para ampliar a produção de energia sem a necessidade de expansão de áreas agrícolas. Essa abordagem concentra-se na conversão de resíduos agroindustriais, especialmente lignocelulósicos, em biocombustíveis e em outros produtos de valor agregado (SHARMA et al., 2022; PATEL et al., 2022).

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar constitui uma das principais fontes de biomassa, sendo gerado em grandes quantidades pelas usinas sucroenergéticas e correspondendo a aproximadamente 25–30% da massa da planta (RACKEMANN et al., 2016). Apesar de seu elevado potencial, apenas

uma fração desse resíduo é atualmente destinada à produção de etanol 2G (KLEIN et al., 2019; KARP et al., 2021; RAMOS et al., 2022).

A subutilização do bagaço está fortemente associada a limitações tecnológicas envolvidas em sua bioconversão eficiente, como a disponibilidade limitada de coquetéis enzimáticos eficazes e a ausência de estratégias robustas para sua aplicação. Além disso, os custos desses processos ainda são elevados, comprometendo sua viabilidade em escala industrial (O'HARA, 2016; ROBINS & SPEIGHT, 2016). Nesse contexto, torna-se estrategicamente necessário o desenvolvimento de biorrefinarias baseadas em tecnologias de segunda geração, capazes de transformar resíduos lignocelulósicos em produtos de alto valor agregado.

A complexidade da parede celular vegetal, composta por celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e outros constituintes estruturais, constitui um dos principais entraves à conversão eficiente da biomassa. No bagaço de cana-de-açúcar, estima-se uma composição média de 42% de celulose, 20% de hemicelulose e 25% de lignina (ZADEH et al., 2020). A conversão eficiente desse material exige sua biodesconstrução por meio de sistemas enzimáticos específicos, especialmente aqueles produzidos por fungos filamentosos.

Fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota destacam-se pela capacidade de secretar um conjunto diversificado de enzimas ativas em carboidratos, conhecidas como enzimas CAZy, responsáveis pela degradação dos componentes da parede celular vegetal (PELÁEZ et al., 2021; NAVARRO et al., 2021). Entretanto, uma única cepa fúngica raramente produz todo o repertório enzimático necessário para uma sacarificação eficiente da biomassa. Por essa razão, estratégias baseadas em consórcios fúngicos formados por organismos de diferentes filos têm sido explorados para potencializar a conversão lignocelulósica. Esses consórcios simulam interações naturais entre microrganismos, e permitem a atuação sinérgica de diferentes classes enzimáticas, como celulasas, hemicelulasas, ligninases e enzimas acessórias, o que aumenta a eficiência da degradação estrutural da biomassa (DRUZHININA & KUBICEK, 2017; PELÁEZ et al., 2021; SPERANDIO & FILHO, 2021).

Nesse contexto, a variabilidade dos secretomas de cocultivo apresenta grande interesse biotecnológico. Estudos recentes indicam que abordagens proteômicas são promissoras para caracterizar as interações moleculares durante o cocultivo de fungos e identificar os principais complexos enzimáticos envolvidos na degradação da biomassa (ASLAM et al., 2017). A proteômica funcional permite não apenas mapear as enzimas produzidas, mas também compreender seus padrões de regulação e possíveis interações, o que fornece subsídios importantes para a otimização da bioprodução de etanol 2G (BOUWS et al., 2008; COUTURIER et al., 2012; SALVACHUA et al., 2013).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Panorama dos resíduos lignocelulósicos no Brasil

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, destacando-se globalmente na produção de soja, milho, cana-de-açúcar, trigo, algodão, arroz e madeira. A cana-de-açúcar é a commodity mais importante em termos de volume. Na safra 2024/25, a produção de cana-de-açúcar no Brasil foi estimada em 676,96 milhões de toneladas, com uma produtividade média de 77,223 kg/ha, o que representa o segundo maior volume da série histórica acompanhada pela Conab 2025. O processamento da cana envolve a extração do caldo, que é concentrado, cristalizado e separado para produzir açúcar bruto e melaço. Esses dois produtos intermediários são utilizados na produção de açúcar e etanol. Os resíduos resultantes da colheita e moagem da cana, como ponteiros, folhas e bagaço, constituem biomassa lignocelulósica, representando 25-30% da massa fresca total da cana. Esses resíduos são comumente descartados no solo como proteção natural ou queimados para geração de energia (CARVALHO et al., 2017; RACKEMANN et al., 2016).

Além da cana-de-açúcar, outras commodities agrícolas amplamente cultivadas no Brasil, como soja, milho, arroz, trigo, sorgo, feijão e algodão, também geram grandes volumes de resíduos lignocelulósicos. Esses materiais incluem palhas, colmos, folhas, vagens, cascas e serragem e representam uma fonte abundante de biomassa com potencial para aplicação na geração de energia e na produção de biomoléculas (MARTELLI-TOSI et al., 2017;

MAGALHÃES JR et al., 2019; FAO, 2024). Trata-se de uma biomassa sólida, estruturalmente complexa, originada de processos naturais fotossintéticos (VASSILEV et al., 2010).

A biomassa lignocelulósica é predominantemente composta por paredes celulares vegetais, especialmente pela espessa parede secundária, que desempenha papéis essenciais na condução de nutrientes, na resistência a forças mecânicas durante o crescimento e na proteção contra estresses. O componente mais valioso da parede celular, do ponto de vista bioenergético, é a glicose, um açúcar de seis carbonos que forma a celulose, um polissacarídeo linear homogêneo ligado por ligações β -1,4. Cadeias individuais de celulose se conectam por ligações de hidrogênio, formando microfibrilas de celulose cristalina. Em plantas vasculares, a parede celular secundária é composta por microfibrilas de celulose embebidas em uma matriz de lignina, um polímero aromático, e pela hemicelulose, o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular, entrelaçada entre a celulose e a lignina. É um polissacarídeo heterogêneo composto por açúcares pentoses e hexoses. Os açúcares predominantes na hemicelulose incluem D-xilose, L-arabinose, D-manose e D-galactose. A xilose é o principal componente da hemicelulose em biomassa herbácea e em madeira dura, enquanto a manose é o componente majoritário da hemicelulose em madeiras macias ou coníferas (GÍRIO et al., 2010; JUTURU & WU, 2013; BRANDON & SCHELLER, 2020). A lignina é o segundo biopolímero vegetal mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose, e compõe as paredes celulares secundárias das plantas, conferindo rigidez estrutural, impermeabilidade e proteção contra microrganismos. Sua estrutura aromática e irregular dificulta a biodegradação (KIRK & FARRELL, 1987; RISEH et. al 2024).

Essa complexidade natural faz da desconstrução e da recuperação de açúcares fermentescíveis processos que requerem métodos e tecnologias, em geral, custosos e intensivos em energia e reagentes, o que limita sua aplicação em escala industrial.

Apesar disso, a biomassa lignocelulósica apresenta elevado potencial para a produção de bioprodutos, como bioetanol e biogás. A principal barreira é a conversão eficiente desses biopolímeros complexos (lignina, celulose e

hemicelulose), exigindo pré-tratamentos físicos, mecânicos, químicos ou biológicos (GUERRIERO et al., 2016).

No contexto do presente trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta relevância particular por constituir um resíduo abundante, de baixo custo e com potencial para aplicação em biorrefinarias lignocelulósicas. Sua recalcitrância decorre da organização estrutural da parede celular vegetal, na qual celulose, hemicelulose e lignina formam uma matriz complexa e de difícil acesso enzimático. Embora a fração péctica seja minoritária em gramíneas, evidências indicam que ela desempenha papel relevante na organização da parede celular e pode influenciar a acessibilidade dos polímeros estruturais à hidrólise enzimática, o que a torna um componente de interesse no contexto da biomassa para bioenergia (LATARULLO et al., 2016). Em biomassa de cana-de-açúcar, estudos com palha também sugerem a relevância de componentes da matriz da parede celular ao longo da degradação, reforçando a necessidade de considerar essas frações na compreensão da recalcitrância do material (PAGLIUSO et al., 2021).

2.2 Potencial das biorrefinarias na produção de compostos de alto valor agregado

A biomassa lignocelulósica ocupa posição estratégica no contexto das biorrefinarias por constituir uma matéria-prima renovável, abundante e passível de conversão em diferentes cadeias de valor. Embora, na prática, sua exploração ainda esteja fortemente associada à geração de energia e à produção de biocombustíveis, o avanço das biorrefinarias tem ampliado o interesse em rotas capazes de gerar bioprodutos de maior valor agregado a partir de resíduos agroindustriais (SEGERS et al., 2024).

Biorrefinarias são complexos industriais que integram processos tecnológicos para a conversão sustentável de resíduos agrícolas, florestais e industriais em bioprodutos de alto valor agregado, como biocombustíveis, bioquímicos e biomateriais. Operando sob os princípios da economia circular, esses sistemas visam à valorização integral da biomassa, promovendo eficiência energética e redução de resíduos (CHERUBINI & STRØMMAN, 2011).

A utilização da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias permite a obtenção não apenas de biocombustíveis, mas também de bioquímicos, biomateriais e coprodutos com maior valor agregado. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, já foram descritas estratégias integradas para a obtenção de xilo-oligossacarídeos com potencial prebiótico, etanol celulósico, nanofibrilas de celulose e nanopartículas de lignina, evidenciando a versatilidade desse substrato em plataformas de valorização em cascata (PEREIRA et al., 2021). Apesar desse potencial, a viabilidade de biorrefinarias lignocelulósicas ainda depende da superação de gargalos associados à recalcitrância da biomassa, à eficiência dos processos de conversão e à viabilidade econômica das rotas propostas. Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas biológicos mais eficientes para a desconstrução da parede celular vegetal constitui etapa central para a consolidação dessas plataformas.

2.3 Mecanismos enzimáticos de degradação da parede celular

A degradação da parede celular vegetal por microrganismos é mediada por um conjunto altamente especializado de enzimas ativas em carboidratos, conhecidas como CAZymes (Carbohydrate-Active enZymes). Essas enzimas desempenham papéis fundamentais na síntese, modificação e hidrólise de oligossacarídeos e polissacarídeos complexos, sendo essenciais para o metabolismo de carboidratos e para a reciclagem de matéria orgânica em ecossistemas naturais (LOMBARD et al., 2014).

A classificação das CAZymes é organizada no banco de dados CAZy, que agrupa as enzimas com base na similaridade de sequência, na organização estrutural e no mecanismo catalítico. Atualmente, essas enzimas são distribuídas em seis classes principais: glicosil hidrolases (GH), glicosil transferases (GT), polissacarídeo liase (PL), carboidrato esterases (CE), enzimas de atividade auxiliar (AA) e módulos de ligação a carboidratos (CBM) (LOMBARD et al., 2014). No contexto da degradação lignocelulósica, as classes GH, CE, PL, AA e CBM desempenham papel central na desconstrução coordenada dos polímeros estruturais da parede celular vegetal. Um modelo simplificado da degradação enzimática dos principais componentes da parede celular vegetal, incluindo

celulose, hemiceluloses e polissacarídeos pécticos, é apresentado na Figura 1. Esse esquema ilustra a necessidade de um sistema multienzimático integrado para a completa desconstrução da biomassa.

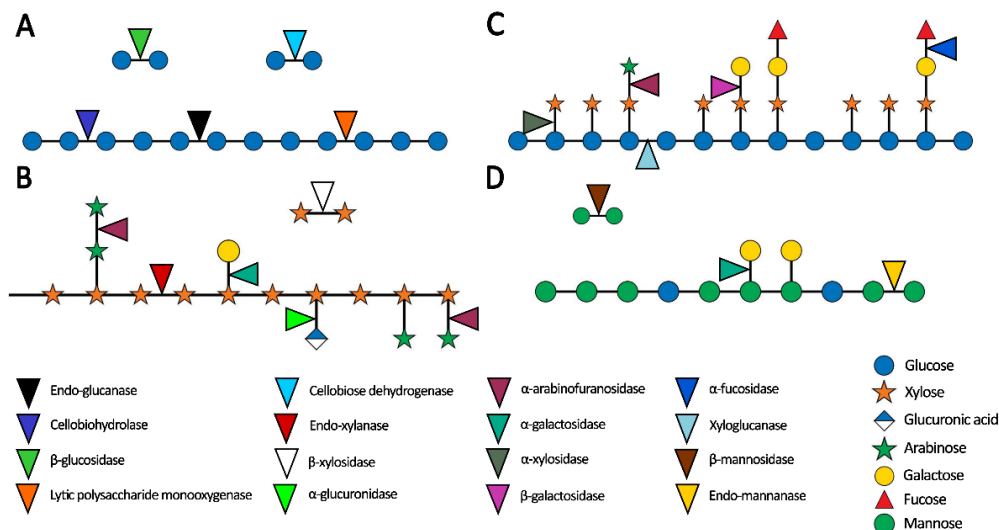


Figura 1 Modelo simplificado ilustrando a degradação enzimática dos principais componentes da parede celular vegetal: (A) celulose, (B) heteroxilano, (C) xiloglicano e (D) heteromanano. As setas indicam os sítios específicos de ação das enzimas ao longo dos polímeros. Adaptado de Vieira et al. (2025).

Sistema celulolítico

A celulose, principal componente estrutural da parede celular vegetal, consiste em cadeias lineares de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, organizadas em microfibrilas altamente cristalinas. Sua degradação requer a ação sinérgica de diferentes famílias de glicosil hidrolases e enzimas oxidativas auxiliares.

As endoglucanases (principalmente das famílias GH5, GH12 e GH45) promovem clivagens internas na cadeia polimérica, gerando novos terminais redutores e não redutores. As celobiohidrolases, ou exoglucanases (tipicamente GH6 e GH7), atuam processivamente nas extremidades das cadeias, liberando celobiose como principal produto intermediário. Por fim, as β -glicosidases (frequentemente GH1 e GH3) hidrolisam a celobiose em glicose, completando a sacarificação da celulose (LYND et al., 2002; BHATIA et al., 2017).

Além das hidrolases clássicas, a degradação eficiente da celulose cristalina depende da ação de enzimas de atividade auxiliar, particularmente as

monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), classificadas majoritariamente na família AA9 em fungos filamentosos. Essas enzimas realizam clivagem oxidativa das ligações β -1,4, promovendo a desorganização estrutural da microfibrila e aumentando a acessibilidade das hidrolases ao substrato (MÜLLER et al., 2018; GUO et al., 2022). A atuação coordenada entre GHs e AAs representa um avanço significativo na compreensão dos mecanismos modernos de hidrólise enzimática da celulose.

Os módulos de ligação a carboidratos (CBMs), particularmente CBM1 em fungos lignocelulolíticos, contribuem para a eficiência catalítica ao ancorar as enzimas à superfície da celulose, elevando a concentração local de atividade enzimática e favorecendo a hidrólise processiva (BORASTON et al., 2004; BERNARDES et al., 2019).

Sistema hemicelulolítico

A hemicelulose apresenta composição estrutural mais heterogênea do que a celulose, sendo constituída por diferentes polímeros, como xilanos, mananos e arabinogalactanos, frequentemente ramificados e acetilados. Essa complexidade estrutural exige um conjunto mais diverso de enzimas para a despolimerização completa.

No caso do xilano, as endo- β -1,4-xilanases (frequentemente GH10 e GH11) promovem clivagens internas na cadeia principal, enquanto as β -xilosidases (GH3 e GH43) liberam xilose a partir dos oligossacarídeos formados. Enzimas desramificadoras, como α -L-arabinofuranosidases (GH51 e GH54) e α -glucuronidases, removem substituintes laterais que limitam o acesso ao esqueleto polimérico. Paralelamente, carboidrato esterases, como acetil-xilan esterases (CE1, CE5) e feruloil esterases, catalisam a remoção de grupos acetil e feruloil, reduzindo impedimentos estéricos e facilitando a ação das hidrolases (KUMAR et al., 2008; JUTURU; WU, 2013).

A degradação de mananos envolve principalmente β -mananases (GH26), β -manosidases e α -galactosidases, cuja atuação coordenada permite a completa conversão desses polímeros em açúcares fermentescíveis.

Polissacarídeos pécticos

As pectinas constituem uma classe estruturalmente complexa de polissacarídeos da parede celular vegetal e participam da sua organização, arquitetura e propriedades físicas. Embora ocorram em menor proporção em gramíneas quando comparadas a outros grupos vegetais, esses polímeros podem influenciar a porosidade da parede e a acessibilidade dos componentes estruturais ao ataque enzimático (ANDERSON; PELLOUX, 2025). Sua degradação depende de um conjunto diverso de CAZymes, incluindo poligalacturonases, pectato liases, pectina liases, pectin metilesterases e outras enzimas desesterificantes e desramificadoras, refletindo a heterogeneidade estrutural dessa fração (JAYANI et al., 2005; YÜKSEL et al., 2025).

A despolimerização enzimática da hemicelulose apresenta elevado interesse industrial, uma vez que ocorre sem a geração de subprodutos tóxicos, em contraste com alguns processos químicos de pré-tratamento. Xilanases e outras hemicelulases já encontram aplicação consolidada nas indústrias de papel, de alimentos e de nutrição animal (JUTURU; WU, 2013; WU et al., 2022).

Sistema ligninolítico e enzimas oxidativas

A lignina, polímero aromático tridimensional formado por unidades fenilpropanoides (H, G e S), constitui a principal barreira estrutural à degradação da parede celular vegetal. Sua desconstrução ocorre predominantemente por meio de sistemas oxidativos complexos, especialmente em basidiomicetos de podridão branca (DEL CERRO et al., 2021).

As lacases (AA1; EC 1.10.3.2) catalisam a oxidação de compostos fenólicos utilizando oxigênio molecular como aceitador final de elétrons. As peroxidases de classe II (AA2), que incluem lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13) e peroxidase versátil (VP; EC 1.11.1.16), utilizam peróxido de hidrogênio como cosubstrato e apresentam elevado potencial redox, sendo capazes de oxidar tanto estruturas fenólicas quanto não fenólicas da lignina (TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001; TOCCO et al., 2021).

A oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} pelas MnPs gera mediadores difusíveis que ampliam o alcance catalítico em regiões menos acessíveis do polímero. A produção de H_2O_2 por enzimas auxiliares complementa o sistema oxidativo, estabelecendo uma rede cooperativa que promove a desestruturação da matriz lignificada (MONCLARO et al., 2022; SURYADI et al., 2022).

Proteínas acessórias e superação da recalcitrância estrutural

Além das enzimas hidrolíticas e oxidativas clássicas, as proteínas acessórias desempenham papel determinante na superação da recalcitrância estrutural da biomassa lignocelulósica. Entre essas proteínas destacam-se as LPMOs, expansinas, swollenin e módulos de ligação a carboidratos (HU et al., 2023).

As expansinas e a swollenin promovem modificações físicas na matriz da parede celular, rompendo interações não covalentes entre microfibrilas e aumentando a acessibilidade enzimática, embora não apresentem atividade hidrolítica direta (BORASTON et al., 2004; DU et al., 2021). As LPMOs, por sua vez, desempenham papel central na clivagem oxidativa de substratos altamente cristalinos, potencializando a ação das celulases tradicionais (MÜLLER et al., 2018; GUO et al., 2022).

Essa atuação integrada entre hidrolases, oxidases e proteínas acessórias configura um sistema multienzimático altamente coordenado, cuja eficiência determina o desempenho da conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis.

Implicações tecnológicas

As enzimas lignocelulolíticas são essenciais para a consolidação de tecnologias sustentáveis voltadas à produção de biocombustíveis e de bioprodutos de alto valor agregado (HUANG et al., 2023). Contudo, o custo associado à produção e ao uso de coquetéis enzimáticos ainda constitui um dos principais entraves à expansão industrial de biorrefinarias lignocelulósicas. Para superar essa limitação, diferentes estratégias têm sido exploradas, incluindo a prospecção de enzimas mais eficientes, a engenharia e otimização de coquetéis

enzimáticos, a redução da carga enzimática necessária por aumento da atividade específica e o uso de sistemas biotecnológicos capazes de ampliar a diversidade funcional do secretoma, como consórcios e cocultivos microbianos (RAMOS et al., 2022). Nesse contexto, o avanço da área depende não apenas da descoberta de novas enzimas, mas também do desenho racional de sistemas catalíticos mais robustos, complementares e economicamente viáveis.

2.4 Diversidade fúngica e seus papéis na degradação da biomassa lignocelulósica

Diversos microrganismos oriundos de habitats distintos apresentam a capacidade de sintetizar uma ampla variedade de moléculas bioativas, utilizadas como combustíveis, fármacos e outros compostos de interesse industrial. No contexto da produção de biocombustíveis, esses microrganismos se destacam pela biossíntese de enzimas especializadas, capazes de atuar sobre diferentes substratos lignocelulósicos em múltiplas etapas do processo biotecnológico. (ADEGBOYE et al., 2021).

Fungos filamentosos exercem papel fundamental na hidrólise biológica da biomassa lignocelulósica, em virtude da produção. Dentre os principais grupos, destacam-se os fungos pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota. *Trichoderma reesei* (Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales) figura entre os ascomicetos mais investigados, sobretudo devido à sua notável capacidade celulolítica, de expressiva relevância industrial. A cepa original, QM6a, foi isolada nas Ilhas Salomão durante a década de 1940, onde demonstrou elevada capacidade de degradação de tecidos celulósicos, como tendas e uniformes militares, durante a Segunda Guerra Mundial. Desde então, múltiplas linhagens mutantes foram desenvolvidas com o objetivo de aprimorar a secreção de celulasas (BISCHOF, RAMONI & SEIBOTH, 2016). O genoma da cepa QM6a foi sequenciado e apresenta aproximadamente 34 Mbp distribuídos em sete cromossomos (MARTINEZ et al., 2008). A linhagem hipercelulolítica RUT-C30 deriva de sucessivas etapas de mutagênese clássica, com seleção para crescimento em celulose sob condições de repressão catabólica. Um dos principais marcos moleculares dessa linhagem é a mutação no gene *cre1*, que codifica o repressor de catabolito por carbono (CRE1). Em RUT-C30, esse gene

encontra-se truncado, resultando em desrepressão parcial do sistema celulolítico e maior expressão de genes codificadores de celulases mesmo na presença de fontes de carbono facilmente assimiláveis. Entretanto, análises genômicas posteriores demonstraram que as alterações na RUT-C30 não se restringem à mutação em *cre1*. O estudo de Seidl et al. (2008) revelou que essa linhagem apresenta uma deleção de aproximadamente 85 kb no genoma, correspondente à perda de 29 genes originalmente presentes na cepa QM6a.

Além do uso em monocultivo, *T. reesei* RUT-C30 é amplamente explorado em estudos de cocultivo, dada sua importância biotecnológica na degradação de biomassa lignocelulósica (STRAKOWSKA et al., 2014). Outro representante notável dos ascomicetos é *Aspergillus niger*, reconhecido pela produção de enzimas hidrolíticas que atuam sobre substratos lignocelulósicos, com destaque para sua elevada atividade de β -glicosidase enzima essencial para a conversão de oligossacarídeos em glicose fermentescível (LYND et al., 2002; SPERANDIO & FILHO, 2019).

No Filo Basidiomycota, fungos do gênero *Pleurotus*, como *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *P. pulmonarius*, destacam-se pela capacidade de degradação de lignina por meio da ação de enzimas oxidativas, incluindo lacases, manganês peroxidases (MnP) e peroxidases versáteis (VP). Embora a lignina não seja utilizada como fonte primária de carbono, sua remoção é estratégica para permitir o acesso aos polissacarídeos estruturais, como celulose e hemicelulose. Espécies de *Pleurotus* demonstram elevada eficiência na degradação de diversos resíduos lignocelulósicos, com potencial para remover mais de 70% da lignina de efluentes industriais e produzir enzimas de interesse biotecnológico, cuja atividade é influenciada por variáveis como o tipo de substrato, pH e tempo de incubação (MAURYA et al., 2015; ATILA, 2017; SEKAN et al., 2019).

Dentre essas espécies, *P. citrinopileatus*, conhecido como cogumelo-oustra-dourado, é um basidiomiceto lignocelulolítico decompositor de madeira. No contexto desta dissertação, seu interesse reside na capacidade do gênero *Pleurotus* de secretar oxidoredutases e outras enzimas associadas à degradação de substratos lignocelulósicos, especialmente componentes da matriz lignificada e frações acessórias da parede celular. Estudos com *Pleurotus*

ostreatus demonstram que o crescimento em substratos lenhosos e não lenhosos induz fortemente oxidoredutases no secretoma, reforçando a relevância funcional desse grupo na desconstrução da biomassa vegetal e sua potencial complementaridade com sistemas celulolíticos de ascomicetos como *T. reesei* (FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2016; INCI & MEHMET, 2023).

A partir de biomassa lignocelulósica diversificada. Cada grupo contribui para diferentes etapas do processo, desde a degradação de carboidratos complexos até a fermentação de açúcares em biocombustíveis, destacando a importância das interações microbianas e capacidades metabólicas na otimização da produção de biocombustíveis (ADEGBOYE et al., 2021; BENATTI & POLIZELI, 2023).

2.5 Cocultivo fúngico como estratégia para degradação de biomassa

Na natureza, microrganismos estabelecem uma ampla gama de interações complexas que influenciam diretamente o crescimento, o desenvolvimento, a expressão gênica e a produção de metabólitos. A intensidade desses efeitos varia de acordo com o grau de contato físico e a compatibilidade entre os organismos envolvidos (ZHANG et al., 2023). Mesmo em condições laboratoriais em que todos os nutrientes necessários são fornecidos, a ausência de interações biológicas entre microrganismos pode comprometer significativamente o desempenho metabólico otimizado (LIU et al., 2023; SELEGATO & CASTRO, 2023).

Em ecossistemas naturais, a decomposição da biomassa lignocelulósica ocorre por meio de sucessão ecológica, envolvendo múltiplos organismos que atuam de forma complementar. Interações de competição, antagonismo e mutualismo modulam a expressão de enzimas degradativas e podem induzir vias metabólicas que permanecem silenciosas em monocultivo (GUO et al., 2024). Nesse contexto, a diversidade microbiana contribui para a estabilidade funcional dos ecossistemas e para a eficiência da ciclagem de carbono (FIERER, 2017).

No caso dos fungos filamentosos, embora espécies individuais possam apresentar elevado potencial secretório, a expressão de determinadas CAZymes

e enzimas oxidativas é frequentemente modulada por interações interespecíficas. Em sistemas de monocultivo, a ausência de interações biológicas pode limitar a expressão de enzimas específicas. Por isso, o estudo de relações competitivas ou cooperativas em cocultivo tem sido explorado como estratégia para identificar combinações microbianas capazes de ampliar o repertório enzimático e favorecer a obtenção de atividades mais adequadas a diferentes bioprocessos lignocelulolíticos (THUAN et al., 2022; LUO et al., 2020). Estudos recentes indicam que o cocultivo pode alterar o perfil de proteínas e enzimas secretadas pelos fungos, resultando em conjuntos enzimáticos mais diversificados e potencialmente complementares do ponto de vista funcional (VIEIRA et al., 2025).

Além da complementaridade enzimática, interações fúngicas podem promover a especialização funcional, na qual cada organismo contribui com atividades distintas em um sistema cooperativo, otimizando a degradação de substratos complexos. Essa dinâmica favorece o desenvolvimento de consórcios enzimáticos mais eficientes, capazes de mimetizar processos naturais de decomposição.

O cocultivo fúngico pode ser definido como o cultivo simultâneo de duas ou mais espécies sob condições controladas, com o objetivo de explorar interações ecológicas e potenciais sinergias metabólicas (SPERANDIO; FILHO, 2019). Em aplicações biotecnológicas, essa estratégia tem sido empregada para ampliar a diversidade de CAZymes secretadas e melhorar a conversão de biomassa lignocelulósica.

Ensaio experimentais demonstram que cocultivos envolvendo o ascomiceto *T. reesei* frequentemente resultam em aumento da atividade celulolítica quando combinados com espécies capazes de complementar deficiências específicas, como a limitada produção de β -glicosidases (DUFF et al., 1987; AHAMED; VERMETTE, 2008; KOLASA et al., 2014). Estudos mais recentes indicam que combinações como *T. reesei* RUT-C30 e *Aspergillus brasiliensis* podem modular o perfil de CAZymes e alterar o desempenho da sacarificação de resíduos lignocelulósicos, incluindo o bagaço de cana-de-

açúcar de maneira dependente do delineamento experimental e da estratégia de inoculação (SPERANDIO et al., 2024).

Além das interações entre ascomicetos, cocultivos com basidiomicetos de podridão branca têm atraído a atenção devido à sua elevada capacidade ligninolítica. Enquanto ascomicetos são particularmente eficientes na degradação da holocelulose, basidiomicetos apresentam maior eficiência na degradação da lignina por meio da secreção de enzimas oxidativas, como lacases e peroxidases de classe II. A combinação desses grupos pode resultar em sistemas multienzimáticos mais completos e robustos, com potencial para melhorar simultaneamente a hidrólise da celulose e a remoção da lignina.

A aplicação de sistemas de cocultivo em biorrefinarias apresenta potencial para reduzir custos operacionais e aumentar a viabilidade econômica da conversão enzimática, ao favorecer a produção do conjunto enzimático diretamente no próprio sistema de cultivo, sem necessidade de formulação prévia de coquetéis separados (VIEIRA et al., 2025), a Figura 2 apresenta um resumo esquemático das aplicações de cocultivos envolvendo Ascomycota e Basidiomycota em processos de biorrefinaria

Apesar do potencial biotecnológico do cocultivo fúngico, seus efeitos não são universais nem necessariamente resultam em aumento global do desempenho enzimático. A resposta do sistema depende da combinação dos parceiros, da ordem e do intervalo de inoculação, do substrato empregado e do nicho metabólico explorado, podendo resultar em antagonismo, complementaridade parcial ou modulação restrita a atividades específicas (SPERANDIO et al., 2024; FANG et al., 2024). Essa natureza contexto-dependente é particularmente importante para a interpretação de resultados em sistemas lignocelulolíticos.

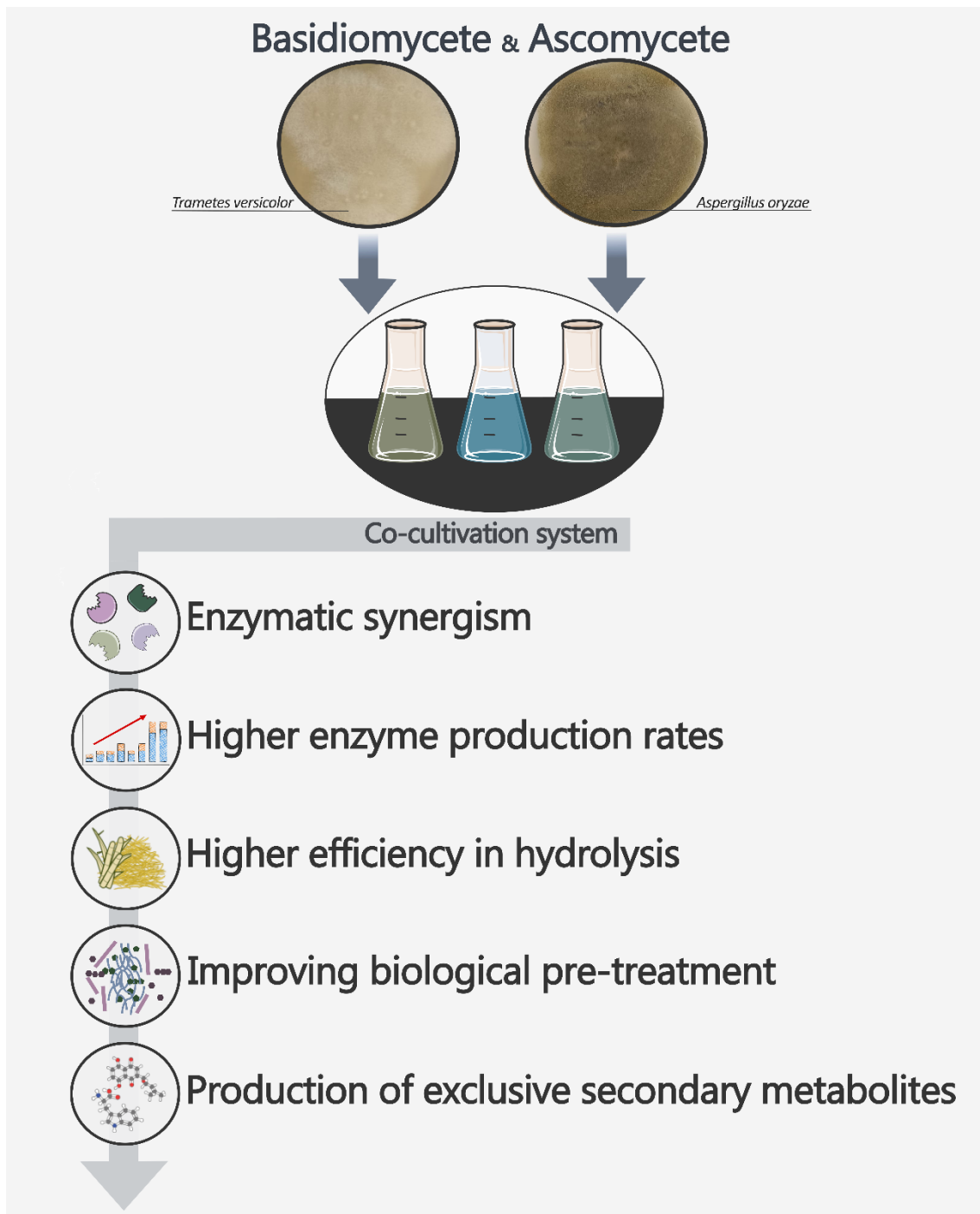


Figura 2 Representação esquemática das aplicações de sistemas de cocultivo fúngico em biorrefinarias, destacando a complementaridade funcional entre Ascomycota (degradação da holocelulose) e Basidiomycota (degradação da lignina). Vieira et al. (2025)

Embora os avanços científicos nessa área sejam significativos, os mecanismos moleculares que regulam as interações entre fungos em cocultivo ainda não são completamente compreendidos. Evidências sugerem que os fungos se comunicam por meio de metabólitos sinalizadores e modificações do microambiente, estabelecendo relações dinâmicas de competição e cooperação.

Para investigar tais mecanismos, têm sido empregadas abordagens experimentais como adição de compostos indutores da expressão enzimática, análises multiômicas e técnicas de engenharia genética, com o objetivo de identificar fatores regulatórios associados à secreção de enzimas e à interação entre os organismos (YAO et al., 2016; YU et al., 2021).

2.6 Caracterização proteômica de secretomas fúngicos em condições de degradação lignocelulósica

O secretoma, conjunto de proteínas exportadas para o meio extracelular, é altamente dinâmico e sensível às condições ambientais. Em fungos filamentosos, constitui um sistema enzimático altamente especializado, atuando como uma biofábrica natural de biocatalisadores com elevada especificidade e eficiência catalítica, amplamente explorado em aplicações industriais devido à sua relação custo-benefício (BOUWS et al., 2008; ALFARO et al., 2014; DI COLOGNA et al., 2018). Abordagens proteômicas têm sido fundamentais para a caracterização funcional desses secretomas, permitindo a identificação de enzimas-chave, o mapeamento de vias regulatórias e a compreensão de mecanismos de interação interespecífica. Estudos aplicando LC–MS/MS ao secretoma de *T. reesei* demonstraram que a composição enzimática varia significativamente em função do substrato, com modulação diferencial de celobiohidrolases, endoglucanases e LPMOs sob crescimento em celulose ou biomassa complexa (ADAV et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012). De modo semelhante, análises proteômicas de basidiomicetos ligninolíticos, como *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium*, revelaram secreção coordenada de lacases, manganês peroxidases e enzimas auxiliares do grupo AA, evidenciando a organização funcional do sistema oxidativo envolvido na degradação da lignina (ALFARO et al., 2016; HERNÁNDEZ-ORTIZ et al., 2012). Esses estudos consolidaram a secretômica fúngica como subárea da biotecnologia voltada à análise sistemática das proteínas secretadas e dos sistemas celulares de secreção envolvidos na degradação de biomassa lignocelulósica (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; JORRÍN-NOVO, 2013).

A preparação de amostras proteicas do secretoma fúngico é frequentemente dificultada pela presença de interferentes, como

polissacarídeos, ácidos húmicos e compostos fenólicos, que comprometem a eficiência da extração e a acurácia da quantificação espectrofotométrica. Para contornar essas limitações, empregam-se estratégias como centrifugação em alta rotação, precipitação com TCA/acetona ou etanol frio, filtração por exclusão molecular, diálise e liofilização. A escolha do protocolo deve ser compatível com a aplicação analítica subsequente, como a espectrometria de massas ou os ensaios funcionais, priorizando a preservação das características a serem analisadas (BIANCO & PERROTTA, 2015).

A análise do secretoma fúngico tem sido amplamente realizada por meio da espectrometria de massas (MS), uma técnica de alta resolução que permite a identificação e a caracterização de proteínas em matrizes biológicas complexas. Essa abordagem consolidou-se como ferramenta essencial na investigação de enzimas e metabólitos com potencial biotecnológico. Dentre as estratégias aplicadas, destacam-se duas metodologias principais: a abordagem *Top-Down*, que permite a análise direta de proteínas intactas, fornecendo informações sobre massa molecular, isoformas e modificações pós-traducionais (CATHERMAN et al., 2014); e a abordagem *Bottom-Up*, atualmente a mais empregada nos estudos de secretoma fúngico, que utiliza digestão proteolítica prévia para posterior identificação de peptídeos, oferecendo elevada sensibilidade e escalabilidade (FILIAUULT et al., 2021).

O uso de ferramentas bioinformáticas é necessário para a caracterização funcional do secretoma, permitindo a análise de proteínas secretadas, a anotação funcional e a reconstrução de redes metabólicas. Avanços recentes em algoritmos de *machine learning* e a expansão de bancos de dados especializados têm contribuído significativamente para o aumento da acurácia e profundidade dessas análises (GRAHAM et al., 2018; SHANKAR et al., 2019).

A análise proteômica aplicada a cocultivos fúngicos constitui uma abordagem robusta para investigar, de forma integrada, as dinâmicas genótípicas e fenotípicas das comunidades microbianas envolvidas na degradação da lignocelulose. Embora métodos clássicos de análise enzimática forneçam informações relevantes, seu alcance é limitado diante da complexidade das interações intra- e interespecíficas nesses sistemas. Assim, a

compreensão aprofundada das enzimas lignocelulolíticas e de sua regulação em cocultivos ainda permanece incipiente (ADAV et al., 2012; VIEIRA et al., 2025). O cocultivo de fungos com potencial ligninolítico e celulolítico representa uma estratégia eficaz para otimizar a desconstrução da biomassa, além de possibilitar a exploração de sinergias metabólicas e a descoberta de novas proteínas por meio da análise do secretoma. Em desenhos comparativos, essa abordagem permite identificar alterações relativas na composição proteica entre condições experimentais, fornecendo subsídios para a compreensão de como o perfil enzimático responde ao contexto de cultivo (GUO et al., 2018).

A espectrometria de massas aplicada à análise de interações proteína-proteína (PPI) no secretoma apresenta potencial para elucidar mecanismos de cooperação ou competição entre fungos em cocultivo, destacando vias regulatórias associadas à simbiose ou ao antagonismo (MENG et al., 2020; FANG et al., 2024). A integração de dados proteômicos com análises transcriptômicas, por meio de ferramentas bioinformáticas, configura uma abordagem robusta para investigar a regulação gênica, considerando fatores como elementos regulatórios, estrutura do mRNA, estabilidade dos transcritos e dinâmica proteica (HAIDER & PAL, 2013; PERCO et al., 2010). Essa abordagem integrativa é crítica para identificar enzimas-chave, como hemicelulases, e aprimorar a anotação funcional de genes de enzimas CAZy em fungos lignocelulolíticos (GUPTA et al., 2016; LI et al., 2022).

Diferentes alcances analíticos dentro da proteômica de secretomas. Estudos descritivos permitem identificar quais proteínas, enzimas ou classes funcionais foram detectadas em determinada condição; estudos comparativos oferecem base para discutir variações relativas entre tratamentos; e abordagens integradas com transcriptômica, metabolômica ou outras camadas de dados possibilitam interpretações mecanísticas mais robustas sobre regulação e interação biológica (FANG et al., 2024). Assim, o tipo de inferência obtida depende diretamente do delineamento experimental e da profundidade analítica empregada.

Um estudo recente conduzido por Sperandio et al. (2024) investigou o cocultivo de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 em bagaço de cana-de-açúcar,

identificando 167 proteínas, cuja distribuição entre as espécies variou conforme a estratégia de inoculação. Os resultados evidenciam o impacto do delineamento experimental na composição do secretoma e na produção enzimática em sistemas de cocultivo. Nesse contexto, a abordagem proteômica destaca-se como ferramenta central para elucidar os mecanismos moleculares que regulam a secreção de enzimas, aprofundando a compreensão das respostas adaptativas e do potencial biotecnológico de consórcios fúngicos.

