



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

JOAB DO NASCIMENTO PIRES

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* AN 400 UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

FORTALEZA

2016

JOAB DO NASCIMENTO PIRES

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* AN 400 UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e
Gestão Ambiental do Instituto Federal do
Ceará como requisito para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Orientador: Profa. Dra. Kelly de Araújo
Rodrigues Pessoa
Co-orientadora: Profa. Dra. Glória Maria
Marinho Silva

FORTALEZA

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca Waldyr Diogo de Siqueira

P667p Pires, Joab do Nascimento .
Produção de celulases por *Aspergillus niger* AN 400 utilizando
resíduos agroindustriais / Joab do Nascimento Pires - Fortaleza:
IFCE, 2016.
100 p.

Dissertação (Tecnologia em Gestão Ambiental).
Orientadora: Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa

1. BATELADAS I. TÍTULO.

CDD 628

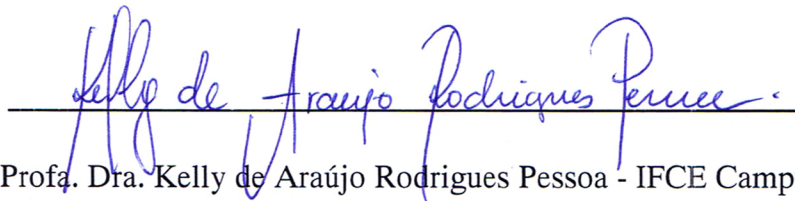
JOAB DO NASCIMENTO PIRES

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus Niger* AN 400 UTILIZANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

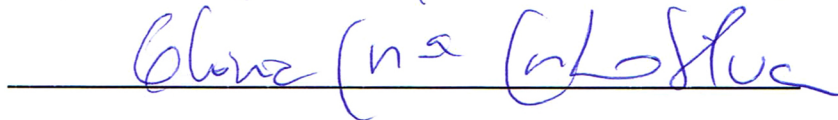
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em 07/06/16

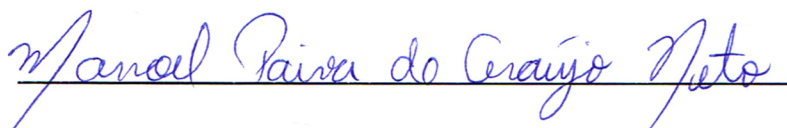
BANCA EXAMINADORA



Presidente Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa - IFCE Campus Fortaleza



Membro Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva - IFCE Campus Fortaleza



Membro Prof. Dr. Manoel Paiva de Araújo Neto - IFCE Campus Acaraú

Aos meus pais José Wilson de Lima Pires e Valdeniza do nascimento pires, e aos meus irmãos José Wilton, Regina Lucia e Francia Diana, os quais estão sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, ajuda e pelo cuidado a cada instante; aos meus pais e irmãos pelo amor e confiança; a minha orientadora Kelly Rodrigues pelo incentivo desde sempre a fazer o mestrado, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência e compreensão em situações difíceis e por sempre estar disponível; aos meus amigos de mestrado por cada momento maravilhoso que passamos juntos, em especial à Ana Claudia Braid e a Isabel Freitas que tiveram grande importância para o desenvolvimento desta pesquisa; aos meus amigos do laboratório LATAM pela ajuda, em especial, minhas amigas Aline Amorim e Amanda Moraes, companheiras de projeto; a um amigo especial que foi pedra fundamental para que eu tivesse a oportunidade de lutar por esse sonho que é a busca pelo título de mestre, Marcus Vinicius Freire Andrade; ao meu amigo Ricardo Marques pela ajuda; a cada pessoa que torceu pelo meu sucesso; à EMBRAPA pelo fornecimento da casca de coco, assim como pela disponibilização dos equipamentos utilizados para o processamento da fibra; a banca examinadora pelo conhecimento agregado e por fim, à CAPES pelo suporte financeiro concedido.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A crescente geração de resíduos agroindustriais tem despertado preocupação em relação ao destino final destes resíduos, visando à proteção do meio ambiente. Dentre tais resíduos, destacam-se o bagaço de cana e a casca de coco, frequentemente destinados aos aterros sanitários ou aos lixões. O desenvolvimento de tecnologias para agregar valores a estes resíduos é importante, pois diminui o volume a descartar e ainda produz renda. Neste contexto, utilizou-se bagaço de cana e de casca de coco como fontes indutoras para produção de enzima celulase. Foram estudadas as condições mais adequadas para viabilizar a produção de celulases por *Aspergillus niger* AN 400. O crescimento do fungo sobre os substratos na presença e ausência da glicose e a influência do tempo reacional (1 a 10 dias) foram inicialmente avaliados. Posteriormente, foram realizados experimentos para verificação da umidade (50%, 60%, 70%, 80% e 95%), do pH inicial (2,5, 3,5 e 5,5) e da presença e ausência de pré-tratamento dos substratos indutores com hidróxido de sódio para produção de celulases pelo fungo. Reatores de 250 mL foram operados em bateladas, nos tempos reacionais de 3, 4, 5 e 6 dias e mantidos em mesa agitadora de bancada à 30 °C. Houve crescimento visual do fungo sobre ambos os substratos, na presença e ausência de glicose. Em relação ao tempo reacional, obteve-se maior atividade enzimática a partir do segundo 2º dia de cultivo (0,073 UI/mL), com valor máximo no 8º dia (0,081 UI/mL), o qual ficou próximo das atividades registradas nos tempos reacionais anteriores, a partir do 2º dia. A umidade não exerceu influência sobre a atividade enzimática, assim como o pH inicial, de acordo com o tratamento estatístico ANOVA. O pré-tratamento químico empregado em ambos os substratos não resultou em maior produção enzimática. Contudo, as atividades de celulases registradas nos reatores com bagaço de cana foram ligeiramente superiores às obtidas nos reatores com casca do coco. Os resultados obtidos apontam para a viabilidade do uso destes resíduos para produção de celulases, sendo que há a necessidade de se estudar mais variáveis para estabelecer outras condições conduzam ao maior rendimento do processo.

Palavras-chave: Fungo. Cana-de-açúcar. Coco. Enzima. Bateladas.

ABSTRACT

The growing generation of agro-industrial waste has aroused the concern regarding the final destination of waste, aimed at environmental protection. Among such waste, sugarcane bagasse and coconut husk stand out, often destined for sanitary landfills or garbage dumps. The development of technologies to add value to this waste is important because it reduces the volume of discard and still produce income. In this context, it was used sugarcane bagasse and coconut husk as sources for inducing production of cellulase. The most appropriate conditions were studied to enable the production of cellulases by *Aspergillus niger* AN 400. The fungus growth on substrates in the presence and absence of glucose and the influence of reaction time (1-10 days) were initially evaluated. Afterwards, experiments were conducted to verify humidity (50%, 60%, 70%, 80% and 95%), initial pH (2.5, 3.5 and 5.5) and the presence or absence of pre- treatment of inducing substrates with sodium hydroxide with the goal to produce cellulases by fungus *Aspergillus niger* AN 400. 250 ml reactors were operated in batch in the reaction times of 3, 4, 5 and 6 days and kept on shaking table bench to 30 °C. There was visual fungal growth on both substrates in the presence and absence of glucose. Regarding the reaction time, it was registered high enzymatic activity from the second day of culture (0.073 IU/mL), with maximum on the eighth day (0.081 IU/ml), which was close to the registered activities in previous reaction times, from the second day. The humidity apparently did not exert influence on the enzymatic activity, as well as the initial pH, according to the statistical treatment ANOVA. The chemical pre-treatment used in both substrates did not result in higher enzyme production. However, the activity of cellulases recorded in the reactors with sugarcane bagasse were slightly higher than those obtained in the reactors with coconut husk. The results indicate the feasibility of using these type of residues to produce cellulases, and there is a need to study more variables to establish other conditions that lead to higher yield of the process.

Keywords: Fungi. Sugar cane. Coconut. Enzyme. Batch.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da celulose, forma linear.	30
Figura 2 - Esquema da ação sinérgica das celulasas sobre a celulose.	36
Figura 3 - Sequência experimental da pesquisa.....	39
Figura 4 - Substratos bagaço de cana-de-açúcar (a) e casca de coco (b) para produção de celulasas por <i>Aspergillus niger</i> AN400.	41
Figura 5 - Reação de oxidação da carbonila pelo reagente DNS.	49
Figura 6 - Fluxograma sequencial da determinação da atividade de celulase total.....	52
Figura 7 - Crescimento micelial fúngico no bagaço de cana: à esquerda, sem glicose presente e à direita, com glicose.	55
Figura 8 – Crescimento micelial fúngico na casca do coco: à esquerda, com glicose presente e à direita, sem glicose.	55
Figura 9 - Variação da atividade de celulase total (Atv) e do pH no decorrer do tempo reacional de 10 dias utilizando o bagaço de cana como substrato indutor.	58
Figura 10 - Crescimento da biomassa fúngica sobre a casca do coco em diferentes condições de umidade: 50%, 60%, 70%, 80% e 95%.	60
Figura 11 - Crescimento da biomassa fúngica sobre o bagaço de cana-de-açúcar em diferentes condições de umidade: 50%, 60%, 70%, 80% e 95%.	61
Figura 12– Aspecto visual da biomassa do fungo nos reatores com teor de umidade de 80% e 95% com bagaço de cana (a e b, respectivamente) e de 95% com casca do coco no tempo reacional de 6 dias.	62
Figura 13 - Variação da atividade enzimática em diferentes condições de umidade na casca do coco.....	63
Figura 14 - Variação da atividade enzimática em diferentes condições de umidade no bagaço de cana.	64
Figura 15 - Variação do pH inicial ao longo do tempo reacional (TR) nas bateladas com bagaço de cana pré-tratado (RFCPCA2,5; RFCPCA3,5 e RFCPCA5,5) e sem pré-tratamento (RFSPCA2,5; RFSPCA3,5 e RFSPCA5,5).	67
Figura 16 - Variação do pH inicial ao longo do tempo reacional (TR) nas bateladas com casca do coco pré-tratado (RFCPCO2,5; RFCPCO3,5 e RFCPCO5,5) e sem pré-tratamento (RFSPCO2,5; RFSPCO3,5 e RFSPCO5,5).	68
Figura 17 - Atividade enzimática nas bateladas contendo bagaço de cana desprovido de pré-tratamento químico.	70

Figura 18 - Atividade enzimática nas bateladas contendo bagaço de cana pré-tratado.	72
Figura 19 - Atividade enzimática nas bateladas contendo casca de coco desprovida de pré-tratamento químico.	76
Figura 20 - Atividade enzimática nas bateladas contendo casca de coco pré-tratado.	78
Figura 21 - Atividade enzimática nas bateladas de controle contendo bagaço de cana.	80
Figura 22 - Atividade enzimática nas bateladas de controle contendo casca de coco.	81
Figura 23 - Produtividade enzimática (prod.) com bagaço de cana tratada (CACT), cana não tratada (CAST), coco tratado (COCT) e coco desprovido de tratamento (COST) nas bateladas de diferente pH inicial.	82
Figura 24 -Gráfico de interação entre os Fatores pH e pré-tratamento para o bagaço de cana.	85
Figura 25 - Gráfico de interação entre os Fatores pH e pré-tratamento para a casca do coco.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Penicillium</i> testadas utilizando resíduo de Cajá e Umbu-cajá adicionado de 0,5% de ácido tânico após 96 h de incubação.	22
Tabela 2 -Macronutrientes fundamentais aos fungos e sua importância.	26
Tabela 3 - Fungos filamentosos produtores de celulasas.	34
Tabela 4 - Valores dos parâmetros utilizados na digestão do material.	42
Tabela 5 - Composição da solução de Vishiniac (micronutrientes).	43
Tabela 6 - Composição do meio nutricional de crescimento.....	44
Tabela 7 - Esquema das bateladas operadas.....	47
Tabela 8 - Curva padrão de glicose para determinação de celulasas totais.	50
Tabela 9 - Determinação dos elementos químicos presentes nos substratos.....	53
Tabela 10 - Tratamento estatístico dos dados referentes ao bagaço de cana e à casca de coco em relação às diferentes umidades testadas.....	66
Tabela 11 -- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao substrato bagaço de cana levando em consideração os fatores pH (A), pré-tratamento (B) e a interação entre os mesmos (A-B).....	86
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao substrato casca de coco levando em consideração os fatores pH (A), pré-tratamento (B) e a interação entre os mesmos (A-B).....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN (DNA) - Ácido desoxirribonucleico

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAD - Flavina - adenina - dinucleotídeo

FES - Fermentação em estado sólido

FS - Fermentação submersa

ITS - Região do Espaço Interno Transcrito

LATAM - Laboratório de Tecnologia Ambiental

NAD - Nicotinamida - adenina - dinucleotídeo

PAH's - Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares

PEAD - Polietileno de Alta Densidade

RNA – Ácido ribonucleico

RRC - Reatores Reacionais Controles

RRF - Reatores Reacionais com Fungos

SINDCOCO - Sindicato Nacional dos Produtores de Coco

TCA – Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

TR – Tempo reacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Geração de resíduos agroindustriais e seu potencial de aproveitamento	18
3.2 Fungos e sua aplicação biotecnológica	21
3.3 Elementos e requisitos nutricionais importantes ao metabolismo fúngico	24
3.4 Gênero <i>Aspergillus</i> e seu potencial biotecnológico	27
3.5 Polissacarídeo Celulose.....	29
3.6 Produção de celulasas por fungos	31
3.7 Enzimas celulasas e sua atuação na celulose.....	35
3.8 Aplicação industrial das celulasas.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Micro-organismo.....	39
4.2 Procedimento de contagem dos conídios	40
4.3 Substratos indutores	41
4.4 Caracterização elementar dos substratos.....	42
4.5 Teste do crescimento fúngico sobre os substratos sem tratamento.	43
4.6 Teste do comportamento da atividade enzimática ao longo do tempo.....	44
4.7 Teste da melhor condição de umidade	45
4.8 Montagem, operação e monitoramento dos reatores em bateladas	46
4.8.1 <i>Pré-tratamento químico dos substratos</i>	48
4.9 Extração das enzimas	48
4.10 Determinação da atividade de celulase total	49
4.11 Tratamento estatístico	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1 Caracterização elementar dos substratos.....	53
5.2 Crescimento fúngico sobre cossustratos.....	55
5.3 Influência do tempo reacional para produção da celulase.....	58
5.4 Influência da umidade para no crescimento fúngico e na produção da celulase.....	60
5.5 Influência do pH inicial e do pré-tratamento químico sobre a atividade enzimática (Etapas I e II)	67

5.6 Influência do tempo de reação na produtividade enzimática.	82
5.7 Influência do substrato na atividade enzimática.....	83
5.8 Tratamento estatístico dos dados.....	84
6 CONCLUSÃO.....	87
7 RECOMENDAÇÕES.....	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Mediante a intensiva geração de resíduos agroindustriais, é de suma importância encontrar formas de agregar valor a estes resíduos, com fim econômico e tecnológico, reduzindo os impactos negativos ao meio ambiente, além de proporcionar emprego e renda (MACHADO; DAMM; JUNIOR, 2009).

Além disso, ao agregar valor aos resíduos agroindustriais, de modo que proporcionem algum benefício, coopera-se para a redução da demanda de destinação inadequada dos mesmos em lixões ou mesmo em aterros sanitários, contribuindo ainda para o aumento do tempo de utilidade destes locais.

É importante também destacar o benefício para os sítios de produção que trabalham diretamente em processos que originam os resíduos agroindustriais, uma vez que poderão ter retorno financeiro mediante o aproveitamento de material residual antes pouco ou em nada aproveitado. Segundo Pelizer, Pontieri e Moraes (2007), caso seja empregada tecnologia adequada, estes materiais podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

Dentro desta perspectiva, uma alternativa viável para utilização desses materiais que seriam descartados, e muitas das vezes sem qualquer tipo de cuidado, seria a produção de enzimas, utilizadas em diferentes segmentos industriais, pela ação de micro-organismos específicos que utilizam esses resíduos como substrato indutor (JÚNIOR, 2014). As enzimas passaram a ser cada vez mais utilizadas em diferentes processos, não apenas na área de alimentos, mas em muitas outras, tais como: médica, têxtil, química, de papel e celulose, produção de detergente, cosméticos, biocombustíveis, dentre outras (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

A produção de enzimas é feita por organismos diversos, desde os organismos simples, como fungos e bactérias, a organismos superiores, como animais e vegetais e as mesmas têm sido usadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos. Contudo, a importância das enzimas só foi reconhecida em meados do século XIX, quando cientistas passaram a entender sua forma de atuação (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

O desenvolvimento tecnológico mundial tem avançado cada vez mais na rota dos processos biotecnológicos para obtenção de enzimas de importante interesse comercial. A biotecnologia, definida como o conjunto de técnicas das ciências biológicas aplicadas à pesquisa e desenvolvimento de produtos voltados ao mercado, através da utilização de

recursos biológicos (SILVEIRA; BORGES; BUAINAINS, 2005), tem sido ferramenta de suma importância para o meio ambiente, atuando no tratamento de efluentes industriais, degradação de resíduos sólidos, biorremediações, produção de biocombustíveis e de outros subprodutos de interesse industrial.

Dentre os micro-organismos, os fungos vêm sendo alvo de grande interesse para a biotecnologia, sendo produtores convenientes de enzimas industriais, proteínas, bioetanol, vitaminas, adoçantes, lipídios, bem como de outros metabólitos de valores medicinais e nutricionais (JOHNSON, 2013) e amplamente empregados em pesquisas voltadas para o tratamento de poluentes orgânicos e inorgânicos que têm apresentado resultados promissores.

O interesse por estes micro-organismos se deve à sua capacidade de decompor diferentes substratos, devido ao diversificado aparato enzimático. Esta capacidade é explorada há tempos, gerando diferentes produtos ou processos (GRIMM *et al.*, 2005). Além disso, as enzimas fúngicas dominam as aplicações comerciais em razão de seu alto nível de expressão e secreção (FERREIRA *et.al.*, 2011).

Assim, a utilização de fungos para a degradação de resíduos e concomitante produção de metabólitos de interesse econômico, representa mercado novo que poderá se fortalecer, prometendo ocupar o setor de tecnologias do futuro, tendo como base o desenvolvimento sustentável.

O maior diferencial desta pesquisa reside no fato dos resíduos de casca de coco e de bagaço de cana poderem ser vistos como fontes alternativas de custo baixo e de fácil aquisição para a produção de enzimas como as celulases, importantes catalizadores utilizados no setor industrial em diferentes processos. Outro aspecto de grande importância é a preservação ambiental devido à utilização destes resíduos como material indutor para produção de tais enzimas, o que poderá cooperar para redução da demanda de destinação inadequada destes resíduos no meio ambiente.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de enzimas celulases pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400 a partir do uso dos resíduos de caca de coco e bagaço de cana-de-açúcar, verificando-se a influência da condição inicial do substrato (com e sem pré-tratamento químico), da umidade e da variação do pH inicial do meio sobre a produção dessas enzimas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A presente pesquisa tem por objetivo avaliar a utilização da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 para produção de enzimas celulasas, a partir da biodegradação de resíduos de casca de coco e de bagaço de cana-de-açúcar como fontes de carbono indutoras.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de crescimento da espécie fúngica sobre os resíduos utilizados na presente pesquisa na presença e na ausência de glicose como fonte de carbono de fácil assimilação;
- Caracterizar a composição dos substratos referente aos elementos químicos constituintes;
- Acompanhar a atividade enzimática no decorrer de diferentes tempos reacionais;
- Avaliar a melhor condição de umidade necessária à maior produção de celulasas pelo fungo a partir do uso dos resíduos;
- Verificar a influência de diferentes valores de pH inicial sobre a produção de celulase;
- Avaliar a influência do pré-tratamento químico sobre a produção de celulase pelo fungo;
- Selecionar, entre a casca do coco e o bagaço da cana, o resíduo que resultar na maior produtividade de celulasas pelo micro-organismo em estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A problemática ambiental quanto ao acúmulo de resíduos agroindustriais pode ser amenizada com o emprego dos mesmos como matéria indutora para a produção de compostos de grande interesse industrial. Será mostrada neste tópico a problemática referente ao descarte inadequado desses resíduos, assim como o potencial que os mesmos podem ter para geração de importantes metabólitos a partir da ação de micro-organismos específicos como os fungos, em especial, a espécie *Aspergillus niger*, a qual se destaca ainda na biorremediação de compostos complexos e em outros processos que envolvam diretamente o metabolismo deste micro-organismo. Serão também apresentados requisitos nutricionais e outros fatores necessários para o desenvolvimento de tecnologias que utilizam fungos como seus protagonistas.

3.1 Geração de resíduos agroindustriais e seu potencial de aproveitamento

No Brasil, o setor agroindustrial tem crescido muito nos últimos anos, entretanto, o mesmo tem contribuído significativamente para o aumento do consumo de insumos e do volume de resíduos sólidos lançados em aterros sanitários (MACHADO; DAMM; JUNIOR, 2009; ROSA *et al.*, 2011), ou até mesmo incorretamente nos lixões.

Como qualquer outro setor voltado à produção em massa, as atividades agroindustriais geram significativa quantidade de resíduos sólidos, sendo a celulose o composto principal em sua constituição. De acordo com Rosa *et al.* (2011), a geração de resíduos está associada ao desperdício no uso de insumos, às perdas entre a produção e o consumo e aos materiais que, gerados ao longo da cadeia agroindustrial, não possuem valor econômico evidente. Esses mesmos autores, estimam que 20% a 30% da safra de grãos, frutas e hortaliças colhidas no Brasil sejam desperdiçados no caminho entre a lavoura e o consumidor.

A geração de resíduos agroindustriais tem despertado questões ambientais no que tange ao destino mais viável para os mesmos, o que tem levado ao crescente interesse pela obtenção de novas formas de reaproveitamento destes materiais. Segundo Rosa *et al.* (2011), estes resíduos podem se constituir em fonte importante para a produção de novos materiais, de produtos químicos e de energia.

De acordo com Santos *et al.* (2011), avanços no processo biotecnológico vêm sendo desenvolvidos em diversos segmentos para a transformação destes resíduos em produtos de interesse comercial e industrial, de modo a lhes agregar valor econômico.

O bagaço de cana, por exemplo, tem suas principais aplicações como fonte direta e indireta de produção de energia e/ou como insumo ou matéria-prima. No primeiro caso, refere-se ao seu uso em caldeiras para a geração de calor e energia elétrica e também para a produção de etanol combustível (MARQUES, 2010), tratando-se de resíduo relativamente interessante do ponto de vista energético, por apresentar poder calorífico inferior em torno de 1.770 kcal/kg, a um teor de umidade de 50% na base seca, possibilitando-o substituir, sem dificuldades maiores, outras fontes de energia mais onerosas como as derivadas do petróleo e lenha (COUTO *et al.*, 2004).

No segundo caso, ou seja, como insumo ou matéria-prima, o bagaço de cana pode ser utilizado como fonte para obtenção de fibra para polpa de celulose para fabricar componentes compensados, alimento animal, furfural e outros produtos químicos (MARQUES, 2010).

Além do bagaço de cana-de-açúcar, outro resíduo agroindustrial que tem alcançado geração significativa é a casca de coco seco ou verde, o que vai depender do processo que essa matéria-prima é destinada, sendo que a crescente agroindústria do envasamento da água de coco-verde gera volumes expressivos de resíduos que atualmente são descartados em lixões, causando problemas ambientais (SANTOS; GOMES; LIMA, 2012). No Brasil, a região Nordeste é a maior responsável pela produção de coco verde: cerca de 69,25% do valor total do coco produzido (MARTINS; JÚNIOR, 2011).

O Sindicato Nacional dos Produtores de Coco (SINDCOCO) relatou que o Brasil produz anualmente 1 bilhão de cocos verdes, de onde é extraída a água, e 1 bilhão de cocos secos, matéria-prima do coco ralado e do leite de coco, sendo que apenas 10% do resíduo gerado desse total é reaproveitado (IDOETA, 2014). Ainda conforme o mesmo sindicato, a quantidade de coco verde destinada para produção de água de coco em 2014 foi de cerca de 1,5 bilhão de frutos com geração de 2.227 toneladas de resíduos gerados e estima-se que 70% de todo resíduo gerado nas praias brasileiras seja constituído por cascas de coco verde (COLLARES, 2015).

Do coco produzido, cerca de 15% do produto é utilizado para o consumo, ou seja, 85% do material é descartado no meio ambiente, quadro que se agrava pelo fato do coco ser material de difícil degradação, chegando a levar oito anos para se decompor inteiramente quando lançado ao solo (MACHADO; DAMM; JUNIOR, 2009).

O acúmulo da casca de coco e de outros resíduos contribui na transmissão de doenças por meio de vetores como: moscas, mosquitos, baratas e roedores que encontram nos resíduos alimentos, abrigo e condições adequadas para proliferação (SILVEIRA, 2008). Conforme descrito na revista A Lavoura (Nº 690/2012), devido ao seu grande volume, este resíduo transformou-se em um problema para os serviços municipais de coleta, sobrecarregando os aterros sanitários e vazadouros, favorecendo além da presença de vetores transmissores de doenças, mau cheiro e possibilidade de contaminação do solo e da água. Outro fator agravante é que o processo de decomposição da fibra de coco resulta na produção de metano que é lançado na atmosfera, sendo o mesmo um dos gases que contribui para aquecimento global, através do efeito estufa (FURTADO; GADELHA, 2012).

O investimento intensivo na busca por soluções para redução dos resíduos agroindustriais no meio ambiente deve ser visado de modo que, ao mesmo tempo, promova o uso destes materiais para outras finalidades. De acordo com Sanchés (2009), vários bioprocessos têm sido desenvolvidos com sucesso a partir de resíduos agroindustriais, inclusive a produção de enzimas microbianas. Estudos apontam altos custos como um fator limitante no processo de produção de enzimas, assim, uma das alternativas para minimizar este problema tem sido o emprego de resíduos agroindustriais como substrato fermentescível (MURUGAN *et al.*, 2011).

De acordo com Pandey (2000), entre diversos insumos produzidos a partir de técnicas de conversão biológica com a utilização de resíduos agroindustriais, a produção de enzimas tem sido cada vez mais estudada devido a sua aplicabilidade em diferentes setores industriais, nos quais se destacam indústrias de alimentos e bebidas, têxteis, papelarias e farmacêuticas.

Lavelle (2000) destacou que este sucesso se deve ao fato de que os resíduos agroindustriais já servem como substrato para o crescimento destes organismos no ambiente natural, onde fungos e outros micro-organismos produzem enzimas específicas para cada fração orgânica do substrato colonizado.

Mediante o relatado, é de grande importância para o meio ambiente que a geração de resíduos agroindustriais seja sucedida por alternativas que promovam a reutilização dos mesmos de modo a reduzir sua disponibilização no meio ambiente. O investimento em pesquisas que visem o reaproveitamento de tais resíduos pode ser visto como um instrumento de sustentabilidade, uma vez que os benefícios refletirão na atual e futuras gerações.

3.2 Fungos e sua aplicação biotecnológica

Os fungos filamentosos, popularmente conhecidos como bolores, são lembrados como agentes causadores de danos à saúde humana e de animais, assim como, parasitas vegetais. No entanto, é necessário lembrar a importância que esses organismos têm para diversas finalidades. Eles são utilizados desde os antigos tempos e, de acordo com Papagianni (2004), a fermentação de bebidas alcoólicas, praticada no Antigo Egito pelos faraós, é um dos primeiros exemplos conhecidos da exploração das atividades bioquímicas dos fungos pelos seres humanos, bem como o uso de levedura para fermentação do pão.

De acordo com Silva e Coelho (2006), os fungos são organismos heterotróficos que obtêm nutrientes por absorção, de modo que lançam um aparato de enzimas específicas que agem sobre os substratos e absorvem os nutrientes através da parede e membrana de suas células, onde no interior existe um fluxo citoplasmático o qual permite a difusão de nutrientes solúveis favorecendo o metabolismo entre as células. Ainda segundo esses autores, os fungos utilizam uma variedade de substratos como fontes de carbono, sendo que alguns grupos são especialistas em degradar substratos particulares, tornando-se mais competitivos perante outros micro-organismos.

Dotados de aparato enzimático diversificado, estes micro-organismos têm sido alvo de várias pesquisas em diferentes áreas, tanto para produção de metabólitos de interesse econômico, como para quebra e/ou remoção de poluentes. Em relação à remoção de compostos complexos, Andrade *et al.* (2010) realizaram estudo, em escala laboratorial, que visou avaliar a remoção do corante azo Vermelho do Congo na concentração de 30 mg/L em meio aquoso basal, utilizando a espécie fúngica *Phanerochaete chrysosporium*, inoculada em reator operado em bateladas sequenciais. O estudo mostrou boa capacidade do fungo para remoção deste corante, pois ao longo do experimento foram obtidos percentuais de remoção significativos durante os cinco primeiros ciclos de 48 h, sendo eles, respectivamente, de 100%, 100%, 91%, 98% e 100%.

Li *et al.* (2008) relataram a existência de fungos com capacidade de degradar extrato de carvão orgânico em meio aquoso, através dos processos de clivagem de grupo funcional, despolimerização e desaromatização. Segundo os mesmos autores, algumas espécies são capazes de biodegradar efetivamente hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (PAH's), particularmente os fungos lignolíticos, causadores de podridão branca, que são capazes de degradar e mineralizar uma grande variedade de compostos recalcitrantes, devido seu

maquinário enzimático, secretando normalmente uma ou mais das três enzimas lignolíticas principais: lignina peroxidase, lacase e manganês peroxidase (NOVOTNY *et al.*, 2006).

No que diz respeito à produção de metabólitos, na medicina, por exemplo, têm proporcionado a síntese de antibióticos, como a penicilina, a qual desencadeou alterações profundas no tratamento de doenças infecciosas por seu poder bactericida e nos anos 40, transformou-se em um fármaco imprescindível no arsenal terapêutico (PEREIRA; PITA, 2005).

Ainda referente à capacidade de produção de importantes metabólitos, em um estudo realizado por Lima e Mota (2011) foram analisadas 10 espécies do gênero *Penicillium* para a produção da enzima *tanase*, selecionando assim as espécies de melhor resposta em relação à produção da referida enzima, para posterior avaliação da atividade enzimática em meio sólido. Estes autores utilizaram resíduos agroindustriais de umbu-cajá e cajá como fontes indutoras e constataram que todas as espécies responderam positivamente quanto à capacidade de degradar ácido tânico em meio de cultura sólido, tanto a caracterização qualitativa quanto à produção de *tanase*, porém, quatro espécies não produziram *tanase* na presença de resíduo de cajá e duas não produziram na presença de resíduo de umbu-cajá.

Na Tabela 1 pode-se observar a atividade enzimática das espécies estudadas por Lima e Mota (2011), na presença dos diferentes resíduos como fonte indutora.

Tabela 1 - Espécies de *Penicillium* testadas utilizando resíduo de Cajá e Umbu-cajá adicionado de 0,5% de ácido tânico após 96 h de incubação.

Espécies	Atividade enzimática no resíduo de Cajá (U/mL)	Atividade enzimática no resíduo Umbu-cajá (U/mL)
<i>Penicillium citrinum</i> URM6224	2,52	0,00
<i>P. chrysogenum</i> URM6022	4,59	0,39
<i>P. digitatum</i> URM6216	2,29	0,53
<i>P. fellutanum</i> URM6137	2,30	1,03
<i>P. glabrum</i> URM6092	0,00	4,22
<i>P. janczewiskii</i> URM6041	4,65	0,63
<i>P. melinii</i> URM6215	0,00	4,62
<i>P. restrictum</i> URM6135	0,00	1,61
<i>P. sclerotiorum</i> URM6154	4,89	0,00
<i>P. simplicissimum</i> URM6138	0,00	0,04

Fonte: Adaptado de Lima e Mota (2011)

Por outro lado, não apenas a espécie de fungo, mas também a otimização dos processos biotecnológicos de produção é um tema de grande importância, pois qualquer melhoria alcançada na produtividade do metabolismo microbiano, em geral, através da manipulação dos parâmetros físico-químicos e nutricionais pode alterar significativamente o rendimento do produto de interesse ou eficiência esperada (LADEIRA *et al.*, 2010).

Ferreira *et al.* (2011) avaliaram o efeito do tempo de fermentação (24, 48, 72 e 96 horas) e a umidade (50%, 60% e 70%) sobre a atividade cinética da enzima *endoglucanase* produzida por meio sólido sobre o resíduo de cajá, a partir da ação metabólica do fungo *Aspergillus niger*. Como resultado, obteve-se a produção máxima de *endoglucanase* de 3,186 UI/mL, em 72 horas de processo, e com umidade de 50%. Após este tempo, nas três condições de umidade avaliadas, ocorreu redução da atividade enzimática, o que, segundo os autores, foi atribuída ao possível esgotamento de nutrientes, ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática ou do crescimento celular. Os autores citaram que os produtos finais de uma dada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via, mecanismo este conhecido como *feedback* negativo. Em relação a maior atividade enzimática observada em seu trabalho, esta ocorreu na condição de umidade de 50%.

Ainda segundo Ferreira *et al.* (2011), o teor de água ideal para o crescimento celular deve proporcionar a formação de película de água na superfície do substrato, de modo a facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio do meio para o micro-organismo, porém, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor. Assim, em sua pesquisa, as reduções da atividade enzimática, nas condições de umidade a 60% e 70%, foram atribuídas à inibição do fungo devido à extrapolação do nível de água ideal para o desenvolvimento da linhagem selecionada, no caso de 50%.

Em outro estudo, Cardoso (2009) avaliou a atividade enzimática de *ligninases* (lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase) e *celulase* de 14 fungos basidiomicetos, isolados do semiárido baiano. Na primeira etapa do experimento foi analisado o fungo que melhor respondeu à produção de ambas as classes de enzimas, através da verificação do tamanho do halo formado em placas de petri, contendo os fungos inoculados em meios de cultura sólidos específicos para identificação da atividade de cada classe enzimática. Após a identificação da espécie que apresentou melhor resultado para as duas classes de enzimas, foram realizados testes de otimização da produção das enzimas, utilizando como substrato para o crescimento deste fungo, resíduo agroindustrial: Casca de coco, bagaço de cana-de-açúcar e fibra de sisal.

As variáveis estudadas para otimização das condições de cultivo foram: pH, temperatura, substrato, umidade e tempo de cultivo, tendo-se destacado o fungo basidiomiceto *Trametes villosa* na produção de enzimas ligninocelulolíticas, com os melhores resultados encontrados para *manganês peroxidase*, sendo a máxima atividade de 117,327 U/L. As condições otimizadas para a secreção desta enzima pelo fungo testado foram: substrato bagaço-de-cana de açúcar, 80% de umidade, pH 9,38, temperatura de 20 °C, e 15 dias de cultivo.

3.3 Elementos e requisitos nutricionais importantes ao metabolismo fúngico

A capacidade biotecnológica dos fungos pode ser ampliada ofertando condições necessárias ou apropriadas para o funcionamento do seu metabolismo, tais como: pH, fonte de carbono facilmente assimilável, macro e micro nutrientes.

Em relação ao pH, de acordo com Griffin (1994), o crescimento ótimo dos fungos ocorre na faixa de pH entre 4 a 6, podendo variar especificamente conforme a espécie. Diversos autores, dentre eles, More *et al* (2010), têm afirmado que o pH baixo, dentro de certo limite, o que varia de acordo com a espécie, é fundamental para a boa produção enzimática.

Outro fator que potencializa a ação metabólica dos fungos é a presença de uma fonte de carbono mais simples e facilmente assimilável. Os carboidratos são a fonte de carbono mais facilmente assimilada pelos fungos para seu crescimento, sendo que a glicose é mais amplamente utilizada (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

A presença de uma fonte de carbono mais simples e facilmente assimilável influencia no aumento da biomassa dos fungos, o que proporciona maior eficiência na remoção de determinados poluentes. De acordo com Kaushik e Malik (2011), processos de remoção de corantes, por exemplo, através de células em crescimento, requerem aportes de nutrientes, tais como o carbono e o nitrogênio, necessários para proporcionar o crescimento do micro-organismo, tornando-se importante otimizar suas concentrações para uma ótima produção de biomassa e consequente remoção deste tipo de poluente.

Rodrigues *et al.* (2011) avaliaram a remoção em meio sintético do corante vermelho do congo, na concentração média inicial de 10 mg/L, utilizando reator em bateladas sequenciais, com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400, em condição de ausência e na presença de glicose (1,0 mg/L e 0,5 mg/L) no meio como cossustrato. Cada etapa era compreendida de três ciclos operacionais, com retirada de alíquota a cada 24 h para monitoramento das variáveis analisadas, sendo o tempo reacional (TR) total de 7 dias. A

melhor resposta quanto à remoção do corante ocorreu na presença de 1 mg/L de glicose, registrando-se eficiência média de remoção de corante de 95%, sendo que o percentual máximo de remoção foi obtido ainda no primeiro ciclo (96%), no TR de 168 h.

Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2010), foi avaliado a remoção do corante vermelho do congo (30 mg/L) por *Aspergillus niger* em reator em batelada com biomassa dispersa, sob a influência da adição dos cossustratos glicose e etanol, na concentração de 0,5 g/L. Os tempos reacionais estudados foram: 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Durante esse período foi investigada a influência da presença e ausência dos cossustratos. Os resultados obtidos demonstraram que a glicose influenciou positivamente na remoção do corante, pois nos reatores com adição de glicose houve remoção média de corante, de 97%, no 3º dia. Já nos reatores que receberam etanol, a melhor remoção foi no 5º dia, com percentual de 93% e nos reatores com ausência de cossustrato a remoção foi de 90%, no 10º dia.

Kaushik e Malik (2011), utilizando a técnica estatística de Superfície de Resposta, avaliaram a otimização para a remoção máxima do corante ácido azul marinho por *Aspergillus lântulo* FJ172995, tendo como variáveis independentes para o estudo a glicose como fonte de carbono nas concentrações de 3 g/L, 5 g/L e 7 g/L; a ureia como fonte de nitrogênio nas concentrações de 0,15 g/L, 0,3 g/L e 0,45 g/L e a concentração inicial do corante de 100 mg/L, 200 mg/L e 300 mg/L. A metodologia de superfície de resposta foi usada para projetar experimentos para otimizar duas variáveis de resposta: remoção do corante (%) e biomassa produzida (g/L). Segundo os mesmos, o processo de remoção de corante por *A. lântulo* é dependente da produção de biomassa, que, por sua vez depende da presença inicial de nutrientes no processo como a glicose, ureia e da concentração inicial de corante. Como resposta, os autores obtiveram que a condição ótima para 99,97% de remoção de corante foi o ensaio contendo 5 g/L de glicose, 0,3 g/L de ureia e a concentração inicial de corante de 200 mg/L, concluindo assim que o processo de remoção é afetado por variáveis do processo, tais como nutriente (ureia e glicose) e concentração inicial de corante.

Além do carbono, outros macronutrientes são fundamentais ao metabolismo e estrutura fúngica. Na Tabela 2 são apresentados os principais macronutrientes e sua importância.

Tabela 2 -Macronutrientes fundamentais aos fungos e sua importância.

Macronutrientes	Importância
Nitrogênio	Síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e algumas vitaminas
Fósforo	Armazenamento de energia e faz parte da molécula de DNA, RNA, fosfolipídios, NAD, FAD, coenzima A e algumas vitaminas
Potássio	É importante nos processos de transporte celular e na regulação do potencial osmótico da célula
Magnésio	Cofator para algumas enzimas envolvidas na glicólise ou no ciclo TCA
Cálcio	Responsável pela manutenção da integridade estrutural da membrana celular e no crescimento de enzimas

Fonte: Putzke e Putzke (2002).

Em relação aos micronutrientes, Putzke e Putzke (2002) relataram que são exigidos em proporções que vão de 10^{-6} M a 10^{-9} M, sendo que o excesso destes pode, inclusive, ser tóxico aos fungos. A importância principal dos micronutrientes está associada à produção de enzimas, as quais ou são ativadas por sua presença ou fazem parte da estrutura molecular da enzima. Podem ocorrer também na composição de vitaminas e outros metabólitos, além de serem necessários ao crescimento e esporulação. Ainda conforme os mesmos autores, a seguir são mencionados alguns microelementos importantes aos fungos:

- a) molibdênio: importante na atividade enzimática, sendo transportador de elétrons na redução enzimática dos nitratos pelos fungos, além de entrar na composição da vitamina B12;
- b) ferro: componente da enzima catalase, dos citocromos envolvidos no transporte de elétrons e outros metabólitos;
- c) zinco: ativador de enzimas no ciclo do ácido tricarboxílico e componente de ácidos orgânicos e outros metabólitos intermediários. Por exemplo, a enzima

fosfofrutoquinase requer zinco para sua síntese, sendo a única enzima que ocorre no ciclo EM (Embden-Meyerhof-Parnas) da glicólise no processo respiratório. Se esta enzima não estiver presente, ocorrerá apenas o ciclo Hexosemonofosfato, se este for executável pela espécie. Caso contrário o processo respiratório pode ser interrompido e, não havendo outra forma de obtenção de energia, causa a morte do fungo;

d) manganês: ativador de enzimas no ciclo tricarboxílico e síntese de ácido nucléico. Sua deficiência geralmente reduz a taxa de esporulação;

e) cobre: importante em certas atividades enzimáticas. Sua deficiência resulta em menor pigmentação em esporos de certos fungos. Seu excesso resulta na interferência de incorporação de materiais pela célula, visto que o cobre se liga ao plasmalema, onde ocorre o controle. Se for incorporado pela célula, pode causar até mutações genéticas.

3.4 Gênero *Aspergillus* e seu potencial biotecnológico

Espécies de *Aspergillus* estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser isoladas a partir de uma variedade de substratos (ABARCA, 2000; XAVIER *et al.*, 2008). Este gênero pertence à divisão Eucomycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae (KLICH, 2002 *apud* XAVIER *et al.*, 2008). As espécies pertencentes a esse gênero são identificadas por características morfológicas, sendo atualmente divididas em seis subgêneros, *Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes* e *Circumdati* (ABARCA, 2000).

Todas as espécies de *Aspergillus* formam colônias filamentosas de diferentes características e, microscopicamente, apresentam hifas septadas de, aproximadamente, 4 µm de diâmetro, sendo a estrutura de frutificação típica formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide que promovem a reprodução assexuada do fungo através da produção de fialoconídios (XAVIER *et al.*, 2008).

Este gênero tem sido usado em uma ampla gama de pesquisas tecnológicas que envolvem produção de metabólitos e remoção e/ou degradação de poluentes.

Puri, Banerjee e Banerjee(2005) comprovaram alta capacidade do *Aspergillus niger* MTCC 1344 em produzir naringinase, que é uma enzima responsável pela quebra da naringina, um composto que atribui amargura aos produtos sintetizados a partir de frutas

cítricas. Parshetti *et al.* (2007) investigaram o potencial de descoloração do corante têxtil reativo Azul-25 através da adsorção e degradação por micélio de *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146, obtendo um percentual máximo de adsorção de 100% no prazo de 7 h.

Corso e Almeida (2009) utilizaram *Aspergillus oryzae* na sua forma paramorfogênica (*pellets*) autoclavada e não autoclavada para remoção de corantes em meio aquoso e assim avaliar a redução da toxicidade do meio após a ação da biomassa fúngica. Os corantes testados nesse estudo foram o Procion Vermelho HE7B, cuja concentração inicial era de 300 µg/mL e Procion Violeta H3R, cuja concentração inicial era de 62,50 µg/mL. Como resultado, verificaram que foi possível ocorrer reduções significativas da toxicidade do meio à *Daphnia similis*. Uma vez expostos a concentrações crescentes de biomassa fúngica, a toxicidade das soluções dos corantes decresceu concomitantemente com a remoção de corantes. Maiores concentrações de biomassa, tanto autoclavada como não autoclavada, levou à remoção total da toxicidade de ambos os corantes no meio.

El-Rahim *et al.* (2009) avaliaram o efeito do pH na biorremoção do corante têxtil direto violeta, de concentração inicial de 500 mg/L, por biomassa viva de *Aspergillus niger* e obtiveram excelentes resultados: atingiram máximos de 92,4%, 64,0%, 91,4% e 62,3%, em valores de pH 2, 3, 8 e 9, respectivamente, em um dia de incubação. Khelifi *et al.* (2009) demonstraram a eficácia da biomassa viva de *Aspergillus alliaceus* 121C para remoção de 150 mg/L dos corantes Índigo e Vermelho do Congo presentes, separadamente, em meio líquido, obtendo remoções de 98,6% e 98%, respectivamente.

Devi *et al.* (2015) realizaram um estudo visando isolar e identificar espécies fúngicas capazes de degradar Polietileno de Alta Densidade (PEAD), sem qualquer pré-tratamento ou aditivos pró-oxidantes. Foi feito o isolamento de cepas a partir de resíduos plásticos de polietileno parcialmente degradados, juntamente com solo, despejados no litoral marinho do Golfo de Mannar, na Índia. Após isolamentos das cepas, as mesmas foram cultivadas em meio sintético líquido contendo PEAD como fonte única de carbono para verificar a eficiência da degradação de PEAD por tais micro-organismos. Dentre os fungos isolados, dois designados como VRKPT1 e VRKPT2 exibiram o crescimento mais rápido e mostraram aumento da formação de biofilme sobre a superfície de PEAD. Estes fungos foram posteriormente identificados, com base nas características morfológicas e análise da sequência de nucleótidos da região do Espaço Interno Transcrito (ITS), como *Aspergillus tubingensis* VRKPT1 e *Aspergillus flavus* VRKPT2. Entre estas duas espécies, a formação de biofilme e a biodegradação do PEAD foram maiores para o *A. flavus* VRKPT2 do que para o *A. tubingensis* VRKPT1. Os resultados experimentais obtidos nesta pesquisa demonstraram a

capacidade de degradação do PEAD destas cepas de modo a vê-las como uma solução viável para a ameaça ambiental provocada por este polímero.

De acordo com Gao *et al.* (2008), espécies de *Aspergillus* são os principais agentes de decomposição, portanto, possuem alto aparato enzimático. Estes autores avaliaram a capacidade de produção de celulasas em substrato sólido por *Aspergillus terreus* M11, utilizando material lignocelulósico como a palha de milho. Os resultados obtidos mostraram o uso potencial de *A. terreus* M11 para produção de celulasas em um período mais curto utilizando um meio simples.

Já Sharma *et al.* (2015) realizaram estudo para avaliar o potencial dos resíduos de vagem de ervilha como substrato indutor para a produção de enzimas celulolíticas (*celulasas* total e β - *glicosidase*) utilizando o metabolismo da espécie fúngica *Aspergillus niger* HN-1 em FES. Nesse estudo, a metodologia de superfície de resposta empregando planejamento composto central (CCD) foi usada para otimizar os parâmetros de processo para produção da enzima, sendo estes: teor de umidade (intervalo de 50-80%), pH (intervalo de 4-8), temperatura (intervalo de 25-40 °C) e tempo de incubação (intervalo de 2-5 d). Como resposta a maior produção de *celulasas* totais deu-se na condição de 50% de umidade, pH 4, temperatura 25 °C e tempo de incubação de 5 d, sendo este valor de 34,67 UI/gds; para a β -*glicosidase*, a maior produção ocorreu a 65% de umidade, pH 6, temperatura 33 °C e tempo de incubação de 3,5 d, sendo este valor de 367,52 IU/gds.

Os resultados obtidos no estudo de Sharma *et al.* (2015) indicaram que o *A. niger* HN-1 foi capaz de produzir boas quantidades de *celulasas* em uma ampla gama de temperatura, pH e teor de humidade. Os autores relataram que a produção de um sistema multicomponente de enzimas celulolíticas funcionalmente ativas, usando matéria-prima abundantemente disponível e de baixo custo, como resíduo de vagem de ervilha, pode levar a um impacto positivo significativo no custo de produção de etanol e de outros produtos químicos industrialmente importantes, tendo em vista a utilização dessas enzimas na conversão de biomassa celulósica em açúcares fermentáveis.

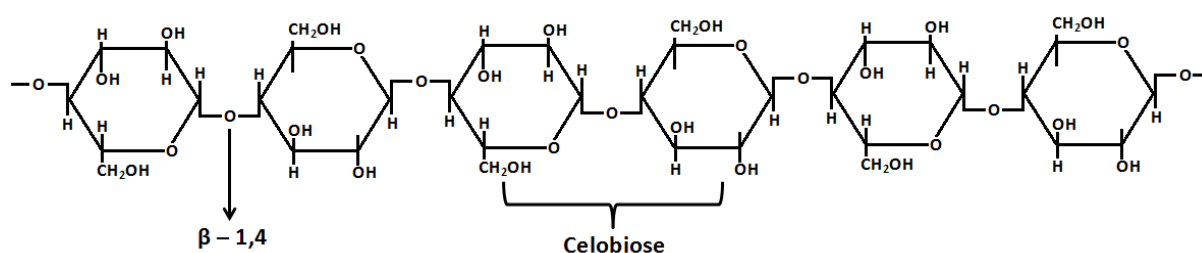
3.5 Polissacarídeo Celulose

A celulose é um polissacarídeo formado por várias unidades de glicose e o mais abundante componente da parede celular de células vegetais. É um homopolímero linear composto de microfibrilas que formam uma estrutura cristalina estabilizada por pontes de hidrogênio, sendo o principal polissacarídeo da parede celular vegetal e encontra-se envolvida

com polímeros de lignina e hemicelulose (HEREDIA; ANA JIMENEZ; GUILLEN, 1995). A celulose junto à lignina e à hemicelulose correspondem à formação de 97% a 99% do peso seco da parede da célula vegetal (MOSIER *et al.*, 2005).