2.7 Moduladores experimentais do desempenho enzimático em cultivos fúngicos

A eficiência da degradação de biomassa lignocelulósica por culturas fúngicas pode ser significativamente aumentada com o uso de elementos externos, adicionados à cultura, como surfactantes, sais inorgânicos, agentes redutores e proteínas acessórias, que alteram propriedades estruturais do substrato e otimizam o microambiente enzimático, favorecendo a hidrólise (VASIĆ et al., 2021; SAINI et al., 2022). Surfactantes, como o Triton X-100, reduzem a tensão superficial, promovem a liberação de enzimas adsorvidas e aumentam a acessibilidade da biomassa (FANG et al., 2013; BENOCCI et al., 2017). Agentes redutores, como DTT e β -mercaptoetanol, rompem pontes dissulfeto, conferindo flexibilidade estrutural às enzimas hidrolíticas e melhorando sua interação com substratos recalcitrantes (BANIK et al., 2013; AGRAWA et al., 2021). Sais inorgânicos, como CaCl_2 , MgSO_4 e MnCl_2 , atuam como cofatores catalíticos e estabilizadores estruturais, prevenindo desnaturação enzimática e, em alguns casos, regulando a expressão de genes lignocelulolíticos (CHEN et al., 2016; CHEN et al., 2021; LI et al., 2021). Além disso, proteínas acessórias, como hidrofobinas, LPMOs, CBMs e expansinas, atuam sinergicamente com enzimas hidrolíticas, promovendo alterações na parede celular e elevando a eficiência catalítica (BROWN et al., 2016; ØSTBY et al., 2020). Em conjunto, esses moduladores experimentais e componentes acessórios do sistema lignocelulolítico ampliam o acesso aos polímeros estruturais da biomassa e podem favorecer o desempenho de cultivos fúngicos na degradação lignocelulósica.

3 Justificativa

Apesar dos avanços nas tecnologias de bioenergia de segunda geração, a conversão eficiente de biomassa lignocelulósica ainda representa um obstáculo significativo à consolidação de biorrefinarias economicamente sustentáveis. A complexidade estrutural da parede celular vegetal, associada à necessidade de atuação coordenada entre enzimas hidrolíticas e oxidativas, evidencia a limitação de sistemas baseados exclusivamente em monocultivos, frequentemente limitados quanto à diversidade do repertório enzimático e à capacidade de ajuste regulatório frente à complexidade do substrato.

Nesse cenário, torna-se pertinente investigar estratégias capazes de ampliar o repertório funcional disponível, aproximando as condições experimentais das interações naturais observadas em ecossistemas lignocelulósicos. O cocultivo entre fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota apresenta-se como uma alternativa conceitualmente promissora, considerando a complementaridade metabólica entre esses grupos. Enquanto ascomicetos são reconhecidos pela elevada produção de celulases e hemicelulases, basidiomicetos destacam-se pela secreção de enzimas oxidativas envolvidas na modificação e degradação da lignina. A integração desses perfis secretórios pode, portanto, resultar em sistemas mais completos e funcionalmente integrados.

Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliam de forma integrada como a interação interespecífica em cocultivos fúngicos influencia a reorganização global do secretoma. Persiste, assim, uma lacuna no entendimento de como essas interações afetam, em nível sistêmico, a composição proteica e o potencial biotecnológico do conjunto secretado.

Diante dessa necessidade, justifica-se a investigação de sistemas de cocultivo fúngico que permitam explorar, de forma controlada, interações interespecíficas com potencial para ampliar a diversidade funcional do secretoma e revelar padrões de modulação enzimática relevantes para a desconstrução da biomassa lignocelulósica.

Nesse contexto, a caracterização do secretoma por LC–MS/MS constitui uma etapa essencial para compreender, em escala global, como a interação entre ascomicetos e basidiomicetos impacta a organização funcional do sistema e pode gerar perfis proteicos de interesse biotecnológico.

A abordagem proteômica assume, portanto, papel central nesta dissertação, não apenas como ferramenta de identificação de enzimas clássicas envolvidas na degradação da biomassa, mas também como estratégia para revelar alterações no repertório secretado, evidenciando possíveis processos de modulação, complementaridade ou reorganização secretória induzidos pelo cocultivo. Essa perspectiva permite avançar da dimensão funcional para a molecular, contribuindo para a caracterização inicial do sistema modelo em nível proteômico global.

Dessa forma, esta dissertação justifica-se pela necessidade de investigar, sob uma abordagem integrada e ainda pouco explorada, os efeitos do cocultivo entre ascomicetos e basidiomicetos sobre o perfil funcional e proteico do secretoma, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na biodesconstrução da biomassa lignocelulósica e oferecendo fundamentos para futuras estratégias de otimização biotecnológica.

4 Materiais e Métodos

A presente metodologia foi estruturada de forma progressiva, abrangendo desde a seleção e a caracterização inicial das interações fúngicas até a análise proteômica global do sistema modelo consolidado. Inicialmente, foram conduzidas etapas de triagem morfológica e funcional em meios sólido e líquido, seguidas da caracterização cinética do sistema selecionado, incluindo análises de robustez temporal e modulação sob diferentes condições de pH.

Com base nos resultados funcionais, foi definido um ponto temporal representativo para o aprofundamento analítico, incluindo ensaios de hidrólise e a caracterização do secretoma por LC–MS/MS. As etapas de preparo proteômico, aquisição de dados e curadoria bioinformática foram conduzidas

segundo critérios padronizados, garantindo rastreabilidade, controle estatístico e robustez na interpretação dos resultados.

4.1 Microrganismos e condições gerais de cultivo

4.1.1 Linhagens fúngicas e identificação taxonômica

As linhagens fúngicas utilizadas neste estudo pertencem à coleção do Laboratório de Interação Planta Praga (LIPP) e do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília e foram previamente identificadas molecularmente pelo grupo por sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Spacer (ITS)* e *Large Subunit (LSU)* do rRNA, assegurando a correta atribuição taxonômica das linhagens. O conjunto de microrganismos empregado no *screening* incluiu oito espécies de fungos filamentosos, com perfis ecológicos e metabólicos distintos (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies fúngicas utilizadas no estudo e respectiva classificação taxonômica em nível de filo.

Espécie	Filo
<i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30	Ascomycota
<i>Clonostachys byssicola</i>	Ascomycota
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomycota
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Basidiomycota
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Basidiomycota
<i>Pleurotus djamor</i>	Basidiomycota
<i>Lentinula edodes</i>	Basidiomycota
<i>Bjerkandera adusta</i>	Basidiomycota

Foram utilizadas linhagens fúngicas filamentosas previamente selecionadas com base em seu potencial lignocelulolítico e em sua relevância biotecnológica. O sistema experimental foi composto por isolados pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota, incluindo espécies reconhecidas pela produção de enzimas CAZy e enzimas oxidativas associadas à degradação de biomassa lignocelulósica.

A linhagem de *T. reesei* RUT-C30 foi utilizada como organismo modelo de referência devido ao seu histórico consolidado na produção de celulasas. As demais linhagens utilizadas como organismos parceiros foram selecionadas com

base em evidências prévias de atividade ligninolítica e potencial de interação interespecífica.

4.1.2 Manutenção, reativação e padronização do inóculo

As linhagens fúngicas foram mantidas criopreservadas na micoteca do laboratório em criotubos contendo discos de micélio imersos em solução de glicerol a 10% (v/v), armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ como estoques de trabalho. Esse sistema de preservação foi adotado para manter a estabilidade genética e fisiológica das linhagens ao longo do período experimental, minimizando a deriva fenotípica associada a sucessivos repiques em meio sólido.

Para o início de cada etapa experimental, as linhagens foram reativadas por meio da transferência asséptica de um disco criopreservado para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ em câmara de crescimento com controle de temperatura e fotoperíodo (Q315F, Quimis®, Diadema, SP, Brasil), mantidas na ausência de luz, até o estabelecimento de colônias com crescimento micelial ativo e morfologia homogênea.

Após a reativação inicial, as culturas foram submetidas a um repique padronizado, consistindo na transferência de discos miceliais de aproximadamente 10 mm de diâmetro, retirados da região periférica da colônia, correspondente à região de crescimento ativo. A seleção da borda micelial visou assegurar o uso de micélio metabolicamente ativo, com menor probabilidade de acúmulo de estruturas reprodutivas, micélio senescente ou regiões submetidas a limitação nutricional.

Os discos transferidos foram inoculados em novas placas contendo BDA e incubados sob as mesmas condições descritas anteriormente. Esse procedimento foi adotado sistematicamente ao longo de todo o projeto, garantindo uniformidade na preparação do inóculo e reduzindo variabilidade experimental associada ao estado fisiológico do micélio.

As placas de monocultivo obtidas após repique foram utilizadas como fonte primária de inóculo para os ensaios em meio sólido e líquido. A padronização do diâmetro dos discos miceliais e da região de estabeleceu um

critério operacional uniforme de inoculação entre experimentos e tratamentos, favorecendo a comparabilidade entre monocultivos e cocultivos.

4.1.3 Meio de cultura padrão e condições experimentais gerais

Os cultivos em meio líquido foram conduzidos conforme metodologia descrita por Sperandio et al. (2024), utilizando bagaço de cana-de-açúcar (BCA) como fonte de carbono padrão e indutor lignocelulósico. O BCA foi previamente seco, moído e peneirado para padronização granulométrica, garantindo maior homogeneidade entre os ensaios e uniformidade na disponibilidade superficial do substrato.

Não foi realizado qualquer pré-tratamento físico-químico adicional (como explosão a vapor, hidrólise alcalina ou ácida), de modo a preservar a integridade estrutural da biomassa lignocelulósica. Essa decisão metodológica teve como objetivo reproduzir condições mais próximas das encontradas em ambientes naturais, nas quais resíduos vegetais são disponibilizados à microbiota decompositora sem etapas industriais de processamento. Dessa forma, buscou-se avaliar o potencial enzimático dos organismos frente a um substrato estruturalmente íntegro e recalcitrante, representativo de cenários ecológicos reais de decomposição.

O meio líquido suplementar empregado para produção enzimática consistiu, por litro, de KH_2PO_4 (7,0 g), K_2HPO_4 (2,0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g) e extrato de levedura (0,6 g). O BCA foi adicionado como única fonte de carbono, na concentração final de 1% (m/v). A composição mineral do meio foi formulada para fornecer suporte nutricional básico, mantendo limitação controlada de carbono solúvel e favorecendo a indução de enzimas extracelulares envolvidas na degradação de polímeros estruturais.

Alíquotas foram distribuídas em frascos Erlenmeyer adequados à condição experimental, garantindo relação volume/área adequada para transferência de oxigênio sob agitação orbital. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos e resfriados à temperatura ambiente antes da inoculação.

Esse sistema foi definido como “meio suplementar + BCA padrão” e constituiu a base experimental para os ensaios de *screening* funcional, a caracterização cinética e os experimentos de modulação de pH.

4.2 *Screening* de interações fúngicas em meio sólido

O *screening* das interações fúngicas foi conduzido em três etapas complementares: (i) caracterização morfológica dos monocultivos, (ii) ensaios de confrontação em cocultivo em meio sólido e (iii) classificação qualitativa dos padrões de interação com base em critérios morfo-espaciais padronizados.

Caracterização morfológica dos monocultivos

Antes dos ensaios de confrontação, todas as linhagens foram cultivadas individualmente em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o meio BDA. Discos miceliais de 10 mm de diâmetro, obtidos da borda de colônias fisiologicamente ativas (Seção 4.1.2), foram inoculados no centro das placas.

As placas foram incubadas a 28 °C em câmara de crescimento, na ausência de luz, por até 7 dias. Durante o período de incubação, foram registradas características morfológicas, incluindo a taxa de expansão radial, a densidade micelial, a formação de zonas concêntricas, a produção de micélio aéreo, a pigmentação e o padrão de crescimento superficial. Essa etapa permitiu estabelecer o padrão morfológico basal de cada isolado, que foi posteriormente utilizado como referência comparativa para a interpretação das alterações observadas nos ensaios de cocultivo.

Ensaio de confrontação em cocultivo

Os ensaios de interação interespecífica foram realizados por meio da inoculação simultânea de dois organismos em placas contendo BDA. Discos miceliais de 10 mm de diâmetro, provenientes de monocultivos fisiologicamente ativos, foram posicionados nas extremidades opostas da placa, mantendo-se uma distância padronizada de 4 cm entre os pontos de inoculação. Foram avaliadas combinações envolvendo interações ascomiceto–ascomiceto e ascomiceto–basidiomiceto, cada uma conduzida em três réplicas independentes. As placas foram incubadas a 28 °C, na ausência de luz, e

monitoradas diariamente. No sétimo dia de cultivo, foi realizado registro fotográfico padronizado para análise comparativa dos padrões de crescimento. A avaliação concentrou-se em parâmetros morfoespaciais, incluindo a dinâmica de expansão radial relativa de cada organismo, a formação de zona de contato (interface micelial), a presença de faixa delimitadora ou halo de exclusão, a ocorrência de sobreposição hifal (interpenetração superficial) e a modulação estrutural na região de contato, evidenciada por alterações na densidade, organização ou padrão zonado do micélio.

Critérios de classificação das interações

A classificação qualitativa das interações foi realizada com base na análise integrada dos parâmetros morfológicos previamente descritos. Foi considerada predominância radial quando uma das linhagens apresentou ocupação visual predominante da placa ao final do período de incubação e manteve avanço contínuo em direção à interface de contato. Foi considerada zona de contato delimitada quando as colônias cresceram até a região de encontro e mantiveram uma faixa visível de separação ou interrupção do crescimento, sem sobreposição evidente na interface. Foi considerada interpenetração hifal quando, após o encontro entre as colônias, observou-se crescimento visível de uma ou de ambas as linhagens para além da linha inicial de contato, com sobreposição parcial da área ocupada pela colônia oposta. Foi considerada modulação estrutural local a presença de alterações morfológicas restritas à região de interface, como mudança de densidade micelial, formação de borda compactada, alteração de coloração ou reorganização do padrão de crescimento em comparação ao monocultivo.

Com base nesses critérios, as interações foram classificadas como competitivas com dominância, quando uma das linhagens apresentou avanço consistente e ocupação predominante da placa; competitivas com coexistência, quando ambas mantiveram crescimento ativo até a interface, sem sobreposição ampla e sem exclusão evidente; e competitivas com repressão, quando uma das linhagens apresentou crescimento nitidamente restringido após o contato. Quando pertinente, a dominância observada foi atribuída à linhagem predominante.

4.3 Estabelecimento de condições padrão de cultivo e análises funcionais

Neste trabalho, o termo secretoma designa o conjunto de proteínas extracelulares secretadas pelos fungos no meio de cultivo sob as condições experimentais estabelecidas. Esse conceito refere-se à fração biológica de interesse, que representa o repertório proteico exportado para o ambiente extracelular durante o crescimento em monocultivo ou cocultivo.

Do ponto de vista operacional, o material analisado corresponde ao sobrenadante do cultivo, após etapas de filtração e centrifugação para remoção do micélio e das partículas sólidas, denominado extrato bruto (EB). O EB contém o secretoma propriamente dito, além de outros componentes solúveis do meio, como sais, açúcares residuais e metabólitos de baixo peso molecular.

Ao longo do texto, o termo secretoma será empregado quando a ênfase recair sobre a fração biológica de proteínas extracelulares, enquanto EB será empregado para se referir à amostra, tal como manipulada experimentalmente, nas etapas de processamento, concentração e preparo para análise.

As combinações fúngicas que apresentaram crescimento coexistente em meio sólido foram avaliadas funcionalmente em meio suplementar + BCA padrão, por meio da quantificação das atividades enzimáticas extracelulares. O objetivo dessa etapa foi determinar se a interação interespecífica promovia modulação do perfil funcional do EB, refletida em alterações nas atividades enzimáticas extracelulares em relação aos respectivos monocultivos.

4.3.1 Estabelecimento dos cultivos em meio líquido

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio suplementar acrescido de BCA padrão como fonte de carbono e indutor lignocelulósico. O BCA foi previamente preparado e adicionado em concentração padronizada, assegurando disponibilidade uniforme de substrato entre os tratamentos. Os sistemas experimentais incluíram o cocultivo entre os dois organismos selecionados e o monocultivo de cada organismo, conduzidos sob condições idênticas e utilizados como controle experimental. Nos cocultivos, cada frasco foi inoculado com dois discos miceliais de cada organismo,

totalizando quatro discos por frasco. Nos monocultivos, foram inoculados dois discos miceliais do respectivo organismo. A proporção inicial de biomassa foi padronizada para um disco micelial de 10 mm de diâmetro por organismo, em 50 mL de meio suplementar (1:50), estabelecendo um critério operacional uniforme de inoculação e favorecendo a comparabilidade entre monocultivos e cocultivos.

Os frascos foram incubados a 28 °C sob agitação orbital constante de 150 rpm em incubadora *shaker* (ACB Labor, SP, Brasil), de acordo com o delineamento do experimento específico (7,9,15 dias).

Coleta do extrato bruto (EB)

Ao final do período de cultivo, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram coletadas em microtubos de 2 mL e definidas como extrato bruto (EB), contendo as enzimas extracelulares secretadas.

As amostras foram centrifugadas em microcentrifuga de bancada (5425, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 5000 × g para remoção de material micelial residual e de partículas do meio. A fração líquida foi transferida para microtubos de 2 mL e armazenada a -20 °C até a realização dos ensaios enzimáticos.

Nenhuma etapa de concentração ou purificação foi realizada nesta fase, preservando o caráter exploratório da *screening* funcional.

4.3.2 Caracterização funcional das interações selecionadas por ensaios de atividade enzimática

As combinações fúngicas selecionadas na etapa de *screening* funcional foram submetidas à caracterização cinética da produção enzimática ao longo do período experimental definido para cada ensaio (9 ou 15 dias, conforme descrito nos respectivos delineamentos).

Os cultivos foram estabelecidos conforme descrito anteriormente, mantendo-se as mesmas condições de volume, composição do meio, proporção do inoculante e parâmetros de incubação. Durante o período experimental, alíquotas de 1 mL do extrato bruto (EB) foram coletadas a intervalos regulares

(24 h), centrifugadas para remoção de biomassa residual e armazenadas a -20 °C até a realização das análises subsequentes.

A caracterização funcional incluiu a quantificação de um conjunto ampliado de enzimas extracelulares, permitindo avaliação integrada do perfil secretório sob condições de monocultivo e cocultivo. Foram avaliadas as enzimas listadas na Tabela 2, que apresenta as classes funcionais, os substratos empregados e os métodos analíticos correspondentes.

Tabela 2: Enzimas extracelulares avaliadas, respectivos substratos e métodos analíticos utilizados no estudo. As atividades hidrolíticas sobre substratos naturais foram determinadas pelo método DNS; as enzimas sobre substratos sintéticos foram quantificadas pela liberação de p-nitrofenol; as enzimas oxidativas foram avaliadas por ensaios cromogênicos específicos; e a atividade proteolítica foi determinada pela hidrólise de azocaseína. A atividade FPase foi empregada como medida integrativa da capacidade celulolítica total.

Classe funcional	Enzima	Substrato	Método analítico	Referência
Enzimas hidrolíticas substratos naturais	CMCase (endoglucanase)	Carboximetilcelulose (CMC) 2%	DNS	Miller (1959)
	Xilanase	Xilana de aveia 1%	DNS	
	Mananase	Galactomanana 1%	DNS	
	Pectinase	Pectina cítrica 1%	DNS	
	FPase (atividade em papel filtro)	Papel filtro Whatman nº 1	DNS	
Enzimas hidrolíticas substratos sintéticos cromogênicos	β -glicosidase	p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG)	Liberação de pNP	Wood & Bhat (1988)
	β -xilosidase	p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX)	Liberação de pNP	
Enzimas oxidativas	Lacase	ABTS	Oxidação cromogênica	Hirakawa et al. (2023)
	Manganês-peroxidase (MnP)	Vermelho de fenol	Oxidação dependente de Mn ²⁺	Glenn et al. (1986); Wariishi et al. (1992)
Enzima proteolítica	Proteases	Azocaseína 0,5%	Hidrólise cromogênica	Kunitz (1947)

A inclusão simultânea de enzimas hidrolíticas, oxidativas e proteolíticas permitiu uma caracterização funcional ampliada do EB, abrangendo tanto a capacidade de degradação de polissacarídeos estruturais quanto a modulação oxidativa e o potencial de remodelamento proteico do ambiente extracelular.

4.3.3 Ensaio de atividade enzimática

Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos segundo protocolo padronizado de montagem reacional, incubação controlada, interrupção química e leitura espectrofotométrica, garantindo reprodutibilidade e comparabilidade entre experimentos.

Ensaio baseado em DNS

As atividades de CMCase, xilanase, mananase e pectinase foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959), utilizando-se substratos naturais específicos para cada enzima. Foram empregados carboximetilcelulose (CMC) a 2% (m/v), xilana de aveia a 1% (m/v), galactomanana de alfarroba a 1% (m/v) e pectina cítrica a 1% (m/v), todos preparados em tampão acetato de sódio pH 5,0. Os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Montagem das reações

As reações foram conduzidas em microplacas de PCR de 0,2 mL (MicroAmp® 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, EUA), contendo 20 µL de substrato e 20 µL de extrato bruto enzimático. Foram incluídos dois controles experimentais: o branco de extrato bruto (EB + tampão) e o branco de substrato (substrato + tampão). As placas foram incubadas a 50 °C por 30 minutos em termociclador (T100™, Bio-Rad, EUA). A reação foi interrompida pela adição de 120 µL de reagente DNS, seguida de incubação a 97 °C por 10 minutos para desenvolvimento da coloração. Após resfriamento, 60 µL de cada reação foram transferidos para placas de leitura e diluídos com 60 µL de água destilada. A absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA). Os valores foram registrados para posterior tratamento computacional conforme Seção 4.4.2

Curvas de calibração de açúcares

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada por meio de curvas padrão específicas para cada substrato, utilizando glicose para CMC, xilose para xilana, manose para galactomanana e ácido galacturônico para pectina.

Soluções padrão na faixa de 2 a 20 µg por reação foram preparadas e processadas sob as mesmas condições experimentais empregadas nas reações com DNS. As leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm no mesmo equipamento utilizado para os ensaios enzimáticos.

Os coeficientes angulares e interceptos das curvas foram utilizados para conversão da absorbância em concentração de produto (Seção 4.4.2).

A atividade FPase foi determinada como medida integrativa da capacidade celulolítica total, utilizando tiras padronizadas de papel filtro como substrato insolúvel. As reações foram conduzidas em tampão acetato de sódio pH 5,0, contendo extrato bruto e o substrato insolúvel, sob incubação controlada a 50 °C por tempo previamente definido. Ao final da incubação, a quantificação dos açúcares redutores liberados foi realizada pelo método DNS, com leitura espectrofotométrica a 540 nm, conforme descrito por Miller (1959) e Ghose (1987).

Ensaio com substratos sintéticos (Wood & Bhat, 1988)

As atividades de β-glicosidase e de β-xilosidase foram determinadas com os substratos p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG) e p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPX), respectivamente. Cada reação foi composta por 5 µL de extrato bruto enzimático, 25 µL do substrato a 5 mM e 45 µL de tampão acetato 100 mM pH 5,0. Após incubação a 50 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de carbonato de sódio 1 M. A absorbância foi determinada a 430 nm.

Enzimas oxidativas

Lacase: Determinada utilizando ABTS 0,5 mM em tampão acetato 0,1 M pH 4,5. A reação continha 20 µL de EB e 180 µL de solução de ABTS. A variação de absorbância foi medida a 420 nm após 5 min a 25 °C.

Manganês-peroxidase (MnP): Determinada pelo ensaio do vermelho de fenol conforme Glenn et al. (1986) e Wariishi et al. (1992). A reação foi conduzida em microtubos contendo tampão succinato, extrato bruto, vermelho de fenol, Mn²⁺ e H₂O₂, em condições controladas de pH e incubação. Após o tempo reacional, a

reação foi interrompida com NaOH 2 M, e a absorbância foi medida a 610 nm.

Proteases

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato 50 mM, pH 6,5. A reação foi composta por substrato e extrato bruto enzimático, incubada a 37 °C por 40 min e interrompida com TCA 10%. Após centrifugação para remoção do material precipitado, o sobrenadante foi alcalinizado com KOH 5 M, e a absorbância foi medida a 430 nm.

4.4 Procedimentos gerais para quantificação enzimática e análise estatística

As atividades enzimáticas avaliadas ao longo dos diferentes experimentos, incluindo o *screening* em meio líquido, as caracterizações cinéticas de 9 e 15 dias e os ensaios sob variação de pH foram processadas segundo um procedimento padronizado de tratamento de dados, cálculo de atividade e modelagem estatística, aplicado de forma consistente em todas as etapas do estudo. Os dados de absorbância foram integralmente organizados e analisados no ambiente estatístico R (versão 4.5.1; R Core Team, 2025), por meio da interface RStudio (Posit Software, Boston, MA, EUA). Para manipulação e organização dos dados foi empregado o pacote *tidyverse*; para modelagem estatística foram utilizados os pacotes *lme4* e *lmerTest*; para obtenção de médias marginais estimadas e comparações múltiplas foram utilizados *emmeans* e *multcomp*; e análises complementares de diagnóstico de modelos foram conduzidas com o pacote *car*.

Para cada ensaio, os dados foram estruturados considerando o tratamento (monocultivos e cocultivo), o fator experimental (tempo de cultivo ou condição de pH), a réplica biológica, a réplica técnica e, quando aplicável, o ensaio independente realizado em momento distinto. Essa organização permitiu a rastreabilidade completa das leituras espectrofotométricas, desde a absorbância bruta até o valor final de atividade enzimática. De forma a assegurar a padronização no processamento das leituras, a aplicação consistente dos critérios de correção de branco e a identificação de outliers, além do controle explícito da variabilidade infra- e interexperimental. Tal sistemática garantiu

comparabilidade direta entre experimentos conduzidos sob delineamentos semelhantes em momentos distintos do trabalho, preservando a robustez estatística das inferências realizadas.

4.4.1 Correção de branco

As leituras espectrofotométricas foram inicialmente registradas como valores de absorvância bruta ($Abs_{(medida)}$), obtidos diretamente no comprimento de onda específico de cada ensaio. O processamento dos dados seguiu uma sequência padronizada. Os dados brutos foram organizados em uma estrutura contendo as seguintes variáveis: tratamento (trat), fator experimental (dia ou pH), réplica biológica (rep_bio), réplica técnica (rep_tec), ensaio independente (rep_ens), quando aplicável, e absorvância medida ($Abs_{(medida)}$). Valores não numéricos, caracteres residuais e vírgulas decimais foram previamente normalizados, assegurando a consistência e a integridade para a análise computacional subsequente.

Correção por branco

A correção de fundo foi realizada para eliminar contribuições de: meio de cultivo; reagentes; substrato não convertido; interferências ópticas do sistema.

A estratégia de correção seguiu hierarquia operacional:

I Branco específico da condição experimental

Quando disponível, utilizou-se branco correspondente ao mesmo fator experimental (dia de cultivo ou pH):

$$Abs_{corr1} = Abs_{medida} - \bar{Abs}_{b_sub\ (condi\ c\ \tilde{a}o)}$$

II Branco específico por tratamento

Na ausência de branco por condição, utilizou-se branco correspondente ao tratamento:

$$Abs_{corr1} = Abs_{medida} - \bar{Abs}_{b_sub\ (tratamento)}$$

III Ausência de branco específico

Quando não havia branco registrado, considerou-se:

$$Abs_{corr1} = Abs_{medida}$$

O valor obtido foi definido como absorvância preliminar corrigida (Abs_{corr1}).

Identificação e tratamento de outliers técnicos

A identificação de valores extremos foi realizada inicialmente entre réplicas técnicas pertencentes ao mesmo conjunto:

(tratamento × fator experimental × ensaio × réplica biológica)

Foi aplicado o critério do intervalo interquartil (IQR), sendo considerado outlier extremo qualquer valor que satisfizesse:

$$Abs_{corr1} < Q1 - 1,5 \times IQR$$

ou

$$Abs_{corr1} > Q3 + 1,5 \times IQR$$

onde: Foram considerados os seguintes parâmetros estatísticos para identificação de dispersão: Q1, correspondente ao primeiro quartil; Q3, correspondente ao terceiro quartil; e IQR, definido como a diferença entre Q3 e Q1 ($IQR = Q3 - Q1$).

Os valores classificados como extremos não foram removidos do conjunto de dados; em vez disso, foram substituídos pela média das demais réplicas técnicas do grupo correspondente:

$$Abs_{tec_corr} = Abs_{corr1} - (\text{n\~{a}o extremos})$$

Essa abordagem permitiu preservar a estrutura experimental, evitando perda arbitrária de réplicas biológicas completas.

Consolidação técnica para réplica biológica

Após o tratamento de outliers técnicos, foi calculada a média das réplicas técnicas para obtenção da absorbância média por réplica biológica:

$$Abs_{bio} = \frac{\sum Abs_{tec_corr}}{n_{técnicas}}$$

Identificação de outliers biológicos

Em experimentos com múltiplas réplicas biológicas ou ensaios independentes, foi aplicado novamente o critério IQR dentro de cada grupo:

(tratamento × fator experimental × ensaio independente)

Absorbância final corrigida

O valor consolidado após as etapas de correção de branco, tratamento de outliers técnicos, consolidação biológica e tratamento de outliers biológicos foi definido como *Abs_final*. Esse valor foi utilizado como entrada nas equações de conversão para atividade enzimática, conforme descrito na seção 4.4.2.

Tratamento de valores negativos

Valores negativos de absorbância final podem ocorrer quando a leitura experimental é inferior ao branco correspondente. Esses valores foram mantidos durante a etapa de controle de qualidade, mas foram truncados para zero na etapa de cálculo da atividade:

$$atividade = \begin{cases} 0, & \text{se } Abs_{final} \leq 0 \\ f(Abs_{final}), & \text{se } Abs_{final} > 0 \end{cases}$$

Essa abordagem garante coerência físico-química, uma vez que atividade enzimática negativa não possui significado experimental.

4.4.2 Conversão de absorvância em atividade enzimática

Após correção de branco, obteve-se a absorvância corrigida ΔAbs (ou ΔA , conforme o ensaio). De modo geral, a quantificação do produto formado foi realizada por curva padrão (DNS e pNP) ou por Lei de Beer–Lambert (ABTS/enzimas oxidativas), seguida de normalização pelo tempo de incubação (t) e pelo volume de extrato enzimático adicionado (V_{enz}). As atividades foram expressas como $U mL^{-1}$ sendo 1 U definida como a formação de 1 μmol de produto por minuto sob as condições do ensaio.

Ensaio baseado em DNS

A partir da curva de calibração do açúcar padrão (glicose / xilose / manose / ácido galacturônico), a concentração de açúcares redutores foi obtida por:

$$C_{mg/mL} = \frac{\Delta Abs - b}{a} \quad (\text{Eq. 1})$$

em que a é o coeficiente angular e b o intercepto da curva padrão.

A massa total de açúcar formada na reação foi:

$$m_{mg} = C_{mg/mL} \cdot V_{reac} \quad (\text{Eq. 2})$$

A conversão para micromoles foi realizada por:

$$n_{\mu mol} = \frac{m_{mg}}{MM_{mg/\mu mol}} \quad (\text{Eq. 3})$$

em que $MM_{\text{mg}/\mu\text{mol}}$ é a massa correspondente a 1 μmol do açúcar ($\text{mg}/\mu\text{mol}$) usada no cálculo.

A atividade enzimática foi então calculada como:

$$U \text{ mL}^{-1} = \frac{n_{\mu\text{mol}}}{t \cdot V_{\text{enz}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Critério de não-negatividade: quando $\Delta Abs \leq 0$, a atividade foi considerada zero.

Parâmetros típicos dos ensaios realizados nesse trabalho $t = 30\text{min}$; $V_{\text{enz}} = 0,020\text{mL}$; $V_{\text{reac}} = 0,040\text{mL}$.

Substratos sintéticos p-nitrofenil

A concentração de p-nitrofenol (pNP) foi obtida pela curva padrão:

$$C_{\text{pNP, mg/mL}} = \frac{Abs_{430} - b}{a} \quad (\text{Eq. 5})$$

A massa total de pNP formada:

$$m_{\text{pNP, mg}} = C_{\text{pNP, mg/mL}} \cdot V_{\text{reac}} \quad (\text{Eq. 6})$$

A conversão em micromoles, utilizando o fator de conversão do pNP:

$$n_{\mu\text{mol}} = \frac{m_{\text{pNP, mg}}}{0,13 \text{ mg}/\mu\text{mol}} \quad (\text{Eq. 7})$$

A atividade foi calculada por:

$$U \text{ mL}^{-1} = \frac{n_{\mu\text{mol}}}{t \cdot V_{\text{enz}}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Parâmetros típicos dos ensaios realizados nesse trabalho: $t = 30\text{min}$;
 $V_{\text{reac}} = 0,065\text{mL}$; $V_{\text{enz}} = 0,005\text{mL}$.

Proteases

A atividade proteolítica foi calculada a partir da variação de absorvância corrigida ΔA (amostra – branco), conforme o princípio de Kunitz, adotando um fator empírico de conversão do método (inclinação operacional do ensaio):

$$U \text{ mL}^{-1} = \left(\frac{\Delta A}{0,001} \right) \cdot \frac{V_{\text{total}}}{t \cdot V_{\text{amostra}}} \quad (\text{Eq. 9})$$

em que:

ΔA é a absorvância corrigida (após brancos),

t é o tempo de incubação (min),

V_{amostra} é o volume de EB adicionado (mL),

V_{total} é o volume total do sistema reacional (mL),

0,001 representa o fator operacional do método (conforme padronização adotada no pipeline).

Parâmetros típicos dos ensaios realizados nesse trabalho: $t = 40\text{min}$;
 $V_{\text{amostra}} = 0,10\text{mL}$; $V_{\text{total}} = 0,30\text{mL}$.

Lacase

A atividade foi calculada pela Lei de Beer–Lambert, utilizando a variação de absorvância a 420 nm:

$$U \text{ L}^{-1} = \frac{(A_{\text{final}} - A_{\text{inicial}}) \cdot V_t \cdot D_f \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d \cdot t \cdot V_s} \quad (\text{Eq. 10})$$

em que:

$A_{\text{final}} - A_{\text{inicial}}$ é a variação de absorvância em t minutos,

V_t é o volume total da reação (mL),

V_s é o volume de amostra (mL),

D_f é o fator de diluição,

ε é o coeficiente de extinção molar do ABTS a 420 nm ($\varepsilon_{420} = 36.000 M^{-1}cm^{-1}$),

- d é o caminho óptico (cm),

t é o tempo (min).

4.4.2.1 Manganês peroxidase

A atividade foi estimada a partir do aumento de absorbância a 610 nm, também por Beer–Lambert:

$$U \text{ mL}^{-1} = \frac{\Delta A_{610} \cdot V_{total} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d \cdot t \cdot V_{amostra}} \quad (\text{Eq. 11})$$

em que:

ΔA_{610} é a absorbância corrigida (amostra – branco),

V_{total} é o volume total da reação (mL),

$V_{amostra}$ é o volume de EB (mL),

t é o tempo de incubação (min),

ε é o coeficiente de extinção molar do vermelho de fenol ($\varepsilon = 44.600 M^{-1}cm^{-1}$),

d é o caminho óptico (cm).

4.4.3 Estratégia de modelagem estatística

Após a obtenção da absorbância final corrigida ($Abs_{\{final\}}$) e sua conversão em atividade enzimática (Seção 4.4.2), os dados foram submetidos a um fluxo padronizado de modelagem estatística com o objetivo de: quantificar os efeitos dos fatores experimentais; controlar a variabilidade entre ensaios independentes; realizar comparações múltiplas ajustadas; produzir representações gráficas estatisticamente informativas.

Estruturação do conjunto de dados para modelagem

O banco de dados final foi organizado em formato longo (long format), contendo as variáveis atividade ($U \cdot mL^{-1}$), tratamento (pc, tr, co), fator experimental (dia ou pH) e ensaio independente (rep_ens), quando aplicável. As variáveis categóricas

foram explicitamente convertidas em fatores no ambiente R, com definição prévia da ordem dos níveis (pc → tr → co), assegurando consistência na interpretação dos coeficientes do modelo estatístico e na organização gráfica dos resultados.

A escolha do modelo foi condicionada à estrutura experimental:

Quando os dados provinham de um único ensaio experimental, ajustou-se um modelo linear clássico, descrito como Atividade ~ tratamento × fator experimental, permitindo avaliar o efeito principal de tratamento, o efeito principal de tempo (ou pH) e a interação entre tratamento e fator experimental. Nos casos em que os experimentos foram conduzidos em momentos distintos, como na cinética de 9 dias e na caracterização ampliada de 15 dias, adotou-se modelo linear misto, considerando o ensaio independente como efeito aleatório, conforme a estrutura Atividade ~ tratamento × fator experimental + (1|ensaio). Nessa abordagem, o tratamento e o fator experimental foram considerados efeitos fixos, enquanto o ensaio foi modelado como intercepto aleatório, permitindo controlar a variabilidade inter-experimental, evitar a inflação artificial dos graus de liberdade e preservar a independência estatística entre os blocos experimentais. A significância dos efeitos fixos foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA) derivada do modelo ajustado.

Para evitar a interpretação direta dos coeficientes brutos do modelo, especialmente na presença de interação, foram estimadas médias marginais ajustadas (Estimated Marginal Means, EMMs) utilizando o pacote *emmeans*. As médias foram estimadas por tratamento dentro de cada nível do fator experimental (por exemplo, tratamento | dia), mantendo a estrutura do modelo ajustado, o que assegura que as comparações estejam adequadamente ajustadas à estrutura do modelo e ao efeito aleatório, quando presente. As comparações múltiplas entre tratamentos foram realizadas por contrastes pareados com ajuste de Sidak para controle do erro do tipo I acumulado, escolha fundamentada em seu menor conservadorismo em relação ao ajuste de Bonferroni, adequação a número moderado de comparações e coerência com delineamentos balanceados. Os resultados foram expressos por meio de letras indicativas de agrupamento estatístico, geradas pela função *cld()* do pacote

multcomp, sendo que tratamentos que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

A adequação dos modelos foi verificada por inspeção visual dos resíduos, avaliação da homocedasticidade, análise da normalidade aproximada dos resíduos e inspeção da estrutura de variância entre ensaios independentes. Considerando que as análises envolveram médias consolidadas de réplicas técnicas e biológicas, a distribuição residual apresentou comportamento aproximadamente simétrico na maioria dos casos, não sendo necessária a aplicação de transformações adicionais nos dados.

4.4.4 Geração dos gráficos finais

A visualização gráfica dos resultados foi realizada utilizando o pacote *ggplot2*, seguindo princípios padronizados de apresentação. Foram plotadas as médias marginais estimadas (EMMs), representadas por barras correspondentes às médias ajustadas, acompanhadas de barras de erro indicando o erro padrão (SE). As letras indicativas de significância estatística foram posicionadas acima dos respectivos intervalos de erro, e o eixo Y foi definido com início em zero para evitar distorções visuais na interpretação dos dados. Valores negativos de atividade foram truncados, preservando coerência físico-química. Nos experimentos com delineamento fatorial, como tratamento × dia ou tratamento × pH, foram empregadas facetas para permitir visualização comparativa clara entre os níveis do fator experimental. As paletas de cores foram padronizadas ao longo do trabalho, garantindo consistência visual entre os capítulos (Figura 3).












	 <i>T. reesei</i> RUT-C30	 <i>C. byssicola</i> (mono)	 <i>P. citrinopileatus</i> (cocultivo)	 <i>P. pulmonarius</i> (mono)
Tratamento	 <i>B. adusta</i> (mono)	 <i>C. byssicola</i> (cocultivo)	 <i>P. ostreatus</i> (mono)	 <i>P. pulmonarius</i> (cocultivo)
	 <i>B. adusta</i> (cocultivo)	 <i>P. citrinopileatus</i> (mono)	 <i>P. ostreatus</i> (cocultivo)	

Figura 3: Esquema ilustrativo da padronização cromática utilizada para identificação dos tratamentos. A manutenção das mesmas paletas de cores ao longo de todo o trabalho assegura consistência visual entre capítulos, contribuindo para melhor organização gráfica e interpretação integrada dos dados.

4.4.5 Rigor estatístico e reprodutibilidade

Todos os ensaios foram conduzidos utilizando replicatas biológicas independentes, e cada réplica biológica foi analisada em réplicas técnicas,

garantindo a separação entre variabilidade experimental e variabilidade instrumental. O tratamento sistemático dos dados incluiu correção de brancos específicos, controle de outliers e modelagem estatística que incorpora explicitamente a estrutura hierárquica dos dados por meio de efeitos aleatórios.

A utilização de modelos lineares mistos permitiu quantificar de forma robusta os efeitos de tratamento, tempo de cultivo e sua interação, reduzindo vieses associados à pseudorrepetição e à heterogeneidade entre cultivos independentes. As análises inferenciais foram conduzidas com métodos apropriados a experimentos multifatoriais, com controle do erro do tipo I por meio de ajustes para comparações múltiplas.

Todos os cálculos de atividade enzimática, processamento de dados e análises estatísticas foram realizados de forma reprodutível no ambiente R, com scripts padronizados e exportação automatizada de tabelas e figuras, assegurando rastreabilidade completa desde a leitura espectrofotométrica até os resultados apresentados.

4.5 Screening funcional em meio líquido

A etapa de *screening* em meio líquido teve como objetivo comparar, em ponto único de tempo de cultivo (sétimo dia), o desempenho enzimático do cocultivo em relação aos respectivos monocultivos, constituindo o primeiro filtro quantitativo após o *screening* morfológico em meio sólido.

A combinação que apresentou incremento consistente da atividade enzimática em condições de cocultivo, quando comparada ao monocultivo de *T. reesei*, foi definida como sistema modelo e selecionada para as etapas cinéticas subsequentes.

4.5.1 Particularidades do desenho experimental

Os cultivos foram conduzidos conforme as condições gerais descritas na Seção 4.3, com duas particularidades metodológicas: a duração fixa de sete dias, estabelecendo ponto temporal único de avaliação, e a inclusão de múltiplas combinações interespecíficas previamente selecionadas para análise comparativa

Para cada combinação, foram avaliados, em três réplicas biológicas independentes, o cocultivo (A+B) e os monocultivos correspondentes (A; B), mantendo-se a proporção inoculante padronizada.