É um polímero insolúvel em água, cuja unidade repetitiva é a celobiose, ou anidroglicose, sendo esta composta por unidades repetidas de β -D-glicopirranose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas, (HEREDIA; ANA JIMENEZ; GUILLEN, 1995; MARQUES, 2010), conforme apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura da celulose, forma linear.



Fonte: Autor (2016)

Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose e a glicose, respectivamente dissacarídeo e monossacarídeo redutores (MARQUES, 2010).

A celulose é considerada a biomassa mais abundante na terra (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; SÁTIRO *et al.*, 2012). Metade do carbono orgânico na biosfera está contida na celulose, o que a faz ser o mais abundante composto orgânico do mundo (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Ela constitui uma importante fonte renovável de carbono, o que estimula o uso de processos de fermentações celulolíticas e aumenta o interesse em aprimorar a degradação de materiais celulósicos e o aperfeiçoamento de estudos acerca da hidrólise da celulose (BRAGA *et al.*, 2009).

De acordo com Coelho *et al.* (2001), a maioria dos rejeitos agroindustriais contém grande quantidade de compostos como celulose, hemicelulose, pectina e outros, não havendo necessidade de grandes complementações nutricionais para o adequado desenvolvimento microbiano. Conforme Júnior (2014), os resíduos agroindustriais contêm de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. Estes compostos podem ser vistos como indutores para a produção de celulasas utilizando microrganismos específicos, como os fungos.

3.6 Produção de celulases por fungos

A produção de enzimas por fungos geralmente ocorre pela utilização de substrato em estado sólido ou em meio submerso. Um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Enquanto em meio sólido esteja ausente qualquer fluido no espaço entre partículas do substrato, em processos submersos, os nutrientes e micro-organismos encontram-se submersos em água (PINTO *et al.*, 2012).

De acordo com Santos *et al.* (2011), os micro-organismos geralmente empregados em substrato sólido são os fungos filamentosos, leveduras e bactérias, dentre os quais se destacam os fungos filamentosos. Esses autores relataram que, especialmente para culturas fúngicas, o cultivo no estado sólido oferece vantagens devido à aeração requerer pressões menores que as requeridas pelo cultivo submerso, além do mais, os produtos obtidos em processos com substratos sólidos são geralmente mais concentrados e os mecanismos de purificação ou isolamento demandam menos custos.

Já Pinto *et al.* (2012) avaliaram a influência de ambos processos como pré-tratamento para sacarificação de resíduos de palha de trigo através da ação enzimática de vários fungos basidiomicetos. Nesse estudo o efeito do pré-tratamento no aumento da sacarificação foi mais evidente para culturas em substrato sólido. Soma-se a tal benefício o fato de que o pré-tratamento em substrato sólido permite cerca de 8 vezes maior redução no consumo de água.

Bansal *et al.* (2012), visando o desenvolvimento de sistema de produção de celulases de baixo custo, analisaram a produção do complexo enzimático por *Aspergillus niger* NS-2 em processo com substrato sólido utilizando diferentes resíduos agrícolas e de cozinha. Sem qualquer suplementação de nutrientes exógenos no meio sólido, constituído por vários resíduos orgânicos, simplesmente umedecidos com água destilada, boas quantidades das três celulases que formam o complexo foram obtidas. Segundo os autores, uma produção apreciável de celulases a partir da ação metabólica deste fungo pode ser vista como uma forma de reduzir os custos na obtenção destas enzimas.

A produção das três celulases pelos fungos, não necessariamente dar-se em proporções fixas. O complexo enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* é conhecido por exibir baixa atividade de β – glicosidase (TEERI, 1997), no entanto, este sistema contém numerosas endoglucanases e duas exoglucanases que correspondem a aproximadamente 80% do total de proteína secretada por este fungo (MARTINS *et al.*, 2008). Já o complexo enzimático da espécie *Penicillium echinulatum* contém mais β - glicosidases do que o

complexo enzimático de *Trichoderma reesei* e representa um candidato potencial para produção de celulasas devido a sua capacidade para secretar esta enzima em níveis que são equivalentes aos relatados para os mais eficientes fungos (CAMASSOLA; DILLON, 2010; MARTINS *et al.*, 2008).

As condições de operação tais como a temperatura, pH, teor de umidade e tempo de incubação são muito importantes para o crescimento microbiano e a produção eficiente de enzima celulolítica pelo uso de substrato sólido (SHARMA *et al.*, 2015).

Zampieri *et al.* (2013) investigaram a ação do complexo enzimático total da celulase e, particularmente, das endoglucanases e β – glicosidases pelo *Penicillium echinulatum* utilizando diferentes fontes de carbono como material indutor. As fontes de carbono testadas foram celulose, carboximetilcelulose, celobiose, glicose, sacarose, glicerol e sorbitol estado presentes no meio fermentativo separadamente na quantidade de 1% cada. A maior atividade do complexo enzimático total, e especificamente das endoglucanases, deu-se na presença de celulose como única fonte de carbono, seguida da atividade na presença somente de carboximetilcelulose. Em relação à β – glicosidases, identificou-se sua atividade quando foram utilizados meios que continham celulose, celobiose, glicose e sorbitol, sendo que sua produção foi observada mais tardia.

Em outro trabalho, Cheng e Liu (2012) realizaram estudo visando desenvolver método promissor para aumentar a produção de hidrogênio a partir da fermentação de resíduos de pedúnculo de milho. Para tal objetivo, os autores avaliaram a fermentação termofílica, utilizando como substrato uma mistura constituída destes resíduos, sendo uma parte desprovida de tratamento fúngico e a outra, previamente tratada com fungo *Trichoderma reesei* Rut C-30 utilizando FES. O tratamento fúngico consistiu na inoculação de 8,4 mL de cultura líquida de micélio em frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de solução de nutrientes e 8g de pedúnculo de milho previamente esterilizados, sendo os frascos incubados numa câmara de cultura a 30 °C. Foram investigados nesse estudo, os efeitos do tempo de pré-tratamento pelo fungo no que diz respeito à produção de celulasas (4, 5, 6, 7 e 8 dias de cultivo), a proporção da mistura na hidrólise deste resíduo (mistura de resíduo pré-tratado com resíduo desprovido de tratamento) e a produção de hidrogênio resultante. O mecanismo de aumento da produção de hidrogênio foi discutido associando-o à produção de celulasas presentes no caldo de fermentação. De acordo com o estudo, o processo de pré-tratamento fúngico, simples e prático, foi eficaz para melhorar a produção de hidrogênio via fermentação termofílica, a partir de resíduos de pedúnculos de milho, registrando-se o maior volume de hidrogênio de 194,9 mL, em 6 dias, para proporção da mistura de resíduo pré-

tratado com fungo e resíduo desprovido de pré-tratamento de 1:5. Os autores justificaram o aumento da produção de hidrogênio pela maior produção de celulase pelo fungo, a qual aumentou a hidrólise dos componentes celulósicos do caldo de fermentação e produziu mais substâncias solúveis disponíveis para que os micro-organismos produtores de hidrogênio atuassem posteriormente.

De acordo com Reis *et al.* (2013), o desenvolvimento de cepas de micro-organismos mais produtivos e processos que aumentam os níveis de produção de enzima podem contribuir para a produção economicamente eficiente de etanol de segunda geração. Para este fim, os autores realizaram um estudo para avaliar a produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29, usando diferentes concentrações de celulose (20, 40, e 60 g/L) em processo de batelada e batelada alimentada, em fermentação submersa. As mais altas atividades de celulases totais (8,3 U/mL), endoglucanases (37,3 U/mL), e xilanases (177 U/mL) foram obtidos no cultivo em batelada alimentada com 40 g/L de celulose. Após a fermentação, o extrato enzimático do *P. echinulatum* e a enzima comercial Cellic CTec2 foram testados para comparar a eficiência na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. As concentrações máximas de glicose e xilose como resultado da hidrólise foram alcançadas após 72 h. Rendimentos de glicose de 28,0% e 27,0% foram obtidos utilizando o extrato enzimático de *P. echinulatum* e Cellic CTec2, respectivamente, ou seja, o fungo demonstrou capacidade semelhante a da enzima comercial para produzir açúcares fermentáveis no processo da hidrólise da cana-de-açúcar, sendo um via importante para a produção de etanol de segunda geração.

Na natureza existe uma grande variedade de micro-organismos, representados principalmente pelos fungos, que produzem celulases (CAMASSOLA; DILLON, 2010). Ruegger e Auk-Tornisielo (2004) avaliaram o potencial de 80 fungos filamentosos isolados do solo da Mata Atlântica quanto à atividade de celulases em resposta à presença de carboximetilcelulose, como única fonte de carbono, em meio de cultura. Os resultados obtidos demonstraram que todas as linhagens estudadas responderam positivamente quanto ao potencial para produção destas enzimas, no entanto, dentre as linhagens estudadas, não houve nenhuma que se destacasse das demais, quanto ao potencial para produção de atividade das celulases.

Semelhantemente, Almeida (2013) avaliou a produção de xilanases e celulases a partir de fungos filamentosos isolados também da Mata Atlântica do Oeste do Paraná utilizando resíduos agroindustriais como fonte indutora. As coletas de materiais em decomposição (raízes, caules, folhas e solo no período de outono no Refúgio Biológico Bela Vista em Foz

do Iguaçu – PR) permitiram o isolamento de 18 fungos filamentosos com capacidade de crescimento a $40^{\circ}\text{C}\pm 2$. Do total isolado, 78%, ou seja, catorze, apresentaram atividade enzimática, dos quais sete produziram somente xilanase e sete produziram ambas as enzimas (xilanase e celulase). Dentre os fungos isolados, foi identificada a espécie *Aspergillus niger* URM 6642 como a maior produtora de ambas as enzimas.

São apresentadas na Tabela 3 diferentes espécies de fungos filamentosos que respondem positivamente em relação à atividade do complexo enzimático da celulase, de acordo com Ruegger e Auk-Tornisielo (2004).

Tabela 3 - Fungos filamentosos produtores de celulases.

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium aculeatum</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium spinulosum</i>
<i>Chalara paradoxa</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>	<i>Penicillium variabile</i>
<i>Chloridium virescens</i>	<i>Penicillium decumbens</i>	<i>Penicillium verruculosum</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium fellutanum</i>	<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>
<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Scopulariopsis carbonaria</i>
<i>Cylindrocladium clavatum</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>
<i>Doratomyces stemonitis</i>	<i>Penicillium herquei</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Gliocephalotrichum simplex</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Trichoderma inhamatum</i>
<i>Gliocladium nigrovirens</i>	<i>Penicillium miczynskii</i>	<i>Trichoderma koningii</i>
<i>Gliocladium roseum</i>	<i>Penicillium nigricans</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>
<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Penicillium purpurogenum</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Myrothecium roridum</i>	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Verticillium lecanii</i>
<i>Paecilomyces carneus</i>	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	-

Fonte: Ruegger e Auk-Tornisielo (2004).

A utilização de fungos para a degradação de materiais e concomitante produção de metabólito de interesse econômico, como enzimas, pode ser vista como ferramenta para o desenvolvimento sustentável, sendo fortalecida através do desenvolvimento de tecnologias que proporcionem melhor aproveitamento biotecnológico desses micro-organismos. Em relação a tais, o principal benefício para sua aplicação na produção de celulase é a facilidade

com que os mesmos podem ser manipulados, bem como sua habilidade para fermentar grande faixa de substratos de baixo custo à produtividade elevada.

3.7 Enzimas celulasas e sua atuação na celulose

A biomassa vegetal contém quantidade significativa de celulose que pode ser explorada como uma fonte valiosa de carbono para a obtenção de produtos químicos de valor agregado. No entanto, a despolimerização da celulose em glicose é um pré-requisito para obtenção de diferentes produtos industriais ou energéticos, utilizando fermentação microbiana a partir de materiais celulósicos como fonte de carbono. Existem duas maneiras de converter a celulose em glicose: hidrólise química e enzimática (JUTURU; WU, 2012).

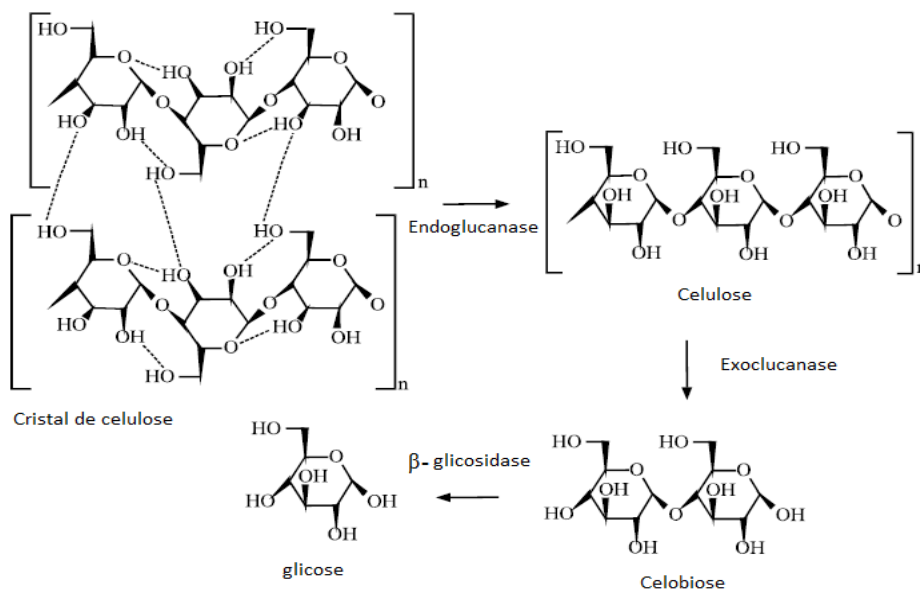
A hidrólise química é realizada por meio de ácidos inorgânicos, em condições adversas. O material hidrolisado, assim obtido, contém não apenas açúcares fermentáveis, mas também produtos da degradação, tais como furfural, que são tóxicos para os micro-organismos utilizados em fases sucessivas do processo de fermentação, sendo que etapas adicionais de desintoxicação normalmente são necessárias para remover tais inibidores (JUTURU; WU, 2012). Aplicação de celulasas para hidrolisar a celulose é mais atraente porque a despolimerização enzimática é ambientalmente mais viável (KARMAKAR; RAY, 2011).

Celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise (CASTRO; PEREIRA JR. 2010). A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: *endoglucanases*, *exoglucanases* e β -*glicosidases* (GARCIA-UBASART *et al.*, 2013; OLSSON; HAHN-HAGERDA, 1996). Estes três tipos de celulasas conferem sinergicamente a hidrólise enzimática completa da celulose (JUTURU e WU, 2012).

As *endoglucanases* hidrolisam ligações glicosídicas em regiões amorfas da celulose solúvel e insolúvel, gerando oligômeros de cadeia longa para a posterior ação das *exoglucanases* que fazem a clivagem destes oligômeros gerando oligossacáridos de cadeia curta. As *exoglucanases* agem nas extremidades de cadeias de celulose libertando *celobioses* que são posteriormente hidrolisados em glicose por β -*glicosidases*, completando assim, a hidrólise total da celulose em açúcares fermentáveis (BANSAL *et al.*, 2011; DESWAL *et al.*, 2011; MILALA *et al.*, 2005).

Na Figura 2 é apresentado esquema da ação sinérgica das celulasas sobre uma cadeia de celulose, levando a formação final da glicose.

Figura 2 - Esquema da ação sinérgica das celulasas sobre a celulose.



Fonte: adaptado de karmakar e Ray (2011)

Desta forma, micro-organismos que excretam celulasas desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de decompor resíduos celulósicos estabelecendo um elo chave no ciclo do carbono. Em um meio típico de decomposição de celulose, uma variedade de bactérias e fungos celulolíticos trabalham conjuntamente para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis, basicamente celobiose e glicose, que são assimilados pelas células (BRAGA *et al.*, 2009).

3.8 Aplicação industrial das celulasas

O interesse na utilização de enzimas em diferentes processos industriais tem sido ampliado, em especial, devido à facilidade com que são obtidas através de processos biotecnológicos e às vantagens que proporcionam em relação aos catalisadores químicos, tais como: maior especificidade; maior velocidade de reação; aumento da pureza dos produtos; redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; fabricação controlada de pequenas quantidades (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

As celulasas apresentam destaque no mercado de enzimas já que podem ser utilizadas em diversos ramos industriais, tais como alimentos, cervejaria e vinho, ração animal, indústria têxtil e de lavanderia, indústrias de papel e celulose, bem como na agricultura e para fins de pesquisa (BHAT, 2000). As pesquisas com enzimas e polissacaridasas, empregadas em tais ramos industriais, começaram no início da década de 1950, devido ao seu enorme potencial para converter a lignocelulose, a fonte mais abundante e renovável de energia na Terra, em glicose e açúcares solúveis (BHAT, 2000).

Relatado por Castro e Pereira Jr (2010), a produção de celulasas em escala industrial foi iniciada em meados da década de 80, objetivando utilizá-la como aditivo para ração animal, no intuito de aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Posteriormente, tais enzimas passaram a ser aplicadas como um insumo para a indústria de alimentos, visando à melhoria das propriedades sensoriais de massas.

Na indústria de polpa e papel, as celulasas são utilizadas para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Garcia-Ubasart *et al.* (2013) estudaram a biomodificação da fibra de linho de celulose para produção de toalhas de papel utilizando uma endoglucanase obtida a partir da bactéria *Paenibacillus barcinonensis* e avaliaram sua influência sobre o processo de refinação e as características do papel resultante. Nesse estudo foi observado que a citada celulase impulsionou a ação do refino desta fibra uma vez que resultou em um índice de tração mais elevado levando a geração de um papel mais resistente, podendo ser considerado um bom tratamento de biorrefinação.

No setor têxtil, as celulasas são usadas para dar melhor acabamento aos tecidos, tornando-os mais lisos, macios e com melhor caimento (LOPES, 2011). Podem também produzir a aparência envelhecida dos jeans, destruindo menos as fibras do que a pedra-pomes que também é empregada com essa finalidade, porém, leva a redução da qualidade dos tecidos devido a abrasão excessiva (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007). Esta enzima entra nas áreas amorfas do algodão, hidrolisa a celulose, remove cochilos da superfície do tecido e confere brilho e suavidade ao mesmo (CAVACO-PAULO, 1998). De acordo com Maryan e Montazer (2013), o tecido denim é convencionalmente tratado com hipoclorito diluído para o branqueamento parcial, porém, a celulase, sozinha ou junto à pedra-pomes, também proporciona um aspecto envelhecido a este tecido.

As celulasas também podem ser aplicadas na produção de detergentes. De acordo com Girelli (2013), as primeiras celulasas a serem utilizadas em detergentes foram as chamadas celulasas de rejuvenescimento das cores. Conforme Calvimontes, Lant e Dutschk (2012), os

efeitos das celulases em detergentes chegam a duplicar a eficiência de lavagem à medida que abrem microporos no tecido, ampliando a entrada de água e dos componentes do detergente, o que facilita a remoção da sujeira retida em regiões mais profundas.

Outra aplicação das celulases é na produção de combustíveis líquidos renováveis tais como etanol, butanol e hidrocarbonetos, a partir de açúcares de biomassa (WILSON, 2009). De acordo com Lynd *et al.* (2008), na produção de combustíveis líquidos pelo uso de biomassa, a celulose da parede celular vegetal é hidrolisada pelas enzimas livres e os açúcares resultantes são utilizados em um segundo passo, gerando o combustível.

Primeiramente, o processo se dá pela perturbação do agregado hemicelulose-lignina-celulose na parede celular da planta através de pré-tratamento químico ou físico, o qual tornar a celulose mais acessível às celulases que hidrolisam este biopolímero gerando açúcares, os quais posteriormente são fermentados para etanol, butanol, ou uma mistura de hidrocarbonetos (SHEEHAN; HIMMEL, 1999). A celulase se tornará o maior volume de enzima industrial, se o etanol, butanol ou algum outro produto da fermentação de açúcares, produzido a partir de biomassa por tais enzimas, tornar-se um importante combustível para transporte (WILSON, 2009).

Contudo, a utilização de celulases em diferentes processos tem se mostrado cada vez mais benéfica no que tange à relação custo e benefício quando associada sua produção à reutilização de resíduos agroindustriais. Deste modo, o emprego destas enzimas na cadeia produtiva de diferentes setores industriais pode ser inserida na filosofia de tecnologias limpas, as quais vêm ganhando ênfase na última década, visando a redução de resíduos gerados e dos impactos por eles causados, a fim de preservar o meio ambiente. Por fim, é importante para o meio ambiente e ao homem a correta destinação destes resíduos, de forma sustentável e mais ainda se essa destinação, além de eficiente e segura, propiciar a geração de insumos de valor econômico, como é o caso das celulases.

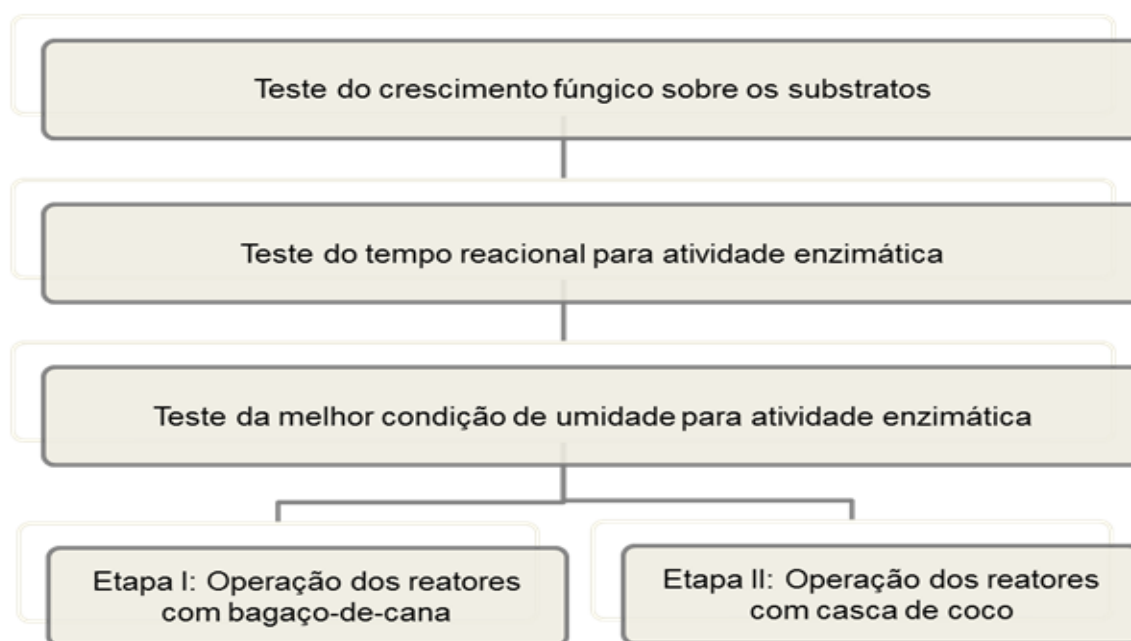
4 MATERIAL E MÉTODOS

Na presente pesquisa foram estudados dois diferentes substratos - bagaço de cana-de-açúcar e casca de coco - como material indutor para produção de enzimas celulasas a partir da degradação microbiológica desses substratos pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400.

Foram realizadas variações das condições do meio reacional a fim de buscar melhor produtividade enzimática. Assim, o trabalho foi dividido em: testes preliminares para avaliação do desenvolvimento fúngico sobre os substratos; verificação do tempo reacional ótimo para atividade enzimática; determinação da melhor condição de umidade para produção da mesma e operação de reatores em batelada (Etapa I e Etapa II).

O presente estudo deu-se na sequência experimental mostrada na Figura 3.

Figura 3 - Sequência experimental da pesquisa.



Fonte: Autor (2016)

4.1 Micro-organismo

O fungo utilizado nesta pesquisa foi o *Aspergillus niger* AN 400, cuja cepa encontra-se na coleção do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM). O inóculo encontrava-se na forma de suspensão de conídios, na concentração de 2×10^6 conídios/mL, para os testes de avaliação do crescimento fúngico sobre substrato e para a verificação do tempo reacional

ótimo para atividade enzimática. Para determinação da melhor condição de umidade e operação dos reatores em batelada, a concentração do inóculo foi de 10^7 conídios/g (ZÚÑIGA, 2010).

Para a produção dos conídios, semeou-se a espécie em placas de Petri esterilizadas, contendo meio de cultura Agar *Saboraud*. O meio foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C , durante 20 minutos, e colocado nas placas para solidificar em temperatura ambiente.