O EB foi coletado apenas no 7º dia, conforme o procedimento descrito na Seção 4.3.1 (clarificação por centrifugação e armazenamento a -20 °C). Nesta etapa não foram realizadas etapas de concentração/purificação, preservando o caráter exploratório da *screening*.

No *screening* de 7 dias, foram quantificadas exclusivamente enzimas hidrolíticas sobre substratos naturais (CMCase, xilanase, mananase e pectinase), conforme a Seção 4.3.3 (DNS; Miller, 1959). Enzimas oxidativas, proteases e FPase não foram incluídas nesta fase.

4.5.2 Particularidades da análise estatística

O processamento seguiu o pipeline padronizado da Seção 4.4 até a obtenção de atividade. A etapa estatística diferiu por três aspectos:

Como se trata de ponto único, o modelo incluiu apenas tratamento:

Atividade ~ tratamento.

Análise estratificada por combinação: Cada par interespecífico foi analisado separadamente, comparando monocultivos e cocultivo dentro da própria combinação.

Modelo linear simples (lm): Como o *screening* foi tratado como execução única por condição (sem concatenação de ensaios independentes), utilizou-se o modelo linear clássico, seguido de EMMs (emmeans) e de comparações múltiplas com ajuste de Sidak; os resultados foram sumarizados por letras de agrupamento e apresentados em gráficos facetados por organismo parceiro.

4.6 Consolidação e caracterização cinética do sistema modelo (9 dias)

Após o *screening* em ponto único, a combinação com incremento funcional consistente em cocultivo foi definida como sistema modelo e submetida

à caracterização cinética para quantificar a dinâmica temporal e controlar a variabilidade interexperimental.

4.6.1 Particularidades do desenho experimental

Em comparação ao screening de sete dias, esta etapa diferiu por contemplar amostragem seriada diária entre os dias 1 e 9, execução em ensaios independentes, realizados em momentos distintos, e foco em uma única combinação previamente definida como sistema modelo. Diferentemente do screening, os dados foram concatenados entre ensaios independentes; para evitar pseudorrepetição, o fator “ensaio independente” foi incorporado explicitamente na estrutura do banco de dados e na modelagem estatística (Seção 4.4), preservando a independência estatística entre as diferentes execuções experimentais.

Nesta etapa foram acompanhadas ao longo do tempo as enzimas hidrolíticas sobre substratos naturais (CMCase, xilanase, mananase e pectinase), conforme Seção 4.3.3.

4.6.2 Particularidades da análise estatística

A análise inferencial considerou o caráter fatorial tempo × tratamento e a variabilidade entre os ensaios. Modelo misto:

$$\textit{Atividade} \sim \textit{tratamento} \times \textit{dia} + (1 \mid \textit{ensaio}),$$

Considerando EMMs por tratamento em cada dia e ajuste de Sidak nas comparações múltiplas.

4.7 Robustez e reprodutibilidade do sistema modelo (15 dias)

Após a consolidação do sistema modelo em 9 dias, foi conduzida cinética ampliada para aumentar o poder estatístico, avaliar a estabilidade temporal prolongada e expandir o painel funcional.

4.7.1 Particularidades do desenho experimental

Em relação à cinética de 9 dias, esta etapa distinguiu-se pela ampliação da janela temporal, com coletas realizadas nos dias 1, 3, 6, 9, 12 e 15, pelo

aumento do número amostral ($n = 6$ réplicas biológicas) e pela expansão do painel enzimático avaliado (Seção 4.7). O experimento de 15 dias foi conduzido com número amostral superior ao da cinética inicial, incorporando maior número de réplicas biológicas e de execuções independentes. Essa ampliação teve como objetivo elevar o poder estatístico, minimizar o impacto de variações pontuais e fortalecer a confiabilidade das inferências sobre o comportamento temporal do sistema-modelo, permitindo avaliação mais robusta da estabilidade e reprodutibilidade do padrão funcional.

Além das enzimas hidrolíticas naturais, foram incorporadas ao painel analítico as atividades de β -glicosidase e β -xilosidase, determinadas com substratos pNP, bem como lacase, manganês peroxidase (MnP) e proteases, conforme os protocolos descritos na seção 4.3.3.

4.7.2 Particularidades da análise estatística

Diferentemente da cinética de 9 dias, o experimento de 15 dias foi conduzido como um único bloco experimental com número amostral ampliado, não havendo fator adicional de ensaio independente. Dessa forma, não foi necessário incluir efeito aleatório na modelagem. A análise inferencial considerou a estrutura fatorial:

$$\textit{Atividade} \sim \textit{tratamento} \times \textit{dia}$$

permitindo avaliar os efeitos principais de tratamento e tempo, bem como sua interação. As médias marginais estimadas (EMMs) foram obtidas por tratamento em cada dia, com ajuste de Sidak ($\alpha = 0,05$) para comparações múltiplas. A ampliação do tamanho amostral proporcionou maior poder estatístico e menor variabilidade residual, permitindo uma avaliação mais robusta da estabilidade temporal e da reprodutibilidade do padrão funcional observado no sistema modelo.

4.8 Eleição do ponto temporal para hidrólise e análises ômicas

A definição do ponto temporal para os ensaios de hidrólise e leitura proteômicas foi realizada com base na análise integrada dos resultados das

cinéticas de 9 e 15 dias do sistema modelo. Foram considerados a manutenção de atividade enzimática relevante no cocultivo, a estabilidade relativa do perfil funcional entre os experimentos e a adequação prática desse tempo para as etapas subsequentes de hidrólise e análise proteômica.

4.8.1 Critérios quantitativos de decisão

A eleição do ponto temporal considerou os seguintes parâmetros:

A eleição do ponto temporal considerou a manutenção de atividade enzimática relevante no cocultivo, com destaque para tendências funcionais de interesse em relação aos monocultivos, sem exigir superioridade global em todas as atividades. Também foi considerado o perfil enzimático global equilibrado, representado pela presença simultânea de diferentes classes funcionais, de modo a evitar a escolha baseada em um pico isolado de uma única atividade. Além disso, priorizaram-se pontos correspondentes à fase de produção consolidada, excluindo-se tempos muito precoces ou muito tardios, com o objetivo de favorecer a estabilidade do padrão funcional. Por fim, considerou-se a consistência relativa entre as cinéticas de 9 e 15 dias como indicativo de maior robustez do comportamento temporal observado.

4.8.2 Racional operacional

Além dos critérios quantitativos, foram considerados aspectos práticos e experimentais, incluindo tempo de cultivo compatível com aplicações biotecnológicas, viabilidade logística para preparo de volumes maiores de extrato bruto (EB), redução do risco de degradação proteica associada a cultivos excessivamente prolongados e otimização do cronograma experimental para as etapas subsequentes. Dessa forma, a condição temporal selecionada representa não apenas um ponto de maior desempenho relativo, mas também uma escolha biologicamente fundamentada e operacionalmente estratégica.

4.9 Modulação do desempenho enzimático sob diferentes condições de pH

Após a consolidação do sistema modelo e a definição do ponto temporal de interesse (Seção 4.8), foi conduzido experimento específico para avaliar a influência do pH inicial do meio suplementar + BCA padrão sobre o perfil secretório em monocultivo e cocultivo.

Diferentemente das etapas cinéticas anteriores, nas quais o fator experimental principal foi o tempo de cultivo, nesta etapa o fator de interesse foi exclusivamente a condição inicial de pH.

4.9.1 Particularidades do desenho experimental

As condições gerais de cultivo seguiram o protocolo descrito na Seção 4.1.3, com modificações específicas relacionadas ao ajuste do pH inicial do meio suplementar para 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0, realizado antes da esterilização, mediante a adição de HCl 1 M, com aferição do pH em pHmetro previamente calibrado. Nesta etapa, o pH foi ajustado exclusivamente no momento inicial do cultivo, sem controle ativo nem reajuste ao longo do crescimento fúngico. O experimento foi, portanto, delineado para avaliar especificamente o efeito do pH inicial sobre o estabelecimento do cultivo e o perfil de secreção enzimática. Adicionalmente, foi adotado ponto temporal único, previamente eleito (Seção 4.8), sem acompanhamento cinético seriado ao longo do tempo.

Foram mantidas as três condições do sistema modelo monocultivo de *T. reesei*, monocultivo do organismo parceiro e cocultivo sendo cada combinação tratamento × pH conduzida em três réplicas biológicas independentes. O experimento de modulação por pH foi restrito à avaliação das enzimas hidrolíticas sobre substratos naturais (CMCase, xilanase, mananase e pectinase), não sendo incluídas enzimas oxidativas, proteases ou atividades sobre substratos sintéticos nesta etapa. Essa escolha metodológica teve como objetivo focar diretamente na modulação do desempenho hidrolítico primário sob diferentes condições de pH inicial.

4.9.2 Particularidades do processamento de dados

O processamento dos dados seguiu o pipeline geral descrito na Seção 4.3.3, com adaptação específica na etapa de correção de branco para incorporar a variabilidade associada às diferentes condições de pH. A correção foi realizada segundo uma hierarquia previamente definida, priorizando o branco específico do mesmo pH, seguido do branco específico do tratamento e, na ausência de controle aplicável, sem correção adicional. Essa estratégia permitiu capturar possíveis interferências ópticas ou químicas induzidas pela variação do pH no sistema reacional. A análise inferencial foi estruturada como delineamento fatorial, considerando a interação entre tratamento e condição de pH:

$$\text{Atividade} \sim \text{tratamento} \times \text{pH}$$

Como o experimento foi conduzido em bloco único, sem concatenação de ensaios independentes, foi ajustado modelo linear clássico (lm), sem efeito aleatório.

As médias marginais estimadas foram obtidas por tratamento dentro de cada nível de pH (trat | pH), com contrastes pareados ajustados por método de Sidak ($\alpha = 0,05$). Os resultados foram apresentados em gráficos facetados por pH, permitindo comparação direta entre monocultivos e cocultivo dentro de cada condição.

4.10 Ensaio de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

4.10.1 Obtenção do secretoma (extrato bruto) para o ensaio de hidrólise

A produção do extrato bruto (EB) destinado ao ensaio de hidrólise foi realizada a partir de sistema modelo definido previamente, seguindo as condições gerais de cultivo líquido descritas nas Seções 4.1.3 (meio suplementar + BCA padrão) e 2.4 (estabelecimento dos cultivos, proporção inoculante e incubação).

Após 6 dias de cultivo (Seção 4.8), alíquotas dos sobrenadantes foram coletadas e clarificadas por centrifugação ($10.000 \times g$, 10 min) para remoção de partículas e biomassa residual, obtendo-se o EB. As amostras foram

armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a etapa de quantificação e ajuste da carga enzimática.

4.10.2 Determinação da atividade FPase e ajuste da carga enzimática aplicada

A atividade de FPase do EB foi determinada como medida integrativa da capacidade celulolítica total, utilizando papel-filtro como substrato e quantificação de açúcares redutores pelo método DNS, seguindo o protocolo padronizado de microensaio descrito na Seção 4.3.3.

Os valores foram corrigidos e convertidos em atividade (U/mL) conforme as equações gerais adotadas para ensaios baseados em DNS (Seção 4.4.2). Para a hidrólise, foi utilizada carga padronizada de 0,5 U/mL em volume final de 6 mL, totalizando 3 U por frasco. O volume de EB necessário para atingir essa condição foi calculado individualmente para cada tratamento, completando-se o volume com tampão acetato até 6 mL.

Montagem do ensaio de hidrólise e condições reacionais

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi conduzida em tubos contendo 6 mL de solução final, composta por 3% (m/v) de BCA (180 mg por frasco), tampão acetato de sódio em pH 4,8 (condição reacional; Seção 4.3.3), extrato bruto (EB) previamente ajustado para carga final de 0,5 U/mL (3 U totais por frasco) e azida sódica em concentração final de 0,01% (m/v) para prevenção de crescimento microbiano. As reações foram incubadas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 150 rpm, por até 72 h. Como referência, foi incluído o coquetel enzimático comercial Celluclast® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 10^{-3} e aplicado sob a mesma carga enzimática (0,5 U/mL), permitindo comparação direta entre os tratamentos. Cada EB biológico foi avaliado em triplicata biológica, com duplicata técnica de hidrólise por réplica biológica.

Coletas temporais e quantificação de açúcares redutores

Alíquotas foram coletadas no início do ensaio e após 6, 12, 24 e 48 h. A quantificação de açúcares redutores seguiu o mesmo princípio do microensaio

baseado em DNS descrito na Seção 4.3.3 (Miller, 1959), com conversão por curva padrão para obtenção de valores em mg/mL.

4.10.3 Processamento de dados e análise estatística específica da hidrólise

O tratamento computacional seguiu o pipeline geral descrito na Seção 4.3.3 (organização em formato longo, correção por brancos, consolidação técnica para réplica biológica e critérios de não-negatividade).

Para o ensaio de hidrólise, a correção de branco foi aplicada dependente do tempo, priorizando: (i) branco de substrato no mesmo tempo e (ii) branco do tratamento no mesmo tempo. As duplicatas técnicas foram agregadas por média para compor o valor por réplica biológica em cada ponto temporal.

A cinética de liberação de açúcares redutores foi analisada por modelo linear misto, considerando os efeitos fixos de tratamento, tempo e sua interação, e incluindo intercepto aleatório para a unidade experimental (*tratamento × réplica biológica*), de modo a acomodar medidas repetidas ao longo do tempo. As comparações múltiplas entre tratamentos em cada tempo foram realizadas por médias marginais estimadas (EMMs) com ajuste de Sidak, e os agrupamentos foram apresentados por letras de significância ($\alpha = 0,05$), conforme estratégia geral descrita na Seção 4.4.

Além da análise temporal, foram calculadas métricas integradas de desempenho: AUC (0–48 h) por integração trapezoidal e comparações entre tratamentos; e, quando aplicável, comparação do ponto final (48 h). Por fim, estimativas de eficiência foram obtidas a partir da concentração final, normalizando-se a massa total de açúcar liberada (6 mL) pela massa inicial de biomassa (180 mg) e pela carga enzimática total aplicada (3 U), permitindo comparações entre tratamentos e em relação ao preparado comercial.

4.11 Caracterização e padronização do EB para análise proteômica

Esta etapa teve como objetivo estabelecer e padronizar o fluxo metodológico para obtenção, concentração, dessalinização e preparo do EB

destinado à análise proteômica por LC–MS/MS. Considerando a natureza diluída das proteínas extracelulares e a presença de sais, açúcares e metabólitos provenientes do cultivo, foram avaliadas e ajustadas estratégias de processamento visando maximizar a recuperação proteica, garantir reprodutibilidade experimental e assegurar compatibilidade com as análises de espectrometria de massas.

Procedimentos padronizados para processamento de amostras

As etapas de quantificação proteica e análise eletroforética descritas ao longo deste capítulo foram conduzidas segundo procedimentos padronizados, empregados de forma consistente durante todo o processamento das amostras.

Quantificação proteica por fluorimetria (Qubit™)

A concentração total de proteínas dos EBs foi determinada por fluorimetria utilizando o kit Qubit™ Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), conforme as instruções do fabricante, com adaptações para o volume de amostra empregado neste estudo. Esse método baseia-se na ligação seletiva de um fluoróforo às proteínas, permitindo a quantificação sensível e específica mesmo na presença de sais, detergentes e outros compostos interferentes.

A solução de trabalho (*Qubit working solution*) foi preparada imediatamente antes do uso pela mistura do reagente Qubit Protein com o tampão Qubit Protein Buffer, na proporção de 1:199 (v/v), de acordo com o número de reações a serem realizadas. Para cada tubo de reação, foram utilizados 200 µL de solução de trabalho.

As curvas de calibração foram obtidas a partir dos padrões fornecidos pelo kit, os quais foram preparados adicionando-se 10 µL de cada padrão a 190 µL da solução de trabalho, resultando em um volume final de 200 µL por tubo. Em seguida, as amostras de EB foram quantificadas utilizando 10 µL de cada amostra, adicionados a 190 µL da solução de trabalho, totalizando igualmente 200 µL por reação.

Após a preparação, os tubos contendo padrões e amostras foram homogeneizados por inversão e incubados à temperatura ambiente por 15

minutos, protegidos da luz, para permitir a completa ligação do fluoróforo às proteínas. A leitura da fluorescência foi realizada no fluorímetro Qubit™ (Thermo Fisher Scientific), previamente calibrado com os padrões do kit.

As concentrações de proteína foram calculadas automaticamente pelo equipamento a partir da curva de calibração gerada, sendo expressas em µg/mL. Para todas as amostras, os valores obtidos foram corrigidos em função do volume de amostra utilizado (10 µL) e do fator de diluição imposto pela adição da solução de trabalho. As quantificações foram realizadas para todas as condições experimentais, permitindo a normalização das cargas proteicas utilizadas nas análises proteômicas subsequentes.

Análise por eletroforese SDS-PAGE (12%)

A avaliação qualitativa do perfil proteico foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), utilizando géis contendo 12% (m/v) de acrilamida na fase de separação.

As amostras foram previamente homogeneizadas com tampão de amostra contendo SDS e agente redutor, aquecidas a 95 °C por 5 minutos para completa desnaturação proteica e aplicadas nos poços do gel em condições padronizadas por amostra após cada etapa de processamento.

A corrida eletroforética foi conduzida em sistema vertical Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, acoplado à fonte de alimentação PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), utilizando tampão Tris-glicina-SDS sob voltagem constante até adequada separação das bandas proteicas.

Após a eletroforese, os géis foram submetidos à coloração por prata, permitindo alta sensibilidade na detecção das proteínas. Posteriormente, os géis foram descorados até obtenção de contraste adequado para visualização do padrão de bandas.

Esse procedimento foi empregado ao longo do experimento para monitoramento da integridade proteica, avaliação de perdas durante as etapas de preparo e

comparação qualitativa entre diferentes estratégias de concentração e purificação.

4.11.1 Cultivo destinado à obtenção do EB

A obtenção do EB destinado à análise proteômica foi conduzida de acordo com as condições padrão de cultivo previamente descritas na seção 4.3.1, em alinhamento com o sistema modelo consolidado (Seção 4.8). Para esta etapa, adotou-se ponto temporal único de coleta, correspondente ao tempo previamente eleito para aprofundamento proteômico, não sendo realizado acompanhamento cinético seriado.

Foram estabelecidos monocultivos do sistema modelo de *T. reesei* RUT-C30 e basidiomiceto parceiro, bem como o cocultivo dessas linhagens. Com o objetivo de contrastar o perfil secretório sob condições metabólicas distintas, foram incluídos cultivos conduzidos exclusivamente em meio mínimo suplementado com glicose 1% (m/v), representando condição de carbono simples, em paralelo aos cultivos submetidos à condição indutiva com bagaço de cana-de-açúcar 1% (m/v), seção 4.1.3.

No total, foram obtidos 24 EBs destinados à espectrometria de massas, organizados em quatro réplicas biológicas por condição experimental (monocultivos e cocultivo sob glicose e bagaço de cana-de-açúcar).

4.11.2 Concentração e pré-purificação do EB

Para cada condição experimental foram conduzidas quatro réplicas biológicas independentes, abrangendo monocultivos e cocultivo do sistema modelo. Ao término do período de cultivo, 30 mL do caldo de cultura de cada réplica foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL, submetidos à filtração em membranas sintéticas para remoção do micélio, seguida de centrifugação a $10.000 \times g$ para completa clarificação do sobrenadante.

O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo cônico e submetido à liofilização completa, sendo posteriormente armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento para análise proteômica.

4.11.3 Estratégias de concentração e purificação avaliadas

Para avaliação comparativa dos métodos de concentração e purificação, uma alíquota do material liofilizado foi ressuspensa em 10 mL de água Milli-Q, resultando em concentração aproximada três vezes superior ao volume inicial processado. Após centrifugação a $10.000 \times g$ para remoção de material insolúvel, o sobrenadante foi dividido em três alíquotas de 3 mL em tubos cônicos de 15 mL e destinadas à aplicação dos diferentes métodos descritos a seguir.

4.11.3.1 Precipitação por acetona/NaCl

No método de precipitação química, cada alíquota de 3 mL foi suplementada com NaCl 3 M até atingir concentração final de 100 mM, seguida de homogeneização em vórtex. Posteriormente, foram adicionados quatro volumes de acetona gelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 mL por amostra), atingindo concentração final de 80% (v/v).

As amostras foram incubadas overnight a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para precipitação completa das proteínas. Após incubação, procedeu-se à centrifugação a $16.000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os pellets proteicos foram secos em fluxo laminar por 1 h.

Os pellets foram então ressuspensos em 500 μL de água Milli-Q, submetidos a nova centrifugação para remoção de resíduos insolúveis, e os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 2 mL e estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises subsequentes.

4.11.3.2 Ultrafiltração

A concentração por ultrafiltração foi realizada utilizando colunas Amicon® Ultra 4 mL com ponto de corte molecular (MWCO) de 3 kDa.

As amostras foram centrifugadas a $4.000 \times g$ até redução do volume para aproximadamente 500 μL . Em seguida, foram realizadas duas etapas de lavagem, adicionando-se água Milli-Q até o volume máximo da coluna, seguidas de nova centrifugação, com o objetivo de reduzir a presença de solutos de baixo peso molecular.

Ao final do processo, os concentrados foram recuperados e ajustados para volume final de 500 μ L em água Milli-Q, o *flow-through* foi transferido para microtubos de 2 mL e estocados a -80 °C para análises posteriores.

4.11.3.3 Diálise

Para o método de diálise, alíquotas de 3 mL do EB (EB) foram transferidas para sacos de diálise com ponto de corte molecular entre 12–14 kDa MWCO (Spectrum™ Labs Spectra Por™ 2) e incubadas a 4 °C.

O meio externo foi substituído a cada 3 h, durante um período total de 9 h, seguido de uma troca adicional overnight, visando a remoção eficiente de sais, açúcares e compostos de baixo peso molecular.

Após a conclusão da diálise, as amostras foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e submetidas à liofilização completa para reconcentração. O material seco foi ressuspenso em 500 μ L de água Milli-Q e centrifugado a $10.000 \times g$ para remoção de material particulado. Os sobrenadantes foram coletados para as análises subsequentes.

4.11.4 Critérios para definição do método definitivo

A definição do método definitivo de concentração e purificação do extrato bruto (EB) foi realizada com base em critérios quantitativos e qualitativos, considerando o rendimento proteico final, o percentual de recuperação em relação à massa inicial estimada, a integridade do perfil proteico avaliada por eletroforese e a reprodutibilidade entre réplicas biológicas. Após a aplicação dos três métodos avaliados precipitação por acetona/NaCl, ultrafiltração e diálise as amostras concentradas foram quantificadas por fluorimetria utilizando o kit Qubit™ Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), conforme descrito na Seção 4.11.1. As concentrações obtidas, expressas em μ g/mL, foram empregadas para estimar o rendimento absoluto e o percentual de recuperação proteica após cada estratégia de processamento.

Adicionalmente, a integridade e o perfil das proteínas recuperadas foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (m/v). Para cada amostra, foram aplicados 15 μ L do extrato na concentração final obtida

após o respectivo método de purificação. A corrida eletroforética foi conduzida sob condições desnaturantes padrão, permitindo comparação do padrão de bandas, presença de arraste proteico e possíveis perdas seletivas de proteínas de diferentes massas moleculares.

4.11.5 Diálise definitiva e dessalinização

Conforme discutido na Seção 4.11.3, após a avaliação comparativa das estratégias de concentração e purificação, foi definida a diálise como método mais adequado para o preparo do EB destinado à análise proteômica. Assim, procedeu-se à etapa definitiva de tratamento das amostras, aplicando-se o protocolo padronizado às demais réplicas biológicas previamente estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, garantindo uniformidade metodológica entre todas as amostras do sistema modelo.

Para essa etapa, foi utilizada membrana *SnakeSkin*[™] Dialysis Tubing (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com molecular weight cut-off (MWCO) de 3,5 kDa, adequada para retenção de proteínas de interesse e remoção eficiente de sais, açúcares e metabólitos de baixo peso molecular.

Cada amostra foi ajustada para volume final de 10 mL em água Milli-Q e transferida para segmentos de aproximadamente 10 cm da membrana previamente hidratada, respeitando a capacidade volumétrica recomendada pelo fabricante. As extremidades foram seladas com cliques apropriados, e os sachês de diálise foram mantidos completamente submersos durante todo o procedimento.

A diálise foi conduzida a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante, utilizando água destilada (H_2O_d) como meio externo. Em cada troca, foi empregado um volume de 1.000 mL (1 L) de água destilada por amostra, estabelecendo razão amostra: meio de 1:100, considerada adequada para promover dessalinização eficiente. O protocolo consistiu em quatro trocas sucessivas do meio externo a cada três horas, seguidas de uma troca adicional overnight, com duração aproximada de 12 horas, totalizando cinco trocas ao longo do procedimento.

Eficiência teórica de dessalinização: Considerando uma razão de diluição de 1:100 a cada troca, a fração remanescente de solutos de baixo peso molecular após n trocas podem ser estimada pela relação:

$$F = \left(\frac{1}{100}\right)^n$$

O que corresponde a uma diluição teórica de 1:10¹⁰, indicando remoção praticamente completa de pequenas moléculas inicialmente presentes no EB. Esse nível de dessalinização é compatível com etapas subsequentes de digestão proteolítica, cromatografia líquida e espectrometria de massas.

Após a conclusão da diálise, o conteúdo das membranas foi cuidadosamente recuperado, transferido para tubos cônicos de 15 mL e submetido à liofilização completa. O material seco foi ressuspenso em 1,5 mL de água Milli-Q, seguido de centrifugação para remoção de material particulado.

A eficiência do processo de dessalinização conforme descrito anteriormente (Seção 4.11.1) foi avaliada por meio da quantificação proteica por fluorimetria utilizando o sistema Qubit™ e eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, conduzida sob duas abordagens complementares: aplicação de volume padronizado (15 µL) por amostra e aplicação de massa proteica padronizada (10 µg) por amostra. Essa estratégia permitiu avaliar simultaneamente a concentração relativa e a integridade do perfil proteico, assegurando a qualidade das amostras. Após a quantificação fluorimétrica do EB, as amostras foram fracionadas em alíquotas contendo 100 µg de proteína total por condição experimental e completamente liofilizadas e então armazenados a -80 °C para as análises subsequentes.

4.11.6 Digestão proteolítica (redução, alquilação e tripsina)

Para a etapa de digestão, tampão TEAB (triethylammonium bicarbonate) 100 mM, pH 8,0, utilizado em todas as etapas do preparo proteômico, foi previamente desionizado por tratamento com resina Amberlite® (1% m/v), seguido de filtração em membrana de 0,22 µm, com o objetivo de remover íons

residuais e contaminantes que pudessem interferir na digestão enzimática e na análise por espectrometria de massas.

Cada pellet proteico foi ressuspenso em 50 μ L de solução desnaturante composta por ureia 8 M (grau proteômico) em TEAB 100 mM, pH 8,0. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e submetidas à sonicação por 5 minutos, para completa solubilização das proteínas.

Redução das pontes dissulfeto

Para redução dos resíduos de cisteína, foi adicionado DTT a partir de solução estoque de 100 mM, de modo a atingir concentração final de 10 mM. Foram adicionados 5 μ L de DTT 100 mM ao volume inicial de 50 μ L, resultando em volume final de 55 μ L. As amostras foram incubadas a 37 °C por 60 minutos em bloco térmico.

Alquilação dos resíduos de cisteína

Após a etapa de redução, foi adicionada iodoacetamida (IAA) a partir de solução estoque de 250 mM, para obtenção de concentração final de 25 mM. Foram adicionados 3 μ L de IAA 250 mM, totalizando volume aproximado de 58 μ L. A reação foi conduzida por **60** minutos à temperatura ambiente (25 °C), na ausência de luz, para evitar degradação da IAA.

Diluição da ureia

Para permitir digestão enzimática eficiente, a concentração de ureia foi reduzida pela adição de 350 μ L de TEAB 100 mM, pH 8,0, resultando em concentração final aproximada de 1 M de ureia. O volume final após essa etapa foi de aproximadamente 408 μ L.

Digestão enzimática com tripsina

A digestão proteolítica foi realizada por adição de tripsina modificada (Sequencing Grade, Promega) na proporção 1:50 (m/m; enzima : proteína). Para 100 μ g de proteína total, foram adicionados 2 μ g de tripsina, a partir de solução estoque preparada conforme instruções do fabricante.

As amostras foram incubadas a 37 °C por 16 horas (overnight), permitindo digestão completa das proteínas em peptídeos adequados para análise por LC–MS/MS.

4.11.7 Dessalinização peptídica em fase sólida

A dessalinização e purificação dos peptídeos gerados após digestão tripsínica foram realizadas por extração em fase sólida (SPE) em microescala, utilizando microcolunas montadas manualmente em ponteiras de 200 µL. Para esta etapa, foi empregado um mix 1:1 (v/v) das resinas POROS™ 20 R2 Reversed-Phase Resin e OLIGO™ R3 Reversed-Phase Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), com o objetivo de ampliar a eficiência de retenção de peptídeos com diferentes graus de hidrofobicidade.

4.11.7.1 Montagem da microcoluna em ponteira

Para montagem da microcoluna, um disco de membrana Empore™ SPE C18 (3M™, St. Paul, MN, EUA), foi recortado com diâmetro compatível com a extremidade inferior da ponteira e inserido no fundo utilizando agulha metálica, formando suporte mecânico para a fase estacionária. A mistura das resinas, previamente hidratada em acetonitrila 100%, foi homogeneizada e aproximadamente 200 µL da suspensão foram transferidos para o interior da ponteira. A compactação da fase estacionária foi realizada por centrifugação a 100 × g por 1 minuto, formando cama cromatográfica homogênea e estável.

4.11.7.2 Condicionamento da fase estacionária

Antes da aplicação das amostras, a microcoluna foi condicionada com três volumes de 200 µL de acetonitrila 100%, cada um seguido de centrifugação a 100 × g até completa passagem do solvente. Em seguida, a fase estacionária foi equilibrada com dois volumes de 200 µL de água Milli-Q contendo 0,1% (v/v) de TFA, também centrifugados a 100 × g, preparando a resina para retenção dos peptídeos em meio aquoso ácido.

4.11.7.3 Aplicação da amostra digerida

As amostras digeridas por tripsina (volume final aproximado de 400 µL) foram previamente acidificadas até pH < 3 mediante adição de 4 µL de ácido

fórmico concentrado, atingindo concentração final aproximada de 1% (v/v). Essa etapa promoveu a inativação da tripsina e a protonação dos peptídeos, favorecendo sua interação hidrofóbica com a fase estacionária. Volumes de 200 µL da amostra acidificada foram aplicados sobre a microcoluna e submetidos à centrifugação a 100 × g até completa passagem.

A microcoluna foi então submetida a três ciclos de lavagem com 200 µL de água Milli-Q contendo 0,1% de TFA, cada um seguido de centrifugação a 100 × g. Após as lavagens, a ponteira foi transferida para microtubo Safe-Lock® Protein LoBind de 1,5 mL (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). A eluição dos peptídeos foi realizada em duas etapas sequenciais, utilizando inicialmente 70 µL de acetonitrila 50% (v/v) contendo 0,1% de TFA, seguidos por acetonitrila 80% (v/v) contendo 0,1% de TFA. As frações eluídas foram combinadas e submetidas à secagem em concentrador centrífugo a vácuo (SpeedVac®, Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha), até completa remoção do solvente.

4.11.8 Determinação do rendimento peptídico

A concentração peptídica final foi determinada por fluorímetro utilizando o sistema Qubit™ Protein Assay, conforme seção 4.11.1. A massa total de peptídeos recuperada por amostra foi estimada multiplicando-se a concentração obtida (µg/mL) pelo volume final de ressuspensão (25 µL).

A recuperação percentual foi calculada considerando-se a carga inicial de 100 µg de proteína total utilizada na etapa de digestão proteolítica, de acordo com a seguinte relação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{massa final de peptídeos (\mu g)}}{100 \mu g} \times 100$$

Esse procedimento permitiu avaliar a eficiência global do preparo proteômico, incluindo as etapas de redução, alquilação, digestão enzimática, dessalinização e secagem.

Com base na concentração peptídica final obtida, foi padronizada a injeção de 4 µg de peptídeos por corrida de LC–MS/MS, garantindo

comparabilidade entre as condições experimentais e intensidade de sinal adequada nas análises proteômicas. Após a quantificação e ajuste de carga, as amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a subsequente aquisição por LC–MS/MS.

4.12 LC–MS/MS

4.12.1 Aquisição por nano-UHPLC acoplada ao Orbitrap (DDA)

As análises proteômicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, e gentilmente conduzidas pelo Prof. Dr. Wagner Fontes.

A análise por LC–MS/MS foi conduzida em sistema de nano-cromatografia líquida Dionex Ultimate 3000 nano-UHPLC (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna analítica de $75\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ cm}$, preenchida com partículas Reprosil-Pur C18 (120 \AA , $3\text{ }\mu\text{m}$) (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Alemanha), acoplada a uma coluna de captura de $100\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ cm}$, contendo o mesmo material de fase estacionária.

A aquisição de dados foi realizada utilizando estratégia de *Data-Dependent Acquisition* (DDA). Após cada varredura MS1, os 15 íons mais abundantes (Top15) foram selecionados para fragmentação por dissociação por colisão de alta energia, com energia normalizada de colisão de 35%.

Foi empregada janela de isolamento de 2 m/z e exclusão dinâmica de 90 segundos, minimizando repetição de fragmentação de precursores previamente analisados. Os espectros MS e MS/MS adquiridos garantiram profundidade analítica adequada para caracterização do repertório proteico presente no EB do sistema modelo.

4.12.2 Construção e utilização do banco de dados proteico

A identificação proteica por LC–MS/MS foi realizada utilizando um banco de sequências proteicas concatenado, derivado dos genomas das linhagens *T. reesei* RUT-C30 e *P. citrinopileatus* utilizados no projeto, cuja construção, anotação e curadoria bioinformática foram previamente descritas por Costa (2026). As proteínas preditas foram previamente anotadas por abordagem integrativa, combinando identificação de domínios conservados e famílias proteicas (InterPro/PFAM), classificação de enzimas CAZy por pipelines dedicados e anotação por similaridade contra bases curadas, com aplicação de critérios para priorização de descrições funcionais não redundantes e controle de qualidade.

Essa curadoria teve como objetivo aumentar a acurácia da atribuição taxonômica e funcional, reduzindo ambiguidades típicas de análises em cocultivo, nas quais a discriminação entre organismos depende criticamente de bancos contextualizados às linhagens e ao desenho experimental. Após a construção e curadoria do banco, as buscas proteômicas foram conduzidas sob estratégia *target–decoy* para controle de falso positivo. A tabela resultante foi posteriormente submetida à remoção de entradas *decoy/reverse* e contaminantes laboratoriais, seguida da aplicação de critérios mínimos de evidência peptídica e score de identificação, conforme descrito nas etapas subsequentes de curadoria bioinformática.

4.12.3 Estratégia de busca, critérios de identificação e controle de FDR

A identificação proteica foi realizada a partir dos dados globais de busca única (*single search*) disponibilizados pelo LBQP, considerando o conjunto completo de amostras em um único grupo de busca, sem estratificação por condição experimental (monocultivo de *P. citrinopileatus*, monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 ou cocultivo) nesta etapa. A busca espectral foi conduzida no software PEAKS sobre o banco concatenado descrito na Seção 4.12.2, sob estratégia *target–decoy* para controle de falso positivo. A etapa de identificação teve como objetivo principal detectar proteínas presentes no repertório total analisado e validar a qualidade global dos

procedimentos de extração, preparo e aquisição dos dados, não sendo empregada, nesta fase, para comparação quantitativa entre condições experimentais. O conjunto resultante foi, portanto, interpretado como um catálogo qualitativo consolidado das proteínas detectadas no sistema estudado. A validação inicial das identificações seguiu os critérios aplicados na busca espectral disponibilizada pelo LBQP, incluindo controle de taxa de falsa descoberta (FDR) e escore de identificação proteica. Para a curadoria subsequente realizada neste trabalho, a tabela exportada de proteínas identificadas foi utilizada como base primária para construção do conjunto qualitativo final de alta confiança, posteriormente refinado por filtros adicionais descritos na Seção 4.12.4.

4.12.4 Curadoria bioinformática em ambiente R

Após a etapa de identificação proteica e validação inicial conduzida no pipeline de busca espectral, foi realizada curadoria bioinformática adicional em ambiente R (versão 4.5.1; R Core Team, 2025) com o objetivo de aumentar a robustez da interpretação biológica e construir o conjunto qualitativo final utilizado neste trabalho.

Toda a modelagem e o tratamento estatístico foram conduzidos na linguagem R, utilizando a interface RStudio (Posit Software, Boston, MA, EUA). Foram empregados principalmente pacotes do ecossistema *tidyverse* (*readr*, *dplyr*, *tidyr*, *stringr* e *ggplot2*) para importação, manipulação e visualização dos dados, além do pacote *janitor* para padronização de variáveis e *openxlsx* para exportação estruturada das tabelas finais. Inicialmente, foram removidas entradas associadas a sequências decoy/reverse e a contaminantes experimentais comuns, como queratina, tripsina e albumina, com base em padrões textuais nos campos *description* e *accession*. Em seguida, aplicaram-se filtros adicionais de alta confiança, incluindo escore de identificação ($-10\lg P \geq 20$), identificação de pelo menos dois peptídeos ($\text{number_peptides} \geq 2$), presença de no mínimo um peptídeo único ($\text{number_unique} \geq 1$) e exclusão de registros com valores ausentes em variáveis essenciais. Essa etapa resultou na construção de um conjunto final qualitativo sustentado por evidência espectral robusta.

4.12.5 Atribuição taxonômica das proteínas

A atribuição taxonômica das proteínas filtradas foi realizada de forma heurística, com base nos campos disponíveis na tabela exportada da busca proteômica, especialmente *description* e *accession*. Proteínas contendo referência explícita a *T. reesei* RUT-C30 no campo *description* foram atribuídas a essa espécie, enquanto entradas contendo referência a *P. citrinopileatus* no campo *accession* foram atribuídas ao respectivo organismo. Registros sem correspondência inequívoca com nenhum dos dois critérios foram classificados como “Unresolved” e mantidos separadamente nas etapas subsequentes de curadoria. Essa atribuição taxonômica foi interpretada com base no conjunto das informações disponíveis no output exportado e deve ser considerada em conjunto com a evidência espectral e funcional associada a cada proteína identificada.

4.12.6 Classificação funcional e anotação de enzimas CAZy

Para tornar os resultados biologicamente interpretáveis no contexto da degradação lignocelulósica e das interações fúngicas, foi realizada anotação funcional baseada em correspondência de palavras-chave (*string matching* baseada em *Gene Ontology* - GO) aplicada ao campo *description*.

A classificação funcional foi conduzida de forma hierárquica. Na primeira etapa, as proteínas identificadas foram distribuídas em categorias amplas, incluindo enzimas CAZy (abrangendo atividades relacionadas à degradação de celulose, hemicelulose, pectina, glicosil hidrolases não especificadas e módulos de ligação a carboidratos CBMs), enzimas redox associadas à degradação de lignina e compostos aromáticos (lacases, peroxidases, oxidoredutases e mono/dioxigenases do tipo P450), hidrofobinas e proteínas de superfície, proteases e componentes do sistema ubiquitina-proteassoma, proteínas envolvidas em transporte de membrana, metabolismo geral, processos ribossomais, além de proteínas relacionadas à regulação gênica e resposta a estresse. Em etapa subsequente, as proteínas inicialmente classificadas como “Outras funções celulares” foram redistribuídas em subcategorias adicionais, incluindo proteínas hipotéticas ou não caracterizadas, proteínas associadas a DNA/RNA (replicação, reparo e processamento), estrutura e citoesqueleto,

tráfego vesicular, metabolismo adicional e proteínas de membrana genéricas. Essa abordagem permitiu reduzir a proporção de categorias não resolvidas e aumentar a resolução funcional da análise.

4.12.7 Análise de enriquecimento funcional

A caracterização descritiva do *dataset* incluiu o cálculo de frequências absolutas (n) e relativas (%) de proteínas por organismo e por classe funcional, bem como percentuais dentro de cada organismo e participação relativa de cada organismo dentro de cada classe.

Para avaliar diferenças na distribuição funcional entre *T. reesei* RUT-C30 e *P. citrinopileatus*, foi realizada análise de enriquecimento por classe funcional utilizando o teste exato de Fisher, apropriado para dados categóricos baseados em contagens.

Para cada classe funcional contendo pelo menos três proteínas no conjunto total, foi construída uma matriz de contingência 2×2 considerando o número de proteínas pertencentes e não pertencentes à respectiva classe em cada organismo. A partir dessa matriz foram estimados o *odds ratio* (OR), o intervalo de confiança de 95% e o valor de p associado à comparação. Para controle do erro do tipo I decorrente de múltiplas comparações, os valores de p foram ajustados pelo método de Benjamini–Hochberg, com controle da taxa de falsa descoberta (FDR), adotando-se p ajustado < 0,05 como critério de significância estatística.

Valores de OR > 1 foram interpretados como enriquecimento relativo em *T. reesei*, enquanto OR < 1 indicaram enriquecimento relativo em *P. citrinopileatus*. Os resultados foram visualizados por meio de gráfico do tipo *forest plot* em escala logarítmica (\log_{10})

4.13 Considerações metodológicas finais

Considerando que a busca proteômica foi conduzida de forma agregada e que a análise foi baseada em presença/ausência de proteínas identificadas, os resultados descrevem o repertório global de proteínas detectadas e sua distribuição funcional relativa, não permitindo inferências quantitativas sobre

diferenças de abundância entre condições experimentais na ausência de dados quantitativos específicos por amostra.

A atribuição taxonômica baseada em heurísticas textuais foi empregada como estratégia operacional de classificação, devendo ser interpretada em conjunto com as evidências espectrais de identificação (escore, número de peptídeos totais e peptídeos únicos), assegurando maior confiabilidade na interpretação biológica dos resultados.