As placas inoculadas com fungos permaneceram por 7 dias (ZÚÑIGA, 2010) em estufa microprocessada de cultura e bacteriologia, da marca Quimis, modelo Q316M, à temperatura de 28°C e, ao final deste período, observou-se o crescimento do filamento por toda a superfície da placa, quando então foi feita a remoção dos conídios com solução Tween 80, constituída de solução salina de 0,9 g/L de cloreto de sódio (NaCl) e 80 μL de Monooleato de Sorbitan ($\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$), adicionando-se 10 mL de solução em cada placa. A suspensão de conídios obtida foi acondicionada em frasco âmbar de 100 mL, previamente esterilizado. Posteriormente, foi realizado o procedimento de contagem, com auxílio de microscópio óptico, para determinação da concentração em conídios/mL. Após determinada sua concentração, a suspensão foi armazenada a -4°C , até seu uso posterior.

4.2 Procedimento de contagem dos conídios

Preparou-se, em um tubo de ensaio, uma solução constituída de 50 μL da suspensão de conídios, acrescida de 950 μL de solução Tween 80, resultando em uma diluição de 1:20. Posteriormente, a solução foi agitada em agitador Vórtex, modelo QL – 901, marca Biomixer, em velocidade fixa de 2.800 rpm.

Em seguida, transferiu-se 20 μL da solução diluída preparada para uma câmara de Neubauer, onde foi feita a contagem dos conídios, utilizando microscópio óptico da marca Bioval, modelo L1000, com aumento de 400 vezes.

O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando atingir uma concentração final de 10^7 conídios/g de meio sólido a partir da solução de conídios obtida na contagem. A concentração de conídios na suspensão inicial (conídios/mL) foi calculado pela Equação 1 e o volume necessário para se obter uma concentração de 10^7 conídios/g a partir da solução obtida foi calculado pela Equação 2 (ZÚÑIGA, 2010).

$$C_{\text{conídios1}} = N \times F \times V_{\text{cam}} \quad (1)$$

Sendo:

$C_{\text{conídios1}}$ = Concentração inicial de conídios (conídios mL⁻¹);

N = número de conídios obtidos na contagem;

F = fator de diluição;

V_{cam} = volume total da câmara ($2,5 \times 10^5$ mL)

$$V_{\text{inóculo}} = m_{\text{substrato}} \times C_{\text{conídios2}} \times C_{\text{conídios1}}^{-1} \quad (2)$$

Sendo:

$V_{\text{inóculo}}$ = volume da suspensão de inóculo a ser adicionado (mL);

$m_{\text{substrato}}$ = massa do substrato usado na FES (g);

$C_{\text{conídios2}}$ = concentração inicial de conídios desejada na FES (conídios g⁻¹);

4.3 Substratos indutores

Foram investigados, no presente trabalho, dois substratos indutores: bagaço de cana de açúcar (Etapa I) e resíduos de casca de coco verde (Etapa II), ambos com e sem pré-tratamento químico. O primeiro foi obtido como resíduo gerado no processo de extração do caldo para comercialização e o segundo, doado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), sendo a casca de coco já triturada como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Substratos bagaço de cana-de-açúcar (a) e casca de coco (b) para produção de celulasas por *Aspergillus niger* AN400.



Fonte: Autor (2016)

Em relação ao bagaço da cana-de-açúcar, foi utilizada na pesquisa a parte interna do colmo, a qual foi retirada manualmente e, posteriormente, cortada com uso de tesouras de uso geral, com lâminas 5.½” em aço inoxidável. Para tirar a umidade, e assim, retardar o seu apodrecimento, após a etapa do corte, o material foi levado para estufa de secagem e mantido à 80 °C, durante 12 h, período após o qual foi armazenado em sacos plásticos. Quando da utilização do coco, a parte empregada nos experimentos foi a camada intermediária fibrosa denominada mesocarpo.

4.4 Caracterização elementar dos substratos

Para verificação de elementos químicos presentes nos substratos bagaço de cana e casca de coco, primeiramente pesaram-se 5 g de cada substrato, separadamente, em cápsulas de evaporação de porcelana, as quais foram digeridas em mufla da marca Coel e modelo TLK48, à temperatura de 500 °C, durante um tempo no qual se obteve somente as cinzas dos materiais.

Após digestão em mufla, o material foi digerido em um forno de micro-onda segundo o método 3052 - *Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices* (Hazardous Waste – Test Methods, Environmental Protection Agency, 1996).

No procedimento da digestão em forno de micro-ondas, primeiramente, transferiu-se 0,5g da amostra pulverizada para tubo de teflon no qual foi adicionado 9 mL de HNO₃ e 3mL de HCl. Manteve-se o conjunto em sistema fechado, forno de micro-ondas. Após a digestão, as amostras foram filtradas e diluídas em 1: 10 e 1: 100 e em solução de ácido nítrico a 2%. A digestão no micro-ondas teve como parâmetros os itens que podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores dos parâmetros utilizados na digestão do material.

Parâmetro	Valor	Unidade
Pressão da digestão	110	psi
TAP - tempo necessário para o alcance da pressão pretendida	10	min
Time - tempo que a pressão deve ser mantida depois do seu alcance.	20	min
Power	100	%

Fonte: Autor (2016)

Após a digestão, a caracterização elementar foi realizada utilizando aparelho ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) o qual quantifica elementos da tabela periódica (Si, Al, P, Mg, Ca, Na, K, Zn, Fe, Ni, P e os metais pesados Pb, Cd, As, Hg, Cr e Mn).

4.5 Teste do crescimento fúngico sobre os substratos sem tratamento.

Este teste foi realizado antes do início das Etapas I e II para avaliação preliminar do crescimento do micro-organismo sobre o bagaço de cana-de-açúcar e do coco, de modo a verificar a viabilidade do crescimento do mesmo sobre os substratos estudados na presença e ausência da glicose como cossubstrato.

Foi empregada incubadora *shaker* de bancada da marca Cientec, modelo CT-712, na qual foram montados 4 pequenos reatores constituídos de *erlenmeyers* de 250 mL. Destes reatores, dois receberam 5 g de bagaço de cana-de-açúcar e dois, 5 g de casaca de coco, ambos sem pré-tratamento químico, com 95% de umidade, obtida pela adição do líquido nutricional para fungos (Tabelas 5 e 6), e suspensão de conídios de *Aspergillus niger* AN 400 (2×10^6 conídios/mL), sendo que em apenas um dos *erlenmeyers* com cana e com coco adicionou-se glicose (2 g/L).

Tabela 5 - Composição da solução de Vishiniac (micronutrientes).

Nutriente	Concentração (g/L)
Etileno Diamino Tetracético (EDTA)	10
Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,4
Cloreto de Manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1
Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,32
Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,32
Molibdato de Amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,22
Cloreto de Cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1,47
Sulfato de Ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1

Fonte: Sampaio (2005)

Tabela 6 - Composição do meio nutricional de crescimento.

Nutriente	Concentração(g/L)
Sulfato de Amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2
Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	1
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	0,25
Fosfato Dihidrogeno de Potássio (KH ₂ PO ₄)	0,2
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	0,01
Sulfato de Cobre (CuSO ₄)	0,08
Ácido Molibídico (H ₂ MoO ₄)	0,05
Sulfato de Manganês (MnSO ₄)	0,05
Sulfato Férrico (Fe ₂ (SO ₄) ₃)	0,05
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄)	0,04

Fonte: Rodrigues (2006)

Os substratos utilizados sem pré-tratamento foram para testar o crescimento do micro-organismo na condição mais desfavorável devido à presença da lignina no substrato indutor.

Antes da inoculação dos conídios, foi realizada a autoclavagem dos reatores a 121 °C, durante 20 minutos e, após esfriarem em condições ambientais, realizou-se a adição do inóculo em capela de fluxo laminar, visando evitar contaminação. Os reatores inoculados foram mantidos sob agitação de 150 rpm, ao longo de 7 dias, o mesmo tempo utilizado no procedimento de produção de conídios descrito no item 4.1, à temperatura de 30 °C.

O meio nutricional empregado teve por finalidade fornecer fonte de nitrogênio (N), enxofre (S), fósforo (P) e micronutrientes necessários para o crescimento dos micro-organismos. Na Tabela 5, é apresentada constituição do Vishiniac que corresponde à solução de micronutrientes, sendo utilizada no meio nutricional na concentração de 1 mL/L e na Tabela 6, os macronutrientes, com suas respectivas concentrações.

Para determinação da biomassa fúngica desenvolvida nos reatores, foi realizada pesagem dos reatores antes da inoculação e após o tempo reacional que foi de 7 dias.

4.6 Teste do comportamento da atividade enzimática ao longo do tempo.

Esse teste foi realizado com finalidade de conhecer o comportamento do micro-organismo em relação à produção enzimática ao longo do tempo reacional de 10 dias, com

intuito de determinar o tempo mais viável a ser utilizado nas etapas posteriores no que diz respeito ao monitoramento da atividade máxima da enzima.

O teste foi realizado somente com o bagaço de cana, pois não se dispunha até então da casca de coco. Desta forma, o tempo de reação estimado neste teste preliminar foi usado também quando a casca de coco foi empregada nas etapas posteriores.

Foi realizada uma batelada constituída de 8 *erlenmeyers* de 250 mL, contendo suspensão de conídios esporos (2×10^6 conídios/mL), 100 mL de meio nutricional de crescimento para o fungo (Tabelas 5 e 6) e 5 g do substrato (ZÚÑIGA, 2011), usado como fonte única de carbono, sem pré-tratamento.

O sistema foi esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos e posto para esfriar em temperatura ambiente em torno de 28 °C, quando procedeu-se ao ajuste do pH para 3,5 (valor central da variação do pH inicial do meio nutricional - ver item 4.8) e realizou-se a inoculação, em condição ambientalmente estéril, utilizando capela de fluxo laminar da marca Silterflux e do tipo fluxo laminar vertical.

O sistema em batelada era desmontado nos tempos reacionais de 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 7 d, 8 d, 9 d e 10 d para verificação da atividade enzimática e do pH.

4.7 Teste da melhor condição de umidade

Foi variada a condição de umidade e monitorada a produção da enzima pelo fungo em estudo a fim de determinar a melhor condição a ser utilizada nas etapas posteriores de produção enzimática. Neste experimento, foram utilizados o bagaço de cana e a casca do coco, separadamente.

As diferentes condições testadas foram de 50%, 60%, 70%, 80% e 95% de umidade no tempo reacional máximo de 6 dias. A umidade nos experimentos foi ajustada segundo a Equação 3 (ZÚÑIGA, 2010).

$$U\% = (m_L) \times (m_L + m_S)^{-1} (3)$$

Sendo:

$U\%$ = umidade

m_L = massa de solução de suplementação de nutrientes (g)

m_S = massa de substrato sólido (g)

O teste foi constituído de 5 bateladas, cada uma formada por 5 *erlenmeyers* que foram utilizados como reatores. Ao longo do experimento, retirava-se um *erlenmeyer* de cada batelada nos tempos reacionais 3 d, 4 d, 5 d e 6 d para determinação da atividade enzimática de celulase total, de acordo com Ghose (1987) e pH utilizando potenciometria. Foi feita ainda a caracterização do meio no tempo inicial (0 d).

Antes da inoculação dos esporos (10^7 esporos/g), os reatores, formados por meio nutricional e substrato, foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos e postos para esfriar em temperatura ambiente, em torno de 28 °C.

O pH do meio foi ajustado para 3,5 e então se procedeu à adição do inóculo do micro-organismo em condição ambientalmente estéril, utilizando capela de fluxo laminar da marca Silterflux e do tipo fluxo laminar vertical.

4.8 Montagem, operação e monitoramento dos reatores em bateladas

Para os ensaios com as bateladas utilizou-se incubadora *shaker* de bancada da marca Cientec, modelo CT-712 com controle da temperatura, mantida em 30 °C, temperatura esta adequada para produção de celulases (YOON *et al.*, 2014). Cada batelada teve duração total de 6 dias, nos quais um grupo de reatores, constituídos por *erlenmeyers* de 250 mL, eram analisados.

Assim, em cada um dos *erlenmeyers* foram inoculados conídios (10^7 conídios/g) na presença de 5 g do substrato, usado como fonte única de carbono, umidificado com meio nutricional de crescimento para o fungo (Tabela 6). A porcentagem de umidade utilizada foi de acordo com o resultado do teste descrito no item anterior - ver 4.6.

Ao todo, foram realizadas 24 bateladas (Tabela 7), cada uma constituída por 8 *erlenmeyers*, sendo que 12 bateladas corresponderam aos Reatores com Fungos (RF) e 12, aos Reatores Controles (RC). Das 24 bateladas, 12 são referentes à Etapa I, com reatores operados utilizando bagaço de cana-de-açúcar e 12 utilizando bagaço de coco (Etapa II).

A Etapa I correspondeu a um total de 12 ensaios, de modo que 6 eram com reatores contendo fungo e cana-de-açúcar e 6 com reatores desprovidos de inóculo fúngico, tendo somente a presença do bagaço-de-cana como fonte de carbono. De cada lote de 6 reatores, 3 receberam a cana de açúcar com pré-tratamento e 3 desprovida do mesmo.

A Etapa II compreendeu o mesmo número de ensaios em batelada que os da Etapa I, porém substituindo-se o substrato bagaço de cana por casca do coco.

Tabela 7 - Esquema das bateladas operadas.

Substrato	Batelada	Característica dos reatores	
Etapa I Bagaço de cana-de-açúcar (CA)	Reatores com Fungo	RFCPCA2,5	c/ fungo, c/ cana, c/ pré-tratamento, pH 2,5
		RFSPCA2,5	c/ fungo, c/ cana, s/ pré-tratamento, pH 2,5
		RFCPCA3,5	c/ fungo, c/ cana, c/ pré-tratamento, pH 3,5
		RFSPCA3,5	c/ fungo, c/ cana, s/ pré-tratamento, pH 3,5
		RFCPCA5,5	c/ fungo, c/ cana, c/ pré-tratamento, pH 5,5
		RFSPCA5,5	c/ fungo, c/ cana, s/ pré-tratamento, pH 5,5
	Reatores Controle	RCCPCA2,5	s/fungo, c/ cana, c/ pré-tratamento, pH 2,5
		RCSPCA2,5	s/ fungo, c/ cana, s/ pré-tratamento, pH 2,5
		RCCPCA.3,5	s/fungo, c/ cana, c/ pré-tratamento, pH 3,5
		RCSPCA3,5	s/ fungo, c/ cana, s/ pré-tratamento, pH 3,5
		RCCPCA5,5	s/fungo, c/ cana, c/ pré-tratamento, pH 5,5
		RCSPCA5,5	s/ fungo, c/ cana, s/ pré-tratamento, pH 5,5
Etapa II Bagaço de coco (CO)	Reatores com Fungo	RFCPCO2,5	c/ fungo, c/ coco, c/ pré-tratamento, pH 2,5
		RFSPCO2,5	c/ fungo, c/ coco, s/ pré-tratamento, pH 2,5
		RFCPCO3,5	c/ fungo, c/ coco, c/ pré-tratamento, Ph 3.5
		RFSPCO3,5	c/ fungo, c/ coco, s/ pré-tratamento, pH 3,5
		RFCPCO5,5	c/ fungo, c/ coco, c/ pré-tratamento, pH 5,5
		RFSPCO5,5	c/ fungo, c/ coco, s/ pré-tratamento, pH 5,5
	Reatores Controle	RCCPCO2,5	s/fungo, c/ coco, c/ pré-tratamento, pH 2,5
		RCSPCO2,5	s/ fungo, c/ coco, s/ pré-tratamento, pH 2,5
		RCCPCO3,5	s/fungo, c/ coco, c/ pré-tratamento, pH 3,5
		RCSPCO3,5	s/ fungo, c/ coco, s/ pré-tratamento, pH 3,5
		RCCPCO5,5	s/fungo, c/ coco, c/ pré-tratamento, pH 5,5
		RCSPCO5,5	s/ fungo, c/ coco, s/ pré-tratamento, pH 5,5

Fonte: Autor (2016)

Cada ensaio em batelada era formado por 8 *erlenmeyers*, dos quais se retiravam dois (duplicata), em função dos tempos reacionais estudados, para determinação da atividade enzimática de celulase total, de acordo com Ghose (1987) e pH utilizando potenciometria. Os tempos reacionais de 3 d, 4 d, 5 d e 6 d foram investigados. Antes da inoculação dos esporos,

cada conjunto de *erlenmeyer* contendo o substrato era esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos e posto para esfriar em temperatura ambiente, em torno de 28 °C.

Tanto na Etapa I como na II, foi prevista a variação do pH inicial do meio nutricional, com os estudos feitos na faixa ácida, para os valores de: 2,5, 3,5 e 5,5. O meio nutricional para ajuste de umidade também foi esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos antes de entrar em contato com o substrato já estéril nos *erlenmeyers*.

Os valores de pH do meio eram ajustados com hidróxido de sódio 6 M ou ácido sulfúrico 2,5 M, conforme a necessidade. O ajuste do meio nutricional e a umidificação do substrato foram realizados em condição ambientalmente estéril utilizando capela de fluxo laminar da marca Silterflux e do tipo fluxo laminar vertical.

4.8.1 Pré-tratamento químico dos substratos

O pré-tratamento químico dos substratos foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Aguiar e Menezes (2000), visando alterar as características estruturais dos resíduos empregados e melhorar a digestibilidade da celulose, visando à melhor solubilização de lignina e, conseqüentemente, facilitar a exposição da celulose à ação do fungo.

O pré-tratamento foi realizado em um recipiente autoclavável de vidro de 5L, no qual foi adicionado 100g de substrato, previamente lavado e moído, e 2000 mL da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 4%. O sistema foi levado à autoclave a 121 °C, por 30 minutos. A recuperação do substrato, após o tratamento, ocorreu por filtração com uso de um tecido não tecido a base de polipropileno, comercialmente conhecido como TNT. Após a retenção do substrato no TNT, o mesmo foi lavado com água corrente até atingir a neutralidade do pH, o qual era monitorado a partir da água residual após lavagem. Por fim, o substrato pré-tratado foi seco em estufa à 65 °C, até obtenção da massa constante, e posteriormente armazenamento em sacos plásticos, mantido em temperatura ambiente.

4.9 Extração das enzimas

A extração enzimática foi realizada de acordo com Zúñiga (2010), adicionando-se 10 mL/g de tampão acetato de sódio a 0,2 M ao meio fermentado, em pH 4,5, totalizando uma quantidade de 50 mL de tampão. Em seguida, procedeu-se a homogeneização em câmara rotativa por 1 hora a 120 rpm e a 32 °C. Filtrou-se o material a vácuo, usando membrana de

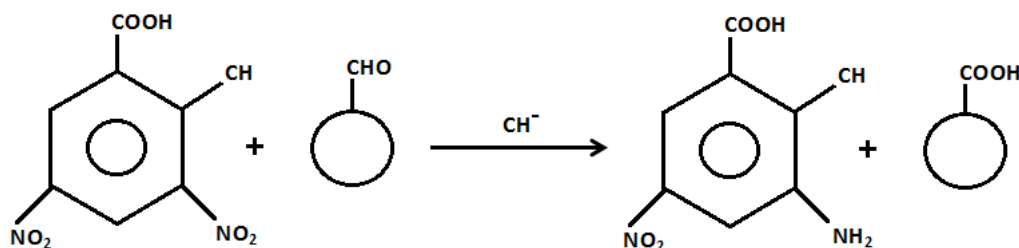
fibra de vidro GF-1, diâmetro 47 mm, e realizaram-se os procedimentos para determinação da atividade enzimática.

4.10 Determinação da atividade de celulase total

A determinação da atividade de *celulases* total deu-se pelo método de Miller (1959), reportado por Ghose (1987), que tem por base a medição da dosagem de açúcares redutores (DNS), liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1, medindo 1,0 x 6,0 cm, a partir das enzimas presentes no extrato produzido.

O reagente DNS possui em sua constituição o ácido 3,5-dinitrosalicílico que é o agente oxidante; sal de Rochelle (solução de tartarato de sódio e potássio) para prevenir o reagente da ação do oxigênio dissolvido; fenol, utilizado para aumentar a quantidade de cor produzida; metabissulfito de sódio, estabilizante da cor obtida na presença do fenol, e hidróxido de sódio, redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitrosalicílico (Butzke *et al.*, 2010). Na Figura 5 é mostrada a reação de oxidação que ocorre no método DNS.

Figura 5 - Reação de oxidação da carbonila pelo reagente DNS.



Fonte: Butzke *et al.* (2010)

Assim, pelo método, ocorre a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (de cor amarelo forte) e a oxidação da glicose, formando o 3-amino-5-nitrosalicílico (de cor vermelho-marrom forte), na proporção estequiométrica. Desta forma, a concentração de açúcar redutor presente na solução é obtida devido à absorção da luz a 540 nm, pelo 3-amino-5-nitrosalicílico (BUTZKE *et al.*, 2010).

Os reagentes empregados para a determinação da celulase total são:

- Reagente DNS: obtido pela dissolução de 0,6 g de 3,5-ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH, em 1.416 mL de água destilada, com posterior adição de 306 g de tartarato de sódio-potássio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6 mL de fenol fundido à 50°C.

- Tampão citrato de sódio: feito com 210 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) dissolvidos em 750 mL de água destilada, procedendo-se a adição de hidróxido de sódio (NaOH) até o pH 4,3 – aproximadamente de 50 a 60 mg de NaOH –, quando então, a solução é diluída para 1000 mL e verificado o pH para ver se atingiu o valor de 4,5. Após a diluição, caso o pH não tenha atingido 4,5, adiciona-se NaOH até atingir este valor, resultando em um tampão 1 M de citrato de pH 4,5. Quando esta solução era diluída para 0,05 M, o pH deveria atingir o valor de 4,8, caso o contrário, ajustava-se.

A construção de curva padrão de glicose (Tabela 8) ocorreu conforme Silva (2008), fazendo uso de solução padrão de glicose de 5 mg/mL, a partir da qual foram feitas diluições com uso do tampão de citrato como diluente, em tubos de ensaio, resultando concentrações de 0 a 5 mg/mL de glicose. Na preparação da solução padrão, a glicose foi mensurada em balança analítica da marca Marte e modelo AY220 e solubilizada em água destilada.

Tabela 8 - Curva padrão de glicose para determinação de celulasas totais.

Padrão (5mg/mL) (mL)	Tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8	mg de glicose/mL	mg de glicose/0,5mL
0	0,5	0	0
0,05	0,45	0,5	0,25
0,1	0,4	1	0,5
0,15	0,35	1,5	0,75
0,2	0,3	2	0,1
0,25	0,25	2,5	1,25
0,3	0,2	3	1,5
0,35	0,15	3,5	1,75
0,4	0,1	4	2
0,45	0,05	4,5	2,25
0,5	0	5	2,5

Fonte:Silva (2008)

Após preparar as diluições, foi adicionado 1 mL de tampão de citrato (pH 4,8 e 0,05 M), em cada tubo de ensaio, prosseguindo-se à determinação de açúcares redutores, com posterior obtenção da equação para determinação da quantidade de glicose (mg), liberada

durante ação das enzimas, obtendo-se, então, a concentração de açúcar total referente a cada uma das concentrações de glicose da curva padrão.

Desta forma, para determinação da atividade da celulase a partir das amostras dos extratos retirados dos reatores, previamente realizava-se a filtração a vácuo das mesmas, usando membrana de fibra de vidro GF-1, diâmetro 47 mm, a fim de separar o resíduo da fermentação (biomassa e esporos) do sobrenadante (extrato enzimático).

Em tubos de ensaio, com volume útil maior que 20 mL e em duplicata, era adicionado 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio (pH 4,8 e 0,05 M), 0,5 mL de extrato enzimático (amostra filtrada) e uma tira de papel filtro de tamanho 1 x 6 cm.