5 Resultados

5.1 *Screening* de interações fúngicas em meio sólido

5.1.1 Caracterização morfológica dos monocultivos

O crescimento micelial dos isolados foi avaliado em meio BDA com o objetivo de caracterizar parâmetros macroscópicos da morfologia colonial, incluindo padrão de expansão radial, organização estrutural do micélio, densidade e distribuição do micélio aéreo, regularidade do bordo colonial e alterações de pigmentação no anverso e reverso das placas (Figura 4).

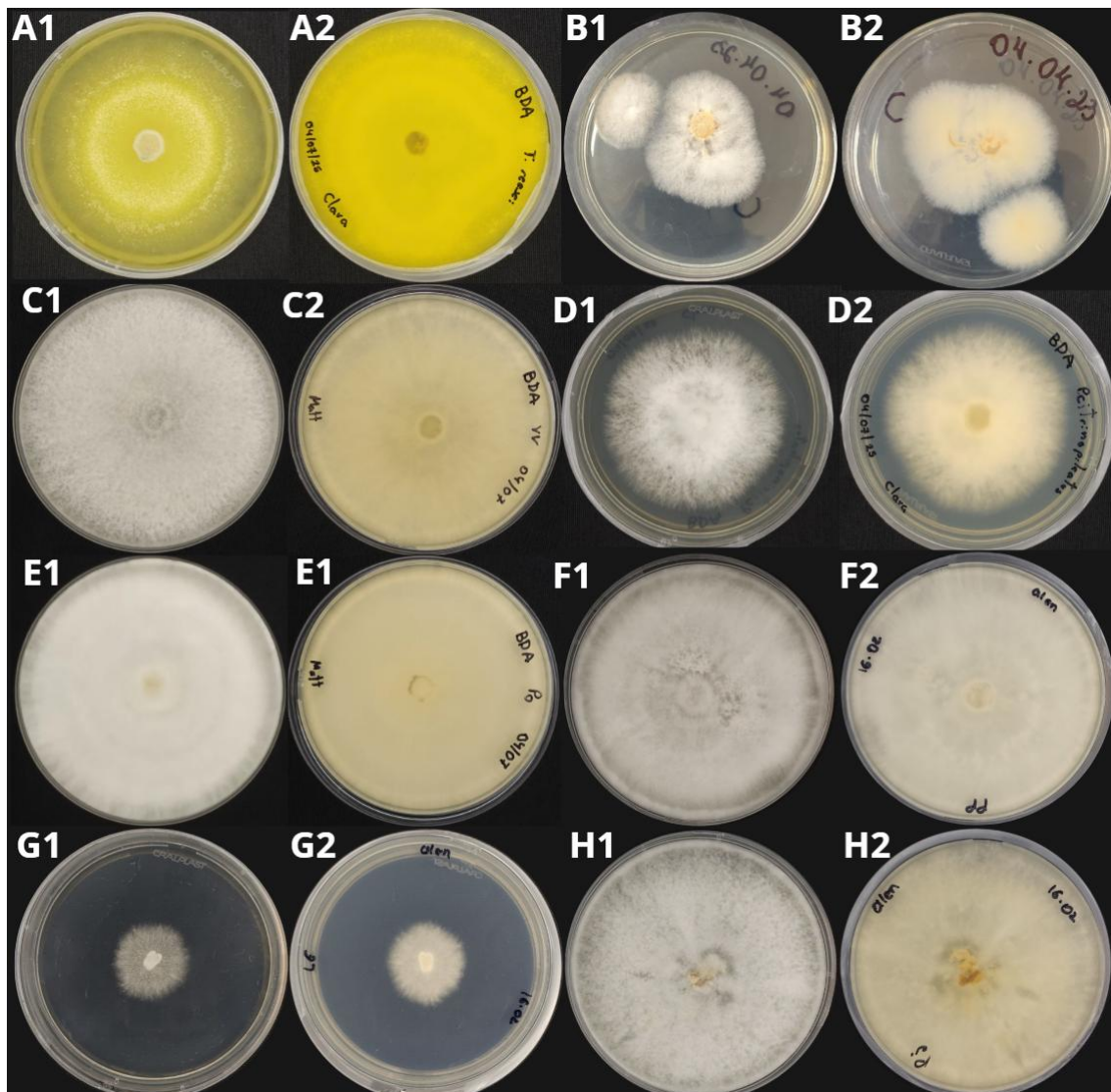


Figura 4: Caracterização macroscópica do crescimento micelial em monocultivo em meio BDA após 7 dias de incubação: *T. reesei* RUT-C30 (A1: anverso; A2: reverso); *C. byssicola* (B1: anverso; B2: reverso); *B. adusta* (C1: anverso; C2: reverso); *P. citrinopileatus* (D1: anverso; D2: reverso); *P. ostreatus* (E1: anverso; E2: reverso); *P. pulmonarius* (F1: anverso; F2: reverso); *L. edodes* (G1: anverso; G2: reverso); *P. djamari* (H1: anverso; H2: reverso).

T. reesei RUT-C30 (Figura 4 A1-A2) apresentou crescimento radial rápido e homogêneo, com ocupação praticamente completa da superfície da placa após sete dias de incubação. A colônia exibiu organização centrífuga regular, com micélio aéreo moderadamente abundante e aspecto pulverulento, de baixa compactação estrutural, associado à esporulação. A coloração inicial amarelada evoluiu para tonalidade levemente esverdeada, compatível com a formação de conídios. A borda da colônia mostrou-se contínua, regular e bem delimitado. No reverso, observou-se pigmentação amarelada difusa, sem evidências de exsudação intensa ou difusão significativa de metabólitos no meio.

C. byssicola (Figura 4 B1-B2) apresentou crescimento não radial, com padrão morfológico heterogêneo e formação de múltiplos focos de crescimento de hifa, caracterizando organização de colônia amorfa. A colônia não atingiu a borda da placa após sete dias de incubação. O micélio apresentou textura algodonosa de baixa densidade estrutural, com pigmentação discretamente rosada no anverso e leve tonalidade rosada no reverso. Não foram observadas alterações estruturais do meio que indicassem penetração hifal acentuada ou difusão expressiva de metabólitos pigmentados.

B. adusta (Figura 4 C1 -C2) exibiu crescimento radial expansivo, cobrindo integralmente a superfície da placa no período avaliado. A colônia apresentou micélio aéreo abundante, de aspecto algodonososo, com organização filamentosa relativamente dispersa na periferia. Observou-se formação de zonas concêntricas de maior densidade micelial, conferindo aspecto levemente zonado ao crescimento. Essas regiões apresentaram maior compactação estrutural quando comparadas às áreas interzonais, sugerindo variação na densidade de ramificação das hifas ao longo da expansão centrífuga. A coloração manteve-se branca no anverso. No reverso, não foram observadas alterações pigmentares relevantes, mantendo-se as características originais do meio.

P. citrinopileatus (Figura 4 D1-D2) apresentou crescimento radial moderado, mantendo padrão centrífugo regular, porém sem atingir completamente a borda da placa após sete dias. A colônia caracterizou-se por micélio denso e aderido ao substrato, com formação abundante de micélio aéreo de textura algodonosa compacta. A coloração manteve-se branca ao longo do período experimental. No reverso, não foram observadas alterações pigmentares significativas.

P. ostreatus (Figura 4 E1-E2) apresentou crescimento vigoroso, com elevada densidade micelial e organização homogênea, ocupando grande parte da superfície da placa no período avaliado. A colônia exibiu textura lanosa, com micélio aéreo espesso e bem desenvolvido, formando uma camada tridimensional perceptível sobre o substrato. O padrão de expansão foi radial e centrífugo, com margens regulares e contínuas, sem evidência de setorização. Observou-se maior compactação estrutural na região central, com transição

gradual para periferia levemente mais difusa. A coloração manteve-se branca ao longo do período experimental. No reverso não foram observadas alterações pigmentares nem difusão de metabólitos no meio.

P. pulmonarius (Figura 4 F1-F2) exibiu crescimento radial expansivo, cobrindo integralmente a superfície da placa no período avaliado. A colônia apresentou micélio aéreo abundante, de aspecto algodinoso, com organização filamentosa homogênea. A coloração manteve-se branca no anverso ao longo do período experimental. No reverso, não foram observadas alterações pigmentares relevantes, preservando-se as características originais do meio.

L. edodes (Figura 4 G1-G2) apresentou crescimento radial lento, mantendo padrão centrífugo regular, porém com expansão limitada, não atingindo a borda da placa após sete dias de incubação. A colônia caracterizou-se por micélio denso e fortemente aderido ao substrato, com formação de micélio aéreo de textura algodinosa compacta. A coloração manteve-se branca ao longo do período experimental. No reverso, não foram observadas alterações pigmentares significativas.

P. djamor (Figura 4 H1- H2) exibiu crescimento radial expansivo, cobrindo integralmente a superfície da placa no período avaliado. A colônia apresentou micélio aéreo abundante, de aspecto algodinoso, com organização filamentosa homogênea. A coloração manteve-se predominantemente branca no anverso, sendo observada discreta pigmentação rosada na região de origem e maior densidade micelial. No reverso, não foram observadas alterações pigmentares relevantes, mantendo-se as características originais do meio.

De modo geral, os isolados apresentaram contrastes marcantes quanto à taxa de expansão radial, densidade e organização do micélio aéreo, bem como na produção de pigmentos. Espécies com crescimento mais acelerado apresentaram rápida colonização da superfície, enquanto basidiomicetos tenderam a formar colônias mais densas e estruturalmente organizadas.

A Tabela 3 evidencia de forma sistemática diferenças entre os isolados quanto à expansão radial, organização estrutural e densidade do micélio aéreo. *T. reesei* RUT-C30 e *B. adusta* apresentaram crescimento rápido e cobertura

completa da placa, enquanto *C. byssicola* e *P. citrinopileatus* exibiram expansão mais lenta e cobertura parcial após sete dias. Predominou textura algodonosa, com variações na compactação micelial; *P. ostreatus* destacou-se pela textura lanosa e maior coesão estrutural, ao passo que *C. byssicola* apresentou crescimento menos compacto e morfologicamente heterogêneo. Zonamento concêntrico foi observado apenas em *B. adusta*. Alteração cromática associada à esporulação ocorreu exclusivamente em *T. reesei*, enquanto os demais isolados mantiveram coloração branca e ausência de pigmentação difusível. Em conjunto, os resultados demonstram variações estruturais relevantes entre os isolados, estabelecendo parâmetros comparativos para os ensaios de cocultivo.

Tabela 3 - Caracterização macroscópica do crescimento micelial dos isolados em monocultivo em meio BDA após 7 dias de incubação. São apresentados os padrões de expansão radial, densidade e organização do micélio aéreo, textura superficial da colônia, presença de zonamento, alterações de pigmentação no anverso e reverso das placas e grau de cobertura da superfície do meio sólido.

Espécie	Figura	Padrão de crescimento	Expansão	Micélio aéreo	Textura	Zonamento	Pigmentação (anverso)	Pigmentação (reverso)	Cobertura
<i>T. reesei</i>	A1–A2	Radial homogêneo	Rápida	Moderado	Pulverulenta	Concêntrico	Amarelada/ esverdeada	Amarelada difusa	Completa
<i>C. byssicola</i>	B1–B2	Amorfo / não radial	Lenta	Moderado	Algodonosa	Ausente	Branca/rosada	Levemente rosada	Parcial
<i>B. adusta</i>	C1–C2	Radial expansivo	Rápida	Abundante	Algodonosa	Concêntrico	Branca	Sem alteração	Completa
<i>P. citrinopileatus</i>	D1–D2	Radial homogêneo	Moderada	Abundante	Algodonosa	Ausente	Branca	Sem alteração	Parcial
<i>P. ostreatus</i>	E1–E2	Radial homogêneo	Rápida	Abundante	Lanosa	Ausente	Branca	Sem alteração	Completa
<i>P. pulmonarius</i>	F1–F2	Radial	Rápida	Abundante	Abundante	Ausente	Branca	Sem alteração	Completa
<i>L. edodes</i>	G1–G2	Radial	Lenta	Abundante	Abundante	Ausente	Branca	Sem alteração	Parcial
<i>P. djamor</i>	H1–H2	Radial	Rápida	Abundante	Abundante	Ausente	Branca/rosada	Sem alteração	Completa

Tabela 4: Caracterização macroscópica das interações em cocultivo entre *T. reesei* RUT-C30 e os demais isolados em meio BDA (7 dias), incluindo dominância radial, tipo de zona de contato, interpenetração hifal, modulação estrutural na interface e classificação da interação.

Combinação	Código	Dominância radial	Zona de contato	Interpenetração hifal	Modulação estrutural na interface	Tipo de interação
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>P. citrinopileatus</i>	A1–A2	Predomínio de <i>T. reesei</i>	Parcialmente definida	Interpenetração superficial	Alteração local da densidade micelial	Competitiva com coexistência
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>P. pulmonarius</i>	B1–B2	Predomínio de <i>T. reesei</i>	Parcialmente definida	Interpenetração superficial	Alteração local da densidade micelial	Competitiva com coexistência
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>P. djamor</i>	C1–C2	Predomínio de <i>T. reesei</i>	Definida	Ausente	Delimitação nítida sem reorganização evidente	Competitiva com coexistência
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>B. adusta</i>	D1–D2	Equilibrado	Definida	Ausente	Alteração local da densidade micelial	Competitiva com coexistência
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>C. byssicola</i>	E1–E2	Predomínio acentuado de <i>T. reesei</i>	Difusa	Ausente	Delimitação nítida sem reorganização evidente	Competitiva com repressão
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>L. edodes</i>	F1–F2	Predomínio acentuado de <i>T. reesei</i>	Difusa	Ausente	Delimitação nítida sem reorganização evidente	Competitiva com dominância (<i>T. reesei</i>)
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>P. ostreatus</i>	G1–G2	Predomínio de <i>T. reesei</i>	Parcialmente definida	Interpenetração superficial	Alteração local da densidade micelial	Competitiva com coexistência

5.1.2 Caracterização das interações em cocultivo

As interações interespecíficas foram avaliadas em ensaios de cocultivo em meio BDA, com inoculação simultânea de *T. reesei* RUT-C30 e cada um dos isolados previamente caracterizados em monocultivo (Figura 5). A análise concentrou-se na dinâmica de expansão radial, formação de zonas de contato, ocorrência de sobreposição hifal e alterações morfológicas na interface de interação.

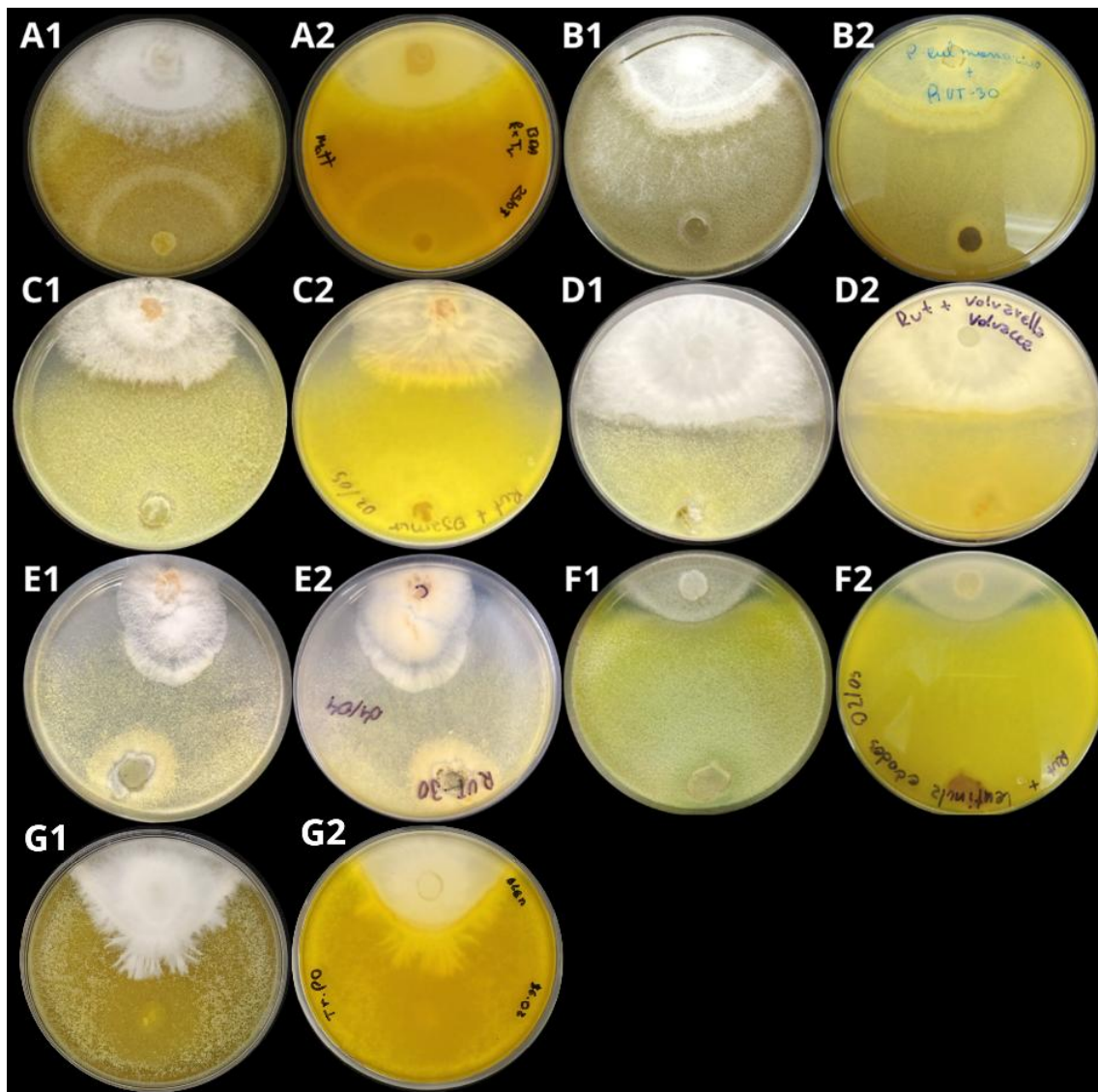


Figura 5: Caracterização macroscópica das interações interespecíficas em cocultivo em meio BDA após 7 dias de incubação: *T. reesei* RUT-C30 + *P. citrinopileatus* (A1: anverso; A2: reverso); *T. reesei* RUT-C30 + *P. pulmonarius* (B1: anverso; B2: reverso); *T. reesei* RUT-C30 + *P. djamor* (C1: anverso; C2: reverso); *T. reesei* RUT-C30 + *B. adusta* (D1: anverso; D2: reverso); *T. reesei* RUT-C30 + *C. byssicola* (E1: anverso; E2: reverso); *T. reesei* RUT-C30 + *L. edodes* (F1: anverso; F2: reverso).

No cocultivo entre *T. reesei* RUT-C30 e *P. citrinopileatus* (Figura 5 A1–A2), observou-se crescimento diferencial entre os isolados, com predominância inicial da expansão radial de *T. reesei*. Durante o crescimento, foi evidenciada a formação de um halo radial intermediário, correspondente a aproximadamente metade da extensão da colônia, caracterizado por maior densidade micelial. Na região de contato, verificou-se formação de faixa delimitadora perceptível, associada à redução do crescimento radial de *P. citrinopileatus*. Foi observada sobreposição parcial das colônias, com hifas aéreas de *P. citrinopileatus* avançando sobre o micélio de *T. reesei*. Apesar da interação competitiva, não se estabeleceu uma delimitação espacial completamente definida, e ambos os organismos mantiveram coexistência, preservando características morfológicas semelhantes às observadas em monocultivo.

No cocultivo com *P. pulmonarius* (Figura 5 B1–B2), observou-se padrão semelhante, com avanço mais rápido de *T. reesei* RUT-C30 em direção à região central da placa. A zona de contato apresentou faixa delimitadora evidente, associada à redução da expansão radial do basidiomiceto. Também foi observada sobreposição parcial, com hifas aéreas de *P. pulmonarius* se projetando sobre o micélio de *T. reesei*. Assim como na interação anterior, ambos os organismos mantiveram coexistência e preservaram suas características morfológicas típicas.

Na interação com *P. djamor* (Figura 5 C1–C2), observou-se avanço predominante de *T. reesei*, embora seu crescimento não tenha atingido completamente as porções laterais adjacentes ao micélio do basidiomiceto. A formação de faixa delimitadora na interface foi evidente, acompanhada de redução da expansão radial de *P. djamor*. Diferentemente das interações anteriores, não foi observada sobreposição hifal significativa entre as colônias. A coexistência foi mantida, com domínio espacial mais acentuado de *T. reesei*, mantendo-se as características estruturais previamente descritas em monocultivo.

No cocultivo entre *T. reesei* RUT-C30 e *B. adusta* (Figura 5 –D2), observou-se crescimento relativamente equilibrado, com ocupação aproximada de 50% da superfície da placa por cada organismo. A zona de contato

estabeleceu-se de forma bem definida na região central, mantendo-se a organização estrutural característica de ambas as espécies. O padrão zonado previamente observado em *B. adusta* mostrou-se menos evidente nas proximidades da interface, indicando modulação local da densidade micelial.

A interação com *C. byssicola* (Figura 5 E1–E2) apresentou padrão distinto, caracterizado por crescimento irregular e ausência de sobreposição hifal na região de contato. Observou-se redução da heterogeneidade estrutural de *C. byssicola* próxima à interface, associada à menor densidade micelial e redução do avanço radial de *T. reesei* RUT-C30 na região adjacente.

No cocultivo com *L. edodes* (Figura 5 F1–F2), observou-se crescimento radial mais lento do basidiomiceto, com avanço predominante de *T. reesei*. A zona de contato apresentou delimitação clara, sem evidência de interpenetração profunda das colônias, mantendo-se uma fronteira micelial estável até o final do período de incubação.

No cocultivo com *P. ostreatus* (Figura 5 G1–G2), observou-se, avanço rápido de *T. reesei* RUT-C30 em direção à região central da placa. A zona de contato apresentou faixa delimitadora evidente, associada à redução da expansão radial do basidiomiceto. Também foi observada sobreposição parcial, com hifas aéreas de *P. ostreatus* se projetando sobre o micélio de *T. reesei*, ambos os organismos mantiveram coexistência e preservaram suas características morfológicas típicas.

De maneira geral, as interações em cocultivo foram caracterizadas por predominância variável do crescimento radial de *T. reesei*, formação de zonas de contato delimitadas e diferentes graus de sobreposição hifal e modulação estrutural na interface. As combinações testadas evidenciaram padrões distintos de competição espacial e reorganização morfológica entre os isolados.

A análise comparativa apresentada na Tabela 4 evidencia que as interações em cocultivo foram predominantemente caracterizadas por competição espacial, com diferentes graus de dominância radial de *T. reesei*. Nas combinações com *P. citrinopileatus* e *P. pulmonarius*, observou-se estabelecimento de zonas de exclusão parcial associadas à interpenetração

superficial das hifas dos basidiomicetos, configurando interações competitivas com coexistência. Já na interação com *P. djamor*, a ausência de interpenetração e a presença de zona de exclusão mais definida indicaram padrão competitivo dominante de *T. reesei*. O cocultivo com *B. adusta* apresentou distribuição espacial equilibrada, com formação de barreira micelial central e modulação do padrão zonado previamente observado em monocultivo, caracterizando interação equilibrada competitiva. Por sua vez, a interação com *C. byssicola* resultou em zona de contato difusa e modulação estrutural mútua, enquanto o cocultivo com *L. edodes* evidenciou formação de fronteira micelial estável sem interpenetração significativa. Em conjunto, os dados demonstram que, embora a competição espacial tenha sido o padrão predominante, o grau de dominância e reorganização estrutural na interface variou conforme a combinação interespecífica avaliada.

5.1.3 Síntese comparativa das interações observadas

A caracterização morfológica dos monocultivos (Figura 4; Tabela 3) evidenciou diferenças estruturais entre os isolados quanto à taxa de expansão radial, densidade micelial, organização do micélio aéreo e produção de pigmentos. *T. reesei* RUT-C30 destacou-se pelo crescimento radial rápido e pela esporulação precoce, enquanto *B. adusta* apresentou expansão igualmente rápida, associada à formação de zonamento concêntrico. Entre os basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, observou-se crescimento radial moderado a vigoroso, com elevada densidade micelial e organização estrutural homogênea, ao passo que *C. byssicola* exibiu padrão amorfo e crescimento menos compacto.

Nos ensaios de cocultivo (Figura 5; Tabela 4), verificou-se predominância variável de *T. reesei* RUT-C30 na ocupação espacial, com estabelecimento de diferentes padrões de zona de contato, incluindo exclusão parcial, barreira micelial definida e fronteira estável. As interações com *P. citrinopileatus*, *P. pulmonarius* e *P. ostreatus*, foram caracterizadas por competição com coexistência e interpenetração superficial. A interação com *P. djamor* apresentou dominância mais acentuada de *T. reesei*, com zona de exclusão definida e ausência de interpenetração significativa. O cocultivo com *B. adusta* evidenciou

crescimento espacial equilibrado entre os organismos e atenuação do padrão zonado observado em monocultivo. Já a interação com *C. byssicola* resultou em modulação estrutural mútua na região de contato.

Com base nesses padrões, foram selecionados para as etapas subsequentes *B. adusta*, *P. citrinopileatus*, *P. pulmonarius* e *C. byssicola*. *B. adusta* foi incluída em razão do crescimento espacial equilibrado e da modulação do zonamento na interface. *P. citrinopileatus*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* foram selecionados por apresentarem interação competitiva com coexistência e interpenetração superficial. A inclusão de *C. byssicola* permitiu estabelecer uma condição comparativa entre ascomicetos, funcionando como referência para avaliação de interações intra-filo.

Por outro lado, *P. djamor* e *L. edodes* não foram priorizados em razão da predominância mais evidente de *T. reesei* RUT-C30 e da formação de zonas de exclusão mais definidas. *P. ostreatus*, embora tenha apresentado crescimento vigoroso em monocultivo, não exibiu padrão de interação contrastante em relação aos demais basidiomicetos avaliados.

Em conjunto, os resultados do screening em meio sólido forneceram critérios objetivos para a seleção das combinações submetidas à triagem funcional em meio líquido.

5.2 Screening funcional em meio líquido

5.2.1 Atividades celulolíticas no screening de 7 dias

O *screening* funcional em meio suplementar + BCA padrão foi realizado após sete dias de cultivo, com determinação das atividades de CMCase, mananase, pectinase e xilanase. Foram avaliados os monocultivos dos organismos definidos na seção anterior (*B. adusta*, *P. citrinopileatus*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* e *C. byssicola*), os cultivos contendo *T. reesei* RUT-C30 e os respectivos cocultivos entre *T. reesei* RUT-C30 e cada organismo parceiro. As comparações estatísticas foram conduzidas dentro de cada sistema independente, com ajuste de Sidak ($p < 0,05$), conforme apresentado na Figura 6, na qual as letras indicam diferenças estatísticas entre tratamentos.

Letras: Sidak ($p < 0,05$) dentro de cada organismo - dia 7

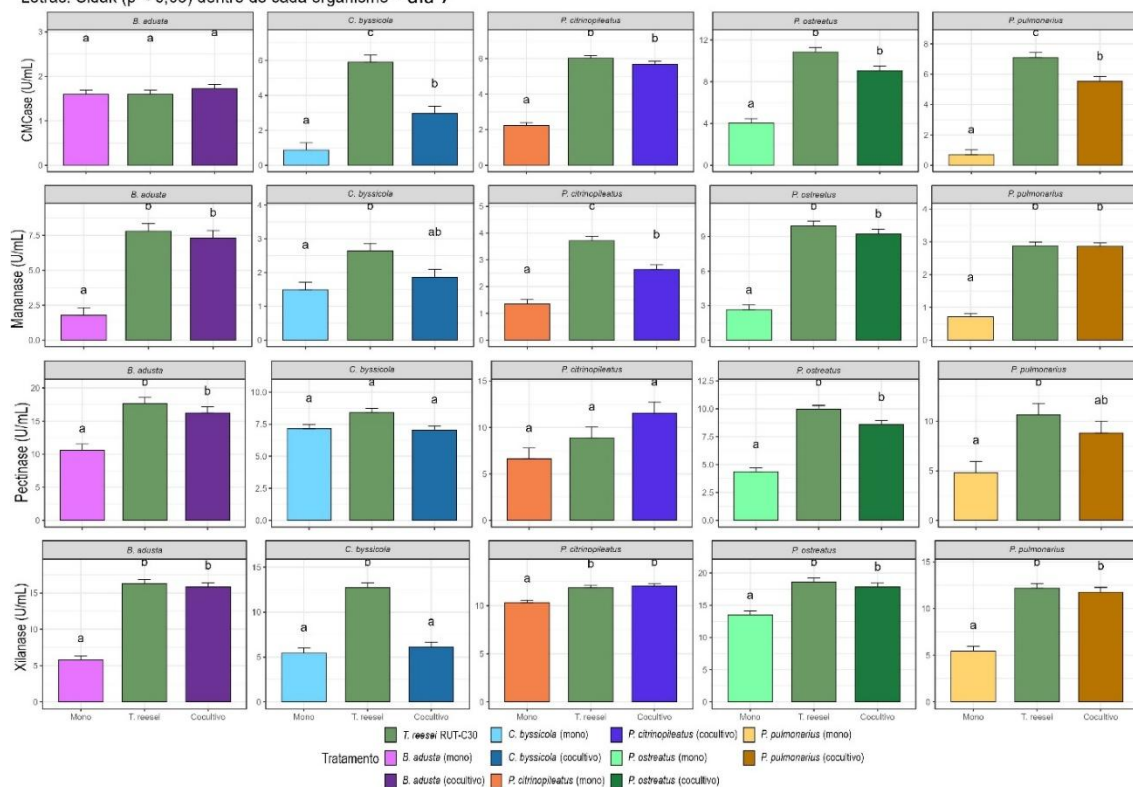


Figura 6: Atividades de CMCCase, mananase, pectinase e xilanase após sete dias de cultivo em meio líquido. Os sistemas estão organizados, da esquerda para a direita, como *B. adusta*, *C. byssicola*, *P. citrinopileatus*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*. Em cada sistema, os tratamentos seguem a ordem: monocultivo do organismo parceiro, cultivo contendo *T. reesei* RUT-C30 e cocultivo. As barras representam médias ajustadas ($\bar{emmeans}$) \pm erro padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre tratamentos dentro de cada sistema (Sidak, $p < 0,05$).

De maneira geral, a presença de *T. reesei* RUT-C30 promoveu incremento significativo das atividades enzimáticas em relação aos monocultivos dos parceiros fúngicos (Figura 6). Entretanto, ao comparar especificamente o cocultivo com o tratamento contendo *T. reesei*, verificou-se que o cocultivo superou os valores observados para o cultivo contendo apenas *T. reesei* RUT-C30 no sistema apenas em situações específicas e sem suporte estatístico.

Para CMCCase, apenas o sistema envolvendo *B. adusta* apresentou valor numericamente superior no cocultivo em relação ao cultivo contendo *T. reesei*. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa, conforme indicado pelas letras de significância. No caso da mananase não foram observados sistemas em que o cocultivo apresentasse valores superiores ao cultivo contendo *T. reesei*. Em todos os organismos avaliados, os valores foram equivalentes ou inferiores. Para pectinase o sistema envolvendo *P.*

citrinopileatus apresentou atividade numericamente superior no cocultivo quando comparado ao cultivo contendo *T. reesei*. Entretanto, essa diferença também não foi estatisticamente significativa. Situação semelhante foi observada para xilanase no mesmo sistema, em que o cocultivo apresentou valor ligeiramente superior, porém sem distinção estatística.

Em conjunto, os resultados indicam que, no sétimo dia de cultivo, os sistemas contendo *T. reesei* RUT-C30 apresentaram atividades superiores aos monocultivos dos organismos parceiros. Contudo, não foi observada superioridade estatística do cocultivo em relação ao cultivo contendo apenas *T. reesei* RUT-C30 para nenhuma das enzimas avaliadas no ponto temporal analisado. Em algumas combinações, verificaram-se incrementos numéricos no cocultivo, porém sem distinção estatística entre os tratamentos.

5.2.2 Comparação monocultivos vs cocultivos

A comparação direta entre o cultivo contendo *T. reesei* RUT-C30 e respectivo cocultivo no sétimo dia de incubação está sintetizada na Tabela 5. Considerando todas as enzimas e organismos avaliados, verificou-se que, na maioria das combinações, os valores do cocultivo foram estatisticamente equivalentes aos observados para o cultivo contendo *T. reesei* RUT-C30 (Figura 6).

Tabela 5: Condições em que o cocultivo apresentou atividade enzimática numericamente superior ao cultivo contendo *T. reesei* RUT-C30 após sete dias de cultivo em meio líquido. São apresentados os valores médios de atividade (U/mL) para cada enzima avaliada. A significância estatística foi determinada pelo teste de Sidak ($p < 0,05$).

Organismo parceiro	Enzima	<i>T. reesei</i> RUT-C30 (U/mL)	Cocultivo (U/mL)	Cocultivo > cultivo <i>T. reesei</i>	Diferença estatística
<i>B. adusta</i>	CMCase	1,59	1,72	Sim	Não
<i>P. citrinopileatus</i>	Pectinase	8,88	11,6	Sim	Não
<i>P. citrinopileatus</i>	Xilanase	11,8	12,0	Sim	Não

Conforme apresentado na Tabela 5: Condições em que o cocultivo apresentou atividade enzimática numericamente superior ao cultivo contendo *T. reesei* RUT-C30 após sete dias de cultivo em meio líquido. São apresentados os valores médios de atividade (U/mL) para cada enzima avaliada. A significância estatística foi determinada pelo teste de Sidak ($p < 0,05$)., apenas três situações

apresentaram valores numericamente superiores no cocultivo em relação ao cultivo contendo *T. reesei*: (i) o sistema envolvendo *B. adusta* para CMCase (1,72 U/mL no cocultivo versus 1,59 U/mL no cultivo contendo *T. reesei*); (ii) o sistema envolvendo *P. citrinopileatus* para pectinase (11,6 U/mL versus 8,88 U/mL); e (iii) o mesmo organismo para xilanase (12,0 U/mL versus 11,8 U/mL).

Entretanto, em nenhuma dessas condições foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos, conforme indicado pelas letras de significância na Figura 6. Para todas as demais combinações analisadas, o cultivo contendo *T. reesei* RUT-C30 apresentou valores iguais ou superiores ao cocultivo, não sendo detectada superioridade estatística do cocultivo em relação ao tratamento contendo apenas *T. reesei* RUT-C30 no ponto temporal avaliado.

5.2.3 Seleção do sistema modelo

A definição do sistema modelo considerou de forma integrada: (i) a magnitude absoluta das atividades enzimáticas, (ii) o desempenho do cocultivo em relação ao monocultivo do parceiro, (iii) a consistência entre enzimas avaliadas e (iv) a coerência com os padrões morfológicos observados em meio sólido.

Dentre as combinações analisadas, o sistema envolvendo *P. citrinopileatus* e *T. reesei* RUT-C30 apresentou valores absolutos elevados para múltiplas enzimas hidrolíticas, com incremento significativo do cocultivo em relação ao monocultivo do parceiro fúngico. Além disso, foram observadas tendências numéricas de aumento para pectinase e xilanase no cocultivo, ainda que sem distinção estatística em relação ao cultivo contendo apenas *T. reesei*.

Considerando o desempenho funcional global e a interação morfológica previamente caracterizada, essa combinação foi selecionada como sistema modelo para as análises cinéticas subsequentes.

5.3 Consolidação e caracterização cinética do sistema modelo (9 dias)

5.3.1 Consolidação dos ensaios independentes e controle de variabilidade experimental

A caracterização das atividades enzimáticas ao longo do tempo foi inicialmente conduzida a partir da concatenação de cinco ensaios independentes, realizados em momentos distintos sob condições experimentais idênticas, com amostragem diária ao longo de nove dias. Para cada enzima avaliada (CMCase, mananase, pectinase e xilanase) foram obtidas 1.719 leituras brutas de absorbância, correspondentes às réplicas técnicas distribuídas entre tratamentos e dias. Após correção por brancos específicos (por dia e/ou tratamento, conforme aplicável) e consolidação das réplicas técnicas por média, o conjunto de dados foi reduzido para 405 observações por enzima, representando as unidades experimentais no nível de réplica biológica.

A triagem de valores extremos no nível biológico (tratamento × dia × ensaio independente) não identificou outliers extremos para nenhuma das enzimas (total_out = 0). Entretanto, a inspeção exploratória dos dados revelou heterogeneidade entre ensaios em pontos específicos da cinética. A visualização das curvas de atividade estratificadas por ensaio independente evidenciou discrepância pontual associada ao ensaio 1 no dia 7, com deslocamento consistente em relação aos demais ensaios. Essa diferença tornou-se particularmente evidente nos boxplots de distribuição por ensaio para o dia 7 (Figura 7), nos quais o ensaio 1 apresentava valores sistematicamente superiores aos demais, sugerindo influência desproporcional sobre as médias estimadas desse ponto temporal.

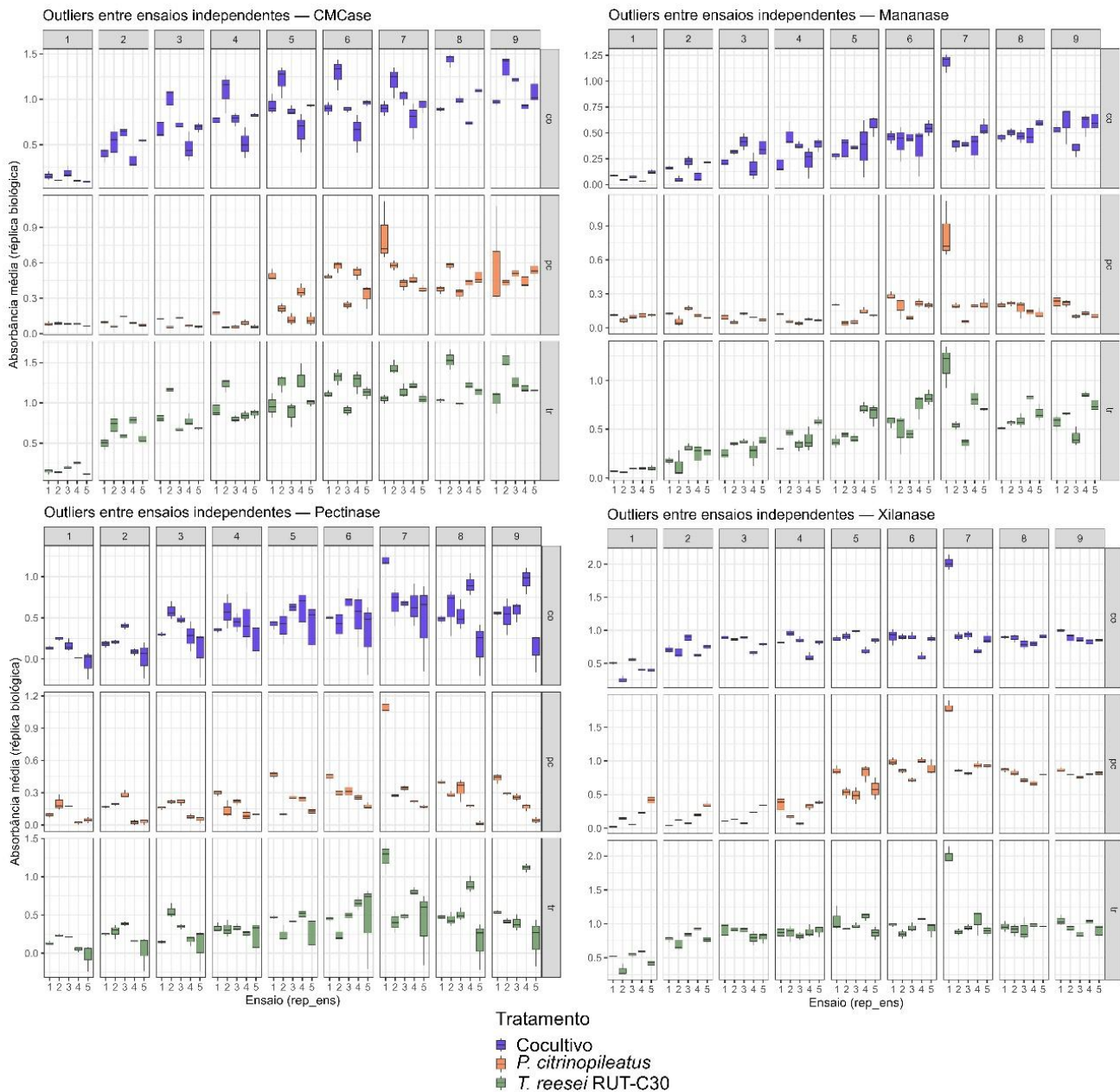


Figura 7: Distribuição das atividades enzimáticas no nível de ensaio independente ao longo do cultivo. Boxplots representando a variação das atividades de CMCCase, mananase, pectinase e xilanase ao longo de nove dias de cultivo para os tratamentos monocultivo de *P. citrinopileatus* (pc), monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 (tr) e cocultivo (co). Cada boxplot corresponde à distribuição das médias biológicas de cada ensaio independente (n = 5 no conjunto completo)

Tal discrepância não configurou outlier extremo segundo os critérios estatísticos aplicados, uma vez que os valores permaneciam dentro da variação global observada. Contudo, considerando que o dia 7 era interpretado como ponto central na definição do perfil funcional do sistema, essa heterogeneidade localizada poderia influenciar de forma desproporcional a estimativa das médias naquele ponto temporal.

Dessa forma, foi conduzida uma nova análise, com exclusão do conjunto de dados intitulado como ensaio 1, visando avaliar a robustez das estimativas e reduzir a influência da variabilidade entre ensaio pontual. Após a remoção, o conjunto de dados passou a conter 1.368 leituras brutas e 324 observações biológicas por enzima. Observou-se redução substancial da amplitude entre ensaio no dia 7 para múltiplas enzimas, especialmente mananase (amplitude no cocultivo reduzida de 0,823 para 0,188) e xilanase (amplitude no cocultivo reduzida de 1,33 para 0,236), confirmando que o conjunto completo apresentava aumento artificial da estimativa naquele ponto temporal. A reanálise teve caráter exploratório e confirmatório, com objetivo de avaliar a estabilidade das estimativas frente à heterogeneidade interensaio.

As análises estatísticas finais foram conduzidas a partir do conjunto refinado, utilizando modelos lineares mistos incorporando o ensaio independente como efeito aleatório ($1|rep_ens$).

$$atividade \sim tratamento \times dia$$

Para todas as enzimas, os efeitos principais de tratamento e dia foram significativos (ANOVA tipo III, $p < 0,001$). A interação tratamento \times dia foi significativa para CMCCase, mananase e xilanase ($p < 0,001$) e, após a reanálise, também para pectinase ($p = 0,046$), indicando que a redução da variabilidade entre ensaios aumentou a capacidade de discriminar diferenças temporais entre tratamentos.

5.3.2 Perfil cinético das enzimas hidrolíticas naturais

A análise cinética das atividades de CMCCase, mananase, pectinase e xilanase ao longo de nove dias revelou dinâmica temporal enzima-dependente, com máximos distribuídos entre os dias 5 e 9, dependendo da enzima avaliada (Figura 8)

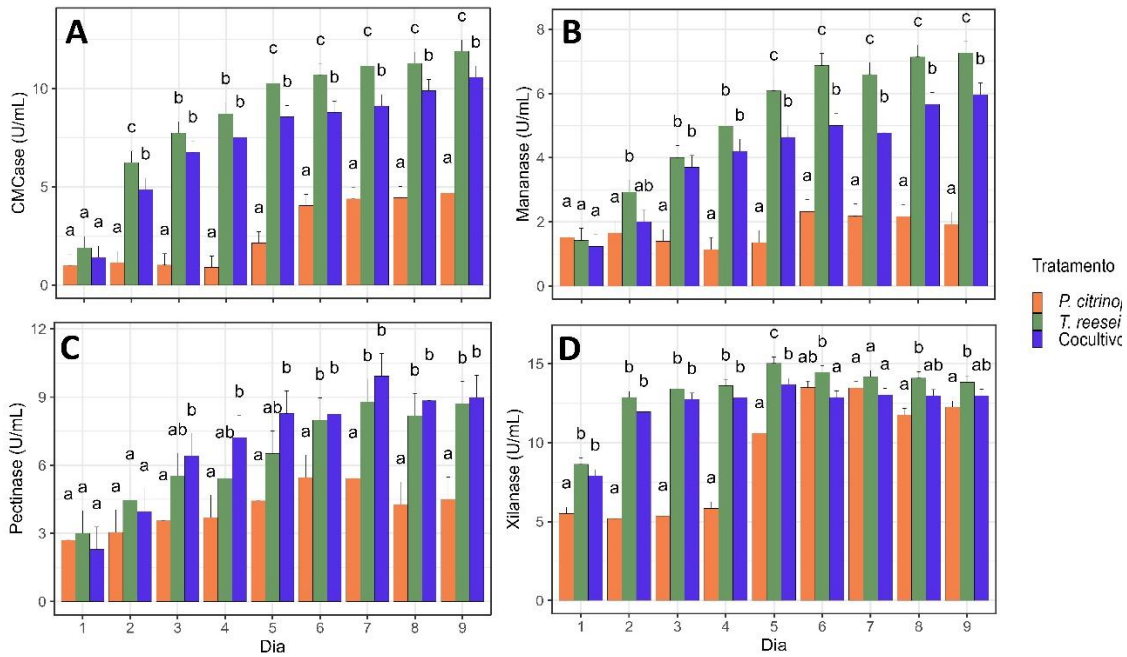


Figura 8: Perfil cinético das atividades de CMCase (A), mananase (B), pectinase (C) e xilanase (D) determinadas ao longo de nove dias de cultivo em meio líquido para *P. citrinopileatus*, *T. reesei* RUT-C30 e o respectivo cocultivo. As barras representam médias ajustadas ($emmeans$) \pm erro padrão, obtidas a partir de modelo linear misto com ensaio independente como efeito aleatório. Letras distintas indicam diferença significativa entre tratamentos dentro de cada dia (Sidak, $p < 0,05$).

Para CMCase (Figura 8 A), observou-se aumento progressivo ao longo do cultivo, com máximos no dia 9 tanto em *T. reesei* RUT-C30 (11,90 U/mL) quanto no cocultivo (10,57 U/mL). Em *P. citrinopileatus*, o maior valor também ocorreu no dia 9 (4,68 U/mL), indicando perfil tardio para essa atividade.

Na mananase (Figura 8 B), o padrão máximo foi igualmente tardio, com picos no dia 9 para *T. reesei* RUT-C30 (7,26 U/mL) e cocultivo (5,96 U/mL), enquanto *P. citrinopileatus* apresentou maior valor no dia 6 (2,32 U/mL). Esse deslocamento do pico em relação ao conjunto completo reforça que a discrepância entre ensaios no dia 7 influenciava a estimação pontual.

Para pectinase (Figura 8 C), o cocultivo apresentou pico no dia 7 (9,93 U/mL), com *T. reesei* RUT-C30 também atingindo maior valor no dia 7 (8,80 U/mL), enquanto *P. citrinopileatus* apresentou máximo no dia 6 (5,47 U/mL). Apesar de manter o pico em tr/co no dia 7, as magnitudes foram inferiores às do conjunto completo, compatíveis com a hipótese de superestimação pontual da média estimada no dia 7 anteriormente observado.

Na xilanase (Figura 8 D), a reanálise indicou máximos mais precoces, com pico no dia 5 para *T. reesei* RUT-C30 (15,03 U/mL) e cocultivo (13,68 U/mL), e no dia 6 para *P. citrinopileatus* (13,49 U/mL). Assim, a atividade xilanólítica atingiu seu máximo antes do intervalo tardio associado às enzimas CMCase e mananase.

De forma integrada, os resultados indicam que o sistema apresenta uma janela funcional ótima distribuída ao longo do cultivo, com xilanase mais precoce (dia 5–6), pectinase em torno do dia 7 e máximos tardios para CMCCase/mananase (dia 9 evidenciando dinâmica temporal diferenciada entre as enzimas avaliadas).

5.3.3 Comparação temporal sob a ótica do cocultivo

Considerando como critério central o incremento do cocultivo em relação ao monocultivo contendo *T. reesei*, verificou-se que a superioridade do cocultivo foi limitada a pontos específicos da cinética e predominantemente associada à pectinase.

Tabela 6: Pontos temporais em que o cocultivo apresentou atividade enzimática superior ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 ao longo do cultivo. As médias estimadas (U/mL) foram obtidas por modelo linear misto (atividade ~ tratamento × dia, com ensaio independente como efeito aleatório). Letras indicam agrupamentos estatísticos pelo teste de Sidak ($p < 0,05$); tratamentos que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente.

Enzima	Dia	<i>T. reesei</i> RUT-C30 (U/mL)	Cocultivo (U/mL)	Cocultivo > <i>T. reesei</i>	Letras (tr vs co)	Diferença estatística
Pectinase	3	5,54	6,41	sim	ab / b	Não
Pectinase	4	5,42	7,22	sim	ab / b	Não
Pectinase	5	6,52	8,28	sim	ab / b	Não
Pectinase	6	7,98	8,26	sim	b / b	Não
Pectinase	7	8,80	9,93	sim	b / b	Não
Pectinase	8	8,17	8,85	sim	b / b	Não
Pectinase	9	8,71	8,97	sim	b / b	Não

Conforme sintetizado na Tabela 6, a superioridade numérica do cocultivo em relação ao monocultivo contendo *T. reesei* RUT-C30 foi mais evidente para a pectinase. Entre os dias 3 e 9, o cocultivo apresentou valores médios superiores aos de *T. reesei*, com maior diferença observada no dia 7 (9,93 vs 8,80 U/mL). Nos dias 8 e 9, os valores permaneceram próximos entre os dois

tratamentos, mantendo-se discreta vantagem numérica do cocultivo. Contudo, as comparações múltiplas pelo teste de Sidak indicaram compartilhamento das mesmas letras de agrupamento entre tr e co nesses pontos temporais. A ausência de significância estatística deve ser interpretada considerando o número limitado de réplicas biológicas disponíveis nesta etapa experimental.

Para CMCase e mananase, o padrão foi convergente. Nos dias iniciais da cinética (1–3), os valores médios foram semelhantes entre os tratamentos; entretanto, a partir do dia 5, o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 apresentou incremento mais acentuado. Para CMCase, os maiores valores foram registrados no dia 9 (11,90 U/mL em *T. reesei* RUT-C30 e 10,56 U/mL no cocultivo), com distinção estatística entre os tratamentos na maior parte da fase final da cinética. De modo semelhante, para mananase, o monocultivo atingiu 7,26 U/mL no dia 9, enquanto o cocultivo apresentou 5,96 U/mL, com separação estatística entre os tratamentos a partir da fase intermediária do cultivo.

Na xilanase, ambos os tratamentos apresentaram aumento progressivo até o pico observado no dia 5. Nesse ponto, *T. reesei* RUT-C30 atingiu 15,03 U/mL e o cocultivo 13,68 U/mL. A análise post hoc indicou distinção estatística nos dias 5 e 6, com o monocultivo formando grupo distinto do cocultivo. Nos dias subsequentes (7–9), as médias aproximaram-se, embora o padrão de valores superiores em *T. reesei* RUT-C30 tenha sido mantido.

De forma geral, a comparação temporal demonstra que o cocultivo acompanhou a tendência cinética observada no monocultivo de *T. reesei*, com diferenças de magnitude dependentes da enzima e do ponto temporal analisado. A superioridade numérica do cocultivo foi mais consistente para pectinase, enquanto para CMCase, mananase e xilanase o monocultivo apresentou maiores valores médios nos principais pontos de máxima atividade ao longo da cinética.

5.4 Robustez e reprodutibilidade do sistema modelo (15 dias)

5.4.1 Aumento do número amostral e verificação de consistência experimental

A avaliação ampliada do sistema modelo foi conduzida ao longo de 15 dias de cultivo, com amostragem nos dias 1, 3, 6, 9, 12 e 15, utilizando maior número de réplicas biológicas em comparação ao ensaio cinético inicial. Para cada enzima avaliada, foram obtidas 450 leituras brutas de absorbância (ou 324 no caso da lacase), resultando em 108 observações biológicas finais por enzima após consolidação das réplicas técnicas.

A triagem de valores extremos no nível biológico identificou número reduzido de outliers (variando entre 0 e 6, dependendo da enzima), os quais tratados conforme pipeline. A baixa proporção de exclusões reforça a consistência experimental do ensaio ampliado.

Diferentemente da etapa anterior, este experimento não incluiu réplicas de ensaio independentes, concentrando-se no aumento do N biológico dentro de um único cultivo ampliado. Assim, a variabilidade observada reflete predominantemente dispersão biológica intragrupo, e não efeito interensaio.

As análises estatísticas foram conduzidas por modelos lineares (atividade ~ tratamento × dia), evidenciando efeitos significativos de tratamento, dia e interação tratamento × dia para a maioria das enzimas avaliadas (ANOVA, $p < 0,001$ na maior parte dos casos), indicando que a expansão temporal permitiu maior resolução da dinâmica funcional do sistema.

5.4.2 Perfil ampliado das enzimas CAZy naturais (15 dias)

A análise das enzimas hidrolíticas naturais (CMCase, mananase, pectinase e xilanase) ao longo de 15 dias revelou redistribuição temporal dos máximos em comparação ao ensaio de 9 dias (Figura 9).

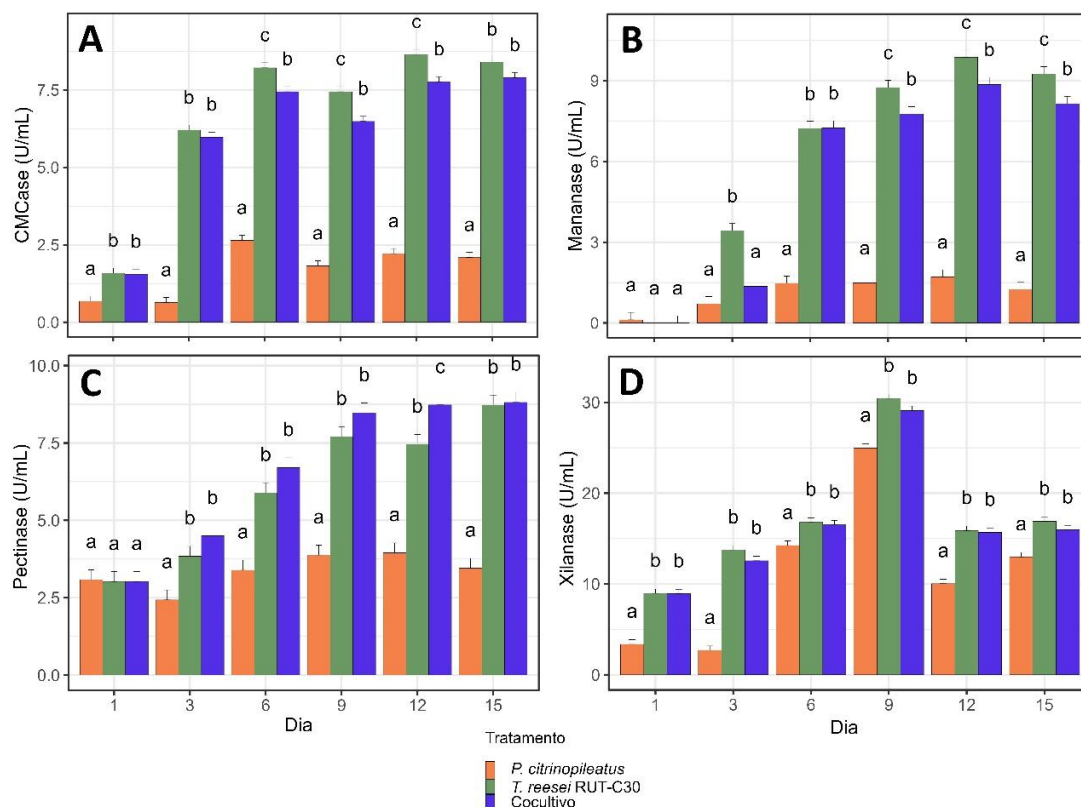


Figura 9: Perfil cinético ampliado das enzimas hidrolíticas naturais ao longo de 15 dias de cultivo. (A) CMCCase; (B) mananase; (C) pectinase; (D) xilanase. As atividades enzimáticas (U/mL) foram determinadas nos dias 1, 3, 6, 9, 12 e 15 para os tratamentos monocultivo de *T. reesei*, monocultivo de *P. citrinopileatus* e cocultivo. Os valores representam médias estimadas (*emmeans*) obtidas por modelo linear (atividade ~ tratamento × dias). Letras indicam agrupamentos estatísticos pelo teste de Sidak ($p < 0,05$)

Para CMCCase (Figura 9 A), observou-se incremento progressivo a partir do dia 6, com máximos tardios no dia 12 para *T. reesei* RUT-C30 (8,65 U/mL) e no dia 15 para o cocultivo (7,90 U/mL). *P. citrinopileatus* apresentou valores inferiores ao longo de toda a cinética. O padrão confirma perfil predominantemente tardio para a atividade celulolítica.

Na mananase (Figura 9 B), os maiores valores foram concentrados no dia 12 para *T. reesei* RUT-C30 (9,87 U/mL) e cocultivo (8,86 U/mL), com leve redução no dia 15. O perfil reforça comportamento semelhante ao da CMCCase, com predominância na fase final do cultivo.

Para pectinase (Figura 9 C), a atividade apresentou incremento contínuo, com máximos no dia 15 para *T. reesei* RUT-C30 (8,73 U/mL) e cocultivo (8,81 U/mL), enquanto *P. citrinopileatus* atingiu maior valor no dia 12. O deslocamento do pico para dias mais tardios indicando incremento progressivo da fração pectinolítica ao longo do cultivo ampliado.

Na xilanase (Figura 9 D), padrão diferiu das demais hidrolases, com máximo concentrado no dia 9 para todos os tratamentos (30,4 U/mL em *T. reesei*; 29,1 U/mL no cocultivo; 24,9 U/mL em *P. citrinopileatus*), seguido de redução nos dias 12 e 15. Assim, mesmo no horizonte ampliado, a atividade xilanolítica mantém caráter relativamente mais precoce.

De forma integrada, o perfil das Enzimas CAZy naturais indica transição temporal: máxima xilanolítica no dia 9, seguida de intensificação celulolítica e mananolítica nos dias 12–15.

5.4.3 Enzimas CAZy sintéticas (substratos pNPG e pNPX)

A avaliação com substratos sintéticos permitiu investigar atividades β -glicosidásica e β -xilosidásica (Figura 10).

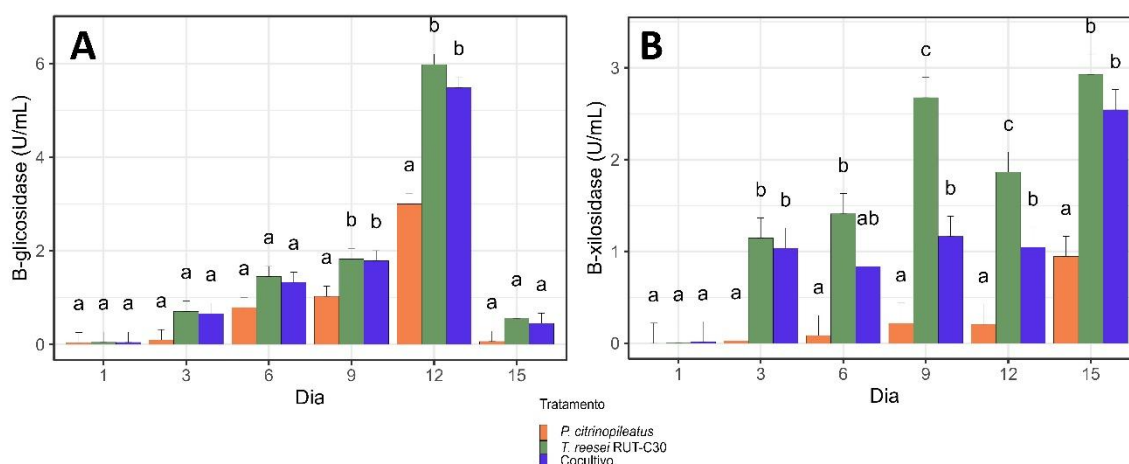


Figura 10: (A) β -glicosidase; (B) β -xilosidase. As atividades enzimáticas (U/mL) foram determinadas nos dias 1, 3, 6, 9, 12 e 15 para os tratamentos monocultivo de *T. reesei*, monocultivo de *P. citrinopileatus* e cocultivo. Os valores representam médias estimadas (*emmeans*) obtidas por modelo linear (atividade ~ tratamento \times dia). Letras indicam agrupamentos estatísticos pelo teste de Sidak ($p < 0,05$).

A β -glicosidase (Figura 10 A) apresentou incremento progressivo até o dia 12, quando foram registrados os maiores valores em *T. reesei* RUT-C30 (5,98 U/mL) e cocultivo (5,48 U/mL), seguido de redução acentuada no dia 15. O padrão sugere pico intermediário de atividade acessória à degradação celulolítica.

A β -xilosidase (Figura 10 B) exibiu incremento contínuo ao longo do cultivo, com máximos no dia 15 para todos os tratamentos (2,93 U/mL em *T.*

reesei; 2,54 U/mL no cocultivo; 0,94 U/mL em *P. citrinopileatus*). Diferentemente da xilanase natural, a atividade β -xilosidásica apresentou perfil tardio sustentado

5.4.4 Enzimas oxidativas e proteolíticas

Além das enzimas CAZy hidrolíticas, foram avaliadas enzimas não classificadas como enzimas CAZy, incluindo lacase, manganês peroxidase (MnP) e proteases, conforme apresentado na Figura 11

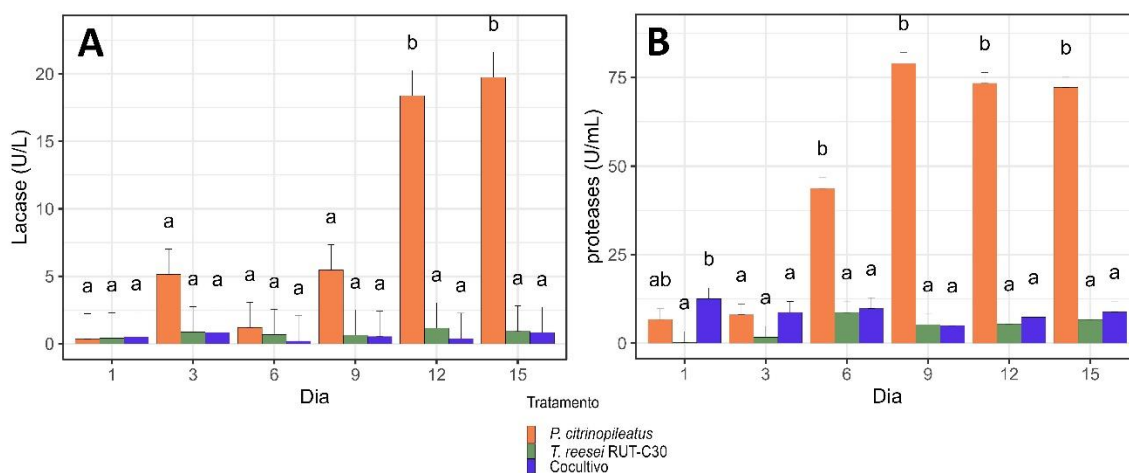


Figura 11: (A) Lacase; (B) Proteases (azocaseína). As atividades enzimáticas (U/mL) foram determinadas nos dias 1, 3, 6, 9, 12 e 15 para os tratamentos monocultivo de *T. reesei*, monocultivo de *P. citrinopileatus* e cocultivo. Os valores representam médias estimadas (*emmeans*) obtidas por modelo linear (*atividade ~ tratamento × dia*). Letras indicam agrupamentos estatísticos pelo teste de Sidak ($p < 0,05$).

A atividade de lacase (Figura 11 A) apresentou forte dependência do tratamento ao longo dos 15 dias de cultivo. Nos tratamentos contendo *T. reesei* RUT-C30 e no cocultivo, os valores permaneceram baixos em todos os pontos amostrais. Em contraste, o monocultivo de *P. citrinopileatus* apresentou aumento progressivo a partir do dia 9, com valores elevados nos dias 12 e 15, atingindo 19,7 U/mL no dia 15.

Para a manganês peroxidase (MnP), não foi detectada atividade enzimática nas amostras analisadas. As leituras permaneceram próximas ao branco do ensaio em todos os tratamentos e tempos avaliados, não permitindo quantificação da atividade sob as condições experimentais adotadas.

A atividade de proteases (Figura 11 B) apresentou aumento a partir do dia 6, com valores mais elevados entre os dias 9 e 15. O maior valor foi observado no monocultivo de *P. citrinopileatus* no dia 9 (79,0 U/mL). Os tratamentos

contendo *T. reesei* RUT-C30 e o cocultivo apresentaram valores inferiores ao longo da cinética, sem picos acentuados comparáveis ao observado no basidiomiceto.

5.4.5 Comparação temporal sob a ótica do cocultivo (15 dias)

Considerando como critério central o incremento do cocultivo em relação ao monocultivo contendo *T. reesei*, observou-se que a superioridade do cocultivo foi enzima-dependente e concentrou-se principalmente em pectinase, além de ocorrer pontualmente em mananase (dia 6) e em componentes não-CAZy avaliados (proteases) em dias específicos. A síntese dos pontos em que o cocultivo apresentou valores médios superiores aos de *T. reesei*.

Tabela 7: Pontos temporais (dias 6, 9, 12 e 15) em que o cocultivo apresentou atividade superior ao monocultivo de *T. reesei*. As médias estimadas (U/mL) foram obtidas por modelo linear (*atividade ~ tratamento × dia*). Letras indicam agrupamentos estatísticos pelo teste de Sidak ($p < 0,05$); tratamentos que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente.

Enzima	Dia	<i>T. reesei</i> RUT-C30 (U/mL)	Cocultivo (U/mL)	Cocultivo > <i>T. reesei</i>	Letras (tr vs co)	Diferença estatística
Mananase	6	7,223	7,247	sim	b / b	Não
Pectinase	6	5,896	6,703	sim	b / b	Não
Pectinase	9	7,708	8,471	sim	b / b	Não
Pectinase	12	7,458	8,734	sim	b / c	Sim
Pectinase	15	8,726	8,814	sim	b / b	Não
Proteases	6	8,640	9,776	sim	a / a	Não
Proteases	12	5,416	7,347	sim	a / a	Não
Proteases	15	6,649	8,797	sim	a / a	Não

Descrição dos resultados para pectinase, o cocultivo apresentou médias numericamente superiores às de *T. reesei* RUT-C30 em todos os pontos avaliados no intervalo operacional (dias 6, 9, 12 e 15). A maior separação ocorreu no dia 12, quando o cocultivo atingiu 8,734 U/mL e *T. reesei* RUT-C30 7,458 U/mL, com separação por letras (b/c) indicando diferença estatística a favor do cocultivo. Nos demais dias (6, 9 e 15), apesar da superioridade numérica, os tratamentos compartilharam letras, sugerindo que a tendência não se traduziu em distinção estatística nesses pontos.

Para mananase, foi observado um ponto de vantagem numérica discreta do cocultivo no dia 6 (7,247 vs 7,223 U/mL), porém sem diferença estatística (b/b). A partir do dia 9, *T. reesei* RUT-C30 passou a manter valores iguais ou superiores aos do cocultivo.

Para as demais enzimas CAZy naturais (CMCase e xilanase) e para as enzimas sintéticas (β -glicosidase e β -xilosidase), não foram observados pontos (dias 6–15) em que o cocultivo superasse *T. reesei*. De modo geral, *T. reesei* RUT-C30 manteve valores iguais ou superiores, especialmente em CMCase e nas atividades associadas aos substratos sintéticos em pontos tardios.

Entre os marcadores não-CAZy, as proteases (azocaseína) exibiram médias numericamente superiores no cocultivo nos dias 6, 12 e 15, mas sem separação por letras, indicando ausência de evidência estatística de superioridade nesses pontos. Assim, no intervalo operacional analisado, o único ponto com diferença estatística favorável ao cocultivo ocorreu para pectinase no dia 12.

5.5 Eleição do ponto temporal para análises ômicas subsequentes

A definição do ponto temporal empregado nas etapas subsequentes (hidrólise enzimática e análises ômicas) foi baseada na síntese dos perfis cinéticos de 9 dias (Seção 5.3) e 15 dias (Seção 5.4). Como critério central, considerou-se o desempenho relativo do cocultivo em comparação ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30, priorizando pontos temporais em que o sistema apresentasse atividades já estabelecidas e, simultaneamente, indícios de ganho funcional associado ao cocultivo.

5.5.1 Critério de decisão e racional operacional

No ensaio de 9 dias, a superioridade do cocultivo em relação a *T. reesei* foi observada de forma recorrente para pectinase ao longo do intervalo analisado, ainda que sem distinção estatística nos pontos avaliados. No ensaio de 15 dias, o cocultivo apresentou médias superiores às de *T. reesei* para pectinase em todos os pontos do intervalo operacional (dias 6–15), com diferença estatística favorável ao cocultivo no dia 12. Para mananase, a

vantagem do cocultivo foi discreta e restrita ao dia 6. Para as demais enzimas avaliadas, *T. reesei* manteve valores iguais ou superiores na maior parte do período.

5.5.2 Eleição do dia-alvo

Com base nesses resultados, o dia 6 foi selecionado como ponto operacional para hidrólise e análises ômicas subsequentes, por representar um estágio em que o perfil funcional já se encontra estabelecido e em trajetória ascendente, mantendo tendência de ganho do cocultivo em pectinase e vantagem pontual em mananase no ensaio ampliado.

5.6 Modulação do desempenho enzimático do sistema modelo em diferentes condições de pH

5.6.1 Crescimento e secreção enzimática sob diferentes pHs

A influência do pH na atividade enzimática foi avaliada na faixa de pH 4 a 7, com o objetivo de verificar se a variação da condição inicial do meio altera o perfil funcional do sistema modelo e de definir uma condição ótima para padronização dos ensaios subsequentes. O experimento foi conduzido com o pH previamente ajustado no meio suplementar + BCA padrão antes da inoculação, mantendo-se cada tratamento sob condição constante durante todo o período de cultivo, sem reajuste posterior

Assim, as atividades enzimáticas quantificadas refletem a resposta fisiológica dos fungos às condições de crescimento impostas por cada pH avaliado. Foram considerados três tratamentos: monocultivo de *P. citrinopileatus*, monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 e cocultivo. O conjunto final para cada enzima compreendeu 36 observações (3 tratamentos × 4 níveis de pH × 3 réplicas biológicas) representado na Figura 12.

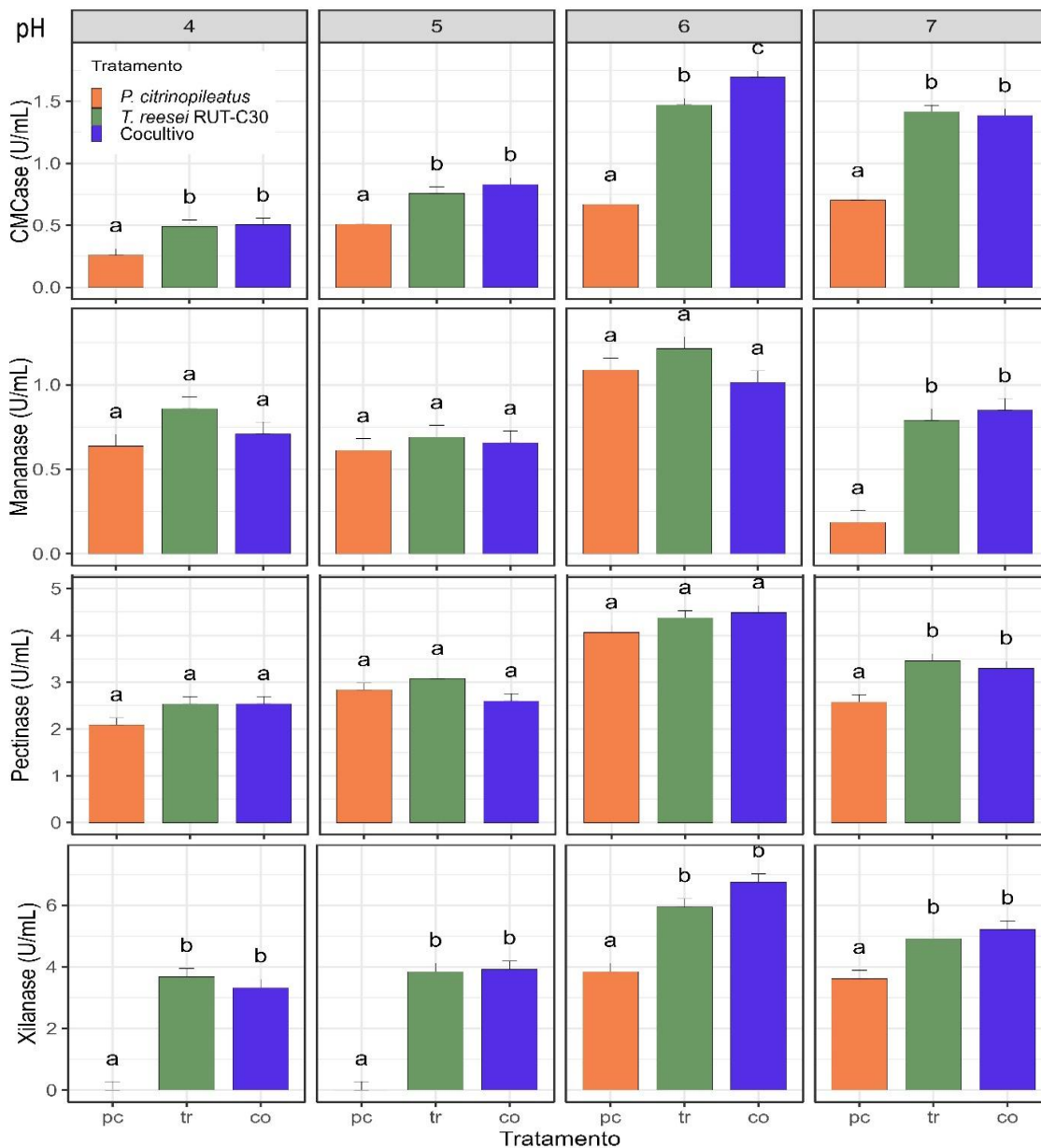


Figura 12: Atividade de CMCCase, mananase, pectinase e xilanase sob diferentes pHs (4–7) nos tratamentos *P. citrinopileatus*, *T. reesei* RUT-C30 e Cocultivo. Barras representam médias estimadas (*emmeans*) ± erro padrão; letras distintas indicam diferença significativa entre tratamentos dentro de cada pH (Sidak, $p < 0,05$).

A análise por modelo linear (atividade ~ tratamento × pH) indicou efeito significativo de pH para todas as enzimas avaliadas ($p < 0,05$), demonstrando que a condição inicial do meio influencia o desempenho enzimático. Também foi observado efeito significativo de tratamento, evidenciando diferenças consistentes de magnitude entre os sistemas avaliados.

A interação tratamento × pH foi significativa para CMCase ($p = 6,11 \times 10^{-7}$), mananase ($p = 5,15 \times 10^{-4}$) e xilanase ($p = 5,67 \times 10^{-4}$), indicando que o efeito do pH depende do tratamento para essas enzimas. Para pectinase, a interação não foi significativa ao nível de 5% ($p = 0,071$), sugerindo comportamento semelhante entre os tratamentos ao longo da variação de pH.

O pH 6 concentrou as maiores médias estimadas de atividade para mananase, pectinase e xilanase em todos os tratamentos avaliados. Para CMCase, o pH 6 foi ótimo para *T. reesei* RUT-C30 e para o cocultivo, enquanto *P. citrinopileatus* apresentou maior atividade em pH 7.

Quando comparadas às respectivas condições de maior atividade, observaram-se reduções expressivas em pH 4 e, em alguns casos, em pH 7. Para xilanase, as atividades em pH 4 foram substancialmente inferiores às observadas em pH 6 em todos os tratamentos. Para mananase e pectinase, houve redução significativa em pH 7 em relação ao pH 6, evidenciando menor desempenho sob condição mais próxima da neutralidade.

Para CMCase, embora o pH 7 tenha maximizado a atividade em *P. citrinopileatus*, os tratamentos contendo *T. reesei* RUT-C30 e o cocultivo apresentaram maior atividade em pH 6, indicando resposta diferencial ao pH entre os sistemas avaliados. Considerando o conjunto das enzimas analisadas, o pH 6 representou a condição de maior atividade predominante e consistente entre tratamentos, sendo definido como condição padrão para os experimentos subsequentes.

5.7 Síntese da caracterização funcional enzimática do sistema modelo

De forma integrada, os resultados apresentados nas seções 5.2 a 5.6 evidenciam que o sistema modelo apresenta variação temporal e dependente do pH nas atividades enzimáticas avaliadas. Ao longo das cinéticas de 9 e 15 dias, o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 manteve valores iguais ou superiores para a maioria das enzimas hidrolíticas naturais e sintéticas.

O cocultivo acompanhou a tendência cinética observada para o monocultivo, apresentando superioridade numérica recorrente para pectinase em diferentes pontos temporais e diferença estatística pontual no ensaio ampliado (15 dias). Para as demais enzimas, a superioridade do cocultivo foi limitada a pontos específicos e sem distinção estatística consistente. A análise sob diferentes condições de pH indicou efeito significativo do fator pH para todas as enzimas avaliadas, com predominância de maiores médias estimadas em pH 6 para a maioria dos tratamentos.

Com base nesses resultados, o dia 6 sob condição de pH 6 foi adotado como ponto experimental para as etapas subsequentes de hidrólise e análises ômicas.

5.8 Avaliação comparativa da hidrólise enzimática padronizada

A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento (Figura 13) foi conduzida com carga padronizada de 0,5 U/mL em volume final de 6 mL (3 U totais por frasco), permitindo comparação direta entre os secretomas de *P. citrinopileatus*, *T. reesei* RUT-C30, o cocultivo e o preparado comercial Celluclast® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

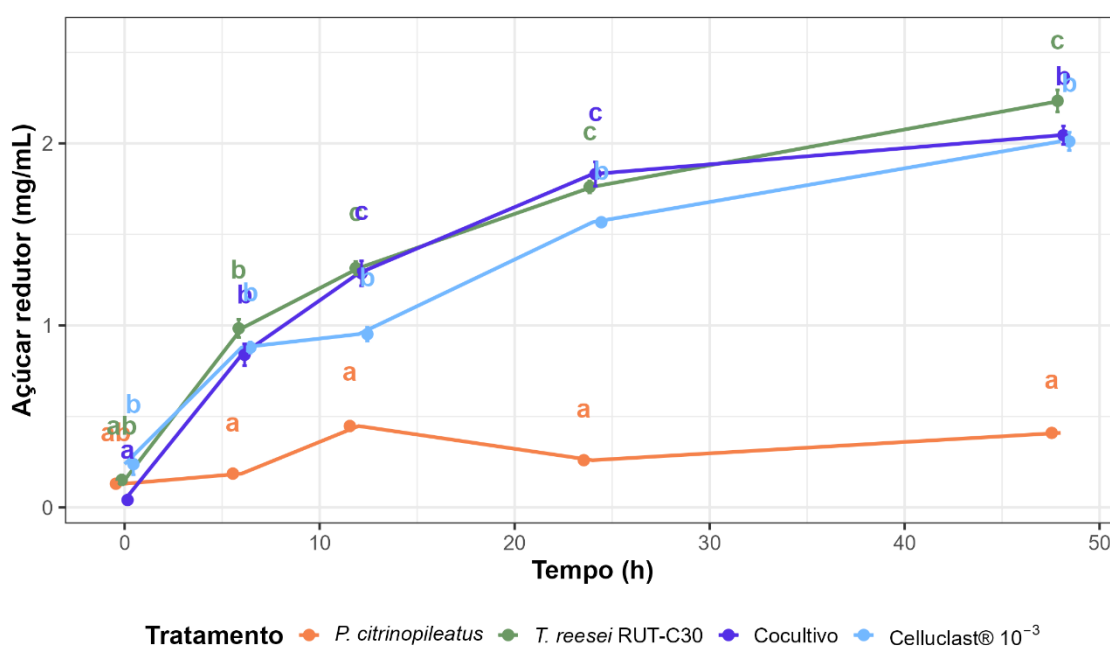


Figura 13: Concentração de açúcares redutores (mg/mL) ao longo de 48 h para os tratamentos *P. citrinopileatus*, *T. reesei* RUT-C30, cocultivo e Celluclast®. Valores expressos como média ± erro padrão (n

biológico). Letras indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada tempo (Sidak, $p < 0,05$).

A análise por modelo linear misto indicou efeito significativo de tratamento, tempo e da interação tratamento \times tempo ($p < 2,2 \times 10^{-16}$), demonstrando que os tratamentos diferiram tanto na magnitude quanto no perfil temporal de liberação de açúcares.

No tempo inicial (0 h), as concentrações de açúcares redutores foram baixas e semelhantes entre os tratamentos. A partir de 6 h, observou-se aumento progressivo na concentração de açúcares para todos os sistemas avaliados. Nesse intervalo, *T. reesei* RUT-C30, o cocultivo e o coquetel comercial apresentaram valores superiores aos observados para *P. citrinopileatus*, com diferenças estatisticamente significativas.

Em 12 h, manteve-se a superioridade de *T. reesei* RUT-C30 e do cocultivo em relação ao monocultivo de *P. citrinopileatus*, enquanto o coquetel comercial apresentou valores intermediários. Entre 12 h e 24 h, observou-se discreta redução na concentração média de açúcares em alguns tratamentos, indicando variação temporal na quantificação, embora a tendência geral de incremento ao longo do ensaio tenha sido mantida.

Aos 24 h, *T. reesei* RUT-C30 e o cocultivo permaneceram com concentrações elevadas de açúcares redutores. O preparado comercial manteve-se numericamente inferior a esses dois sistemas ao longo da cinética, ainda que as diferenças estatísticas tenham variado conforme o tempo avaliado.

No tempo final (48 h), *T. reesei* RUT-C30 apresentou a maior concentração média de açúcares redutores, sendo estatisticamente superior ao cocultivo nesse ponto específico. O cocultivo manteve valores superiores ao comercial e substancialmente superiores ao monocultivo de *P. citrinopileatus*, que apresentou os menores valores ao longo de todo o ensaio.

5.8.1 Desempenho global da hidrólise (AUC 0–48 h)

A área sob a curva (AUC 0–48 h) foi calculada por integração trapezoidal para avaliar o desempenho cumulativo dos tratamentos ao longo de todo o ensaio de hidrólise (Figura 14).