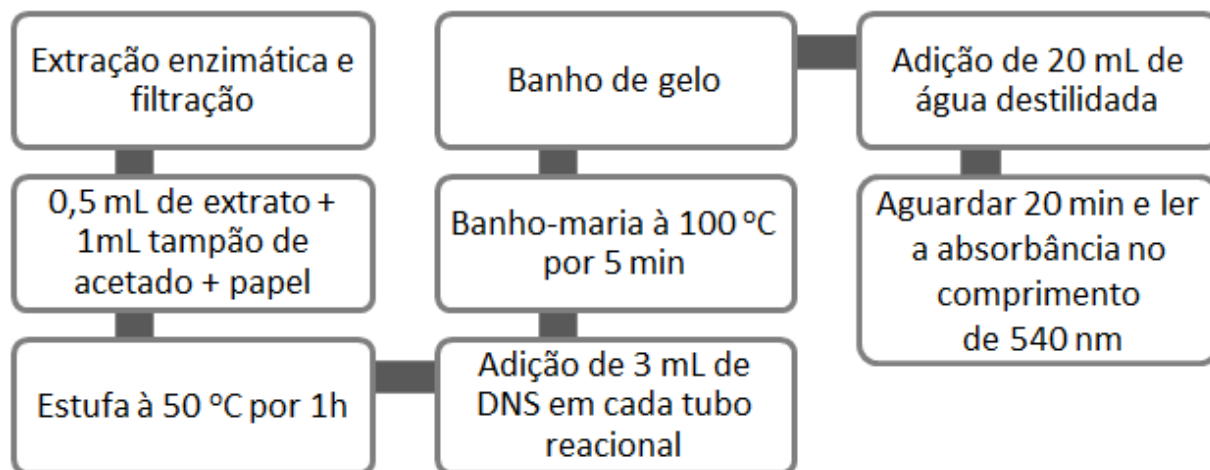
Para o branco total, o extrato enzimático era substituído por 0,5 mL do mesmo tampão de citrato. Para o branco da enzima, adicionava-se 1mL do mesmo tampão de citrato e 0,5 mL de extrato enzimático, sem a presença da tira de papel filtro. Em seguida, o sistema composto pelos tubos reacionais, branco total e branco da enzima era levado à estufa microbiológica, onde permanecia a 50 °C e, após 60 min de incubação, introduziam-se 3 mL aos tubos de solução de DNS, os quais, posteriormente, eram levados à fervura em banho-maria da marca Quimis e modelo Q334M-28, durante 5 min, para produção de cor. Então, os tubos eram retirados e colocados em banho de gelo para interromper a reação e após, recebiam 20 mL de água destilada.

Os tubos tinham seu conteúdo misturado completamente por inversão, procedimento que ocorre várias vezes, resultando na separação do fundo do tubo em cada inversão. Após 20 min, realizava-se leitura da absorbância da reação em espectrofotômetro da marca Thermo Scientific e modelo Evolution 60S no comprimento de onda de 540 nm.

O valor obtido da absorbância do branco da enzima era subtraído de cada um dos valores da absorbância dos tubos reacionais que constituíam a duplicata. Os valores obtidos da subtração eram lançados na curva padrão de glicose (0 a 2,5 mg/0,5 mL) para se ter a massa de glicose (mg) liberada no ensaio. Para as diluições da curva padrão de glicose eram realizados os mesmos procedimentos das amostras, sendo que não era adicionada a fita de papel nos tubos e os mesmos não eram levados à estufa a 50 °C com tempo de incubação de 60 min.

Na Figura 6 é mostrada, de maneira sucinta, a sequência da análise enzimática.

Figura 6 - Fluxograma sequencial da determinação da atividade de celulase total.



Fonte: Autor (2016)

Conforme descrito por Ghose (1987), quando o extrato enzimático analisado libera menos do que a quantidade crítica de glicose (2 mg), não necessita de diluição e, neste caso, calcula-se a atividade enzimática conforme a Equação 4, sendo que uma unidade enzimática equivale a 1µmol de glicose liberado por mL por minuto (GHOSE, 1987), no período do ensaio, sendo expressa em UI/mL (unidade de atividade enzimática por mL).

$$\text{FPU} = \text{mg glicose liberada} \times 0,185 \quad (4)$$

Origem da equação acima:

$$1,0 \text{ mg de glicose} = 1,0/0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,185 \text{ unidades mL}^{-1}$$

4.11 Tratamento estatístico

Aplicou-se aos dados obtidos nos experimentos referentes as Etpas I e II o Teste ANOVA, utilizando o soft ACTION, com nível de significância 0,05 pré-determinado. Para avaliar se existe ou não interação entre os fatores em estudo, basta verificar se os gráficos de interação gerados no teste ANOVA se interceptam ou não. Em relação ao teste de umidade, foram aplicados os testes estatísticos Levene e Bartlett, também utilizando o soft ACTION, respectivamente para os dados obtidos com bagaço de cana e casca de coco com nível de significância 0,05 pré-determinado para ambos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A produção de enzimas do complexo celulolítico não está somente ligada à linhagem do micro-organismo responsável, mas também às técnicas e substratos utilizados no processo. Diversos fatores podem influenciar na produção do complexo celulolítico. Técnicas de cultivo, pH, umidade, temperaturas dentre outros. Na sessão que segue, serão apresentados os resultados obtidos na presente pesquisa de modo a avaliar a influência dos parâmetros em discussão.

5.1 Caracterização elementar dos substratos

De acordo com a literatura, a composição elementar de vegetais sofre influência considerável da composição do solo onde a cultura está sendo produzida, além de outros fatores tais como quantidade de chuvas e a época do ano (BRÍGIDA *et al.*, 2010). Na Tabela 9 encontra-se cada elemento químico detectado na caracterização dos substratos e suas quantidades.

Tabela 9 - Determinação dos elementos químicos presentes nos substratos.

Elemento	Bagaço de cana (mg/g)	Casca de coco (mg/g)
Al	29,3	14,2
Cd	121,7	159,5
Fe	15,7	0,7
Cu	14,5	14,6
Pb	77,0	196,3
Mg	10,4	5,0
Mn	39,5	16,6
Ni	12,8	13,1
Na	14,3	1,3
Ti	37,5	19,7
Ca	7,2	14,4
Co	23,4	9,0
Ba	9,2	15,3
Zn	15,4	4,4
Cr	16,0	21,9

Fonte: Autor (2016)

A detecção dos elementos químicos nos substratos em estudo pode ser atribuída à presença dos mesmos no solo onde tais vegetais se desenvolveram. Segundo Galán e Romero (2008) o solo acumula e concentra os metais devido a sua capacidade de retenção principalmente nas camadas superficiais que correspondem à parte biologicamente mais ativa do mesmo.

De acordo com Magna, Machado e Portella (2011), os metais presentes nestas camadas podem estar facilmente acessíveis aos vegetais cultivados em áreas contaminadas.

É possível observar que os elementos encontrados em maiores quantidades foram o Cd e o Pb, tanto para o bagaço de cana, como para a casca do coco, sendo estes valores, respectivamente, de 121,7 mg/g e 77 mg/g para o primeiro e de 159,5 mg/g e 196,3 mg/g para o segundo.

Zeng *et al.* (2007) reportam que o chumbo é o metal poluente mais abundante no solo. O alto teor do mesmo pode ser devido ao tráfego intenso na região que libera vapores de chumbo para a atmosfera, os quais são depositados nas superfícies através das chuvas, por exemplo, (JÚNIOR, 2011). De acordo com Kabata Pendias e Pendias (2011), o acúmulo de Pb na superfície de solos é de grande significado ecológico, porque este metal é conhecido por afetar significativamente a atividade biológica de solos. Os mesmos autores mencionam, com base na literatura, que aumentos nos níveis de Pb no solo podem limitar a atividade enzimática da microbiota e, em consequência, aumentar significativamente o acúmulo de matéria orgânica no local incompletamente decomposta, especialmente em relação a materiais que não sejam degradados rapidamente, tais como a celulose. Em relação ao Cd, na agricultura, uma fonte direta de contaminação por esse metal é a utilização de fertilizantes fosfatados (JÚNIOR, 2011). De acordo com Cooley, Thurman e Tomsett (1986), este metal pesado em dosagens maiores pode causar efeitos deletérios sobre o metabolismo celular e progressiva inibição da esporulação de fungo.

A caracterização dos elementos presentes nos substratos em estudo foi importante para melhor entendimento das etapas posteriores tendo em vista que uma propriedade importante das enzimas celulolíticas é sua capacidade de ser influenciada por outras moléculas, especialmente metais, sejam sofrendo efeitos inibitórios ou indutores (JÚNIOR, 2011). De acordo com Lima *et al.* (2005), os íons que inibem mais frequentemente as celulasas são Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+2} e Zn^{+2} , que chegam a provocar até a perda total da atividade catalítica, estando presentes em concentração tão baixas quando 2 mM. Dentre tais elementos, foram detectados em ambos os substratos os metais Cu e Zn.

5.2 Crescimento fúngico sobre cossustratos

No teste de crescimento do micro-organismo sobre o bagaço de cana e de coco ocorreu desenvolvimento da biomassa em ambos os sistemas reacionais, como observado nas Figuras 7 e 8, ou seja, tanto na presença quanto na ausência de glicose.

Figura 7 - Crescimento micelial fúngico no bagaço de cana: à esquerda, sem glicose presente e à direita, com glicose.



Fonte: Autor (2016)

Figura 8 – Crescimento micelial fúngico na casca do coco: à esquerda, com glicose presente e à direita, sem glicose.



Fonte: Autor (2016)

O crescimento do *Aspergillus niger* AN 400 foi observado mesmo na presença de líquido livre, o que já era esperado pelo fato de que, de acordo com Rocha (2010), 90% das enzimas comerciais serem produzidas por sistemas de fermentação líquida em tanques profundos, sistemas em que o volume de água é elevado. Assim, a presença do líquido livre no meio não impactou negativamente no que diz respeito ao crescimento micelial do fungo.

A glicose é o composto mais facilmente degradado pelos seres vivos, o que pode resultar no aumento mais rápido da biomassa e, conseqüentemente, da eficiência de remoção de matéria orgânica, uma vez que a glicose é o principal combustível para a produção de ATP em micro-organismos eucarióticos (CHAMBERGO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2007).

No entanto, notou-se que a adição de glicose não foi fator seletivo na resposta do crescimento microbiano, embora seja fonte de carbono de fácil assimilação, pois o crescimento do fungo deu-se visualmente semelhante na ausência e na presença deste cossustrato, em ambos os resíduos. Isto se mostrou como fator positivo no que diz respeito à capacidade do micro-organismo de obter o carbono necessário ao seu desenvolvimento a partir de tais fontes complexas (ROCHA, 2010), ultrapassando a barreira física que a lignina geralmente proporciona a ação microbiana.

Em seu trabalho, Wu, Xiao e Yu (2005) avaliaram a capacidade de degradação de lignina presente em água residuária de indústria de papel pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. Foi constatado que a degradação da lignina foi potencializada quando a glicose encontrava-se disponível no meio na concentração de 1 g/L e que um aumento adicional na concentração desse cossustrato (20 g/L e 50 g/L), resultou em uma rápida diminuição da eficiência de remoção da lignina. Isto pode ser explicado porque primeiramente ocorre o metabolismo primário, que favorece o crescimento micelial, juntamente com o consumo de carboidratos de fácil assimilação. Posteriormente, o crescimento micelial diminui, podendo até cessar, surgindo o metabolismo secundário de deslignificação que ocorre em resposta à depleção de carboidratos (ROUCHES, 2016), de forma que se carboidratos de fácil assimilação estiverem disponíveis em altas concentrações, não se tem início ao metabolismo secundário.

Na presente pesquisa, a glicose não mostrou ter sido preponderante para o crescimento dos fungos, uma vez que houve crescimento também na ausência deste cossustrato.

Conforme mencionado por Rouches (2016), a glicose, embora possa funcionar como cossustrato eficiente, pode reprimir a atividade de celulase. O sistema celulolítico microbiano pode sofrer repressão catabólica em concentrações excessivas de açúcares simples, como glicose, maltose e arabinose (SEIBOTH *et al.*, 1997).

O fato de o micro-organismo ter se desenvolvido na ausência da glicose pode apontar para maior viabilidade da pesquisa, pois a não utilização de glicose conduz à redução de custos operacionais.

Deste modo, tanto o bagaço de cana quanto a casca de coco foram materiais suporte favoráveis ao crescimento do *Aspergillus niger* AN 400, o que os tornou atrativos para a continuidade da presente pesquisa e de outras que visem à produção de metabólitos microbianos de interesse industrial.

Quanto à quantidade de biomassa fúngica formada sobre os substratos, após o tempo de cultivo de 7 dias, tempo esse que foi observado visualmente o desenvolvimento micelial, acreditou-se que a diferença entre o peso dos reatores com biomassa desenvolvida e dos reatores antes do crescimento, daria uma estimativa do peso da biomassa fúngica formada em cada sistema, no entanto, não foi possível sua determinação.

Durante a execução da pesagem, ao se fazer diferença entre o peso do conjunto (*erlenmeyer*, meio nutricional líquido, substrato e biomassa em crescimento), antes e após o tempo de reação de 7 dias, observaram-se valores negativos, os quais foram atribuídos à possível perda de umidade durante o tempo decorrido e/ou a própria ação metabólica do fungo sobre os substratos.

De acordo Rutsatz (2006), esses valores diferem porque, normalmente, a massa do meio diminui significativamente ao longo do cultivo devido à conversão do substrato em dióxido de carbono. O referido autor relatou que métodos de quantificação direta, em geral, envolvem a separação da biomassa do substrato e, por isso, dificilmente podem ser utilizados para fungos filamentosos. No entanto, a quantificação precisa da biomassa no presente experimento não foi levada em consideração, à medida que o objetivo inicial seria de apenas avaliar a capacidade do micro-organismo em se desenvolver nos substratos propostos, na presença e na ausência de uma fonte de carbono de fácil assimilação.

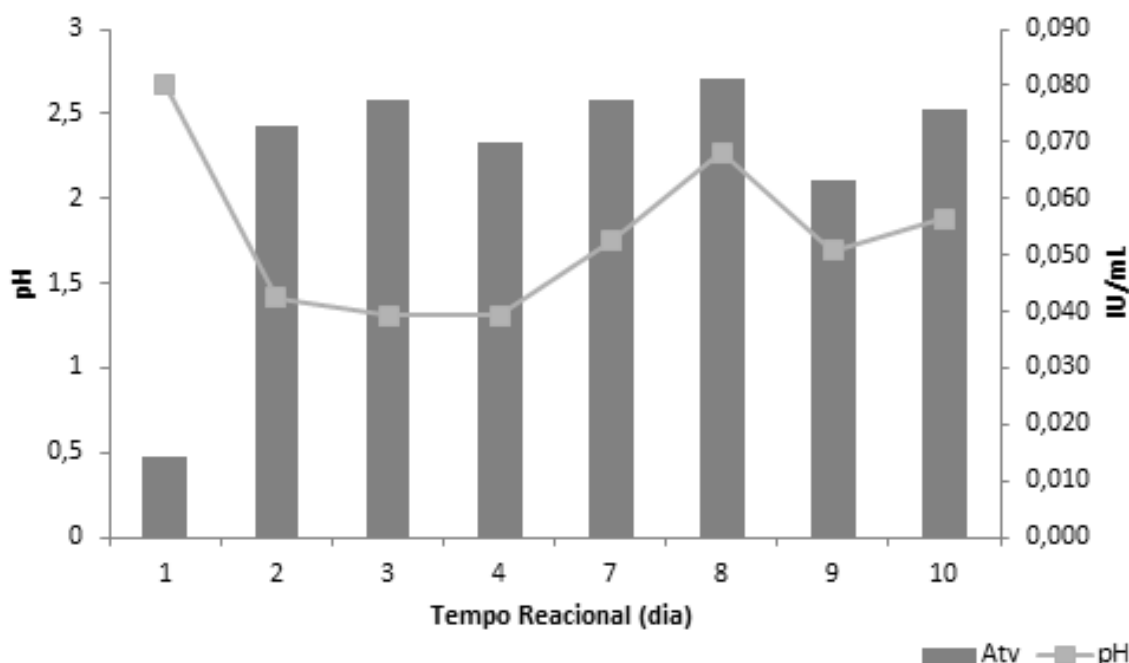
É importante também frisar a capacidade que o *Aspergillus niger* AN 400 demonstrou ao se desenvolver fazendo uso de tais substratos, transpondo a barreira física que a lignina normalmente proporciona ao dificultar a atividade microbiana sobre materiais lignocelulósicos e confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo, impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010), o que não foi o caso do fungo utilizado na presente pesquisa.

5.3 Influência do tempo reacional para produção da celulase

O comportamento da atividade enzimática para a celulase e a variação do pH ao longo do tempo reacional de 10 dias utilizando o bagaço de cana são apresentados na Figura 9.

Observou-se que a atividade enzimática passou a ocorrer com maior intensidade a partir do segundo dia de reação, a qual atingiu valor de 0,073 UI/mL. O pico da atividade no sistema ocorreu no 8º dia (0,081 UI/mL) e, no último dia de operação (10º dia), chegou a 0,076 UI/mL.

Figura 9 - Variação da atividade de celulase total (Atv) e do pH no decorrer do tempo reacional de 10 dias utilizando o bagaço de cana como substrato indutor.



Fonte: Autor (2016)

Um estudo realizado por Zúñiga (2010) utilizou o fungo *Aspergillus niger* para produção de *celulases* específicas através da tecnologia de FES. A primeira etapa desse experimento consistiu na avaliação da cinética de produção de *celulase* total, a cada 24 horas, durante quatro dias, com finalidade de determinar o melhor tempo para a cinética de produção da referida enzima, visando seu uso em etapas futuras. O autor utilizou farelo de trigo como substrato indutor, e como resultado obteve a produção máxima de *celulase* total de 0,040 UI/mL, após 3 dias (72 h) de fermentação. Na presente pesquisa, o início da atividade

enzimática foi observado a partir do 2º dia de reação, ou seja, um dia antes em comparação ao tempo reacional que levou à produção máxima de *celulase* na pesquisa de Zúñiga (2010) e com maior atividade enzimática (0,073 UI/mL).

Outro fator relevante foi que o bagaço de cana, substrato utilizado na presente pesquisa, apresentou melhor resposta como substrato indutor para a atividade enzimática quando comparado à máxima produção atingida na pesquisa de Zúñiga (2010) ao fazer uso de farelo de trigo, material considerado como fonte de carbono boa para produção de uma ampla variedade de enzimas, incluindo as celulolíticas (HU *et al.*, 2011).

Em relação ao pH, observou-se que, nos sistemas testados, o mesmo manteve-se na faixa ácida, com valores de 1,31 a 2,67, ao longo de todo tempo reacional. No 1º dia, ocorreu a redução do pH de 3,5 para 2,67 e, deste último valor, para 1,41, no 2º dia, o qual coincidiu com o aumento da atividade enzimática no sistema. O pH permaneceu próximo de 1,4 até o 4º dia, elevando-se para 2,27, no 8º dia, quando foi observado o pico máximo da atividade enzimática.

Conforme More *et al.* (2010), a produção de ácidos orgânicos como metabólitos secundários de fungos pode proporcionar a manutenção do meio ácido, o que é fundamental para melhor produção enzimática. Na literatura, trabalhos respaldam a capacidade do *Aspergillus niger* de produzir ácidos orgânicos, mantendo o meio ácido.

Em seu experimento, Anjum *et al.* (2010) avaliaram a capacidade de *Aspergillus niger* produzir ácidos orgânicos a partir da degradação da glicose, solução diluída (50% v/v) de melaço, casca de manga, sementes e farelo de arroz, todos na quantidade de 5% (m/v). No extrato gerado após fermentação, identificou-se a produção de ácidos orgânicos, incluindo cítrico, oxálico, tartárico e málico, dentre os quais, destacou-se a produção de ácido cítrico, seguido por ácido málico, em todas as amostras analisadas, com considerável diminuição do pH, na faixa de 3,4-4,9, em todos os frascos devido à produção de tais ácidos.

A produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* MNNG-115 também foi comprovada em um estudo realizado por Ali e Haq (2005), os quais avaliaram o efeito promovido da suplementação de diferentes aditivos e microminerais metálicos sobre a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* MNNG-115, utilizando como fontes de carboidratos o bagaço de cana-de açúcar e o melaço. Assim como na presente pesquisa, durante todo o experimento realizado pelos referidos autores, o meio também se manteve ácido entre os valores de 2,6 a 4,3.

No presente experimento, a partir do 2º dia, ao aplicar-se o teste estatístico de Tukey, foi possível ratificar que não houve diferença significativa nas atividades enzimática (P valor $> 0,05$) em relação aos tempos reacionais posteriores (Figura 9). Isto pode ser explicado pelo fato das enzimas não terem sido consumidas na reação, não alterando seu equilíbrio químico (MAIOLINI, 2009) e, provavelmente, pela não formação ou presença de compostos químicos que causariam a inibição das mesmas durante o processo.

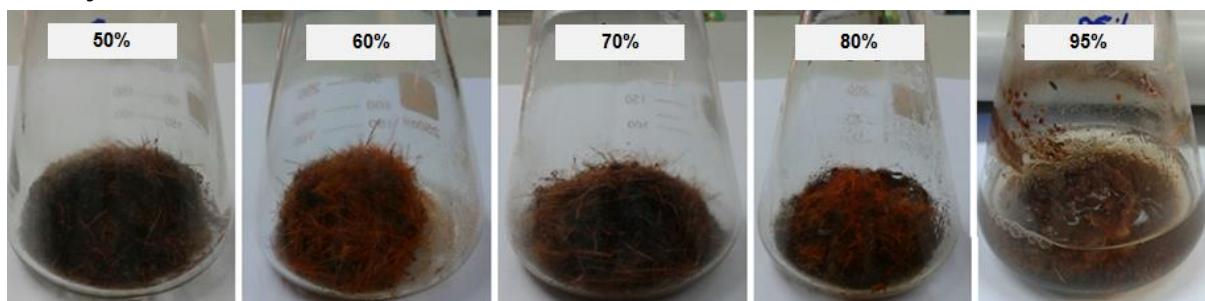
De acordo com Zúñiga *et al.* (2011), *Aspergillus niger* é uma espécie que não necessita de tempos reacionais longos para a produção de celulases, o que é interessante para fins comerciais em comparação ao tempo de cultivo de outros fungos celulolítico.

Deste modo, o tempo reacional escolhido para as próximas etapas da pesquisa, com base nas atividades enzimáticas obtidas nesse teste, foi de 6 dias, tempo esse intermediário entre 4 e 8 dias, sendo neste último registrado o pico de atividade enzimática, o qual não se diferiu muito do observado no 4º dia.

5.4 Influência da umidade para no crescimento fúngico e na produção da celulase

Nas Figuras 10 e 11 são apresentados registros do crescimento fúngico sobre os substratos casca de coco e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente, no ultimo dia de experimento (dia 6). Observou-se que em ambos os substratos o líquido nutricional não ficou visível nos reatores quando o teor do líquido era de 50%, 60%, 70% e 80% e visível nos reatores com teor de 95%.

Figura 10 - Crescimento da biomassa fúngica sobre a casca do coco em diferentes condições de umidade: 50%, 60%, 70%, 80% e 95%.



Fonte: Autor (2016)

Figura 11 - Crescimento da biomassa fúngica sobre o bagaço de cana-de-açúcar em diferentes condições de umidade: 50%, 60%, 70%, 80% e 95%.



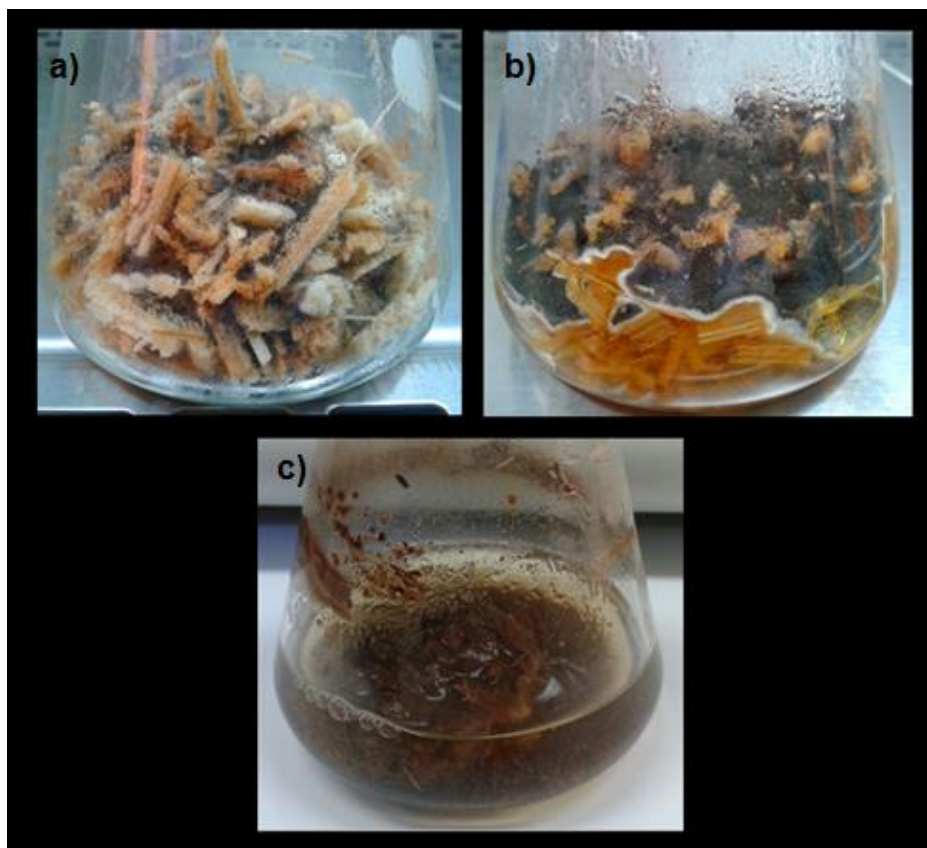
Fonte: Autor (2016)

Tal fato se deve pela característica dos substratos de absorverem o líquido do meio o qual fica retido nos interstícios e nos espaços existentes entre as fibras. Nos reatores com teor de umidade de 95%, o líquido apresentou-se visível, mostrando que nesta condição há quantidade de água suficiente para saturar os substratos.