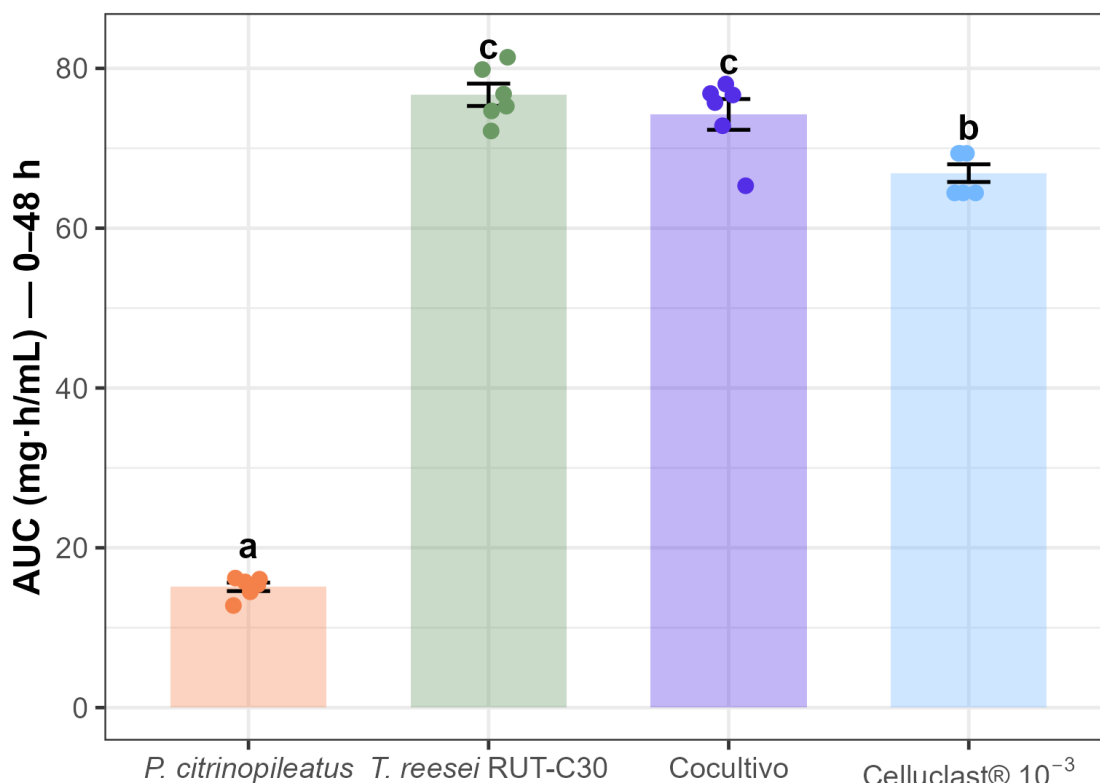


Figura 14: Área sob a curva de liberação de açúcares redutores (AUC, mg·h/mL) calculada para o intervalo de 0 a 48 h nos tratamentos *P. citrinopileatus*, *T. reesei* RUT-C30, cocultivo e Celluclast®. Pontos representam réplicas biológicas. Barras indicam média ± erro padrão. Letras indicam diferenças significativas entre tratamentos (Sidak, $p < 0,05$).

Os maiores valores médios de AUC foram observados para *T. reesei* RUT-C30 ($76,69 \pm 1,40$ mg·h/mL) e para o cocultivo ($74,24 \pm 1,92$ mg·h/mL), indicando maior liberação acumulada de açúcares ao longo do período experimental. O preparado comercial apresentou valor intermediário ($66,89 \pm 1,11$ mg·h/mL), enquanto o monocultivo de *P. citrinopileatus* apresentou o menor valor ($15,11 \pm 0,53$ mg·h/mL).

As comparações múltiplas indicaram diferenças estatisticamente significativas entre *P. citrinopileatus* e os demais tratamentos. Entre *T. reesei* RUT-C30 e o cocultivo, os valores de AUC foram próximos, refletindo desempenho cumulativo semelhante ao longo da cinética. De modo geral, a métrica integrada confirmou o padrão observado na análise temporal da concentração de açúcares

5.8.2 Eficiência de conversão da biomassa e desempenho integrado

A concentração final de açúcares redutores aos 48 h foi utilizada para estimar a massa total liberada por frasco e normalizada em relação à massa inicial de biomassa (180 mg), permitindo expressar a conversão da biomassa não pré tratada em porcentagem (Tabela 8).

Tabela 8 Desempenho final da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento, após 48 h sob carga padronizada de 0,5 U/mL (3 U totais). São apresentados a concentração final de açúcares redutores (mg/mL), a conversão da biomassa (%), a eficiência por unidade enzimática aplicada (mg/U), a área sob a curva (AUC 0–48 h). Valores expressos como média \pm erro padrão.

Tratamento	AR 48 h (mg/mL)	Conversão (%)	mg açúcar/U	AUC (mg·h/mL)	AUC/U	AUC relativo ao comercial
<i>P. citrinopileatus</i>	0,409 \pm 0,019	1,36	0,82	15,11 \pm 0,53	5,04	0,23
<i>T. reesei</i> RUT-C30	2,234 \pm 0,060	7,45	4,47	76,69 \pm 1,40	25,56	1,15
Cocultivo	2,045 \pm 0,050	6,82	4,09	74,24 \pm 1,92	24,75	1,11
Celluclast®	2,011 \pm 0,050	6,70	4,02	66,89 \pm 1,11	22,30	-

A *T. reesei* RUT-C30 apresentou a maior concentração final de açúcares (2,234 \pm 0,060 mg/mL), correspondendo a conversão de 7,45% da biomassa. O cocultivo apresentou conversão de 6,82%, valor próximo ao preparado comercial (6,70%). O monocultivo de *P. citrinopileatus* apresentou conversão significativamente inferior (1,36%).

A eficiência específica por unidade enzimática aplicada (mg/U) seguiu o mesmo padrão, com maiores valores observados para *T. reesei* RUT-C30 (4,47 mg/U), seguido pelo cocultivo (4,09 mg/U) e pelo preparado comercial (4,02 mg/U). *P. citrinopileatus* apresentou eficiência substancialmente inferior (0,82 mg/U).

Quando expressos em relação ao desempenho do coquetel comercial Celluclast®, os valores de AUC indicaram desempenho 14,7% superior para *T. reesei* RUT-C30 (AUC_ relativo ao comercial = 1,15) e 10,9% superior para o cocultivo (AUC_ relativo ao comercial = 1,11). *P. citrinopileatus* apresentou desempenho correspondente a aproximadamente 23% do comercial.

De forma integrada, os resultados da hidrólise enzimática indicam que, sob carga enzimática padronizada, *T. reesei* RUT-C30 apresentou o maior desempenho em termos de concentração final de açúcares, liberação acumulada ao longo do tempo e eficiência de conversão da biomassa. O cocultivo manteve desempenho próximo ao monocultivo mais eficiente ao longo de toda a cinética, com valores cumulativos superiores ao preparado comercial nas métricas integradas avaliadas. O monocultivo de *P. citrinopileatus* apresentou os menores valores em todas as análises realizadas.

5.9 Caracterização e padronização do EB para análise proteômica

5.9.1 Avaliação de estratégias de concentração e purificação do EB

A fim de definir a estratégia mais eficiente de preparo do EB antes da etapa de digestão proteolítica, três métodos de concentração e purificação foram comparados a partir do extrato bruto obtido do cultivo em bagaço de cana-de-açúcar: diálise *Spectrum*TM (MWCO 12–14 kDa), precipitação com acetona/NaCl e ultrafiltração em colunas Amicon® (MWCO 3 kDa). Os perfis proteicos resultantes foram analisados por SDS-PAGE (Figura 15).

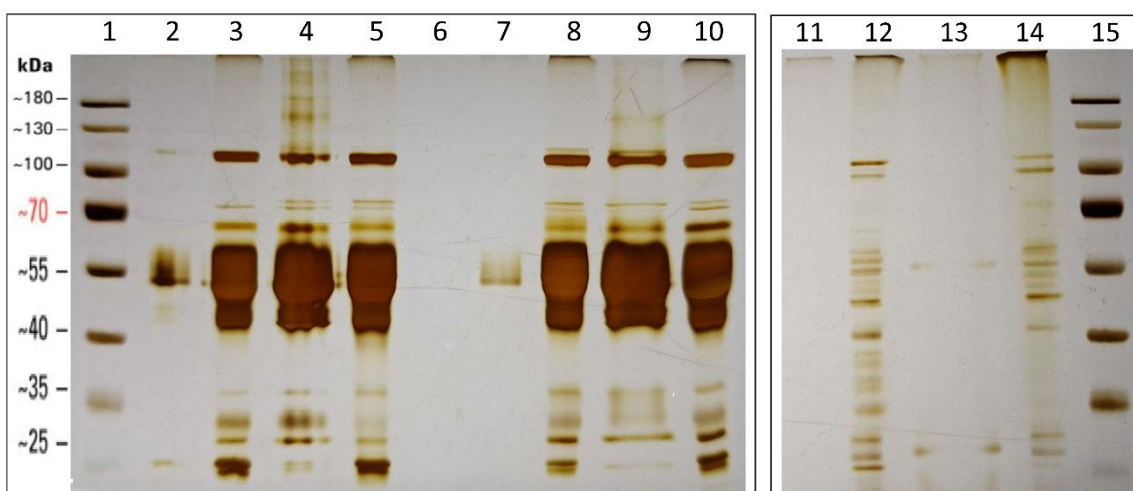


Figura 15: SDS-PAGE (12% bisacrilamida) do EB fúngico após diferentes métodos de concentração e purificação. Canais: (1) marcador de peso molecular (MWM); (2–5) *T. reesei* RUT-C30 sem tratamento, após diálise, após precipitação com acetona e após ultrafiltração; (6) controle vazio (sem aplicação de amostra); (7–10) cocultivo nas mesmas condições; (11–14) *P. citrinopileatus* sem tratamento, após diálise, após precipitação com acetona e após ultrafiltração; (15) MWM.

Os géis evidenciaram diferenças consistentes tanto entre organismos quanto entre métodos de preparo. Os monocultivos de *T. reesei* RUT-C30 e o cocultivo apresentaram maior intensidade global de bandas, com destaque para a região próxima a 55 kDa. Em contraste, *P. citrinopileatus* exibiu menor intensidade eletroforética, refletindo menor concentração proteica no sobrenadante do cultivo, em concordância com as quantificações fluorimétricas.

Entre os métodos avaliados, a diálise resultou em maior diversidade de bandas e melhor definição eletroforética, particularmente na faixa abaixo de 35 kDa. A ultrafiltração apresentou perfil intermediário, enquanto a precipitação com acetona demonstrou redução evidente na diversidade e intensidade das bandas, sugerindo menor eficiência de recuperação proteica nas condições empregadas.

Análise quantitativa da eficiência dos tratamentos

A partir das concentrações obtidas nas amostras sem tratamento, foi estimada a concentração teórica esperada após o fator de concentração acumulado (18×). Os valores teóricos esperados corresponderam a 2808 µg/mL para *P. citrinopileatus*, 4608 µg/mL para *T. reesei* RUT-C30 e 3888 µg/mL para o cocultivo. A comparação entre os valores esperados e as concentrações observadas após aplicação dos diferentes métodos (Tabela 9) revelou recuperação parcial da fração proteica em todas as condições avaliadas.

Tabela 9: Concentração proteica (µg/mL) do EB após aplicação dos métodos de diálise (MWCO 12–14 kDa), precipitação com acetona/NaCl e ultrafiltração em colunas Amicon® (MWCO 3 kDa). A concentração esperada foi calculada a partir da condição sem tratamento multiplicada pelo fator de concentração total (18×)..

Tratamento	Sem tratamento	Dialisado	Precipitação	Ultrafiltração	Concentração esperada
<i>P. citrinopileatus</i>	156	1010	1000	1060	2808
<i>T. reesei</i>	256	2580	1480	2160	4608
Cocultivo	216	2500	1840	1770	3888

A diálise *Spectrum*[™] (MWCO 12–14 kDa) apresentou as maiores taxas de recuperação relativa, atingindo aproximadamente 36% para *P. citrinopileatus*, 56% para *T. reesei* RUT-C30 e 64% para o cocultivo, com média geral de ~52%

indicando melhor preservação da fração proteica de alto peso molecular sob as condições avaliadas.

A ultrafiltração em colunas Amicon® (MWCO 3 kDa) apresentou desempenho intermediário, com recuperação variando entre 38% e 47%, resultando em média de ~44%.

Por sua vez, a precipitação com acetona/NaCl apresentou menor eficiência global, com média de ~38%, destacando-se a baixa recuperação observada para *T. reesei* RUT-C30 (32%), valor inferior ao esperado com base no padrão biológico previamente observado.

A representação gráfica da eficiência de recuperação (Figura 16) mostra que a diálise apresentou os maiores valores de recuperação relativa entre os métodos avaliados, de forma consistente entre os organismos.

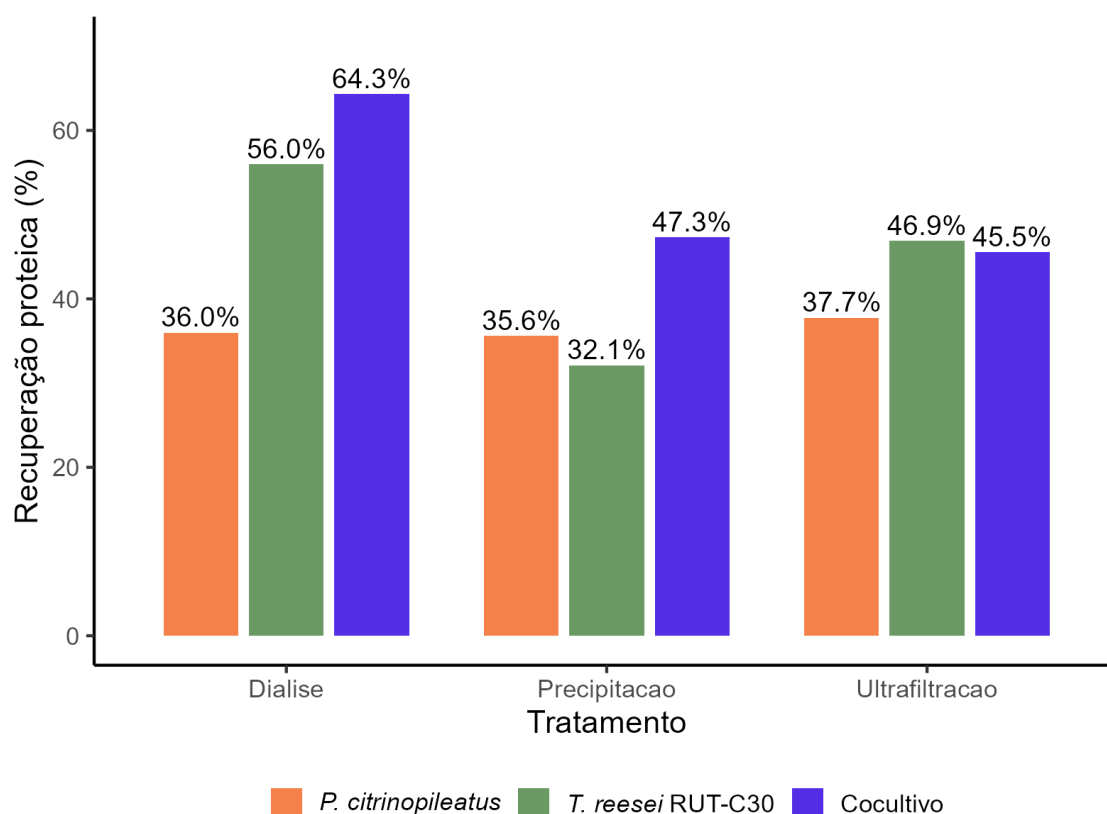


Figura 16: Eficiência de recuperação proteica (%) após diálise *Spectrum*™ (MWCO 12–14 kDa), precipitação com acetona/NaCl e ultrafiltração em colunas Amicon® (MWCO 3 kDa) do EB fúngico. A recuperação foi calculada com base na concentração esperada (controle sem tratamento ×18). A diálise apresentou maior eficiência média, enquanto a precipitação com acetona/NaCl mostrou menor desempenho relativo. As cores indicam *P. citrinopileatus*, *T. reesei* RUT-C30 e cocultivo.

Em conjunto, os dados de SDS-PAGE e de recuperação proteica indicaram que a diálise apresentou maior recuperação da fração proteica e melhor preservação do perfil eletroforético do EB nas condições avaliadas.

Com base nesses resultados, a diálise foi adotada como método padrão de preparo pré-digestão nas etapas subsequentes. Após essa otimização inicial com EB obtido em bagaço de cana-de-açúcar, o protocolo foi aplicado às demais amostras destinadas à digestão enzimática e à análise por LC-MS/MS..

5.9.2 Diálise definitiva e padronização da carga proteica

Quantificação final do EB após diálise definitiva (3 kDa)

A quantificação das 24 amostras após diálise definitiva revelou diferenças consistentes entre organismos e substratos. Observou-se que: (i) As amostras cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar apresentaram maiores concentrações proteicas, (ii) *T. reesei* RUT-C30 manteve os maiores valores absolutos. (iii) O cocultivo apresentou valores intermediários a elevados, especialmente sob substrato complexo.

Após a etapa de otimização metodológica, a diálise adotada para a maior parte das amostras finais foi realizada com membrana SnakeSkin™ (MWCO 3,5 kDa), seguida de liofilização e ressuspensão aquosa padronizada em 1,5 mL. No conjunto destinado às etapas subsequentes de digestão e LC-MS/MS, entretanto, também foram mantidas como réplica biológica adicional algumas amostras previamente dialisadas na etapa preliminar com membrana Spectrum™ (MWCO 12–14 kDa). Assim, o conjunto final analisado não foi completamente homogêneo do ponto de vista técnico quanto ao MWCO empregado na diálise, aspecto considerado na interpretação qualitativa dos dados proteômicos. As concentrações proteicas determinadas por fluorimetria estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 Concentração proteica (µg/mL) do EB após diálise definitiva em membrana SnakeSkin™ (MWCO 3,5 kDa) e ressuspensão final em 1,5 mL. As réplicas marcadas com (*) correspondem às amostras previamente dialisadas na etapa de otimização metodológica Spectrum™ (MWCO 12–14 kDa), incorporadas nesta fase como réplica biológica adicional e mantidas para as etapas subsequentes de

digestão e análise por LC–MS/MS.

Tratamento	Substrato	R1 (µg/mL)	R2 (µg/mL)	R3 (µg/mL)	R4 (µg/mL)
<i>P. citrinopileatus</i>	Glicose	344	398	330	–
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Glicose	918	516	914	–
Cocultivo	Glicose	650	1160	860	–
<i>P. citrinopileatus</i>	Bagaço	1310	1350	866	1010*
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Bagaço	1340	2060	1500	2580*
Cocultivo	Bagaço	1800	1930	1570	2500*

A quantificação revelou diferenças consistentes entre organismos e substratos. De modo geral, as amostras cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar apresentaram maiores concentrações proteicas do que as cultivadas em glicose. *T. reesei* RUT-C30 apresentou os maiores valores absolutos, enquanto o cocultivo exibiu concentrações intermediárias a elevadas, sobretudo sob substrato lignocelulósico.

Comparação da aplicação por volume fixo e por massa padronizada

Com base nas concentrações obtidas, foi realizada análise eletroforética comparando dois critérios de aplicação no SDS-PAGE, e apresentados na Figura 16:

(i)Aplicação por volume fixo (15 µL por poço); (ii) Aplicação padronizada por massa proteica (10 µg por poço). Os volumes utilizados para a

padronização foram ajustados individualmente de acordo com a concentração de cada amostra, garantindo equivalência de proteína total entre as condições.

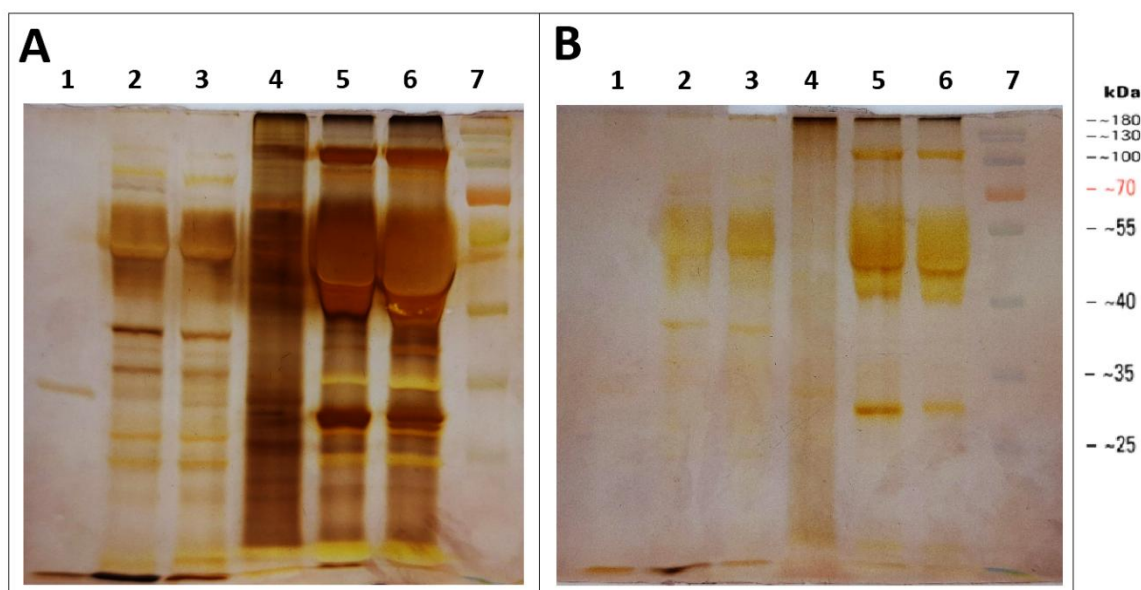


Figura 17: SDS-PAGE (12%) do EB fúngico (MWCO 3,5 kDa), comparando aplicação por volume fixo e por concentração proteica padronizada. Em (A), as amostras foram aplicadas em volume fixo de 15 µL por poço; os canais 1–3 correspondem às amostras cultivadas em glicose e os canais 4–6 às amostras cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar (BCA), organizadas na ordem *P. citrinopileatus*, *T. reesei* RUT-C30 e cocultivo; o canal 8 corresponde ao marcador de peso molecular (MWM). Em (B), as mesmas amostras foram aplicadas após padronização para 10 µg de proteína total por poço, mantendo a organização dos canais descrita em (A).

A aplicação por volume fixo evidenciou diferenças marcantes na intensidade das bandas, refletindo diretamente as variações nas concentrações proteicas entre as amostras. De maneira geral, as amostras provenientes de cultivo em bagaço apresentaram maior intensidade e maior variedade de bandas quando comparadas às cultivadas em glicose.

Após a padronização por massa (10 µg), os perfis eletroforéticos tornaram-se mais comparáveis em termos de intensidade global, permitindo análise mais precisa das diferenças qualitativas na composição do EB. Mesmo após a normalização, o contraste entre as fontes de carbono permaneceu evidente, com maior intensidade e diversidade de bandas nas amostras cultivadas em bagaço.

Observou-se, em particular, uma banda intensa na região aproximada de 35 kDa nas amostras de bagaço, ausente ou pouco evidente nas condições em glicose, indicando alteração no perfil proteico em resposta ao substrato

lignocelulósico. Nos monocultivos de *T. reesei* RUT-C30 e no cocultivo, o padrão de bandas mostrou-se semelhante entre si, sugerindo proximidade funcional no perfil secretado sob essas condições. Já *P. citrinopileatus* apresentou menor intensidade global, porém maior diversidade de bandas sob bagaço quando comparado à glicose.

De modo geral, a padronização da carga proteica permitiu comparar com maior precisão as diferenças qualitativas entre os perfis eletroforéticos do EB, minimizando o efeito da variação na concentração total de proteína entre as amostras. Esse procedimento foi então mantido nas etapas subsequentes de preparo proteômico.

5.9.3 Digestão proteolítica e rendimento peptídico

A partir das amostras dialisadas, alíquotas contendo 100 µg de proteína total foram submetidas às etapas de redução, alquilação e digestão enzimática com tripsina. Após dessalinização em microcolunas Poros R2, os peptídeos foram ressuspensos em volume final de 25 µL de ácido fórmico 0,1% e quantificados por fluorimetria. As concentrações obtidas estão apresentadas na Tabela 11: Concentração peptídica (µg/mL) obtida após digestão proteolítica, dessalinização em microcolunas e ressuspensão final em 25 µL de ácido fórmico 0,1%. A massa estimada foi calculada considerando o volume final de 25 µL por amostra, e a recuperação (%) foi determinada com base na carga inicial de 100 µg de proteína total antes da digestão.

Tabela 11: Concentração peptídica (µg/mL) obtida após digestão proteolítica, dessalinização em microcolunas e ressuspensão final em 25 µL de ácido fórmico 0,1%. A massa estimada foi calculada considerando o volume final de 25 µL por amostra, e a recuperação (%) foi determinada com base na carga inicial de 100 µg de proteína total antes da digestão.

Tratamento	Substrato	R1 (µg/mL)	R2 (µg/mL)	R3 (µg/mL)	R4 (µg/mL)	Massa estimada (µg) *	Recuperação (%) **
<i>P. citrinopileatus</i>	Glicose	263	159	175	–	6,6 – 4,0	4–7%
<i>T. reesei</i>	Glicose	342	853	644	–	8,6 – 21,3	9–21%
Cocultivo	Glicose	385	515	490	–	9,6 – 12,9	10–13%
<i>P. citrinopileatus</i>	Bagaço	432	374	399	328	10,8 – 8,2	8–11%
<i>T. reesei</i>	Bagaço	853	1070	1050	790	21,3 – 26,8	21–27%

Tratamento	Substrato	R1 ($\mu\text{g/mL}$)	R2 ($\mu\text{g/mL}$)	R3 ($\mu\text{g/mL}$)	R4 ($\mu\text{g/mL}$)	Massa estimada (μg) *	Recuperação (%) **
Cocultivo	Bagaço	793	536	1040	1080	19,8 – 27,0	20–27%

Considerando que cada amostra iniciou o processo com 100 μg de proteína total, a massa final recuperada após as etapas de digestão e dessalinização variou aproximadamente entre 4 e 27 μg por amostra, correspondendo a uma recuperação estimada entre 4% e 27%. Essa redução quantitativa reflete perdas acumuladas ao longo do preparo proteômico, incluindo digestão enzimática, retenção parcial de peptídeos na microcoluna Poros R2, etapas de eluição e secagem em concentrador a vácuo (SpeedVac).

Apesar dessas perdas inerentes ao processamento, o rendimento obtido foi suficiente para as análises por LC–MS/MS, uma vez que a injeção demandou apenas 4 μg de peptídeos por corrida. De maneira consistente com as etapas anteriores de quantificação proteica, as amostras cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar apresentaram maiores rendimentos peptídicos médios quando comparadas às cultivadas em glicose. *T. reesei* RUT-C30 manteve os maiores valores absolutos de recuperação, enquanto o cocultivo apresentou rendimento intermediário a elevado, particularmente sob substrato lignocelulósico.

Em conjunto, esses resultados indicam que o protocolo adotado gerou peptídeos em quantidade adequada para as análises por LC–MS/MS, com rendimento compatível entre as amostras processadas.

5.10 Desempenho analítico da LC–MS/MS e identificação global de proteínas

5.10.1 Desempenho instrumental e qualidade da identificação

A análise proteômica por LC–MS/MS resultou na aquisição de 352.287 espectros MS e 369.238 espectros MS/MS, refletindo elevada profundidade analítica e adequada cobertura do material proteico extraído. A identificação foi conduzida por busca de homologia utilizando banco concatenado contendo

sequências completas de *T. reesei* RUT-C30 e *P. citrinopileatus*, sob estratégia *target-decoy* para controle de falso positivo.

Foram identificadas 547 proteínas, agrupadas em 504 grupos proteicos. Os critérios de validação resultaram em taxas de FDR de 1,0% para PSMs, 3,5% para peptídeos e 0,7% para proteínas, indicando alta confiabilidade das identificações. Os parâmetros de busca e os filtros aplicados na etapa inicial de identificação e na curadoria subsequente estão descritos na Seção 4.12.

Como a busca foi realizada considerando o conjunto completo de amostras de forma agregada, sem estratificação por monoculturas ou cocultivo, os resultados representam um repertório proteico global e qualitativo do sistema experimental, voltado à detecção de presença de proteínas, e não à comparação entre condições.

5.10.2 Curadoria bioinformática e construção do conjunto proteico final

Após a exportação dos resultados, foi realizada curadoria adicional em ambiente **R**, com aplicação de critérios mais restritivos para a construção de um conjunto proteico de alta confiança. Inicialmente, foram removidas entradas associadas a sequências *decoy/reverse* e contaminantes laboratoriais, identificadas por padrões textuais nos campos *description* e *accession*. Em seguida, foram aplicados os seguintes filtros mínimos: (i) escore de identificação $-10\lg P \geq 20$; (ii) pelo menos dois peptídeos identificados por proteína; (iii) pelo menos um peptídeo único; (iv) ausência de valores ausentes em variáveis essenciais.

Após essa etapa de refinamento, o conjunto final foi reduzido para 305 proteínas de alta confiança, correspondendo a aproximadamente 56% das identificações iniciais. Essa redução reflete a restrição do *dataset* a proteínas com maior suporte espectral e maior confiabilidade para as interpretações biológicas subsequentes.

5.10.3 Atribuição taxonômica das proteínas identificadas

Após aplicação dos filtros bioinformáticos restritivos (remoção de decoys/contaminantes, $-10\lg P \geq 20$, ≥ 2 peptídeos e ≥ 1 peptídeo único), obteve-se um conjunto proteico final composto por 305 proteínas atribuídas taxonomicamente, sendo 192 associadas a *T. reesei* RUT-C30 (63%) e 113 a *P. citrinopileatus* (37%) (Figura 18).

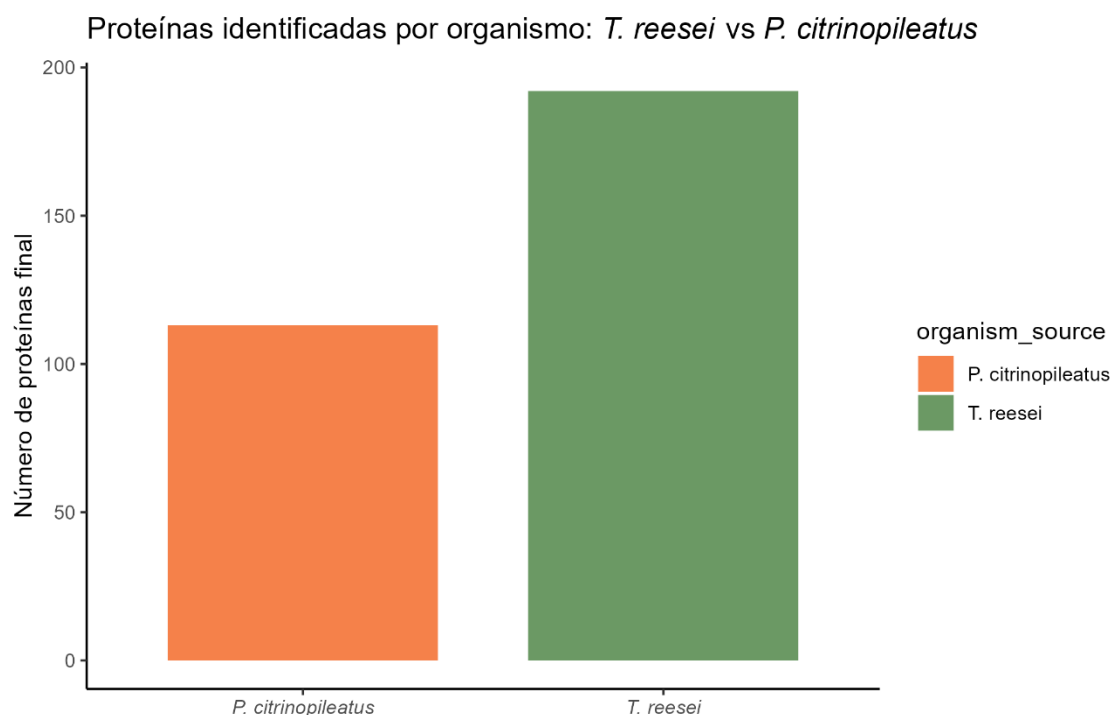


Figura 18: Distribuição taxonômica do conjunto proteico global identificado Após aplicação dos filtros bioinformáticos ($-10\lg P \geq 20$, ≥ 2 peptídeos e ≥ 1 peptídeo único), o conjunto final foi composto por 305 proteínas atribuídas taxonomicamente, sendo 192 associadas a *Trichoderma reesei* RUT-C30 (63%) e 113 a *P. citrinopileatus* (37%). A figura representa a distribuição das proteínas de acordo com sua origem taxonômica dentro da análise proteômica global.

Além da diferença quantitativa, observou-se também maior robustez analítica média nas proteínas atribuídas a *T. reesei*. As medianas de escore ($-10\lg P$), cobertura (%) e número de peptídeos únicos foram superiores em *T. reesei* RUT-C30 (168; 18,5%; 7) quando comparadas a *P. citrinopileatus* (103; 9%; 4), respectivamente. Esses dados indicam maior profundidade de identificação e suporte peptídico para o repertório atribuído a *T. reesei* dentro do conjunto agregado analisado.

A atribuição taxonômica foi realizada de forma heurística com base nos campos *description* e *accession*, considerando a estrutura do banco concatenado utilizado na busca. Registros sem correspondência inequívoca

foram classificados como “*Unresolved*” e excluídos das análises comparativas, permanecendo, documentados no conjunto bruto de identificação. Assim, as comparações taxonômicas subsequentes devem ser interpretadas como proporcionais e qualitativas, dependentes da atribuição heurística adotada.

5.10.4 Classificação funcional global

A classificação funcional refinada e enriquecimento funcional por termos GO, permitiu redistribuir proteínas inicialmente agrupadas como “Outras funções celulares” em categorias biologicamente mais informativas, reduzindo a fração não resolvida.

Distribuição funcional proteico identificado em *T. reesei* e *P. citrinopileatus*

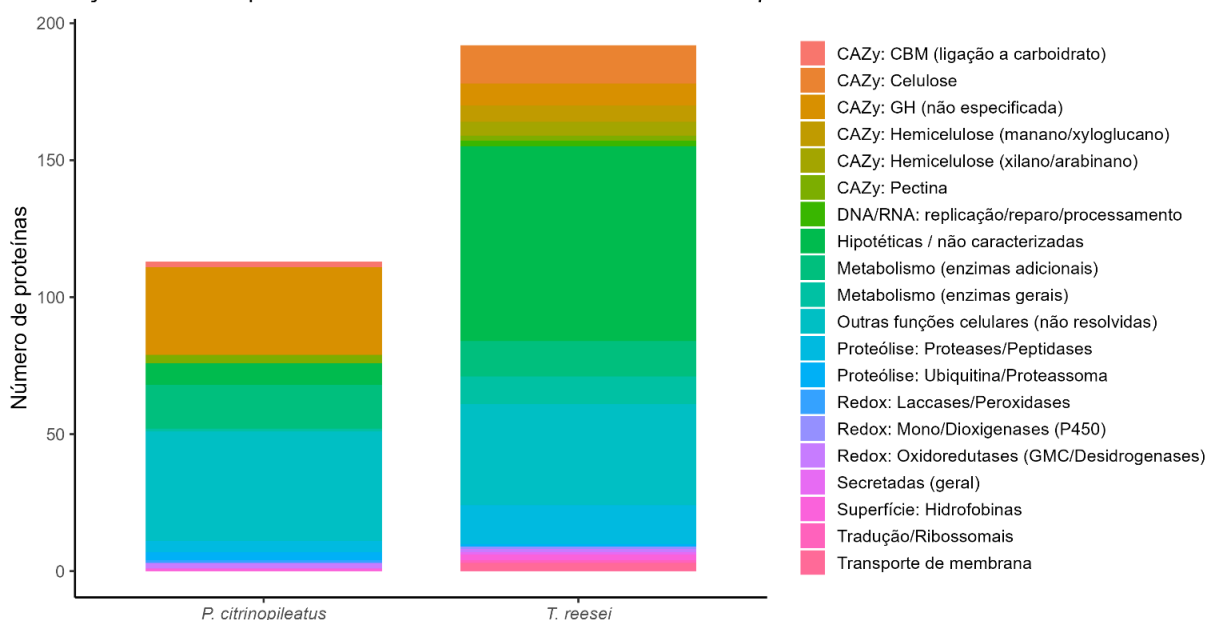


Figura 19: Classificação funcional refinada e distribuição das proteínas por organismo. A classificação funcional das proteínas identificadas foi refinada com base em termos de *Gene Ontology* (GO), distribuição de em categorias biologicamente informativas. Distribuição funcional das proteínas atribuídas a *T. reesei* RUT-C30 e *P. citrinopileatus* representada por barras empilhadas, considerando todas as categorias funcionais. Comparação I das principais categorias funcionais por organismo, excluindo proteínas hipotéticas e categorias não resolvidas, evidenciando diferenças na contribuição relativa entre os repertórios proteicos identificados.

A distribuição funcional por organismo está apresentada na Figura 19 (barras empilhadas, excluindo categorias hipotéticas e não resolvidas).

Observou-se que *T. reesei* RUT-C30 apresentou maior número absoluto de proteínas em múltiplas categorias metabólicas e estruturais, em consonância com o maior total de proteínas identificadas para esse organismo. Em contraste, *P. citrinopileatus* apresentou representação proporcionalmente mais

concentrada em categorias associadas à degradação de carboidratos, dentro do conjunto qualitativo atribuído.

5.10.5 Perfil de enzimas carboidrato-ativas (Enzimas CAZy)

A análise funcional refinada permitiu identificar 72 proteínas classificadas como enzimas carboidrato-ativas (Enzimas CAZy) no conjunto proteico final. Em termos absolutos, ambos os organismos contribuíram de maneira semelhante para esse repertório, sendo 37 proteínas atribuídas a *P. citrinopileatus* e 35 a *T. reesei*.

Entretanto, quando considerada a proporção relativa em relação ao total de proteínas identificadas por organismo, observou-se diferença marcante. Em *P. citrinopileatus*, as enzimas CAZy corresponderam a 32,7% do proteoma identificado (37 de 113 proteínas), enquanto em *T. reesei* RUT-C30 representaram 18,2% (35 de 192 proteínas). Assim, embora *T. reesei* RUT-C30 apresente maior número absoluto de proteínas no conjunto global, *P. citrinopileatus* apresentou maior densidade relativa de enzimas carboidrato-ativas no conjunto identificado.

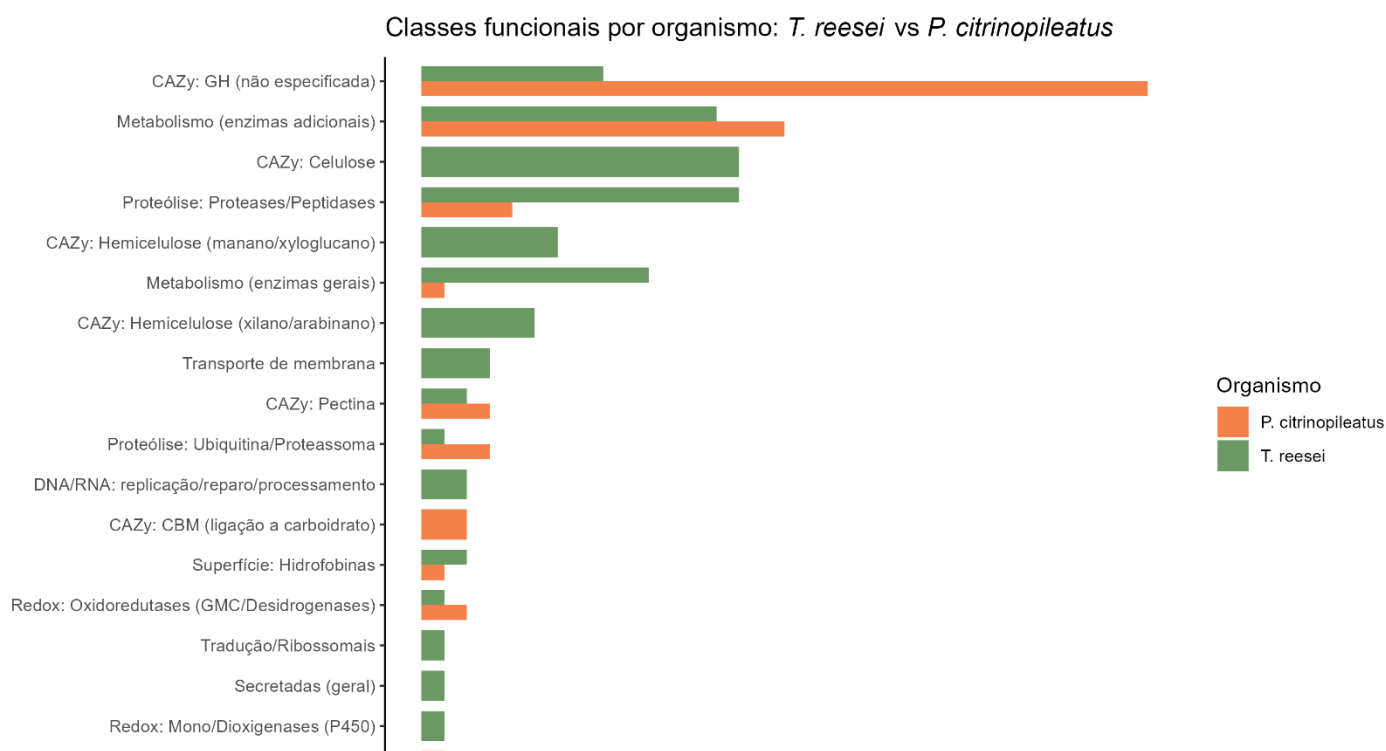


Figura 20: Perfil de enzimas carboidrato-ativas (CAZy) e enzimas oxidativas por organismo. Distribuição das 72 proteínas classificadas como CAZy no conjunto proteico final, discriminadas por subclasses funcionais e atribuídas a *Trichoderma reesei* RUT-C30 (n = 35) e *P. citrinopileatus* (n = 37). Os valores representam número absoluto de proteínas por categoria. Também estão indicadas as enzimas oxidativas identificadas (lacases, peroxidases, oxidoredutases e mono/dioxigenases P450), com atribuição taxonômica correspondente.

O detalhamento por subclasses CAZy (Figura 20) evidenciou padrões distintos entre os organismos. *T. reesei* RUT-C30 apresentou forte concentração de proteínas associadas à degradação de celulose (CAZy: Celulose), consistentes com o perfil clássico desse ascomiceto como produtor de celobiohidrolases e endoglucanases altamente especializadas. Em contraste, *P. citrinopileatus* exibiu maior representação na categoria “CAZy: GH (não especificada)” e distribuição relativamente mais ampla entre hemicelulases (manano/xyloglucano e xilano/arabinano) e pectinases, sugerindo repertório funcional mais diversificado dentro do conjunto carboidrato-ativo identificado.

Além das Enzimas CAZy, foram identificadas cinco proteínas classificadas como enzimas oxidativas (Redox), incluindo lacases, peroxidases, oxidoredutases do tipo GMC/desidrogenases e mono/dioxigenases (P450). Destas, três foram atribuídas a *P. citrinopileatus* (2,7% do total de proteínas desse organismo) e duas a *T. reesei* RUT-C30 (1,0%). Embora o número absoluto seja reduzido, a proporção relativa novamente foi superior em *P. citrinopileatus*, resultado compatível com o potencial oxidativo característico de basidiomicetos na modificação de compostos aromáticos e frações lignínicas.

Em conjunto, os dados indicam que, enquanto *T. reesei* RUT-C30 apresenta repertório numericamente mais amplo e fortemente orientado à degradação de celulose, *P. citrinopileatus* exibe maior representação proporcional de enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos diversos e em processos oxidativos, refletindo estratégias funcionais potencialmente complementares dentro do contexto lignocelulósico.

5.10.6 Análise de enriquecimento funcional entre organismos

A comparação estatística entre organismos foi realizada por teste de Fisher para cada classe funcional contendo pelo menos três proteínas (Figura 21) com base na sobre-representação de categorias funcionais dentro do conjunto qualitativo de proteínas identificadas.

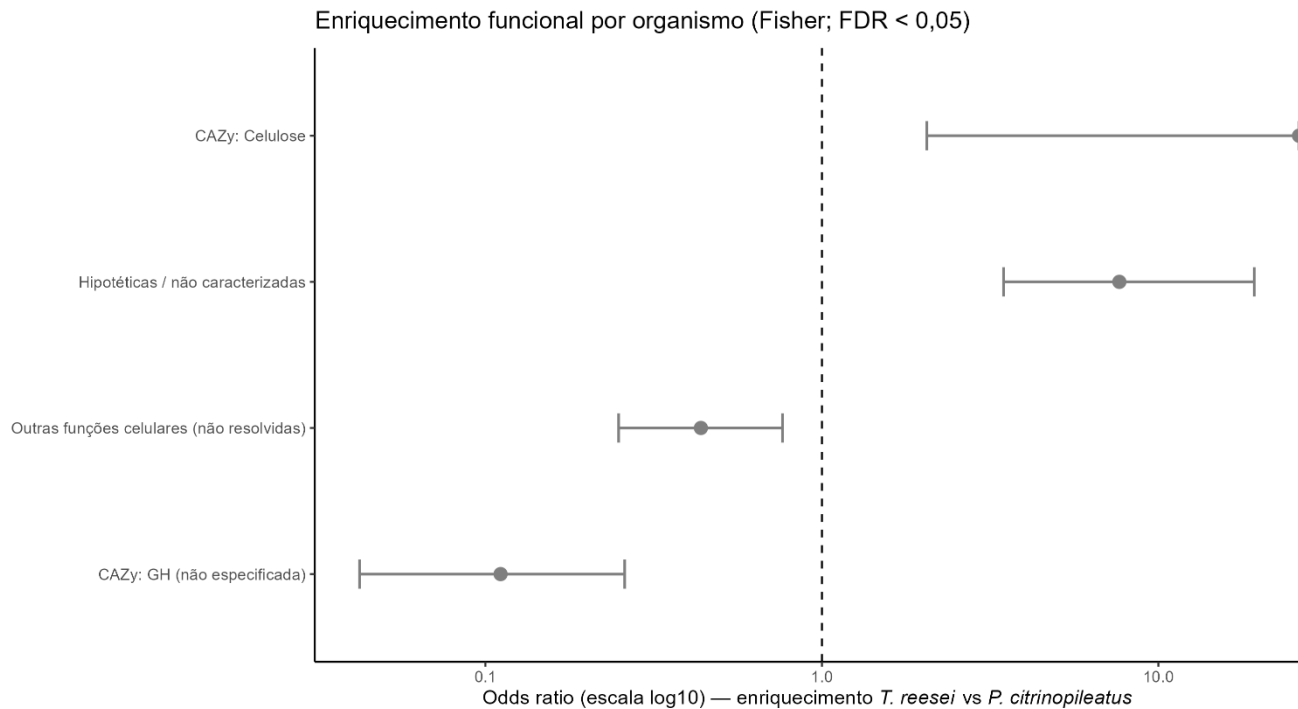


Figura 21: teste de Fisher aplicado às classes funcionais com pelo menos três proteínas, com *odds ratio* (OR) ajustados pelo método de Benjamini–Hochberg (FDR). Valores de OR > 1 indicam enriquecimento relativo em *Trichoderma reesei* RUT-C30, enquanto OR < 1 indicam enriquecimento relativo em *P. citrinopileatus*. São destacados os enriquecimentos significativos ($p_{\text{adj}} < 0,05$), incluindo CAZy: Celulose e proteínas hipotéticas em *T. reesei*, e CAZy: GH (não especificadas) e outras funções celulares em *P. citrinopileatus*. Valores de OR tendendo ao infinito indicam ausência da categoria em um dos organismos no conjunto analisado.

Após ajuste dos valores de p pelo método de Benjamini–Hochberg (FDR), foram identificadas classes funcionais com sobre-representação estatisticamente significativa entre os organismos comparados. Essa análise deve ser interpretada em caráter qualitativo e proporcional, pois se baseia na distribuição de classes funcionais no repertório detectado, e não em medidas de abundância proteica.

Sobre-representação em *T. reesei* RUT-C30:

Proteínas hipotéticas / não caracterizadas (OR = 7,66; $p_{\text{adj}} < 0,001$), indicando que a probabilidade de uma proteína pertencer a essa categoria foi aproximadamente 7,6 vezes maior em *T. reesei* do que em *P. citrinopileatus*.

CAZy: Celulose (OR $\rightarrow \infty$; $p_{\text{adj}} < 0,01$). O valor infinito do odds ratio decorre da ausência de proteínas dessa classe em *P. citrinopileatus* no conjunto filtrado, resultando em célula zero na matriz de contingência 2×2 e indicando enriquecimento exclusivo em *T. reesei* dentro do dataset analisado.

Ssobre-representação em *P. citrinopileatus*:

CAZy: GH (não especificadas) (OR = 0,11; $p_{\text{adj}} < 0,001$), indicando menor probabilidade relativa dessa classe em *T. reesei* e, conseqüentemente, um enriquecimento proporcional em *P. citrinopileatus*.

Outras funções celulares (não resolvidas) (OR = 0,44; $p_{\text{adj}} < 0,01$), também sugerindo maior representação relativa dessa categoria em *P. citrinopileatus*.

De modo geral, valores de OR > 1 indicam sobre-representação relativo em *T. reesei*, enquanto OR < 1 indicam enriquecimento relativo em *P. citrinopileatus*. A magnitude dos odds ratios observados evidencia diferenças estruturais na composição funcional entre os organismos, mesmo sob uma abordagem qualitativa baseada exclusivamente em presença/ausência de proteínas.

5.10.7 Panorama global do perfil do secretoma identificado

De forma integrada, a análise proteômica qualitativa revelou um repertório global consistente e biologicamente coerente com os perfis funcionais previamente observados nos ensaios enzimáticos. A maior contribuição absoluta de proteínas atribuída a *T. reesei* RUT-C30 refletiu sua elevada capacidade secretória nas condições avaliadas, enquanto *P. citrinopileatus* apresentou maior densidade proporcional de enzimas carboidrato-ativas e de componentes oxidativos, sugerindo uma estratégia funcional complementar no contexto lignocelulósico.

A identificação de classes diferencialmente enriquecidas entre os organismos reforça que, mesmo sob abordagem baseada em presença/ausência, o sistema modelo apresenta assinaturas funcionais distintas e potencialmente complementares. Esses resultados fornecem base molecular para a interpretação das dinâmicas enzimáticas descritas anteriormente e estabelecem fundamento para discussões integrativas acerca da contribuição de cada organismo no cocultivo.

Em conjunto, o *dataset* proteômico consolidado constitui um catálogo qualitativo robusto do secretoma do sistema modelo, validando a eficiência do fluxo metodológico adotado e oferecendo subsídios para análises funcionais e interpretações mecanísticas aprofundadas na seção de Discussão.

6 Discussão

6.1 Biomassa lignocelulósica, biorrefinarias e cocultivo fúngico como estratégia biotecnológica

A biomassa lignocelulósica representa um dos recursos renováveis mais abundantes e estratégicos para a consolidação de plataformas de biorrefinarias, permitindo a conversão de resíduos agroindustriais em biocombustíveis, bioquímicos e biomateriais dentro de uma perspectiva de economia circular. Contudo, a etapa de desconstrução da parede celular vegetal permanece como um dos principais gargalos tecnológicos, em função da recalcitrância estrutural imposta pela organização hierárquica de celulose, hemicelulose, pectinas e lignina (ALVIRA et al., 2010; HIMMEL et al., 2007).

Fungos filamentosos desempenham papel central nesse cenário por secretarem repertórios extracelulares complexos de enzimas carboidrato-ativas (CAZy) e proteínas auxiliares. Linhagens de ascomicetos como *T. reesei* destacam-se pela elevada produtividade de celulasas e hemicelulases, enquanto basidiomicetos ligninolíticos apresentam maior diversidade funcional, incluindo enzimas oxidativas associadas à modificação da lignina e reorganização estrutural do substrato (BALDRIAN, 2008).

Nesse contexto, o cocultivo fúngico tem sido proposto como estratégia biotecnológica capaz de explorar complementaridades metabólicas naturais, ampliando o espectro funcional do secretoma e modulando a dinâmica de degradação da biomassa. Estudos demonstram que interações interespecíficas podem resultar em reorganização seletiva do perfil enzimático, com impactos dependentes da compatibilidade metabólica e da estratégia de estabelecimento do sistema (SPERANDIO et al., 2024; MITTERMEIER et al., 2022). À luz desse arcabouço, o presente trabalho investigou como interações entre *T. reesei* RUT-

C30 e basidiomicetos poderiam influenciar a dinâmica funcional do secretoma e o desempenho hidrolítico em biomassa estruturalmente íntegra.

6.2 Interação ecológica inicial: competição com coexistência como cenário regulatório

A hipótese central deste trabalho propôs que interações interespecíficas em cocultivo poderiam reprogramar vias secretórias, promovendo produção coordenada de Enzimas CAZy e proteínas auxiliares com impacto funcional na desconstrução da biomassa lignocelulósica. A análise integrada dos resultados obtidos ao longo das diferentes etapas experimentais permite discutir essa hipótese sob três eixos principais: (i) natureza ecológica da interação, (ii) modulação funcional do perfil enzimático e (iii) implicações para o desempenho hidrolítico.

O screening morfológico em meio sólido revelou que as interações entre *T. reesei* RUT-C30 e os organismos parceiros foram predominantemente competitivas, caracterizadas por formação de zonas de contato delimitadas e redução parcial da expansão radial. Contudo, essas interações não culminaram em exclusão total de um dos organismos, mas sim em padrões de coexistência, com interpenetração superficial das hifas e manutenção da integridade estrutural de ambos os parceiros. Diferentemente de sistemas nos quais há formação de zonas claras de inibição ou lise micelial, o padrão observado indica o estabelecimento de uma interface biologicamente ativa, na qual há competição por espaço e recursos, mas sem supressão metabólica evidente de nenhum dos organismos.

Em estudo prévio conduzido por Peláez et al. (2022), envolvendo *T. reesei* RUT-C30 e *Panus lecomtei*, foi descrita interação semelhante em termos de delimitação espacial, porém acompanhada da formação de uma linha pigmentada na região de contato, interpretada como possível resposta oxidativa associada à secreção de lacases ou metabólitos competitivos. No presente sistema, tal característica não foi observada. A ausência de pigmentação visível sugere que, embora a competição esteja estabelecida, ela pode não envolver

ativação oxidativa macroscopicamente detectável, ou que tais respostas ocorram abaixo do limiar de detecção visual.

Nos tratamentos envolvendo *P. citrinopileatus* e *P. pulmonarius*, foi frequente a sobreposição de hifas aéreas dos basidiomicetos sobre a colônia de *T. reesei*, especialmente na região de contato. Esse padrão indica que a interação não se limitou a um bloqueio físico bidimensional no plano do substrato, mas envolveu reorganização espacial tridimensional do crescimento micelial. A formação de micélio aéreo abundante é característica de basidiomicetos ligninolíticos e pode representar estratégia adaptativa de manutenção territorial e exploração de microambientes quando o avanço radial encontra resistência competitiva.

Ecologicamente, a sobreposição de hifas aéreas sugere que o estresse competitivo imposto por *T. reesei* RUT-C30 não resultou em supressão severa da atividade metabólica dos basidiomicetos. Em interações altamente antagônicas, é comum observar retração micelial, lise ou exclusão espacial definitiva (BODDY, 2000), o que não foi evidenciado no presente sistema. Assim, a coexistência competitiva observada caracteriza um cenário de pressão fisiológica contínua, no qual ambos os organismos permanecem metabolicamente ativos na interface.

Em sistemas fúngicos, interações competitivas com coexistência são frequentemente associadas à ativação de mecanismos adaptativos mediados por reconhecimento químico e sinalização por metabólitos difusíveis. A presença de outro organismo pode desencadear respostas regulatórias envolvendo ajustes na expressão gênica, alteração do perfil de secreção extracelular e redistribuição do investimento metabólico. Diferentemente de interações de exclusão, nas quais um dos competidores é rapidamente suprimido, a coexistência competitiva impõe ambiente regulatório dinâmico, favorecendo estratégias alternativas de exploração do substrato.

No contexto do sistema selecionado como modelo: *T. reesei* RUT-C30 + *P. citrinopileatus*, a manutenção de ambos os organismos na interface sugere que a competição não se restringe ao crescimento radial, mas pode envolver

disputa por nichos funcionais dentro do substrato. Tal condição estabelece um cenário potencialmente favorável à modulação do repertório de Enzimas CAZy, especialmente em frações menos exploradas por cada organismo individualmente. Entretanto, é importante destacar que o padrão morfológico constitui evidência indireta desse ambiente regulatório. A confirmação direta de reprogramação secretória dependente da interação requer comparação quantitativa do secretoma entre condições. A caracterização estrutural das interações em meio sólido fornece fundamento ecológico consistente para a investigação funcional realizada neste trabalho.

6.3 Screening inicial em meio líquido: sinais de modulação, não amplificação global

O *screening* funcional em meio suplementar + BCA padrão, após sete dias de cultivo, representou a primeira avaliação quantitativa do desempenho hidrolítico dos sistemas selecionados no *screening* morfológico. A análise incluiu atividades de CMCase, mananase, pectinase e xilanase, permitindo comparar monocultivos e cocultivos sob condições padronizadas.

De maneira geral, os sistemas contendo *T. reesei* RUT-C30 apresentaram valores significativamente superior de atividade enzimática em relação aos monocultivos dos organismos parceiros, confirmando o perfil consolidado desse ascomiceto como produtor robusto de celulasas e hemicelulasas sob substrato complexo. Esse padrão reforça o papel de *T. reesei* como referência funcional dominante no contexto lignocelulósico.

Entretanto, ao comparar especificamente o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 com os respectivos cocultivos, não foi observada superioridade estatisticamente significativa do sistema misto para nenhuma das enzimas avaliadas no ponto temporal de sete dias. Esse resultado indica que, sob o delineamento experimental adotado, a interação interespecífica não resultou em amplificação global do desempenho hidrolítico em relação ao organismo isolado.

Contudo, a interpretação desses dados não deve restringir-se à ausência de significância estatística. A análise detalhada das médias revelou três situações pontuais em que o cocultivo apresentou desempenho numericamente

superior ao monocultivo de *T. reesei*: (i) CMCase na interação com *B. adusta*; (ii) pectinase na interação com *P. citrinopileatus*; e (iii) xilanase na mesma combinação. Embora tais diferenças não tenham ultrapassado o limiar estatístico estabelecido pelo ajuste de Sidak, a recorrência do padrão no sistema envolvendo *P. citrinopileatus*, particularmente no eixo pectinolítico, sugere tendência funcional consistente.

Esse comportamento indica que o cocultivo não promoveu uma amplificação indiscriminada das atividades hidrolíticas, mas pode ter induzido modulações direcionadas em frações específicas do repertório enzimático. Em termos metabólicos, esse padrão é compatível com modelos de complementaridade funcional, nos quais a interação entre organismos favorece exploração diferencial de nichos bioquímicos dentro do substrato, em vez de aumento uniforme de todas as enzimas.

Um aspecto metodológico relevante na interpretação desses resultados refere-se ao tamanho amostral empregado no *screening* (n biológico = 3 por condição). Em experimentos com variabilidade biológica inerente, amostras reduzidas limitam o poder estatístico para detectar diferenças de magnitude moderada entre médias, especialmente quando aplicadas correções para múltiplas comparações. Estudos metodológicos demonstram que tamanhos amostrais reduzidos podem resultar em subestimação da detectabilidade de efeitos reais, mesmo quando diferenças biologicamente relevantes estão presentes (BUTTON et al., 2013; ABDI, 2007). Assim, a ausência de distinção estatística formal no ponto temporal avaliado deve ser interpretada à luz do caráter exploratório dessa etapa, e não necessariamente como evidência de inexistência de modulação funcional.

Sob essa perspectiva, o *screening* inicial cumpriu papel estratégico: identificou sistemas com desempenho absoluto elevado, consistência funcional entre enzimas e indícios de modulação setorial, particularmente no eixo pectinolítico. Esses critérios, aliados à coerência ecológica previamente estabelecida nas interações morfológicas, fundamentaram a seleção do sistema *T. reesei* RUT-C30 + *P. citrinopileatus* para caracterização cinética aprofundada.

No campo de cocultivo fúngico aplicado à conversão de biomassa, ganhos enzimáticos são frequentemente relatados, mas mostram-se fortemente dependentes da identidade metabólica dos parceiros e das condições de cultivo. SPERANDIO et al. (2024), ao investigarem o cocultivo de *Aspergillus brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 em bagaço de cana-de-açúcar, observaram reorganização seletiva do repertório secretório, com modulações específicas de atividades hidrolíticas em função da dinâmica de estabelecimento do sistema. De modo semelhante, estudos de consórcios microbianos artificiais demonstram que a cooperação funcional pode emergir de rearranjos direcionados, e não necessariamente de amplificação homogênea de todas as enzimas (MITTERMEIER et al., 2022).

Em interações envolvendo basidiomicetos ligninolíticos, a complementaridade entre hidrolases e enzimas oxidativas tem sido associada à melhoria da modificação estrutural do substrato e, em determinados contextos, ao aumento de eficiência de sacarificação (BALDRIAN, 2008; ALVIRA et al., 2010). Assim, os resultados aqui observados caracterizados por modulação setorial, e não amplificação global inserem-se em um padrão descrito na literatura, no qual o principal benefício do cocultivo reside na reorganização funcional do sistema, dependente do nicho metabólico explorado.

6.4 Leitura integrada do *screening*: crescimento, nicho e desempenho funcional não são equivalentes

A análise integrada do *screening* morfológico e funcional revelou que a eficiência de expansão micelial em meio sólido não se traduziu diretamente em maior desempenho hidrolítico em meio líquido. *B. adusta*, por exemplo, apresentou elevada expansão radial e crescimento vigoroso em BDA, ocupando rapidamente a superfície da placa. Contudo, esse comportamento não se refletiu em maior perfil hidrolítico nas condições líquidas avaliadas. Esse resultado demonstra que capacidade de colonização espacial e potencial secretório constituem dimensões fisiológicas distintas e não necessariamente correlacionadas.

A expansão radial elevada pode refletir eficiência na exploração física do substrato e na ocupação territorial, mas não implica, de forma automática, investimento proporcional na secreção de enzimas hidrolíticas específicas. A produção de enzimas carboidrato-ativas (CAZy) envolve custo metabólico significativo e é regulada por disponibilidade de carbono, sinais ambientais e mecanismos de repressão catabólica. Assim, crescimento vigoroso não equivale necessariamente a maior intensidade de degradação enzimática mensurável, particularmente quando avaliada em sistema líquido padronizado.

Outro aspecto relevante emergiu da comparação entre interações intra-filo e inter-filo. O cocultivo entre os ascomicetos *T. reesei* RUT-C30 e *C. byssicola* resultou em maior repressão da atividade hidrolítica de *T. reesei* quando comparado às interações com basidiomicetos. Esse padrão sugere maior sobreposição ecológica e metabólica entre os ascomicetos, possivelmente competindo por nichos semelhantes e utilizando repertórios enzimáticos parcialmente redundantes. Em contextos de elevada sobreposição funcional, a competição pode intensificar mecanismos regulatórios repressivos, incluindo disputas por fontes de carbono e ativação de circuitos de repressão catabólica.

De forma consistente, interações intra-filo tendem a apresentar maior antagonismo funcional do que interações inter-filo, em função da maior similaridade de nicho metabólico (HISCOX et al., 2018). Embora essa tendência não seja universal, ela oferece arcabouço interpretativo coerente para o comportamento observado no presente sistema.

Por outro lado, as interações entre *T. reesei* RUT-C30 e basidiomicetos como *P. citrinopileatus* e *B. adusta* não promoveram repressão comparável da atividade hidrolítica de *T. reesei*, sugerindo possível utilização diferencial de nichos bioquímicos dentro do substrato. Basidiomicetos ligninolíticos frequentemente apresentam repertórios mais diversificados de enzimas oxidativas e hemicelulolíticas, o que pode reduzir a competição direta por frações estritamente celulolíticas, tradicionalmente dominadas por *T. reesei*.

Em conjunto, esses resultados indicam que a dinâmica de interação depende menos da simples presença de um segundo organismo e mais da

proximidade funcional entre os parceiros. A sobreposição de nicho metabólico pode resultar em antagonismo funcional e repressão relativa do secretoma, enquanto repertórios complementares podem permitir coexistência com modulação seletiva da secreção enzimática. Assim, a composição funcional do consórcio emerge como determinante central do resultado biotecnológico, sendo a compatibilidade metabólica tão relevante quanto a capacidade enzimática individual.

6.5 Dinâmica temporal do secretoma: sucessão funcional, maturação do basidiomiceto e robustez interpretativa

A caracterização cinética ampliada, conduzida com maior número amostral e acompanhamento por até 15 dias, permitiu avaliar com maior robustez estatística a reorganização temporal do secretoma. A dinâmica observada com atividade xilanolítica precoce seguida por intensificação celulolítica e mananolítica em fases tardias é consistente com modelos temporais descritos para fungos lignocelulolíticos, nos quais ocorre sucessão coordenada do arsenal enzimático ao longo da degradação da parede vegetal (ALFARO et al., 2016).

Antes da consolidação desse perfil ampliado, contudo, o ensaio de 9 dias revelou aspecto metodológico fundamental: a influência da variabilidade interensaio na interpretação de pontos temporais específicos. A concatenação de cinco ensaios independentes permitiu capturar a variação experimental global do sistema, mas evidenciou heterogeneidade pontual concentrada no dia 7, associada a um dos ensaios. Embora os valores permanecessem dentro da variação estatística aceitável e não configurassem outliers extremos, a discrepância elevava artificialmente as médias estimadas naquele ponto temporal, com potencial de inflacionar a interpretação biológica da cinética.

A reanálise após exclusão criteriosa do ensaio discrepante não alterou o padrão global da dinâmica enzimática, mas reduziu substancialmente a amplitude entre ensaios, especialmente para mananase e xilanase. Esse procedimento evidencia que, em sistemas biológicos complexos, a ausência de

outliers formais não exclui a possibilidade de influência desproporcional de um subconjunto experimental sobre estimativas pontuais. Assim, o controle rigoroso da variabilidade interensaio foi determinante para garantir robustez interpretativa e evitar superestimação de eventos temporais isolados.

Importante destacar que, mesmo após o refinamento do conjunto de 9 dias, a tendência de superioridade numérica do cocultivo no eixo pectinolítico permaneceu consistente entre os dias 3 e 9, ainda que sem distinção estatística formal. A manutenção desse padrão após controle da variabilidade reforça que o fenômeno observado não era artefato associado ao ensaio discrepante, mas característica recorrente do sistema, cuja confirmação dependeria de maior resolução estatística posteriormente alcançada no ensaio ampliado.

No experimento de 15 dias, conduzido com maior número de réplicas biológicas dentro de um único cultivo ampliado, a variabilidade observada refletiu predominantemente dispersão intragrupo. Essa ampliação elevou o poder discriminatório dos modelos estatísticos e confirmou, no dia 12, a superioridade significativa do cocultivo em pectinase, consolidando tendência previamente detectada sob menor N amostral.

Destaca-se, de forma particular, o padrão associado ao basidiomiceto. A lacase apresentou expressão significativa apenas no monocultivo de *P. citrinopileatus* e predominantemente em fases tardias (dias 12–15). Esse comportamento está alinhado com descrições clássicas de basidiomicetos saprotróficos, nos quais enzimas oxidativas são frequentemente associadas a estágios avançados de colonização e modificação estrutural do substrato (BALDRIAN, 2008). De forma semelhante, a atividade proteolítica elevou-se em fases intermediárias e tardias, sugerindo transição metabólica dependente do estágio de desenvolvimento e possível remodelamento do secretoma.

Observou-se também que *P. citrinopileatus*, quando analisado isoladamente, apresentou incremento tardio de atividades celulolíticas, indicando que sua eficiência secretória máxima pode ocorrer em janelas temporais posteriores às tradicionalmente exploradas em sistemas dominados por *T. reesei*. Esse resultado reforça que colonização inicial ou crescimento

micelial acelerado não equivalem, necessariamente, à máxima produção hidrolítica.

No contexto do cocultivo, o delineamento experimental adotado com inoculação simultânea e proporção fixa de inóculo pode ter favorecido dominância precoce do ascomiceto, potencialmente limitando a expressão tardia do arsenal oxidativo e proteolítico do basidiomiceto. Zhang et al. (2025) demonstraram que a modificação da dinâmica de inoculação altera a complexidade e o padrão de correlações positivas nas redes microbianas, favorecendo cooperação funcional em fases específicas do processo. Tal evidência dialoga diretamente com a hipótese de que, no presente sistema, a estratégia de estabelecimento inicial pode ter restringido a manifestação plena do potencial complementar do basidiomiceto.

Em conjunto, os resultados indicam que a eficiência funcional em cocultivo é fenômeno dinâmico e temporalmente estruturado, dependente da identidade metabólica dos parceiros, da variação experimental global e da estratégia de estabelecimento inicial. A extensão da análise para 15 dias revelou que o potencial enzimático do basidiomiceto se manifesta de maneira mais evidente em fases tardias, enquanto o controle rigoroso da variabilidade no ensaio de 9 dias reforçou a necessidade de cautela na definição de pontos ótimos baseados em picos isolados. Assim, a modulação observada no sistema modelo não se configura como amplificação abrupta do desempenho hidrolítico, mas como reorganização temporal seletiva do secretoma, cuja expressão plena depende da maturação do cultivo e do equilíbrio competitivo entre os parceiros.

6.6 Assinatura pectinolítica do cocultivo: modulação setorial com relevância mecânica

Entre todas as atividades avaliadas ao longo da caracterização cinética, a pectinase foi a única que exibiu padrão recorrente e direcional de superioridade do cocultivo em relação ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 ao longo de múltiplos pontos temporais. No ensaio de 9 dias, o cocultivo manteve valores médios superiores entre os dias 3 e 9, ainda que sem distinção estatística; no ensaio ampliado de 15 dias, essa tendência foi novamente observada e tornou-

se estatisticamente significativa no dia 12. Esse comportamento indica que o ganho pectinolítico se consolida quando o sistema é analisado em janela temporal mais extensa e sob maior robustez experimental.

Tal padrão reforça a interpretação de que a modulação induzida pela interação interespecífica não se manifesta como amplificação homogênea do repertório hidrolítico, mas como reorganização setorial do secretoma característica frequentemente descrita em sistemas de cocultivo, nos quais o principal benefício reside na ampliação da diversidade funcional, e não necessariamente na maximização simultânea de todas as atividades (VIEIRA et al., 2025).

Do ponto de vista mecanística, a relevância do eixo pectinolítico encontra respaldo na organização hierárquica da parede celular vegetal. Pectinas compõem a lamela média e participam da coesão intercelular, influenciando a organização da matriz polissacarídica. Sua presença pode reduzir porosidade e limitar a difusão de enzimas hidrolíticas no interior do material lignocelulósico. Assim, a remoção dessas frações tende a aumentar a acessibilidade estrutural e facilitar etapas subsequentes de desconstrução (DONEV et al., 2018). Estudos demonstram que a remoção enzimática ou química de pectina pode elevar a eficiência da hidrólise global, mesmo quando a celulose é o alvo final do processo (PAKARINEN et al., 2012). Nesse contexto, ainda que o cocultivo não tenha superado *T. reesei* nas atividades celulolíticas máximas, o incremento consistente em pectinase é compatível com a hipótese de um mecanismo indireto de melhora do desempenho global, mediado por aumento de acessibilidade ao substrato.

A relevância da assinatura pectinolítica observada no cocultivo transcende a interpretação mecanística associada à arquitetura da parede celular. Industrialmente, pectinases são amplamente empregadas na clarificação e aumento de rendimento de sucos e em processos de maceração despectinização de tecidos vegetais, além de aplicações em processos têxteis, em função da capacidade de reduzir viscosidade e modificar a matriz polissacarídica (JAYANI et al., 2005; HOONDAL et al., 2002).

A assinatura pectinolítica observada também dialoga com diferenças amplas de estratégia degradativa entre ascomicetos e basidiomicetos. *T. reesei* é reconhecido como produtor altamente especializado de celulases e hemicelulases, enquanto basidiomicetos do gênero *Pleurotus* apresentam secretomas mais diversificados, frequentemente incluindo hidrolases direcionadas a polissacarídeos não celulósicos e enzimas associadas à modificação estrutural do substrato. Análises secretômicas em *Pleurotus* revelam repertórios complexos sob substratos lignocelulósicos, com múltiplas hidrolases e enzimas auxiliares/oxidativas (FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2016). Além disso, a eficiência degradativa pode depender de proteínas de baixo peso molecular e redes regulatórias que modulam o desempenho global do sistema (YARDEN et al., 2023), reforçando que capacidade degradativa não se resume ao somatório de celulases clássicas, mas emerge da ação cooperativa de múltiplos componentes secretados.

No presente estudo, essa interpretação encontra plausibilidade adicional na caracterização proteômica qualitativa. Embora a abordagem empregada não permita discriminar abundâncias relativas entre monocultivos e cocultivo, a análise de presença/ausência e a distribuição funcional por taxonomia revelaram maior densidade relativa de enzimas CAZy atribuídas a *P. citrinopileatus*, incluindo classes associadas à degradação de polissacarídeos não celulósicos. Ainda que agregada, essa evidência é compatível com a hipótese de que o basidiomiceto possa contribuir para ampliar o leque funcional do sistema, oferecendo potencial complementar particularmente em frações menos dominadas por *T. reesei*.

Do ponto de vista ecológico-regulatório, a modulação setorial da pectinase é coerente com cenários de competição com coexistência. A presença do parceiro pode redirecionar o investimento secretório para nichos bioquímicos menos explorados, reduzindo sobreposição funcional direta. Em diversos sistemas de cocultivo fúngico voltados à conversão de biomassa, o principal resultado relatado não é ganho universal de atividade, mas ampliação do espectro enzimático por complementaridade ou indução específica sob interação (VIEIRA et al., 2025; SPERANDIO et al., 2024).

Em síntese, os dados indicam que a principal assinatura funcional da interação *T. reesei* RUT-C30 + *P. citrinopileatus* reside na intensificação relativa do eixo pectinolítico, com manifestação dependente do tempo e evidência mais robusta sob janela temporal ampliada. Essa modulação pode estar associada a uma etapa estratégica de reorganização inicial do substrato lignocelulósico, favorecendo acessibilidade estrutural e potencialmente impactando a eficiência global do sistema, mesmo na ausência de aumento significativo das atividades celulolíticas máximas.

A confirmação direta de reprogramação coordenada do secretoma, entretanto, exige como perspectiva futura uma abordagem proteômica quantitativa por tratamento, capaz de discriminar abundâncias relativas de pectinases e proteínas auxiliares entre monocultivos e cocultivo, e de correlacionar essas diferenças com marcadores objetivos de acessibilidade e modificação estrutural do substrato.

6.7 Definição do ponto temporal com base na dinâmica funcional do secretoma

A identificação da assinatura pectinolítica do cocultivo impôs a necessidade de definir em qual estágio temporal essa modulação deveria ser investigada nas etapas subsequentes. Como discutido anteriormente, a superioridade numérica do cocultivo concentrou-se de forma consistente no eixo pectinolítico ao longo da cinética, tornando-se estatisticamente significativa no dia 12 no ensaio ampliado. Contudo, indícios dessa modulação já eram detectáveis em estágios intermediários do cultivo.

Nesse contexto, a escolha do dia 6 como ponto operacional fundamentou-se em análise integrada entre dinâmica funcional, robustez estatística e viabilidade temporal do processo. Embora o dia 12 tenha fornecido a confirmação estatística mais robusta do ganho pectinolítico, o desenho do projeto priorizou um ponto intermediário que capturasse a fase de modulação em curso com maior viabilidade operacional e menor tempo de processo. No dia 6, as atividades enzimáticas já se encontram em trajetória ascendente e em patamar funcional consolidado, enquanto o cocultivo apresenta indícios claros

de ganho relativo em relação ao monocultivo de *T. reesei*, especialmente no eixo pectinolítico. Assim, esse ponto captura o sistema em fase de reorganização secretória ativa, antes do predomínio absoluto das atividades celulolíticas tardias.

Embora enzimas como CMCase e mananase atinjam seus máximos em fases posteriores (dias 9–15), o estabelecimento funcional do secretoma ocorre previamente. O dia 6 representa estágio em que o sistema já superou a fase inicial de adaptação metabólica, mas ainda não atingiu saturação funcional tardia. Dessa forma, permite avaliar a interação em momento potencialmente mais sensível às contribuições diferenciais entre os parceiros.

Sob a perspectiva biotecnológica, a adoção de ponto intermediário é coerente com estratégias descritas para consórcios microbianos artificiais, nas quais o desempenho não deve ser avaliado exclusivamente por máximos tardios, mas pela estabilidade funcional e eficiência global ao longo do tempo (MITTERMEIER et al., 2022). Em processos industriais de conversão de biomassa, períodos prolongados de cultivo elevam custos operacionais e aumentam risco de instabilidade populacional. Assim, a priorização de uma janela intermediária equilibra desempenho hidrolítico e viabilidade processual.

Portanto, a eleição do dia 6 decorre diretamente da assinatura funcional identificada no cocultivo. Ao capturar o sistema em fase de modulação pectinolítica já estabelecida, mas ainda anterior ao domínio pleno das atividades tardias, esse ponto temporal oferece equilíbrio entre sensibilidade biológica e racionalidade operacional, mantendo coerência com os dados experimentais e com perspectivas de aplicação.

6.8 pH como modulador fisiológico do secretoma: efeito integrado além da atividade enzimática

A modulação do pH demonstrou exercer influência abrangente sobre o perfil secretório do sistema modelo. Como o pH foi previamente ajustado no meio de cultura (sem controle ativo ao longo do cultivo), as diferenças observadas refletem resposta fisiológica integrada dos organismos, envolvendo regulação transcricional, secreção proteica e estabilidade enzimática extracelular.

Além do efeito direto sobre a atividade catalítica das enzimas secretadas, o pH ambiental atua como sinal regulatório capaz de modular taxa de crescimento micelial, morfologia das hifas, composição da parede celular e eficiência da maquinaria secretória. Assim, variações de pH podem alterar não apenas a atividade específica das enzimas carboidrato-ativas (CAZy), mas também a quantidade total de proteína secretada e a dinâmica metabólica global do sistema. Dessa forma, os efeitos observados devem ser interpretados como resultado de ajustes fisiológicos integrados, e não apenas como variações pontuais de estabilidade enzimática.

A literatura demonstra que a produção de enzimas CAZy em fungos filamentosos é fortemente modulada pelo pH ambiental por meio de sistemas regulatórios que controlam a expressão gênica em função da acidez do meio (PEÑALVA; ARST, 2002; MARTÍNEZ et al., 2008). Em *T. reesei*, faixas levemente ácidas a próximas da neutralidade (pH 5–6) são frequentemente associadas à maior produção de celulases e hemicelulases, enquanto condições mais ácidas podem reduzir a expressão e/ou estabilidade de determinadas enzimas.

No presente estudo, o pH 6 concentrou as maiores médias de atividade para mananase, pectinase e xilanase, além de representar condição ótima para CMCCase em *T. reesei* e no cocultivo. A redução expressiva das atividades em pH 4 e, em alguns casos, em pH 7, reforça a sensibilidade do sistema às condições ambientais. Em pH mais ácido, a diminuição pode estar associada tanto à regulação negativa da expressão quanto à menor estabilidade estrutural de enzimas extracelulares; em pH mais elevado, pode ocorrer desbalanço regulatório e alteração na eficiência secretória.

Esses resultados estão alinhados com estudos que demonstram que pequenas variações no pH do cultivo podem alterar significativamente o rendimento enzimático e o perfil do secretoma em fungos lignocelulolíticos, independentemente de se tratar de monocultivo ou sistema misto. Assim, a padronização em pH 6 para as etapas subsequentes não apenas reflete a condição de maior desempenho funcional observada experimentalmente, mas também encontra respaldo na fisiologia conhecida de fungos produtores de enzimas CAZy.

Dessa forma, a definição do pH 6 contribui para a consistência experimental e reduz viés decorrente de condições subótimas, assegurando que as análises subsequentes sejam conduzidas sob regime ambiental favorável à expressão do potencial secretório do sistema.

6.9 Manutenção do desempenho hidrolítico em sistema de cocultivo

A hidrólise enzimática foi conduzida utilizando bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento físico-químico. Essa escolha metodológica foi deliberada e fundamentada no objetivo de avaliar o desempenho dos secretomas em condição estruturalmente íntegra da biomassa, preservando a matriz lignocelulósica e permitindo a atuação integrada de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e potencialmente oxidativas.

A literatura reconhece que pré-tratamentos promovem aumento significativo da acessibilidade da celulose, elevando as taxas e os rendimentos de hidrólise (ALVIRA et al., 2010; HIMMEL et al., 2007). Contudo, tais estratégias removem parcial ou substancialmente a lignina e modificam a arquitetura da parede celular, reduzindo a complexidade estrutural do substrato. Nesse cenário, a contribuição de enzimas associadas à modificação de lignina e à atuação em interfaces lignina-carboidrato pode ser subestimada.

Considerando que o cocultivo envolve um basidiomiceto (*P. citrinopileatus*), grupo amplamente reconhecido pela produção de enzimas oxidativas associadas à modificação da lignina, a utilização de bagaço não pré-tratado permitiu avaliar o desempenho do sistema em uma condição mais próxima da estrutura natural da biomassa vegetal. Basidiomicetos apresentam capacidade de secreção de enzimas ligninolíticas e auxiliares que podem contribuir para a modulação da acessibilidade da matriz lignocelulósica (HIMMEL et al., 2007; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Nesse contexto, a manutenção do desempenho hidrolítico do cocultivo em patamar comparável ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 assume relevância adicional. Embora o monocultivo de *P. citrinopileatus* tenha apresentado baixa eficiência nas métricas avaliadas, o sistema combinado não apresentou redução

do desempenho em relação ao monocultivo mais eficiente. Isso sugere que a maior diversidade secretória do cocultivo não compromete a atividade celulolítica global, mesmo em substrato estruturalmente complexo.

Além disso, a literatura destaca que a relação entre atividade medida por ensaios padrão (como FPase) e eficiência real de sacarificação pode ser modulada pela composição do coquetel enzimático e por interações sinérgicas entre enzimas (GHOSE, 1987; WILSON, 2009). Assim, a equivalência de carga enzimática aplicada neste estudo reforça que as diferenças observadas refletem propriedades funcionais do secretoma, e não variações quantitativas de dose.

Dessa forma, os resultados indicam que, sob condição estruturalmente íntegra da biomassa, o cocultivo mantém desempenho hidrolítico elevado, configurando um sistema potencialmente vantajoso por combinar diversidade enzimática e eficiência catalítica sem perda de rendimento. Nesse enquadramento, a manutenção do desempenho hidrolítico do cocultivo, aliada ao incremento pectinolítico observado na cinética, sugere que o consórcio pode combinar eficiência celulolítica preservada com potencial de modificação estrutural do substrato.