A umidade é um fator crítico para o crescimento dos fungos em substrato sólido. Ao contrário de processos onde acultura é líquida, os processos com uso de substrato sólido e poroso requer o controle do nível de umidade, sendo essencial à otimização da ação do micro-organismo sobre o mesmo (SANTOS *et al.*, 2013).

Como mostrado nas Figuras 10 e 11, o desenvolvimento da biomassa fúngica, possivelmente, foi influenciado pelo teor de umidade dos substratos, sendo essa a única variável dos sistemas, tendo-se detectado crescimento visível em alguns dos reatores, apesar de que, em outros, esse crescimento não tenha sido visivelmente perceptível. Nos reatores com cana, observou-se que o desenvolvimento do micro-organismo foi melhor nos reatores com de 80% e 95% de umidade, sendo que a biomassa cresceu de forma mais visível no reator de 95%. Semelhantemente, para a casca de coco, notou-se que a biomassa também cresceu melhor visualmente no reator com 95% (Figura 12).

Figura 12– Aspecto visual da biomassa do fungo nos reatores com teor de umidade de 80% e 95% com bagaço de cana (a e b, respectivamente) e de 95% com casca do coco no tempo reacional de 6 dias.



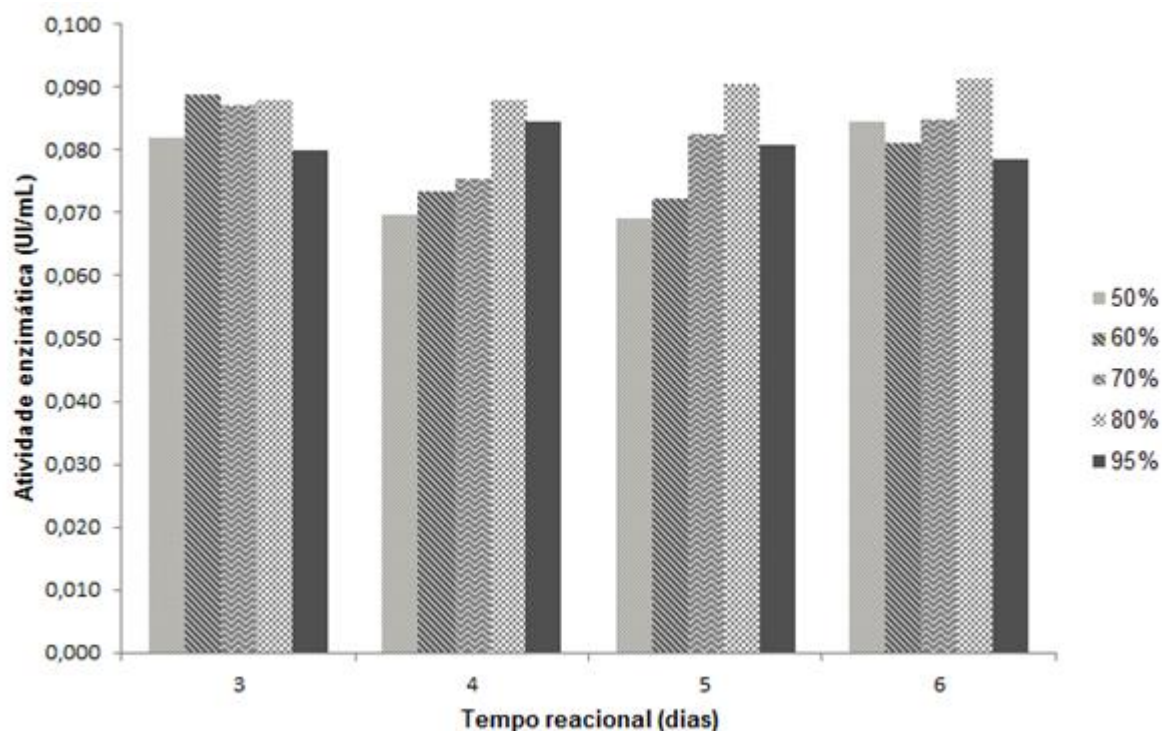
Fonte: Autor (2016)

Em um trabalho realizado por Alexandrino *et al.* (2007), no qual utilizaram a espécie fúngica *Pleurotus ostreatus* para produção de enzimas a partir da ação metabólica do fungo sobre resíduos de laranja, análises visuais das culturas permitiram concluir que o desenvolvimento e o crescimento do fungo foram mais precoces quando a umidade inicial foi superior a 75%. Neste mesmo estudo, nas culturas em que a umidade inicial variou entre 75 e 80%, foi verificado que o fungo cresceu de forma homogênea nas partículas do substrato sólido. Já nas culturas em que a umidade inicial foi superior a 80%, o crescimento foi caracterizado pela formação de uma massa micelial espessa, acima do substrato, o que também ocorreu na presente pesquisa em ambos os substratos empregados, como observado nos reatores com 95% de teor de umidade.

Porém, nos reatores com umidade abaixo de 80% (Figuras 10 e 11), o crescimento micelial não foi tão visível em comparação com o crescimento observado nos reatores de 95%, o que pode ser atribuído ao baixo teor de água presente no meio, uma vez que um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento da biomassa fúngica (SANTOS *et al.*, 2013).

Em relação à atividade enzimática, a variação da mesma é mostrada nas Figuras 13 e 14, observando-se o comportamento da atividade em função da variação da umidade para os substratos casca de coco e bagaço de cana nos TR de 3 d, 4 d, 5 d e 6 d, respectivamente.

Figura 13 - Variação da atividade enzimática em diferentes condições de umidade na casca do coco.



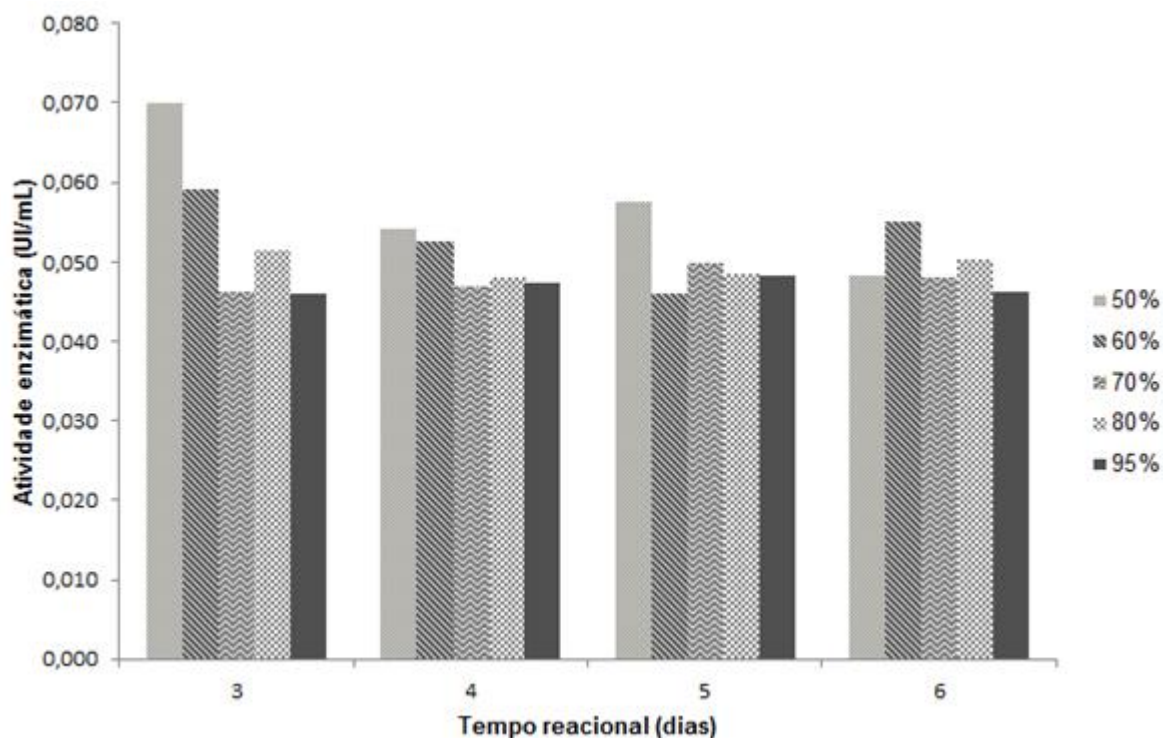
Fonte: Autor (2016)

Para a casca do coco, a maior atividade enzimática foi registrada nos reatores com umidade de 80%, atingindo um valor de 0,091 UI/mL no TR de 5 dias e permanecendo com o mesmo valor no 6º dia. Verificou-se também que nessa condição de umidade, a atividade enzimática não sofreu redução ao longo do experimento, sendo que para os tempos reacionais de 3 e 4 dias a atividade foi a mesma (0,088 UI/mL).

Ainda para este substrato, nas condições de umidade de 50%, 60% e 70%, a atividade atingiu valores, respectivamente, de 0,082 UI/mL, 0,089 UI/mL e 0,087 UI/mL, no TR de 3 dias, e sofreu redução no 4º dia para 0,070 UI/mL, 0,073 UI/mL e 0,075 UI/mL, respectivamente. Para essas mesmas condições de umidades, foi observado que no último TR (6 dias), a atividade enzimática aumentou para 0,085 UI/mL, 0,081 UI/mL e 0,085 UI/mL, respectivamente. No entanto, é importante destacar que para 60% e 70% a atividade no último dia de experimento ficou abaixo das observadas no TR de 3 dias (0,089 UI/mL e 0,087

UI/mL, respectivamente). Redução da atividade enzimática também foi observada na umidade de 95% que, no dia 3, foi de 0,080 UI/mL e, no dia 6, de 0,078 UI/mL.

Figura 14 - Variação da atividade enzimática em diferentes condições de umidade no bagaço de cana.



Fonte: Autor (2016)

Para o substrato bagaço de cana, a maior atividade enzimática foi registrada para os reatores com umidade de 50%, no TR de 3 dias, atingindo o valor de 0,070 UI/mL. Posteriormente, a atividade enzimática nessa condição de umidade reduziu para 0,054 UI/mL, no TR de 4 dias, e para 0,048 UI/mL, no TR de 6 dias. Houve redução também na atividade enzimática nos reatores de 60% e 80%, sendo que para o primeiro, a atividade variou de 0,059 UI/mL (TR de 3 dias) a 0,055 UI/mL (TR de 6 dias) e, para o segundo, de 0,052 UI/mL (TR de 3 dias) a 0,050 UI/mL (TR de 6 dias).

No que se refere aos reatores com 70% e 95%, a variação da atividade nesses sistemas ocorreu de maneira semelhante, ambos apresentando atividade enzimática de 0,046 UI/mL e 0,047 UI/mL, nos tempos reacionais de 3 e 4 dias, nesta ordem, chegando no TR de 6 dias a alcançar atividade de 0,048 UI/mL para o reator de 70% e 0,046 UI/mL para o de 95%.

Apesar da literatura reportar que as enzimas geralmente não são consumidas após reação de quebra de substratos (LIMA *et al.*, 2008; MAIOLINI, 2009), o que conduziria a

atividade enzimática constante ou maior, sem que haja redução de seu valor com o passar do tempo, outros fatores influenciam na redução da atividade enzimática no meio.

Assim, a diminuição da produção de enzimas observada na maioria dos reatores pode ser explicada devido ao esgotamento de nutrientes que inibe o crescimento de fungos e, conseqüentemente, a formação de enzimas, ou ainda, por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática. Geralmente as enzimas apresentam mecanismo de controle que são estimulados ou inibidos por produtos do meio (SANTANA *et al.*, 2012). Frequentemente, os produtos finais de uma dada via metabólica são inibidores de enzimas que catalisam os primeiros passos da via (SANTOS *et al.*, 2013). Este mecanismo é conhecido como a realimentação negativa ou *feedback* negativo (FERREIRA *et al.*, 2011).

Biazus *et al.* (2006), trabalhando com malte de milho, observaram que na produção de enzimas o início é lento, em seguida, acelera até atingir o seu valor máximo; depois disso, a concentração de produtos gerados são inibidos e a sua atividade é reduzida.

É importante observar que na condição de umidade de 50%, onde ocorreu a maior atividade enzimática com bagaço de cana, a biomassa fúngica não era tão visível no final do experimento (Figura 11), de modo que uma alta produção de biomassa não implicou necessariamente em uma maior atividade enzimática, pois com esse substrato a biomassa mais visível foi observada nos reatores com umidade de 95%, no TR de 6 dias, nos quais a atividade enzimática ficou no intervalo entre 0,046 e 0,048 UI/mL, abaixo do pico da atividade detectada no reator de 50%.

Para os reatores com 50% de umidade, foi verificado que no final do ensaio, a massa micelial encontrava-se visivelmente menor que a presente no reator de 95%.

O mesmo foi observado para a casca de coco que teve sua maior atividade enzimática (0,091 UI/mL) na umidade de 80% (Figura 13), no TR de 5 dias. Porém, a biomassa estava mais visível na umidade de 95% (Figura 12), na qual a atividade enzimática variou de 0,078 e 0,084 UI/mL.

Estes resultados são corroborados por Rocha (2010) que relatou a existência de um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular em função do micro-organismo envolvido, que pode não coincidir com a maior concentração do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, as enzimas. Esta afirmação também é endossada por Narahara *et al.* (1982) ao estudarem o efeito da umidade do substrato sobre a atividade das enzimas proteases e amilases produzidas pela espécie fúngica *Aspergillus oryzae*. Os autores concluíram que o valor de umidade ótimo para a produção de enzimas em substratos sólidos não necessariamente coincide com a maior produção celular.

Comparando os valores encontrados para o substrato bagaço de cana e casca do coco, verificou-se diferença entre os resultados nos distintos resíduos, o que demonstrou que nem todos os substratos possuem o mesmo potencial para a produção de diferentes enzimas. Os valores de atividade enzimática encontrados para bagaço de cana variaram de 0,046 a 0,070 UI/mL e para a casca do coco, variou de 0,070 a 0,091 UI/mL.

Diferentes valores com base nos diferentes substratos indutores também foram observados por Santos *et al.* (2013), os quais analisaram a atividade de celulasas produzidas utilizando resíduos do processamento do cacau, manga e seriguela, pela ação de *Aspergillus niger* em condições de umidade de 40%, 50% e 60%. Os valores obtidos pelos autores foram maiores dos encontrados na presente pesquisa, na condição de umidade de 50%, sendo que, ao empregar o resíduo de cacau como substrato, a atividade foi de 7,08 UI/mL, em aproximadamente 2 dias; para o de manga, a atividade foi de 4,45 UI/mL, para um tempo reacional de aproximadamente 4 dias e para o resíduo de seriguela, a atividade foi de 11,62 UI/mL, em 2 dias.

Em outra pesquisa, também com 50% de umidade, Ferreira *et al.* (2011) alcançaram atividade de *endoglucanase* máxima, de 3,186 UI/mL, ao utilizar o fungo *Aspergillus niger* na biodegradação de resíduo de cajá, após 3 dias de reação. É importante ressaltar que na presente pesquisa a maior atividade enzimática quando o substrato foi o bagaço de cana também foi obtida em condição de umidade de 50%.

Os valores das atividades enzimáticas encontrados para ambos os substratos não mostraram diferença significativa (P-valor > 0,05) ao serem avaliados estatisticamente, conforme é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Tratamento estatístico dos dados referentes ao bagaço de cana e à casca de coco em relação às diferentes umidades testadas.

Substrato (Teste estatístico)	Bagaço de cana (Levene)	Casca de coco (Bartlett)
Grau de liberdade	4	4
P - valor	0,10183	0,10433

Fonte: Autor (2016)

Deste modo, a condição de umidade escolhida para as etapas posteriores foi a de 95%, tendo em vista que as umidades menores não possibilitaram a presença de líquido livre no meio devido a alta absorção por ambos os substratos, sendo inviável para verificação da influencia do pH inicial nas Etapas I e II.

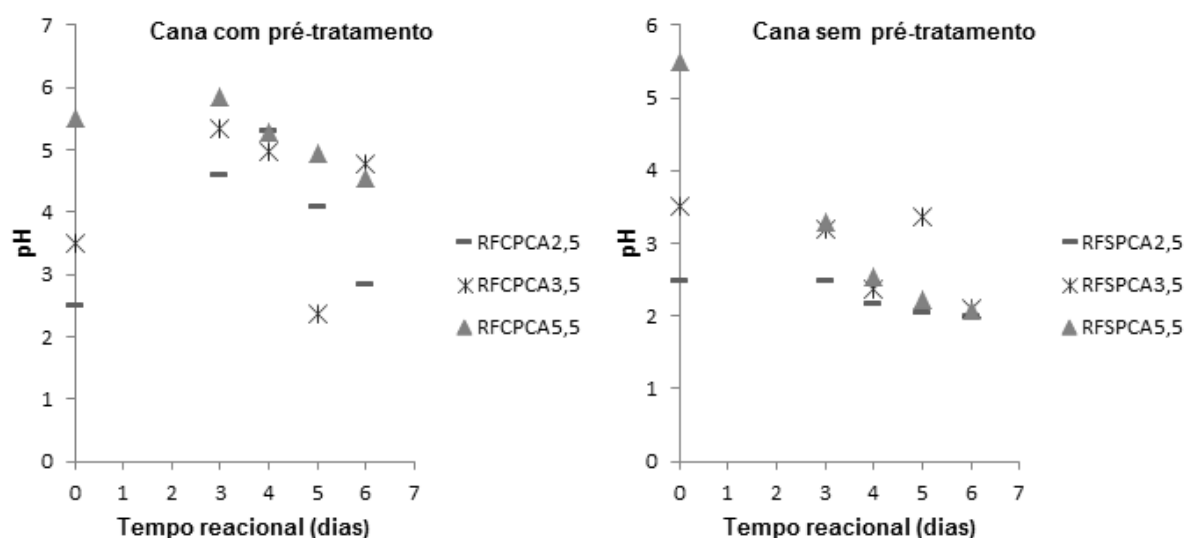
5.5 Influência do pH inicial e do pré-tratamento químico sobre a atividade enzimática (Etapas I e II)

Observaram-se variações do valor do pH inicial no decorrer do tempo reacional total para os substratos bagaço de cana e casca do coco, com e sem pré-tratamento químico, em todas as bateladas operadas.

Em relação ao bagaço de cana, observa-se na Figura 15 que ocorreu elevação do pH do meio nos reatores cujo o substrato foi pré-tratado, para valores de 4,6, 5,4 e 5,8, respectivamente, em RFCPCA2,5, RFCPCA3,5 e RFCPCA5,5, sendo que, chegou-se ao final do experimento (6º dia), nestes mesmos reatores, a valores de 2,9, 4,8 e 4,6, na mesma ordem.

Os reatores que continham a cana sem pré-tratamento, a diminuição do pH do tempo inicial até o TR de 3 dias foi verificada somente em RFSPCA5,5, no qual houve a redução do pH de 5,5 para 3,3. Nos demais reatores, no TR de 3 dias, o pH manteve-se praticamente inalterado.

Figura 15 - Variação do pH inicial ao longo do tempo reacional (TR) nas bateladas com bagaço de cana pré-tratado (RFCPCA2,5; RFCPCA3,5 e RFCPCA5,5) e sem pré-tratamento (RFSPCA2,5; RFSPCA3,5 e RFSPCA5,5).



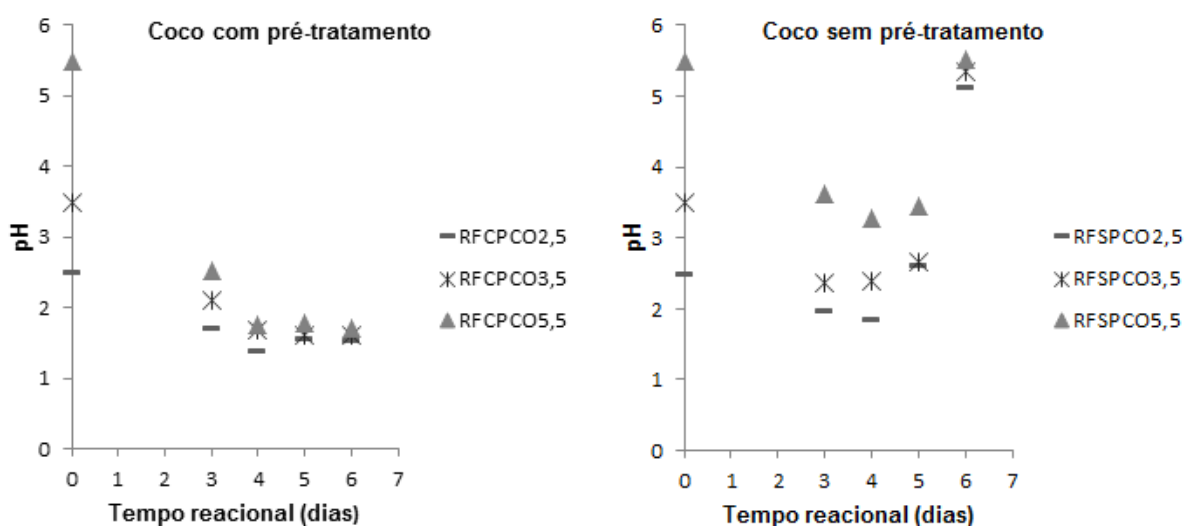
Fonte: Autor (2016)

De modo geral, nos reatores que continham a cana sem pré-tratamento, o pH nas três bateladas diminuiu ao longo do tempo de reação, registrando-se, no 6º dia, pH 2 independente do valor inicial do pH do meio.

Ao se utilizar a casca do coco como substrato, o pH, no TR de 3 dias, diminuiu em todos os reatores em que o mesmo havia recebido pré-tratamento (Figura 16), com pH de 1,7 em RFCPCO2,5, e, mais acentuadamente, em RFCPCO3,5 (2,1) e em RFCPCO5,5 (2,5). A diminuição do pH nestes reatores ocorreu até o 6º dia, quando foram registrados valores de 1,5, 1,6 e 1,7, respectivamente, em RFCPCO2,5, RFCPCO3,5 E RFCPCO5,5.

Para os reatores em que o coco não recebeu pré-tratamento, em 3 dias, também foi observada diminuição do pH nos reatores RFSPCO2,5, RFSPCO3,5 e RFSPCO5,5, atingindo-se, respectivamente, valores de 2, 2,4 e 3,6. Contudo, no final da batelada, o pH aumentou nos três reatores, registrando-se valores de 5,1, 5,3 e 5,5, respectivamente.

Figura 16 - Variação do pH inicial ao longo do tempo reacional (TR) nas bateladas com casca do coco pré-tratado (RFCPCO2,5; RFCPCO3,5 e RFCPCO5,5) e sem pré-tratamento (RFSPCO2,5; RFSPCO3,5 e RFSPCO5,5).



Fonte: Autor (2016)

Desta forma, é importante notar que os reatores com e sem pré-tratamento do substrato coco praticamente, seguiram um padrão de variação de pH no decorrer do experimento, mesmo tendo-se partido de valores de pH inicial diferentes, sendo que para o coco tratado, a variação do pH tendeu a diminuir e para o coco sem tratamento, a aumentar.

Em todos os sistemas operados, o meio manteve-se em uma faixa ácida que variou de 1,4 a 5,84, o que favorece a atividade das celulasas, de acordo com a literatura que indica valores de pH entre 3,0 e 5,0 para atividade de celulasas totais fúngicas (ANG *et al.*, 2013).

O fato de o pH manter-se abaixo da neutralidade no decorrer do processo é benéfico para produção de celulasas, porque pH mais elevado, característico de meio alcalino,

proporciona efeito negativo sobre a produção destas enzimas, como foi observado por Sharma *et al.* (2015) que avaliaram a influência do pH na produção de celulases pela espécie fúngica *Aspergillus niger* HN-1. De acordo com Niranjane, Madhou e Stevenson (2007), o pH ótimo para a atividade de celulases fúngica varia de espécie para espécie, embora, na maioria dos casos, sejam citados valores de 3 a 6.

De fato, no trabalho de Rosa (2014), a produção ótima de celulases por diferentes cepas fúngica, ocorreu em meio ácido, sendo que a maior atividade de celulases produzidas pela cepa *Rasamsonia emersonii* foi em meio reacional de pH 4,0; 5,0, para espécie *Thermomyces lanuginosus* e pH 5,5 para outra cepa do mesmo fungo *Rasamsonia emersonii*, corroborando com o que foi relatado por Niranjane, Madhou e Stevenson (2007).

De acordo com Yoon *et al.* (2014), o pH pode variar ligeiramente no decorrer da utilização do substrato pelo fungo, sendo que esta variação está relacionada com as atividades metabólicas do fungo, podendo ser devido à formação de ácidos orgânicos, o que já foi discutido anteriormente (6º parágrafo de 5.3), como também devido ao consumo de sal de amônio no meio de fermentação, que no caso do meio nutricional utilizado no presente experimento continha sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) como fonte de nitrogênio.

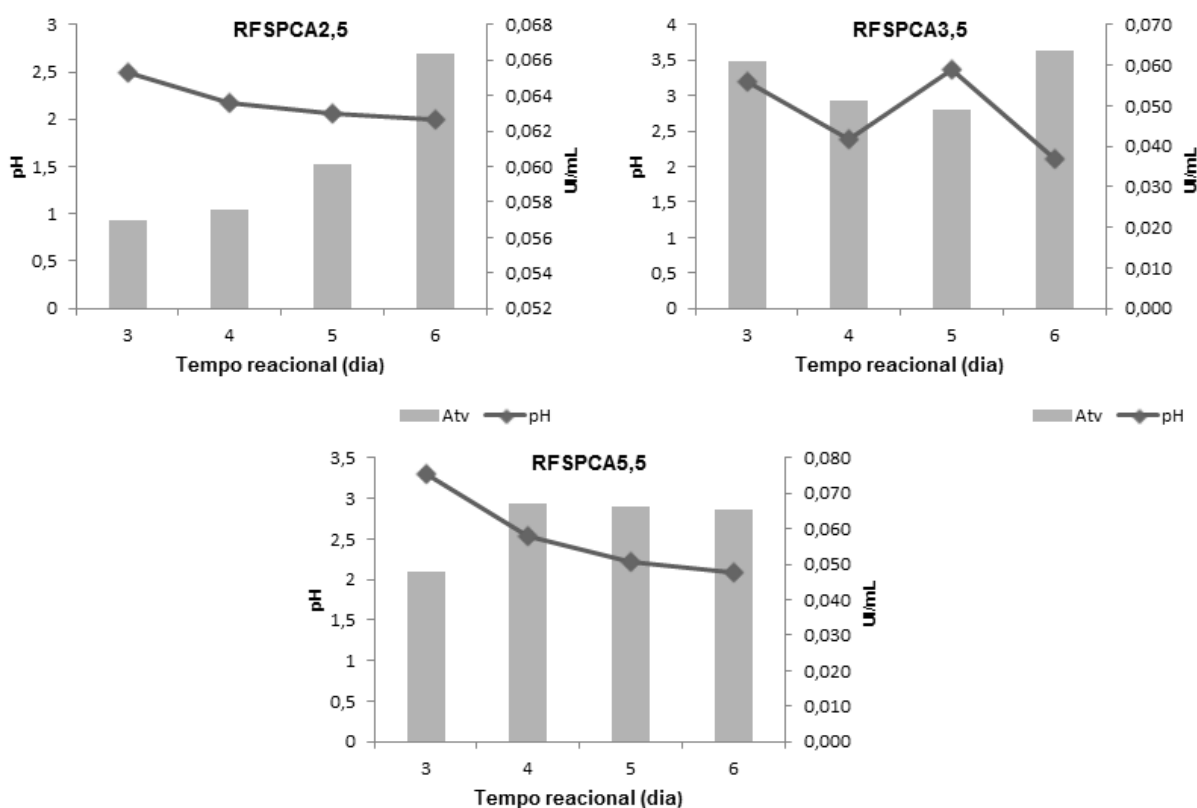
No que diz respeito à atividade enzimática referente aos reatores com bagaço de cana sem pré-tratamento (Figura 17), observou-se que o pico de atividade nos reatores RFSPCA2,5 foi de 0,066 UI/mL no TR de 6 dias, tempo esse em que foi observada pequena redução do pH inicial, chegando a 2,0. Para RFSPCA3,5, a atividade máxima foi encontrada também no TR de 6 dias, a qual foi de 0,064 UI/mL, quando o pH do meio também era 2. No entanto, esta atividade não diferenciou muito da encontrada no TR de 3 dias (0,061 UI/mL) para este mesmo reator. Para RFSPCA5,5, a maior atividade deu-se em um tempo reacional menor (4 dias), de 0,067 UI/mL, mantendo-se a mesma quase inalterada até o final do experimento, de modo que no TR de 6 dias, registrou-se 0,065 UI/mL.

Nesta etapa, foi possível observar que os valores de pH inicial de 2,5, 3,5 e 5,5 não exerceram influência significativa na atividade enzimática ao longo do experimento, pois as atividades registradas não apresentaram grandes variações entre si (P-valor > 0,05).

Em estudo realizado por Sales *et al.* (2010), os autores avaliaram, além de outras variáveis, a influência do pH inicial, para produção de celulases pelas espécies fúngicas *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 49243, com uso de bagaço de cana-de-açúcar como substrato também desprovido de pré-tratamento. Nesse estudo, testou-se valores de pH iniciais numa faixa maior (6,0, 7,0 e 8,0) do que a utilizada na presente pesquisa.

Os valores de atividades encontrados por Sales *et al.* (2010) foram superiores aos registrados no presente experimento, sendo que a mais alta atividade de celulases totais, de 0,45 UI/mL, foi obtida no cultivo da espécie *A. aculeatus* URM 4953, com pH inicial 6,0 e tempo de cultivo de 7 dias. É importante destacar que em seu experimento, os autores utilizaram meio nutricional um pouco diferente do utilizado nesta pesquisa, estando presente ureia e ausente sulfato férrico, nitrato de sódio, sulfeto de cobre e ácido molibídico, os quais fazem parte da constituição do meio empregado nesta pesquisa, o que possivelmente pode influenciar na produção enzimática pelo fungo.

Figura 17 - Atividade enzimática nas bateladas contendo bagaço de cana desprovido de pré-tratamento químico.



Fonte: Autor (2016)

Em outra pesquisa, Wen, Liao e Chen (2005), utilizando *Trichoderma reesei* RUT-C30, obtiveram atividade de celulase total máxima em pH 5,7, no tempo de cultivo de 6 dias, sendo este valor de 1,74 UI/mL, tendo como substrato indutor esterco bovino. É interessante mencionar que os autores também avaliaram outras variáveis que influenciam na maior expressividade enzimática, a saber: concentração do substrato, temperatura e suplementação com KH_2PO_4 , CoCl_2 e Tween-80.

A alta expressividade enzimática registrada no estudo de Sales *et al.* (2010) e de Wen, Liao e Chen (2005), em relação aos valores obtidos no presente trabalho, pode ser atribuída a algumas diferenças peculiares de cada estudo, tais como: os constituintes do meio nutricional, os diferentes substratos - levando em consideração sua origem -, assim como as espécies utilizadas, uma vez que diferentes espécies fúngicas podem apresentar diferentes potenciais para a produção enzimática como relatado por Fernandes (2009) que avaliou a produção de amilíases, celulasas, proteases e lipases por diferentes espécies fúngicas oriundas de fontes de isolamento distintas.

Fernandes (2009) concluiu que pode haver diferença na atividade enzimática até mesmo para fungos de uma mesma espécie, assim como esse potencial pode estar relacionado ou não à fonte de isolamento da espécie.

Em um estudo realizado por Basso, Gallo e Basso (2010), utilizando bagaço de cana desprovido de pré-tratamento, foram alcançadas atividades de celulasas de 0,06 UI/mL para a linhagem *Aspergillus fumigatus*, valor esse semelhante aos encontrados na presente pesquisa, e de 0,05 UI/mL para o fungo *Trichoderma sp*, sendo este valor menor que a maior atividade registrada pelo fungo utilizado na presente pesquisa, no referido ensaio, que foi de 0,067 UI/mL no reator RFSPCA5,5, com tempo reacional de 4 dias. É importante frisar que as atividades registradas por tais autores foram de fungos isolados do próprio bagaço de cana, ou seja, já adaptados ao substrato e num tempo reacional de 10 dias, tempo esse maior do que o utilizado neste experimento.

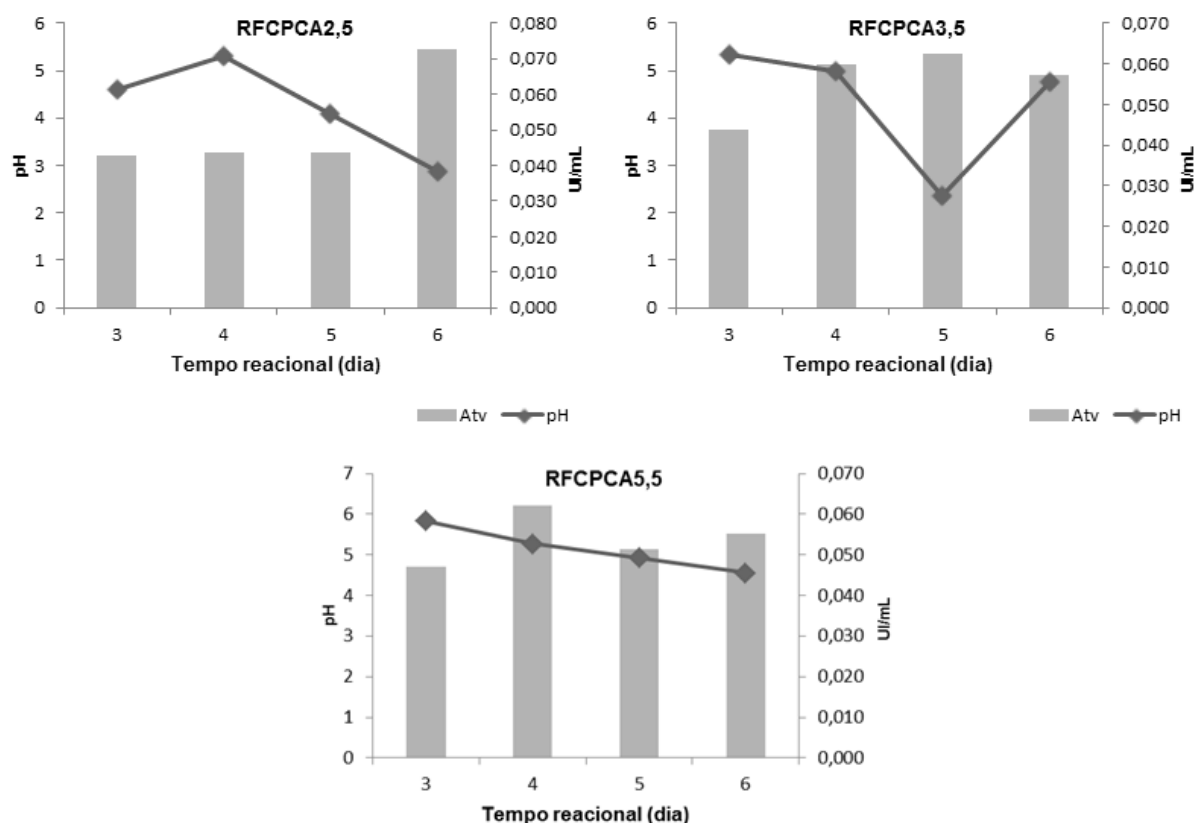
Aguiar e Menezes (2000) também obtiveram valor de atividade de celulasas aproximadamente de 0,06 UI/mL ao utilizar *Aspergillus niger* IZ-9 aos sete dias de incubação em bagaço de cana-de-açúcar também desprovido de tratamento. Lopes *et al.* (2008), obtiveram valor de 0,042 UI/mL utilizando a linhagem T676 de *Trichoderma* em bagaço de cana aos 3 dias de incubação, valor esse menor do que os registrados no presente ensaio.

Mendoza (2009) avaliou a produção de celulasas pelo fungo *Trichoderma harzianum* em meio sintético líquido contendo diferentes fontes de carbono na concertação de 1% (m/v), em um tempo de incubação de 9 dias. No referido estudo, no meio que continha bagaço de cana como fonte de carbono, detectou-se a mais alta atividade de celulasas totais, sendo este valor de 0,063 UI/mL, seguido do meio suplementado de celulose (0,034 UI/mL), xilana (0,019 UI/mL) e, por último, uma menor atividade de celulasas totais foi registrada no meio que tinha glicose como fonte de carbono (0,009 UI/mL), indicando ser bagaço de cana um bom substrato para indução de celulasas for espécies fúngicas.

É interessante observar também que um mesmo resíduo, em função de algumas características que possam variar devido à sua origem, pode influenciar na produção enzimática, mesmo utilizando um mesmo fungo, o que foi constatado ao comparar as atividades enzimáticas obtidas neste item com as registradas no item 5.3, quando foi verificada a influência do tempo reacional e chegou-se a valores que variaram de 0,063 UI/mL a 0,081 UI/mL para a atividade enzimática, os quais são superiores aos registrados no presente ensaio, utilizando também o bagaço de cana como substrato indutor.

Para as bateladas contendo bagaço de cana pré-tratado, de acordo com a Figura 18, observou-se que a máxima atividade registrada no reator RFCPCA2,5 foi de 0,073 UI/mL, no TR de 6 dias, tempo esse que coincidiu com a maior atividade registrada neste mesmo reator quando o substrato não recebeu pré-tratamento.

Figura 18 - Atividade enzimática nas bateladas contendo bagaço de cana pré-tratado.



Fonte: Autor (2016)

Nos reatores RFCPCA3,5, a maior atividade foi de 0,062 UI/mL, em 5 dias, e coincidiu com a maior atividade registrada em RFCPCA5,5, também de 0,062 UI/mL, porém em um tempo reacional menor, de 4 dias.

As atividades enzimáticas registradas nos reatores que possuíam cana pré-tratada – condição em que se esperava maior atividade enzimática pela melhoria da digestibilidade e consequente facilidade ao ataque microbiano –, não foram diferentes das atividades obtidas nos reatores que receberam bagaço de cana *in natura*, ou seja, sem tratamento, mostrando que nem sempre o uso intensivo de pré-tratamentos em substratos visando à produção de celulases tem resultados positivos.

No substrato bagaço de cana desprovido de pré-tratamento, a maior atividade enzimática deu-se na batelada RFSPCA5,5 (0,067 UI/mL), no TR de 4 dias, e a maior atividade registrada utilizando bagaço pré-tratado não foi muito superior a esta, sendo de 0,073 UI/mL na batelada RFSPCA5,5, no TR de 6 dias.

De acordo com Zúñiga (2010), o principal efeito desejado na aplicação da solução alcalina é a remoção da lignina, dissolução de hemicelulose e a disponibilização da celulose, a partir da cisão das ligações lignina-carboidrato e da fragmentação da macromolécula de lignina.

Porém, o uso de hidróxido de sódio para pré-tratamento dos resíduos empregados, neste estudo, não favoreceu o aumento da atividade enzimática, como era esperado por se considerar que o mesmo proporcionaria a deslignificação do substrato, expondo a celulose a uma melhor ação do micro-organismo.

Em um estudo realizado por Aguiar e Menezes (2000) para produção de enzimas em bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio 4%, quando do emprego do substrato com pré-tratamento, foram observados níveis de produção enzimática para *endoglucanase* semelhantes aos do bagaço desprovido do pré-tratamento. Semelhantemente, Zúñiga (2010), ao avaliar o efeito de diferentes pré-tratamentos sobre o bagaço de cana para a produção de enzimas, dentre elas as celulases, constatou que o uso de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio para pré-tratar a cana não acarretou em maior atividade de celulase em comparação com o uso da cana sem pré-tratamento alcalino, o que foi condizente com a maioria dos resultados obtidos no presente estudo.

Possíveis explicações para as atividades registradas nos reatores que continham bagaço de cana pré-tratado não diferirem acentuadamente das observadas nos que disponibilizavam de substrato com tratamento é que pré-tratamentos alcalinos podem aumentar o índice de cristalinidade da celulose, sendo que a literatura tem sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível a processos de conversão (ZÚÑIGA, 2010). De acordo com Kadla e Gilberto (2000), as regiões amorfas são

mais acessíveis ao ataque enzimáticos, então, é preferível que se tenha no meio o substrato na forma amorfa e não cristalina.

No trabalho de Zúñiga (2010), as menores atividades foram registradas nos substratos pré-tratados com álcalis, sendo estes valores, aproximadamente, de 0,005 UI/mL, contra a atividade registrada no bagaço desprovido de pré-tratamento que foi de aproximadamente 0,03 UI/mL, valores esses menores do que os obtidos neste experimento. Tais resultados indicaram, mediante análises químicas, que apesar da desestruturação das microfibras e a expressiva solubilização de lignina, o aumento no índice de cristalinidade da celulose remanescente diminui seu potencial como fonte de carbono microbiano. Para registrar a influência do índice de cristalinidade na produção de celulasas na pesquisa da citada autora, seus valores foram de 58,18%, 69,9% e 69,12%, respectivamente para o bagaço *in natura*, pré-tratado com NaOH e pré-tratado com Ca(OH)₂.

Outro fato observado é que a concentração de ambas as bases empregadas no pré-tratamento pela referida autora era de 2% e, nessa concentração, observou-se diferença acentuada nas atividades enzimáticas registradas: cerca de 0,005 UI/mL para o bagaço tratado com as soluções alcalinas e 0,03 UI/mL para o bagaço desprovido de pré-tratamento. Na presente pesquisa, a concentração de hidróxido empregado foi de 4%, não se tendo registrado diferença significativa (P-valor > 0,05) na atividade enzimática no que se refere ao substrato tratado ou não.

Tal fato pode sugerir que, possivelmente, após o tratamento com solução de hidróxido a 4%, o índice de cristalinidade do bagaço de cana possa ser menor que o obtido após tratamento com concentração de 2%. Porém, o mesmo não foi suficiente para que as atividades desenvolvidas a partir do uso do bagaço de cana exposto ao tratamento com 4% fossem maiores que as registradas no bagaço *in natura*.

Em estudo realizado por Silva *et al.* (2013) foi verificado que o índice de cristalinidade da fibra de bucha vegetal, utilizando diferentes concentrações de hidróxido de sódio (5%, 10% e 15%), diferiu de acordo com a concentração utilizada no tratamento. Os índices de cristalinidade obtidos na referida pesquisa foram de 75%, 79%, 81% e 71% para a fibra de bucha bruta, respectivamente, após o pré-tratamento com hidróxido de sódio a 5%, 10% e 15%. Assim, pode ser que haja um limite na concentração do álcali no que se refere ao índice de cristalinidade.

Além da questão da possível cristalização da celulose, o pré-tratamento do resíduo pode ter gerado ainda a formação de subprodutos que prejudicaram a produção de enzimas. De acordo com Zúñiga (2010), pré-tratamentos químicos envolvem a formação de substâncias

tóxicas com conhecidos efeitos prejudiciais para o metabolismo fúngico. Estas substâncias tóxicas podem ser outra explicação para o uso de pré-tratamento não ter acarretado em produção de maior atividade enzimática com o substrato tratado e sim se equiparado à condição em que a cana não foi tratada.

Além das explicações supracitadas, as maiores porosidades produzidas como consequências da remoção de componentes da estrutura dos substratos, podem ainda ter ocasionando fenômenos de absorção enzimática no substrato celulósico, ficando tais enzimas indisponíveis para detecção (CHERNOGLAZOV *et al.*, 2008).

De acordo com Sun e Chen (2002), o álcali (geralmente soda ou cal) proporciona “inchamento” ou *swellin* da biomassa, e com isto o aumento da superfície específica e da porosidade do substrato.

De forma complementar, Berggren *et al.* (2003) e Knill e Kennedy (2003) observaram a ocorrência de reações, após tratamento com hidróxido de sódio, as quais retiram unidades terminais de açúcares redutores das cadeias de polissacarídeos, eliminando desta maneira fontes indutoras de celulasas.

Em relação ao uso da casca de coco como substrato, em termos de atividade enzimática, foram registrados menores valores em relação às atividades expressas quando do emprego do bagaço de cana.

Observou-se na Figura 19, que ao se variar o pH de partida nos reatores com coco e sem pré-tratamento, os picos de atividade enzimática ocorreram no mesmo TR (3 dias) e com valores praticamente iguais, sendo estes de 0,037 UI/mL, 0,039 UI/mL e 0,038 UI/mL, respectivamente. Após 3 dias de reação, houve redução pequena da atividade nos três reatores (RFSPCO2,5, RFSPCO3,5, RFSPCO5,5), chegando no tempo reacional de 6 dias aos valores respectivos de 0,028 UI/mL, 0,027 UI/mL e 0,033 UI/mL.

Outro fato é que o comportamento do pH ao longo do experimento com coco sem pré-tratamento foi semelhante, independentemente do valor do pH inicial. Observou-se que o pH inicial nas três bateladas, no TR de 3 dias, sofreu pequena redução (Figura 19), sendo estes valores de 2, 2,4 e 3,6, respectivamente, para as bateladas RFSPCO2,5, RFSPCO3,5 e RFSPCO5,5. No entanto, após esse período, o pH tendeu a se elevar no decorrer do cultivo chegando no TR de 6 dias com valores, respectivamente, de 5,1, 5,3 e 5,5.

É possível que a elevação do pH nos três reatores esteja relacionado com a redução da atividade enzimática observada no decorrer do tempo de cultivo.

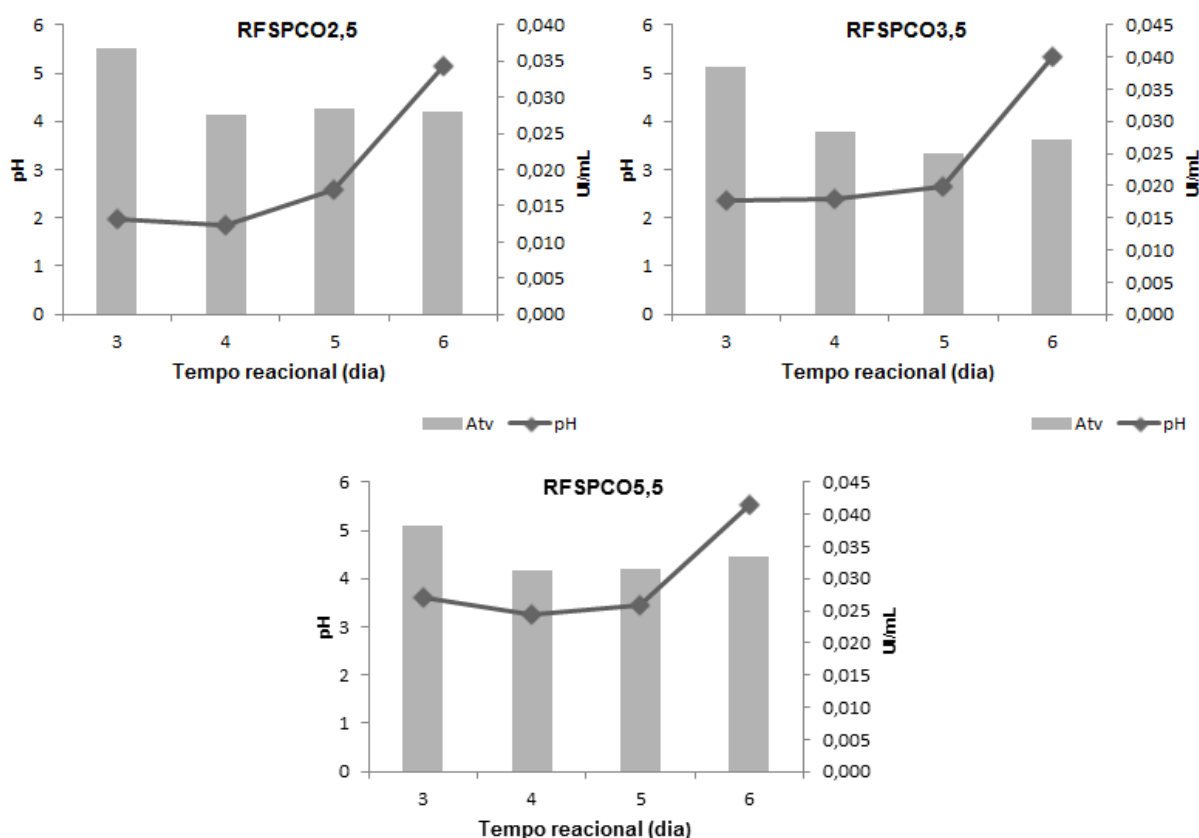
Conforme observado na Figura 19, a atividade enzimática tendeu a diminuir e o pH a aumentar durante todo o processo. Essa diminuição pode estar relacionada ao mecanismo

conhecido como *feedback* negativo, o qual descreve que os produtos finais de uma dada via metabólica são inibidores de enzimas que catalisam os primeiros passos da via (FERREIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013).

Uma possível explicação para a elevação do pH é que a redução da atividade enzimática possa ter levado a uma diminuição do uso do substrato como fonte de carbono, de modo a resultar na utilização pelo micro-organismo de subprodutos provenientes do seu metabolismo inicial sobre o substrato como fonte de carbono complementar, como por exemplos, ácidos orgânicos, fazendo com que o pH do meio sofresse aumento.