6.10 Proteômica global: leitura qualitativa e plausibilidade funcional

A análise proteômica por LC-MS/MS resultou na identificação de 305 proteínas de alta confiança após curadoria bioinformática restritiva, com baixas taxas de FDR em nível de PSM, peptídeo e proteína, evidenciando consistência técnica e validação do pipeline analítico empregado. Nesse sentido, a proteômica cumpriu um objetivo metodológico central do trabalho: demonstrar a viabilidade analítica do desenho experimental aplicado ao sistema modelo e assegurar que o protocolo de extração, processamento e identificação foi capaz de capturar o repertório proteico secretado com confiabilidade.

Entretanto, é fundamental explicitar o principal limite interpretativo dessa abordagem. As amostras foram analisadas de forma agregada, sem estratificação por tratamento (monocultivos versus cocultivo) e sem quantificação comparativa por condição. Assim, o conjunto obtido representa um

repertório global qualitativo (presença/ausência) do sistema experimental e não permite inferir reprogramação secretória dependente da interação, tampouco atribuir diferenças de abundância entre tratamentos. Qualquer inferência sobre modulação diferencial entre monocultivo e cocultivo ultrapassaria o escopo metodológico efetivamente realizado.

Ainda assim, enquanto leitura estrutural, o conjunto é biologicamente informativo. A atribuição taxonômica indicou maior número absoluto de proteínas associadas a *T. reesei*, com maior suporte peptídico médio, coerente com sua dominância funcional observada nos ensaios enzimáticos. Por outro lado, *P. citrinopileatus* apresentou maior representatividade de enzimas CAZy dentro do conjunto identificado em relação ao seu total proteico identificado, além de distribuição funcional mais ampla entre subclasses e maior representação proporcional de enzimas redox. Esse padrão é compatível com estratégias degradativas tipicamente atribuídas a basidiomicetos e em nível estrutural, fornece plausibilidade para a hipótese de complementaridade funcional entre os parceiros no repertório global detectado.

Essa leitura encontra respaldo em estudos recentes de secretômica em cocultivo envolvendo *T. reesei*. Sperandio et al. (2024), ao analisarem o cocultivo de *Aspergillus brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 em bagaço de cana-de-açúcar, identificaram repertório secretório combinado no qual a contribuição de cada organismo variou conforme a dinâmica de estabelecimento do sistema. Os autores demonstraram que o cocultivo não promoveu aumento uniforme de todas as atividades hidrolíticas, mas resultou em modulações específicas, dependentes do contexto ecológico e da ordem de inoculação, com reorganização do perfil de enzimas carboidrato-ativas. Esse padrão reforça a noção de que consórcios fúngicos tendem a operar por ajuste seletivo do secretoma, e não por amplificação indiscriminada do desempenho global.

É importante enfatizar que tais observações não demonstram o mecanismo do cocultivo. Elas não evidenciam diretamente que o basidiomiceto aumentou a secreção de determinadas enzimas na presença do ascomiceto. Contudo, sustentam plausibilidade estrutural para a assinatura pectinolítica observada nos dados cinéticos e para a ideia de que o consórcio reúne

repertórios metabólicos distintos no conjunto proteico global detectado, sem permitir atribuição diferencial por condição.

Um diferencial relevante desta proteômica foi a utilização de banco de dados proteico derivado dos genomas das próprias linhagens empregadas no projeto, anotado e curado no mesmo arcabouço experimental que fundamentou as análises transcriptômicas anteriores. Em sistemas de cocultivo, a discriminação taxonômica depende criticamente da qualidade e adequação do banco utilizado. Uma biblioteca contextualizada reduz ambiguidades de atribuição, fortalece a confiabilidade das identificações e minimiza erros de classificação cruzada entre organismos. Ainda assim, deve-se reconhecer que basidiomicetos frequentemente apresentam proporção elevada de proteínas pouco caracterizadas ou anotadas como hipotéticas, o que limita a resolução funcional fina e pode concentrar incerteza em categorias regulatórias e oxidativas.

Nesse enquadramento, a proteômica apresentada configura-se como caracterização exploratória do repertório secretado, ao mesmo tempo em que valida o pipeline metodológico empregado. Ela reforça a plausibilidade de complementaridade entre os organismos, mas a demonstração direta de reprogramação secretória induzida pelo cocultivo permanece como etapa futura, dependente de proteômica comparativa com replicação biológica e quantificação relativa ou absoluta. Além disso, a análise de enriquecimento funcional discutida anteriormente deve ser interpretada como sobre-representação de categorias em um conjunto qualitativo de proteínas identificadas, e não como evidência de abundância proteica diferencial entre os organismos.

Quando conectada aos dados funcionais, a proteômica global fornece um enquadramento coerente para a assinatura pectinolítica observada no cocultivo. Mesmo sem distinguir abundância por condição, o fato de *P. citrinopileatus* apresentar maior densidade relativa de enzimas CAZy e distribuição funcional mais ampla é consistente com uma leitura estrutural na qual o basidiomiceto pode estar associado a frações menos dominadas por *T. reesei*, como pectinas e determinados componentes hemicelulósicos. Assim, os dois eixos cinética enzimática e composição global do secretoma convergem para a mesma

hipótese operacional: o cocultivo não amplifica indiscriminadamente o desempenho hidrolítico, mas pode estar associado a reorganização funcional seletiva, com efeito mais evidente no eixo pectinolítico.

Essa convergência, contudo, é apresentada com rigor conceitual. Trata-se de plausibilidade mecanística, e não de demonstração causal. O fechamento do circuito de evidência exigirá proteômica comparativa estratificada por tratamento, com quantificação robusta de pectinases e proteínas auxiliares, associada a métricas independentes de acessibilidade estrutural e desempenho hidrolítico sob condições sensíveis à remoção de pectinas.

6.11 Produção intelectual decorrente do estudo

O desenvolvimento deste trabalho resultou na publicação de um artigo de revisão na área de cocultivo fúngico aplicado à bioconversão de biomassa lignocelulósica, elaborado em colaboração com o grupo de pesquisa. O manuscrito intitulado *“Fungal Coculture: Unlocking the Potential for Efficient Bioconversion of Lignocellulosic Biomass”* foi publicado no periódico *Journal of Fungi*, contando com a participação do autor desta dissertação como segundo autor, com contribuição equivalente à do primeiro autor (VIEIRA et al., 2025). DOI: 10.3390/jof11060458.

Adicionalmente, resultados parciais do estudo foram apresentados em eventos científicos da área. O trabalho *“Efeito das proteínas hidrofobinas no sistema de cocultivo fúngico de Trichoderma reesei e Pleurotus citrinopileatus”* foi apresentado no IV Simpósio de Biologia Microbiana (Brasília, 27–29 de novembro de 2024), no formato pôster. Posteriormente, o trabalho *“Análise do secretoma e potencial hidrolítico de Trichoderma reesei e Pleurotus citrinopileatus em cocultivo aplicados à conversão de biomassa lignocelulósica”* foi apresentado no V Simpósio de Biologia Microbiana (Brasília, 27–28 de novembro de 2025), também no formato pôster.

6.12 Limitações do estudo

O presente estudo teve caráter exploratório e de *screening* racional, com foco na seleção de um sistema modelo biologicamente plausível e

funcionalmente informativo para etapas subsequentes. Nesse contexto, é fundamental explicitar os limites metodológicos que delimitam o nível de inferência possível a partir dos resultados obtidos.

Poder estatístico no screening inicial

Uma limitação relevante refere-se ao tamanho amostral reduzido no *screening* funcional inicial (n biológico = 3 por condição), aliado ao uso de correções conservadoras para múltiplas comparações. Em sistemas biológicos com variabilidade intrínseca, amostras reduzidas limitam o poder estatístico para detectar diferenças de magnitude moderada entre médias. Assim, tendências numéricas consistentes podem não atingir significância formal, especialmente sob ajustes como Sidak ou procedimentos equivalentes.

Essa limitação tornou-se evidente quando tendências observadas no *screening* foram posteriormente avaliadas no ensaio ampliado de 15 dias, no qual o aumento do número de réplicas biológicas permitiu maior resolução estatística e sustentou, por exemplo, distinção significativa no eixo pectinolítico em ponto temporal específico. Dessa forma, parte dos resultados onde houve superioridade de valor absoluto de atividade, mas não significância estatística entre tratamentos observados entre tratamentos ocorreram como consequência natural de um delineamento exploratório adequado para triagem inicial, e não como evidência conclusiva de ausência de efeito biológico.

Variabilidade interensaio e sensibilidade a picos pontuais

Outra limitação metodológica evidenciada na caracterização cinética de 9 dias foi a heterogeneidade entre ensaios independentes. Embora discrepâncias pontuais não tenham sido classificadas como *outliers* extremos, observou-se que um ensaio específico influenciava desproporcionalmente as médias estimadas em um ponto temporal (dia 7), elevando artificialmente a magnitude de determinadas atividades.

Esse achado reforça que, em sistemas biológicos complexos, a ausência de *outliers* formais não exclui a possibilidade de influência indevida de um conjunto específico sobre estimativas pontuais. Interpretações baseadas

exclusivamente em picos isolados podem ser sensíveis à variabilidade global do sistema. A reanálise criteriosa adotada neste trabalho reforça a importância de replicação entre ensaios, inspeção estratificada por lote e escolha de janelas operacionais sustentadas por tendências consistentes ao longo do tempo.

Diferenças na carga proteica total secretada

A quantificação de proteína total no EB revelou diferença expressiva entre os sistemas avaliados. No sistema modelo, *P. citrinopileatus* apresentou concentração proteica inferior (156 µg/mL) quando comparado a *T. reesei* RUT-C30 (256 µg/mL) e ao cocultivo (216 µg/mL).

Essa diferença tem implicações interpretativas diretas. Parte do desempenho inferior do basidiomiceto em termos de atividade (U/mL) pode refletir menor carga total de proteínas secretadas sob as condições avaliadas, e não necessariamente ausência de enzimas relevantes. Assim, a contribuição funcional de *P. citrinopileatus* pode estar subestimada quando analisada exclusivamente por atividade volumétrica. Como perspectiva experimental, torna-se relevante investigar estratégias como o pré-estabelecimento do basidiomiceto antes da adição de *T. reesei*, o ajuste da proporção de inóculo (carga micelial inicial) e a análise de atividades específicas normalizadas por proteína total (U/mg). Tais abordagens podem permitir avaliação mais precisa da contribuição funcional de *P. citrinopileatus* e testar de forma mais robusta a hipótese de complementaridade metabólica no sistema modelo.

Ausência de ensaios oxidativos e de hidrólise no screening inicial

O *screening* inicial não incluiu ensaios de hidrólise nem avaliação sistemática de enzimas oxidativas. Essa ausência limita a conexão direta entre padrões de crescimento, tendências de enzimas CAZy e desfechos finais de sacarificação. Considerando que basidiomicetos frequentemente manifestam seu arsenal oxidativo em fases tardias, a inclusão de marcadores oxidativos e ensaios simplificados de hidrólise já na etapa de triagem pode aumentar a sensibilidade do processo de seleção de consórcios.

Proteômica qualitativa agregada

A limitação mais determinante no eixo ômico foi o desenho da proteômica agregada qualitativa. As amostras foram analisadas de forma conjunta, sem estratificação por tratamento (monocultivos vs. cocultivo) e sem quantificação comparativa por condição. Esse desenho impossibilita inferir diferenças específicas induzidas pela interação interespecífica e impede concluir reprogramação secretória coordenada em nível de abundância relativa entre condições experimentais. Além disso, a associação das proteínas identificadas aos organismos de origem foi realizada de forma heurística, com base nos campos *description* e *accession* da exportação proteômica. Embora esse procedimento tenha permitido atribuição taxonômica operacional do repertório detectado, casos sem correspondência inequívoca foram classificados como “Unresolved”, exigindo cautela na interpretação comparativa entre os organismos.

Assim, embora a proteômica tenha validado a viabilidade analítica do pipeline e fornecido retrato estrutural do repertório proteico detectável, as inferências funcionais derivadas da distribuição de CAZymes e das análises de enriquecimento refletem a composição e a representação relativa de classes proteicas no conjunto identificado, e não diferenças quantitativas de abundância entre proteínas ou entre condições. Dessa forma, a demonstração direta da hipótese central requer proteômica quantitativa por condição, com replicação biológica independente. A abordagem atual sustenta plausibilidade mecanística, mas não estabelece causalidade.

6.13 Perspectivas e direções futuras

Os resultados obtidos delineiam um conjunto claro de direções experimentais e estratégicas para aprofundamento e validação do sistema modelo.

Otimização do consórcio e dinâmica de inoculação

A contribuição do basidiomiceto mostrou-se mais evidente em fases intermediárias e tardias do cultivo, sugerindo que a dominância precoce de *T. reesei* pode limitar a manifestação plena do potencial complementar do parceiro. Ajustes na proporção de inóculo, estratégias de inoculação sequencial e regimes

dinâmicos de pH representam abordagens promissoras para maximizar complementaridade funcional sem comprometer o desempenho celulolítico.

Validação funcional aplicada

Investigações futuras podem incluir ensaios de hidrólise sob diferentes cargas de sólidos, comparação com coquetéis comerciais e avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados. A análise sob biomassa submetida a diferentes pré-tratamentos permitirá avaliar se o incremento pectinolítico observado traduz-se em ganho operacional mensurável em sistemas de maior complexidade.

Proteômica quantitativa e integração multiômica

A etapa mais estratégica de aprofundamento reside na implementação de proteômica quantitativa comparativa entre monocultivos e cocultivo, conduzida com replicação biológica independente e delineamento estatístico robusto. Diferentemente da abordagem qualitativa agregada empregada nesta dissertação, uma estratégia quantitativa permitirá identificar proteínas diferencialmente secretadas, estimar variações de abundância relativa e conectar tais alterações às assinaturas funcionais observadas, especialmente no eixo pectinolítico.

Do ponto de vista metodológico os dados gerados estão aptos a abordagens *label-free* baseadas em intensidade (LFQ) oferecem viabilidade operacional e boa reprodutibilidade quando combinadas a modelos lineares mistos e controle rigoroso de FDR. Em sistemas de secretoma, nos quais a dinâmica temporal é relevante, a combinação de quantificação multiplexada com recortes temporais estratégicos (por exemplo, dias 6 e 12) pode esclarecer se a modulação observada em pectinase decorre de aumento específico de determinadas isoformas, indução de proteínas auxiliares ou redistribuição do investimento secretório.

A integração com dados transcriptômicos representa um segundo eixo fundamental. A comparação entre níveis de expressão gênica, (dados já obtidos pelo grupo para essas condições) e abundância proteica permitirá distinguir

eventos regulatórios primários (controle transcricional) de fenômenos pós-transcricionais, como eficiência de secreção, estabilidade proteica ou processamento diferencial. A análise integrada pode revelar genes diferencialmente expressos no cocultivo e verificar se tais genes correspondem a proteínas efetivamente detectadas e quantificadas no secretoma. Discrepâncias entre transcritos e proteínas podem indicar camadas regulatórias adicionais relevantes para a adaptação interespecífica.

A incorporação de metabolômica ampliaria ainda mais a compreensão sistêmica do consórcio. A análise de metabólitos extracelulares (açúcares liberados, ácidos orgânicos, compostos fenólicos derivados da lignina, intermediários aromáticos) permitiria correlacionar alterações no secretoma com modificações químicas efetivas no substrato. Além disso, perfis metabólicos podem indicar competição por carbono, secreção de metabólitos sinalizadores ou ativação de rotas oxidativas não capturadas apenas pela análise enzimática. A integração proteoma transcrito metaboloma possibilita modelar fluxos funcionais e inferir como a interação altera a dinâmica de uso de substrato.

Um desdobramento estratégico envolve a construção de uma base integrada reunindo genes e proteínas diferencialmente regulados, fatores de transcrição candidatos e suas respectivas classes funcionais. Essa estrutura permitiria identificar eixos regulatórios centrais e módulos cooperativos do cocultivo por meio de análises de redes, distinguindo respostas nucleares do consórcio de adaptações específicas da interação.

Em perspectiva aplicada, esse banco multiômico possibilitaria estratégias racionais de otimização, como seleção direcionada de combinações enzimáticas, ajuste de proporções de inóculo, desenho de consórcios sintéticos e edição genética de reguladores-chave. Assim, a transição de uma proteômica qualitativa para uma abordagem quantitativa integrada representa o passo essencial para converter plausibilidade mecanística em demonstração causal e aplicação biotecnológica efetiva.

7 Conclusão

O presente estudo investigou, sob uma abordagem integrada e progressiva, como interações interespecíficas em um sistema modelo de cocultivo fúngico influenciam a organização do secretoma e o desempenho funcional frente à biomassa lignocelulósica. A hipótese central propôs que a interação entre organismos filogeneticamente distintos poderia induzir reconfigurações secretórias capazes de impactar o perfil enzimático e, potencialmente, a eficiência de degradação do substrato.

Os resultados indicam que o cocultivo entre *T. reesei* RUT-C30 e *P. citrinopileatus* não promove amplificação global das atividades hidrolíticas quando comparado ao monocultivo dominante. Em vez disso, o sistema revela padrão de modulação seletiva, dependente do tempo e do contexto fisiológico. A principal assinatura funcional observada foi a intensificação relativa do eixo pectinolítico no cocultivo, consistente ao longo das cinéticas e confirmada sob maior robustez experimental. Essa modulação não se manifesta como aumento indiscriminado do repertório hidrolítico, mas como reorganização setorial do secretoma, sugerindo redistribuição estratégica do investimento metabólico sob condição de interação.

A análise ecológica inicial indicou cenário de competição com coexistência, caracterizado por delimitação espacial sem exclusão metabólica severa. Tal padrão sustenta a plausibilidade de um ambiente regulatório dinâmico, no qual a presença do parceiro funciona como modulador fisiológico e não apenas como competidor antagônico. A integração entre os dados morfológicos e funcionais evidencia que crescimento radial, ocupação de nicho e desempenho hidrolítico não são métricas equivalentes, reforçando a complexidade da resposta adaptativa em sistemas consorciados.

A dinâmica temporal revelou sucessão funcional coerente com modelos clássicos de degradação lignocelulósica: atividade xilanolítica precoce, seguida por intensificação celulolítica e mananolítica em fases posteriores. A eleição do dia 6 como ponto operacional representou decisão fundamentada na convergência entre modulação detectável, patamar funcional consolidado e

viabilidade processual, demonstrando que a definição de condições ótimas deve considerar não apenas máximos absolutos, mas estabilidade e racionalidade biotecnológica.

A proteômica global qualitativa reforçou a viabilidade analítica do pipeline e revelou repertório estrutural compatível com hipótese de complementaridade funcional entre os organismos. Embora o desenho agregado não permita inferir reprogramação secretória quantitativa dependente da interação, a maior densidade relativa de enzimas CAZy em *P. citrinopileatus* e a distribuição funcional distinta entre os parceiros, observadas em uma leitura qualitativa e proporcional do repertório identificado, são consistentes com a plausibilidade mecanística da modulação observada funcionalmente. Assim, os eixos funcionais e proteômico convergem para uma interpretação compatível com reorganização seletiva do sistema, ainda que a demonstração causal dependa de abordagens quantitativas futuras.

De forma abrangente, o trabalho contribui ao: Estabelecer e validar um sistema modelo biologicamente coerente para estudo de complementaridade fúngica; demonstrar que a interação interespecífica pode modular setores específicos do secretoma sem necessariamente aumentar o desempenho global; estruturar uma base metodológica sólida para aprofundamento multiômico comparativo.

Em última instância, esta dissertação não encerra a hipótese de reprogramação secretória coordenada, mas a delimita com rigor, distinguindo plausibilidade estrutural de demonstração quantitativa. Partindo de um screening exploratório e culminando em uma plataforma experimental estruturada, este trabalho estabelece uma base capaz de sustentar investigações multiômicas futuras e orientar estratégias racionais de otimização de consórcios enzimáticos aplicáveis a biorrefinarias lignocelulósicas, passo necessário para transformar complementaridade potencial em ferramenta biotecnológica efetiva.

8 Referencias:

ABDI, Hervé. Bonferroni and Sidák corrections for multiple comparisons. In: SALKIND, Neil J. (org.). *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Thousand Oaks: Sage, 2007.

ADAV, Sunil S.; RAVINDRAN, Anand; SZE, Siu Kwan. Quantitative proteomic analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 2, p. 894–905, 2012.

ADAV, Sunil S. et al. Quantitative proteomic analysis of secretome of microbial consortium during saw dust utilization. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 18, p. 5590–5603, 2012.

ADEGBOYE, Mobolaji Felicia et al. Bioprospecting of microbial strains for biofuel production: metabolic engineering, applications, and challenges. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 5, 2021.

AGRAWAL, Ruchi et al. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125042, 2021.

AHAMED, Aftab; VERMETTE, Patrick. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 399–407, 2008.

ALFARO, Manuel et al. Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. **Journal of Proteomics**, v. 102, p. 28–43, 2014.

ALFARO, Miguel et al. Comparative proteomic analysis of *Pleurotus ostreatus* secretome under lignocellulosic substrates. **Proteomics**, Weinheim, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2016.

ALFARO, María et al. Temporal proteomic profiling of *Pleurotus ostreatus* during lignocellulose degradation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

ANDERSON, Charles T.; PELLOUX, Jérôme. The dynamics, degradation, and afterlives of pectins: influences on cell wall assembly and structure, plant development and physiology, agronomy, and biotechnology. **Annual Review of Plant Biology**, v. 76, n. 1, p. 85-113, 2025.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

ASLAM, B. et al. Proteomics: technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, p. 1–15, 2016.

ATILA, Funda. Evaluation of suitability of various agro-wastes for productivity of *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus eryngii* mushrooms. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 17, n. 5, p. 1–11, 2017.

BALDRIAN, Petr. Enzymes of saprotrophic basidiomycetes involved in wood degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 501–521, 2008.

BANIK, Samudra Prosad et al. Advances in cellulosic enzyme technologies for enhanced stability and catalysis. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 12, n. 02 Suppl 1, p. 49–65, 2021.

BENATTI, Ana Laura Totti; POLIZELI, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes. Lignocellulolytic biocatalysts: the main players involved in multiple biotechnological processes for biomass valorization. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 162, 2023.

BENNATI-GRANIER, Chloé et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospira anserina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1–14, 2015.

BENOCCI, Tiziano et al. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 1–25, 2017.

BERNARDES, Amanda et al. Carbohydrate binding modules enhance cellulose enzymatic hydrolysis by increasing access of cellulases to the substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 57–68, 2019.

BHATIA, Shashi Kant et al. Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. **Energy Conversion and Management**, v. 148, p. 1142–1156, 2017.

BIANCO, Linda; PERROTTA, Gaetano. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from sample preparation to secretome analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5803–5829, 2015.

BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 106, 2016.

BODDY, Lynne. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, n. 3, p. 185–194, 2000.

BODDY, Lynne. Fungal community ecology and wood decomposition processes in angiosperms: from standing tree to complete decay of coarse woody debris. **Ecological Bulletins**, p. 43–56, 2001.

BORASTON, Alisdair B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 3, p. 769–781, 2004.

BOUWS, Henning; WATTENBERG, Andreas; ZORN, Holger. Fungal secretomes: nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 381–388, 2008.

BRANDON, Andrew G.; SCHELLER, Henrik V. Engineering of bioenergy crops: dominant genetic approaches to improve polysaccharide properties and composition in biomass. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 282, 2020.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hydrolysis using fractional factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 144–157, 2016.

BROWN, Neil Andrew et al. RNAseq reveals hydrophobins that are involved in the adaptation of *Aspergillus nidulans* to lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1–17, 2016.

BUGGE, M.; HANSEN, T.; KLITKOU, A. What is the bioeconomy? A review of the literature. **Sustainability**, v. 8, n. 7, p. 691, 2016.

BUTTON, Katherine S. et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 14, p. 365–376, 2013.

CARVALHO, Danilo José; VEIGA, João Paulo Soto; BIZZO, Waldir Antonio. Analysis of energy consumption in three systems for collecting sugarcane straw for use in power generation. **Energy**, v. 119, p. 178–187, 2017.

CATHERMAN, Adam D.; SKINNER, Owen S.; KELLEHER, Neil L. Top down proteomics: facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 4, p. 683–693, 2014.

CHANDEL, Vinay et al. Current advancements in pectin: extraction, properties and multifunctional applications. **Foods**, v. 11, n. 17, p. 2683, 2022.

CHARNEY, Jesse; TOMARELLI, Rudolph M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. 1947.

CHEN, Ling et al. Characterization of the Ca²⁺-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 560–575, 2016.

CHEN, Yumeng et al. cAMP activates calcium signalling via phospholipase C to regulate cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, p. 1–13, 2021.

CHERUBINI, Francesco; STRØMMAN, Anders H. Principles of biorefining. In: *Biofuels*. Academic Press, 2011. p. 3–24.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). *Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar – safra 2024/25, 4º levantamento*. Brasília, DF: Conab, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoesagropecuarias/safras/safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 27 fev. 2026.

CONAB. Estimativa da Conab. Disponível em: <https://www.novacana.com/noticias/safra-de-cana-24-25-encerra-676-96-milhoes-de-toneladas-conforme-estimativa-conab-170425>. Acesso em: 12 maio 2025.

COSTA, Rutiane Moreira de Jesus. *Uma análise dual RNA-seq do aumento da produção enzimática no cocultivo de Trichoderma reesei RUT-C30 e P. citrinopileatus em biomassa lignocelulósica*. 2026. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2026.

COUTURIER, Marie et al. Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2012.

D'AMATO, D. et al. Green, circular, bio economy: a comparative analysis of sustainability avenues. **Journal of Cleaner Production**, v. 168, p. 716–734, 2017.

DEL CERRO, Carlos et al. Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 9, p. e2017381118, 2021.

DI COLOGNA, Nicholas de Mojana et al. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 1–10, 2018.

DONEV, Evgeniy et al. Engineering non-cellulosic polysaccharides of wood for the biorefinery. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. 1537, 2018.

DU, Liping et al. Enhancing the enzymatic hydrolysis efficiency of lignocellulose assisted by artificial fusion enzyme of swollenin-xylanase. **Industrial Crops and Products**, v. 173, p. 114106, 2021.

DUFF, Sheldon J. B.; COOPER, David G.; FULLER, O. Maynard. Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and β -glucosidase by a mixed fungal fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 1, p. 47–52, 1987.

FANG, Hao et al. Enhanced cellulolytic enzyme production by the synergism between *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02 and by the addition of surfactants. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 390–398, 2013.

FANG, Hao et al. Multi-omics study on the mixed culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* with improved lignocellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 190, p. 107374, 2024.

FATMA, Shabih et al. Lignocellulosic biomass: a sustainable bioenergy source for the future. **Protein and Peptide Letters**, v. 25, n. 2, p. 148–163, 2018.

FERNÁNDEZ-FUEYO, Elena et al. A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 9, n. 1, p. 49, 2016.

FERNÁNDEZ, Raquel González; JORRÍN-NOVO, Jesús V. Proteomic protocols for the study of filamentous fungi. In: *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*. p. 299–308, 2013. (editora/local não informados na sua lista).

FERREIRA, João J. et al. Industry 4.0 implementation: environmental and social sustainability in manufacturing multinational enterprises. **Journal of Cleaner Production**, v. 404, p. 136841, 2023.

FIERER, Noah. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017.

FILIATRAULT-CHASTEL, Camille et al. From fungal secretomes to enzymes cocktails: the path forward to bioeconomy. **Biotechnology Advances**, v. 52, p. 107833, 2021.

FUKASAWA, Yu. Ecological impacts of fungal wood decay types: a review of current knowledge and future research directions. **Ecological Research**, v. 36, n. 6, p. 910–931, 2021.

GHISELLINI, P.; CIALANI, C.; ULGIATI, S. A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 114, p. 11–32, 2016.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GÍRIO, Francisco M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 242, p. 329–341, 1986.

GLOBAL CARBON ATLAS. GCB 2023. Disponível em: <https://globalcarbonbudget.org/carbonbudget2023/>. Acesso em: 12 maio 2025.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Raquel; JORRÍN-NOVO, Jesús V. Contribution of proteomics to the study of fungal biology and biotechnology. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 93, p. 3–18, 2013.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; JORRÍN-NOVO, J. V. Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 3–16, 2012.

GRAHAM, Ciaren; MCMULLAN, Geoff; GRAHAM, Robert L. J. Proteomics in the microbial sciences. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 1, p. 17–30, 2011.

GUERRIERO, Gea et al. Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2016.

GUO, Hongliang; WANG, Xiao-Dong; LEE, Duu-Jong. Proteomic researches for lignocellulose-degrading enzymes: a mini-review. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 532–541, 2018.

GUO, Xiao et al. Lytic polysaccharide monooxygenase: a new driving force for lignocellulosic biomass degradation. **Bioresource Technology**, v. 362, p. 127803, 2022.

GUO, Lichun et al. Strategies to enhance production of metabolites in microbial co-culture systems. **Bioresource Technology**, p. 131049, 2024.

GUPTA, Vijai K. et al. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.

HAIDER, Saad; PAL, Ranadip. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. **Current Genomics**, v. 14, n. 2, p. 91–110, 2013.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, Paola et al. Comparative secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* grown on lignocellulosic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 17, p. 1–12, 2012.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804–807, 2007.

HISCOX, Jenni et al. Fungal interactions and resource capture in wood decay systems. **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 21–30, 2018.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. *Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4–5, p. 409–418, 2002.

HU, Yunzi et al. Recent advances in substrate-enzyme interactions facilitating efficient biodegradation of lignocellulosic biomass: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 180, p. 105594, 2023.

HUANG, C. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by co-culture of *Trichoderma reesei* and white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 239–245, 2015.

HUANG, Yingying et al. Comparative transcriptomic analysis of key genes involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 200, 2023.

İNCI, Şule; KIRBAĞ, Sevda; AKYÜZ, Mehmet. Growth period, yield, and nutrient contents of *Pleurotus citrinopileatus* Singer grown on some local agricultural wastes in Turkey. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 16, p. 15029–15038, 2023.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. *Microbial pectinolytic enzymes: A review*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119–134, 2007.

JOURDIER, E. et al. Proximity ligation scaffolding and comparison of two *Trichoderma reesei* strains genomes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 353–363, 2013.

KABEL, M. A. et al. Enzyme production by filamentous fungi on complex substrates is not directly proportional to biomass accumulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, n. 3, p. 601–610, 2006.

KHALESI, Mohammadreza; GEBRUERS, Kurt; DERDELINCKX, Guy. Recent advances in fungal hydrophobin towards using in industry. **The Protein Journal**, v. 34, p. 243–255, 2015.

KIRK, T. Kent; FARRELL, Roberta L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465–505, 1987.

KLEIN, B. C. et al. Beyond ethanol, sugar, and electricity: a critical review of product diversification in Brazilian sugarcane mills. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 3, p. 809–821, 2019.

KLEINSCHMIT, D. et al. Shades of green: a social scientific view on bioeconomy in the forest sector. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 29, n. 4, p. 402–410, 2014.

KOLASA, Marta et al. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 143–148, 2014.

KOLLIPARA, Laxmikanth; ZAHEDI, René P. Protein carbamylation: in vivo modification or in vitro artefact? **Proteomics**, v. 13, n. 6, p. 941–944, 2013.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. **Journal of General Physiology**, New York, v. 30, p. 291–310, 1947.

KUWAHARA, Masaaki et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247–250, 1984.

LATARULLO, Mariana BG et al. Pectins, endopolygalacturonases, and bioenergy. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1401, 2016.

LI, Y. et al. Comparative transcriptome analysis of *Trichoderma reesei* reveals different gene regulatory networks induced by synthetic mixtures of glucose and β -disaccharide. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 57, 2021.

LI, Zhengchun et al. Identification of genes and metabolic pathways involved in resin yield in masson pine by integrative analysis of transcriptome, proteome and biochemical characteristics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11420, 2022.

LIGUORI, R. et al. Second generation ethanol production from brewers' spent grain. **Energies**, v. 8, n. 4, p. 2575–2586, 2015.

LIU, Yi-Nan et al. Mining microbial resources from water. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 191, p. 106883, 2023.

LOMBARD, Vincent et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D490–D495, 2014.

LOPATUKHIN, E. V. et al. Fungal hydrophobins: biosynthesis, properties, and possibilities of application in biotechnology. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 372–382, 2024.

LUO, Ruhong et al. Synergistic treatment of alkali lignin via fungal coculture for biofuel production: comparison of physicochemical properties and

adsorption of enzymes used as catalysts. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, p. 575371, 2020.

LYND, Lee R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MAGALHÃES JR., Antonio Irineudo et al. Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 6, p. 1505–1519, 2019.

MARTELLI-TOSI, Milena et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 512–520, 2017.

MARTINEZ, Diego et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 5, p. 553–560, 2008.

MAURYA, Devendra Prasad; SINGLA, Ankit; NEGI, Sangeeta. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, v. 5, p. 597–609, 2015.

MENG, Xiaohui et al. The functioning of a novel protein, swollenin, in promoting the lignocellulose degradation capacity of *Trichoderma guizhouense* NJAU4742 from a proteomic perspective. **Bioresource Technology**, v. 317, p. 123992, 2020.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MILLIKIN, Robert J. et al. Ultrafast peptide label-free quantification with FlashLFQ. **Journal of Proteome Research**, v. 17, n. 1, p. 386–391, 2018.

MITTERMEIER, Fabian et al. Synthetic microbial consortia for biomass conversion: strategies and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 267–281, 2022.

MITTERMEIER, Fabian et al. Artificial microbial consortia for bioproduction processes. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 23, n. 1, p. e2100152, 2023.

MONCLARO, Antonielle Vieira et al. The enzyme interactome concept in filamentous fungi linked to biomass valorization. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126200, 2022.

MÜLLER, Gerdt et al. The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 1–17, 2018.

O'HARA, I. M. The sugarcane industry, biofuel, and bioproduct perspectives. In: *Sugarcane-Based Biofuels and Bioproducts*. p. 1–22, 2016.

ØSTBY, Heidi et al. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 47, n. 9–10, p. 623–657, 2020.

PAGLIUSO, Débora et al. The effect of sugarcane straw aging in the field on cell wall composition. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 652168, 2021.

PAKARINEN, Annukka et al. Removal of pectin improves enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 275–281, 2012.

PALONEN, H. et al. Evaluation of lignin binding and inactivation of cellulases by lignin-rich fractions from pretreated biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, p. 679–689, 2004.

PATEL, A. K. et al. Nano magnetite assisted flocculation for efficient harvesting of lutein and lipid producing microalgae biomass. **Bioresource Technology**, v. 363, p. 128009, 2022.

PELÁEZ, Rubén Darío Romero et al. Production of enzymatic extract with high cellulolytic and oxidative activities by co-culture of *T. reesei* RUT-C30 and *Panus lecomtei*. **Fermentation**, v. 8, n. 10, p. 522, 2022.

PELÁEZ, R. D. R. et al. Co-culturing of micro- and macro-fungi for producing highly active enzyme cocktail for producing biofuels. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100833, 2021.

PEÑALVA, Miguel A.; ARST JR., Herbert N. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 426–446, 2002.

PERCO, Paul et al. Linking transcriptomic and proteomic data on the level of protein interaction networks. **Electrophoresis**, v. 31, n. 11, p. 1780–1789, 2010.

PEREIRA, Barbara et al. High yield biorefinery products from sugarcane bagasse: Prebiotic xylooligosaccharides, cellulosic ethanol, cellulose nanofibrils and lignin nanoparticles. **Bioresource technology**, v. 342, p. 125970, 2021.

PFAU, S. et al. Visions of sustainability in bioeconomy research. **Sustainability**, v. 6, n. 3, p. 1222–1249, 2014.

RACKEMANN, Darryn W.; ZHANG, Zhanying; DOHERTY, William O. S. Conversion of sugarcane carbohydrates into platform chemicals. In: *Sugarcane-Based Biofuels and Bioproducts*. p. 207–236, 2016.

RAMOS, Márcio Daniel Nicodemos et al. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development**, v. 68, p. 103–119, 2022.

RAPPSILBER, Juri; MANN, Matthias; ISHIHAMA, Yasushi. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, 2007.

RIBEIRO, Daniela A. et al. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* grown on sugarcane bagasse. **BMC Biotechnology**, Londres, v. 12, p. 1–13, 2012.

RISEH, Roohallah Saberi et al. Agricultural wastes: a practical and potential source for the isolation and preparation of cellulose and application in agriculture and different industries. **Industrial Crops and Products**, v. 208, p. 117904, 2024.

ROBINS, Karen T.; SPEIGHT, Robert E. Chemicals manufacture from fermentation of sugarcane products. In: *Sugarcane-Based Biofuels and Bioproducts*. p. 111–136, 2016.

SAINI, Jitendra Kumar et al. Strategies to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for biorefinery applications: a review. **Bioresource Technology**, v. 360, p. 127517, 2022.

SALVACHÚA, Davinia et al. Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1–14, 2013.

SEIDL, Verena et al. Transcriptomic analysis of the hypercellulolytic mutant *Trichoderma reesei* RUT-C30 reveals the effect of the *cre1* truncation and additional genomic deletions. **BMC Genomics**, Londres, v. 9, p. 327, 2008.

SEKAN, Alona S. et al. Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. **PeerJ**, v. 7, p. e6664, 2019.

SELEGATO, Denise M.; CASTRO-GAMBOA, Ian. Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1117559, 2023.

SEGERS, Britt et al. Lignocellulosic biomass valorisation: a review of feedstocks, processes and potential value chains and their implications for the decision-making process. **RSC sustainability**, v. 2, n. 12, p. 3730-3749, 2024.

SHARMA, Krishna Kant. Exploring fungi-associated lignocellulose degradation: secretomic and proteomic approaches. In: *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology: Basic and Applied Aspects of Fungi*. p. 251–277, 2019.

SHARMA, Vishal et al. Agro-industrial food waste as a low-cost substrate for sustainable production of industrial enzymes: a critical review. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1373, 2022.

SPERANDIO, Guilherme Bento; FERREIRA FILHO, Edivaldo Ximenes. Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 142, p. 109–123, 2019.

SPERANDIO, G. B.; FERREIRA FILHO, E. X. F. An overview of *Trichoderma reesei* co-cultures for the production of lignocellulolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 3019–3025, 2021.

SPERANDIO, Guilherme Bento et al. Exploring the synergistic secretome: insights from co-cultivation of *Aspergillus brasiliensis* and *Trichoderma reesei* RUT-C30. **Journal of Fungi**, Basel, v. 10, n. 10, p. 677, 2024.

STRAKOWSKA, Judyta; BŁASZCZYK, Lidia; CHEŁKOWSKI, Jerzy. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. S1, p. S2–S13, 2014.

STÜBNER, Matthias et al. Heterologous expression of the hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* in *Pichia pastoris* and evaluation of its surface activity and contribution to gushing of carbonated beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1–2, p. 110–115, 2010.

SURYADI, Herman et al. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, v. 8, n. 2, 2022.

TANAKA, Takumi et al. *Aspergillus* hydrophobins: physicochemical properties, biochemical properties, and functions in solid polymer degradation. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1498, 2022.

TEN HAVE, Rimko; TEUNISSEN, Pauline J. M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 11, p. 3397–3414, 2001.

THUAN, Nguyen Huy et al. Recent advances in microbial co-culture for production of value-added compounds. **3 Biotech**, v. 12, n. 5, p. 115, 2022.

TOCCO, Davide et al. Recent developments in the delignification and exploitation of grass lignocellulosic biomass. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 6, p. 2412–2432, 2021.

TOMEI, Julia; HELLIWELL, Richard. Food versus fuel? Going beyond biofuels. **Land Use Policy**, v. 56, p. 320–326, 2016.

VASIĆ, Katja; KNEZ, Željko; LEITGEB, Maja. Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 753, 2021.

VASSILEV, Stanislav V. et al. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, v. 89, n. 5, p. 913–933, 2010.

VEREMAN, Jeroen et al. Improved extraction and purification of the hydrophobin HFBI. **Biotechnology Journal**, v. 16, n. 11, p. 2100245, 2021.

WARIISHI, H.; VALLA, K.; GOLD, M. H. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 23688–23695, 1992.

WENGER, Craig D.; COON, Joshua J. A proteomics search algorithm specifically designed for high-resolution tandem mass spectra. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 3, p. 1377–1386, 2013.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 295–299, 2009.

WOLFENDEN, Brian S.; WILLSON, Robin L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis

studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 7, p. 805–812, 1982.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, T. M.; KELLOGG, S. T. (ed.). *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1988. v. 160, p. 87–112.

WU, Di et al. Lignocellulose biomass bioconversion during composting: mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. **Chemosphere**, v. 286, p. 131635, 2022.

XU, Danyun et al. Identification of hydrophobin genes and their physiological functions related to growth and development in *Pleurotus ostreatus*. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126723, 2021.

YAO, L. et al. Discovery of novel xylosides in co-culture of basidiomycetes *Trametes versicolor* and *Ganoderma applanatum* by integrated metabolomics and bioinformatics. **Scientific Reports**, v. 6, p. 33237, 2016.

YU, Guihong et al. Coculture, an efficient biotechnology for mining the biosynthesis potential of macrofungi via interspecies interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 663924, 2021.

YÜKSEL, Ecem; KORT, Remco; VORAGEN, Alphons GJ. Structure and degradation dynamics of dietary pectin. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 65, n. 29, p. 6249-6268, 2025.

ZADEH, Zahra Echresh et al. Recent insights into lignocellulosic biomass pyrolysis: a critical review on pretreatment, characterization, and products upgrading. **Processes**, v. 8, n. 7, p. 799, 2020.

ZHANG, Jianfeng et al. Enhanced biodegradation of phenol by microbial collaboration: resistance, metabolite utilization, and pH stabilization. **Environmental Research**, v. 238, p. 117269, 2023.

ZHANG, Yu et al. Two-stage inoculation with lignocellulose-degrading microorganisms in composting: enhanced humification efficiency and underlying mechanisms. **Environmental Research**, v. 271, p. 120906, 2025.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 815–827, 2009.