Lopes *et al* (2011) ao estudarem remoção de macronutrientes de efluente da indústria de castanha de caju por fungos, também verificaram elevação do pH no final dos ciclos estudados. Os autores atribuíram isso, ao provável consumo dos ácidos orgânicos produzidos pelo fungo após a exaustão da fonte de carbono.

Figura 19 - Atividade enzimática nas bateladas contendo casca de coco desprovida de pré-tratamento químico.



Fonte: Autor (2016)

Mediante o relatado, pode-se dizer que a atividade enzimática do fungo em estudo, na presença de casca de coco sem pré-tratamento, não tenha sido influenciada pelos diferentes valores de pH iniciais utilizados nesta pesquisa.

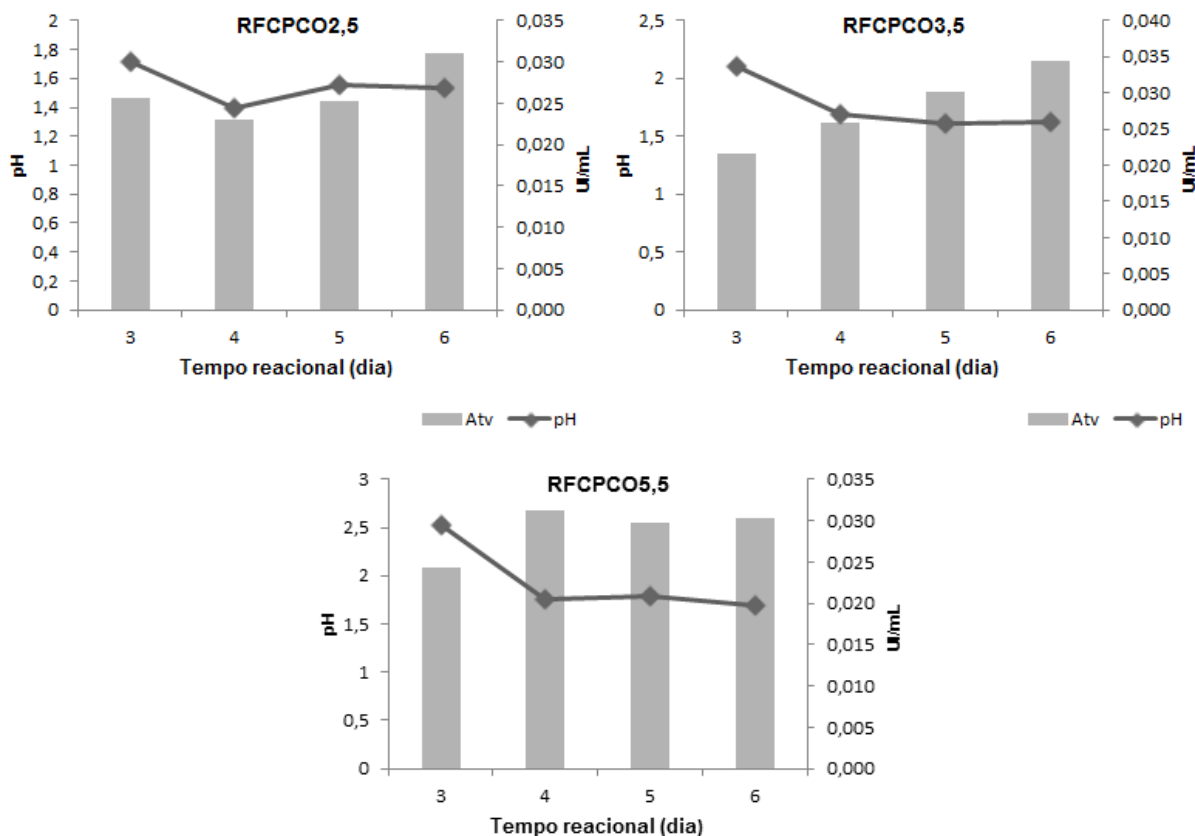
Júnior (2014) avaliou o efeito do pH e da umidade na produção de endoglucanases (CMCases) e celulases totais (FPases) pelas espécies fúngicas *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium Chrysogenum* utilizando como substrato indutor a casca do coco e uma mistura de casca de coco com pedúnculo de caju. Os valores do pH inicial (3,0, 5,0 e 7,0) não influenciaram positivamente na atividade da CMCase para o fungo *A. fumigatus*, quando o substrato era somente o coco, assim como também não influenciaram a atividade desta enzima para o fungo *P. Chrysogenum*, quando o substrato era a mistura de 50% de coco e 50% de pedúnculo de caju. A influência do pH também não foi registrada para produção de FPase pelo *P. Chrysogenum*, quando o substrato era somente o coco.

Em relação às bateladas operadas com casca de coco pré-tratada, observou-se que os picos de atividade enzimática deram-se no TR de 6 dias, em RFCPCO2,5 e RFCPCO3,5 (Figura 20), sendo estes valores, respectivamente, de 0,031 UI/mL e 0,034 UI/mL, e no TR de 4 dias, em RFSPCO5,5, na qual foi registrado atividade de 0,031 UI/mL. Para este último, a atividade ao longo do experimento não variou muito, chegando ao TR de 6 dias com valor de 0,030 UI/mL.

Os valores de atividade enzimática encontrados na presente pesquisa para o substrato casca de coco pré-tratado são semelhantes às atividades registradas por Júnior (2014) que utilizou casca de coco desprovida de pré-tratamento químico para avaliar a produção de enzimas do complexo celulolítico pela ação das espécies fúngicas *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium Chrysogenum*. Em sua pesquisa, Júnior (2014) não detectou atividade de celulases totais para a espécie *A. fumigatus* e as atividades referentes ao *P. Chrysogenum* foram de 0,031 a 0,032 UI/mL, em 5 dias de reação. Como já mencionado, estes resultados foram semelhantes aos valores encontrados nesta pesquisa nos reatores com substrato pré-tratado, nos quais os picos de atividade variaram de 0,031 UI/mL a 0,034 UI/mL.

É importante destacar ainda que, em termos de produtividade, Júnior (2014), após tempo de cultivo de 5 dias, alcançou 0,0063 UI/mL.d. No presente experimento, as maiores atividades registradas para o coco desprovido de pré-tratamento foram observadas em 3 dias de cultivo – variando de 0,037 UI/mL a 0,039 UI/mL, em função do pH inicial –, de modo que, na presente pesquisa, o *A. niger* AN 400 foi responsável por produtividade maior, registrando-se valor médio de 0,0126 UI/mL.d.

Figura 20 - Atividade enzimática nas bateladas contendo casca de coco pré-tratado.



Fonte: Autor (2016)

No geral, também não houve grande diferença na variação da atividade enzimática para o substrato casca de coco com e sem pré-tratamento químico com hidróxido de sódio a 4%, sendo que para a casca de coco tratada, a atividade enzimática variou de 0,022 a 0,034 UI/mL e para o casca do coco desprovida de pré-tratamento foi de 0,025 a 0,039 UI/mL.

De maneira semelhante, Oliveira (2010) ao avaliar a atividade enzimática de celulasas de espécies fúngicas, isoladas da casca de coco verde, utilizando esse substrato na forma de pó como material indutor, com e sem tratamento de deslignificação pelo emprego de hidróxido de sódio a 4%, registrou que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para a linhagem identificada no trabalho como CZ01 quando se utilizou o substrato sem tratamento (1,26 UI/g) e com tratamento (1,24 UI/g), situação semelhante a observada no presente trabalho.

Apesar do tratamento químico com hidróxido de sódio ser amplamente utilizado na literatura como ferramenta para reduzir o teor de lignina do bagaço de cana, nesta pesquisa, o mesmo não influenciou no incremento da produção de celulasas pelo fungo tanto para o bagaço de cana quanto para a casca do coco.

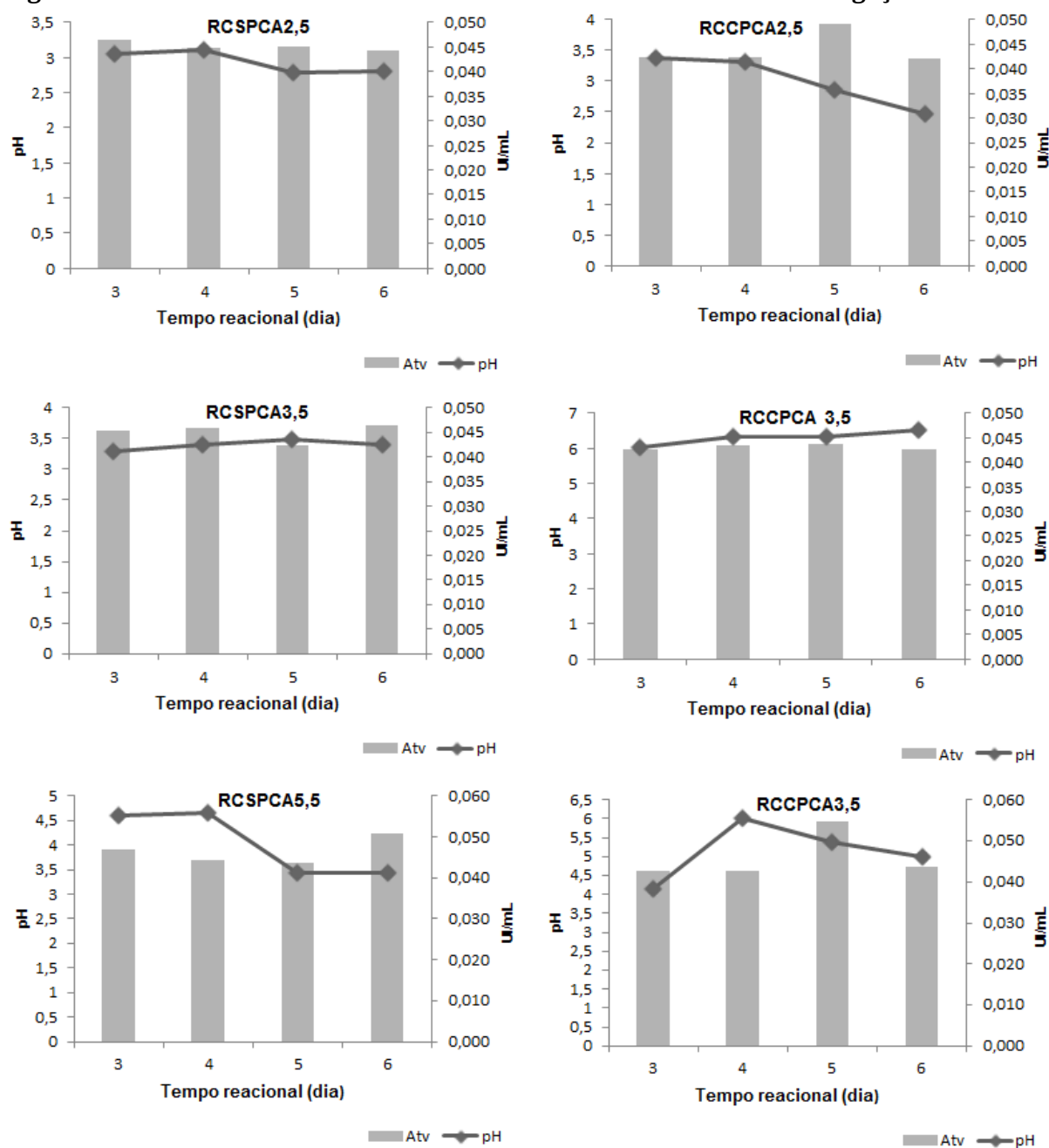
É possível que determinados compostos usados no pré-tratamento melhorem a produção de enzimas, proporcionando maior remoção de lignina sem gerar compostos tóxicos ao fungo e nem aumentar o índice de cristalinidade da celulose, como relatado por Teixeira *et al.* (2011) que ao utilizarem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em seu experimento alcançaram redução do teor de lignina do bagaço de cana de 27,7% para 5,8%, deixando a celulose mais exposta.

Zúñiga (2010) relatou que o pré-tratamento hidrotérmico resultou em um menor índice de cristalinidade quando comparado a tratamentos com álcalis, sendo que o pré-tratamento adequado de materiais lignocelulósicos representa uma etapa importante na rota de produção, uma vez que visa separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar a fração amorfa da mesma e solubilizar a hemicelulose, disponibilizando a celulose para que fique mais acessível às hidrólises biológicas (SARKAR *et. al.*, 2012)

Apesar dos diferentes valores de pH iniciais não terem influenciado significativamente na produção enzimática para ambos os substratos, com e sem pré-tratamento, foi possível observar, na presente pesquisa, que nas bateladas contendo bagaço de cana desprovida de pré-tratamento (Figura 17), bagaço de cana com pré-tratamento (Figura 18) e casca de coco pré-tratado (Figura 20), os picos de atividades enzimática ocorreram em menor tempo reacional (4 dias) quando o pH inicial era de 5,5, o que leva-se a pensar que tal condição de pH é mais favorável para produção enzimática pelo micro-organismo em estudo.

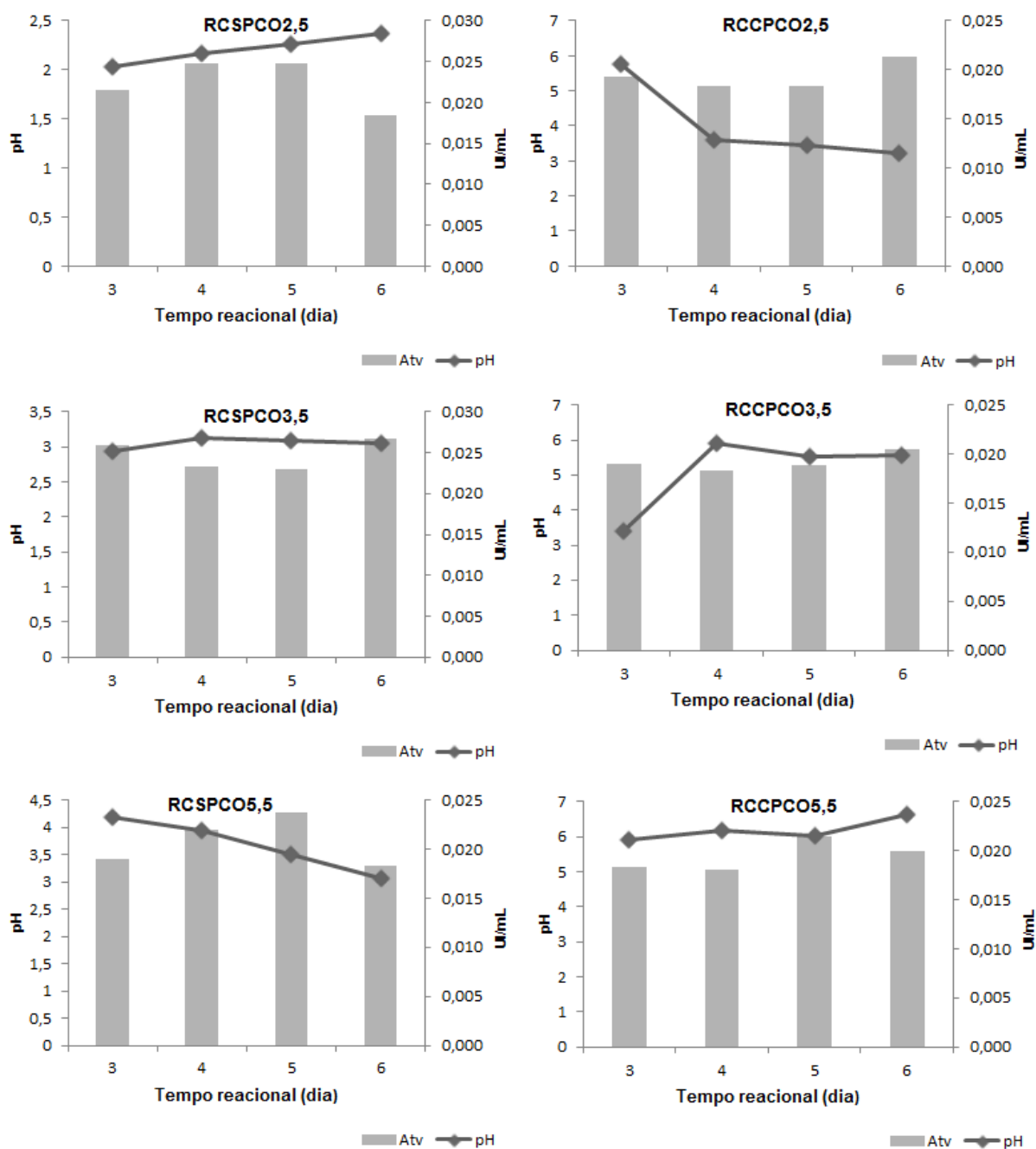
Em relação aos dados referentes aos controles para ambos os substratos, com e sem tratamento, não foram satisfatórios, tendo em vista que foi possível observar desenvolvimento de biomassa de microrganismos em todas as bateladas operadas, apresentando valores de atividade enzimática. Para o bagaço de cana, a atividade variou de 0,042 a 0,051 UI/mL para o bagaço sem pré-tratamento e de 0,042 a 0,055 UI/mL para o mesmo com pré-tratamento (Figura 21). Para a casca de coco, a variação da atividade foi de 0,018 a 0,027 UI/mL para este substrato desprovido de pré-tratamento e de 0,018 a 0,021 UI/mL para o mesmo com pré-tratamento (Figura 22).

Figura 21 - Atividade enzimática nas bateladas de controle contendo bagaço de cana.



Fonte: Autor (2016)

Figura 22 - Atividade enzimática nas bateladas de controle contendo casca de coco.



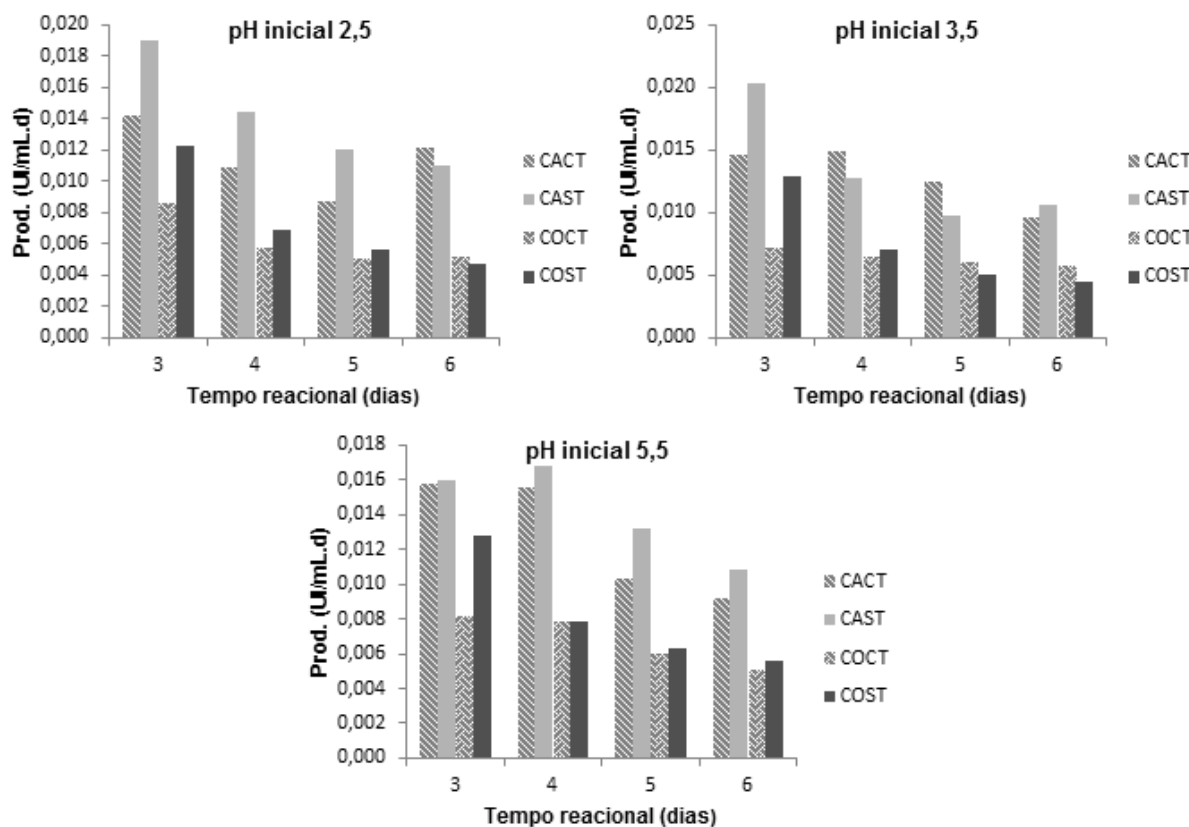
Fonte: Autor (2016)

5.6 Influência do tempo de reação na produtividade enzimática.

Apesar do tratamento químico e do valor inicial do pH não terem exercido influência significativa sobre a atividade de celulase, ao levar em consideração o fator tempo de cultivo, o qual incide sobre a produtividade enzimática, obtida pela razão entre a atividade enzimática (UI/mL) e o tempo de cultivo (d), constatou-se que as maiores produtividades ocorreram em 3 dias de reação (Figura 23). Após este tempo de reação, houve redução da produtividade na maioria das bateladas, com exceção da batelada RFCACT3,5 – cana com pré-tratamento alcalino e pH inicial de 3,5 –, RFCACT5,5 – cana com pré-tratamento e pH inicial de 5,5 –, RFCAST5,5 – cana não pré-tratada e pH inicial 5,5 –, e RFCOCT5,5 – coco pré-tratado e pH inicial 5,5.

Nas bateladas RFCACT3,5, RFCACT5,5 e RFCOCT5,5, a produtividade se manteve a mesma no 3º e 4º dia, sendo estes valores de 0,015 UI/mL.d, 0,016 UI/mL.d e 0,008 UI/mL.d, respectivamente. Já para RFCAST5,5, observou-se pequeno aumento no 4º dia de reação, de 0,016 UI/mL.d para 0,017 UI/mL.d.

Figura 23 - Produtividade enzimática (prod.) com bagaço de cana tratada (CACT), cana não tratada (CAST), coco tratado (COCT) e coco desprovido de tratamento (COST) nas bateladas de diferente pH inicial.



Fonte: Autor (2016)

A redução da produtividade de celulasas foi observada por Rocha (2010), após tempo de reação de 4 dias, ao avaliar a produção de celulasas de três linhagens de *A. niger* ATCC (16404, 1057 e 9029), utilizando como substrato mistura de casca de maracujá e resíduos de arroz. A diminuição da atividade com aumento do tempo reacional, o que consequentemente leva a uma redução da produtividade, pode ser atribuído à produção de subprodutos resultantes do metabolismo microbiano, bem como ao esgotamento de nutrientes, os quais inibem o crescimento de fungos e formação de enzimas (SANTOS, *et al.* 2013; SHAFIQUE; BAJWA.; SHAFIQUE, 2009).

Contudo, verificou-se que as melhores produtividades, deste estudo, ocorreram nos substratos sem pré-tratamento, sendo as maiores ocorridas em RFCAST2,5 (0,019 UI/mL.d) e RFCAST3,5 (0,020 UI/mL.d).

Dos dois substratos testados, a produtividade enzimática máxima foi superior em 1,61 vezes para quando o substrato usado foi a cana sem tratamento em vez do coco sem tratamento. Segundo Vries e Visser (2001), os fungos apresentam diferentes produtividades enzimáticas em função da composição do meio em que se encontram e do tipo e concentração do substrato indutor, refletindo a necessidade de estudo das exigências nutricionais do micro-organismo para estimular uma efetiva biossíntese enzimática e atingir expressivas produtividades de celulasas .

5.7 Influência do substrato na atividade enzimática

Ao comparar os resultados obtidos a partir da ação metabólica do fungo sobre substratos bagaço de cana (Etapas I) e a casca do coco (Etapas II), observou-se que as atividades enzimáticas registradas para o primeiro, de 0,043 UI/mL a 0,073 UI/mL foram maiores que para o segundo, de 0,022 UI/mL a 0,039 UI/mL. Isto pode ser explicado pela diferença na constituição estrutural da biomassa desses substratos, uma vez que nem todos os substratos possuem o mesmo potencial para a produção de enzimas. De acordo com Aguiar e Menezes (2000), a resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo do indutor.

Apesar de não ter sido possível caracterizar os substratos em relação à quantidade de celulose e lignina, deve-se mencionar que a composição elementar da biomassa vegetal depende consideravelmente do tipo de cultura. Desta forma, salienta-se que, de acordo com a literatura, o teor de lignina presente na casca do coco é superior ao do bagaço de cana, sendo que a casca de coco pode apresentar de 36% a 44% de lignina, conforme Corradini *et al.*

(2009), Júnior (2014) e Nascimento *et al.* (2014). Para o bagaço de cana, a lignina pode representar de 22% a 32% da constituição deste resíduo, segundo os trabalhos de Banerjee e Pandey (2002), Nascimento (2011) e Soares (2013).

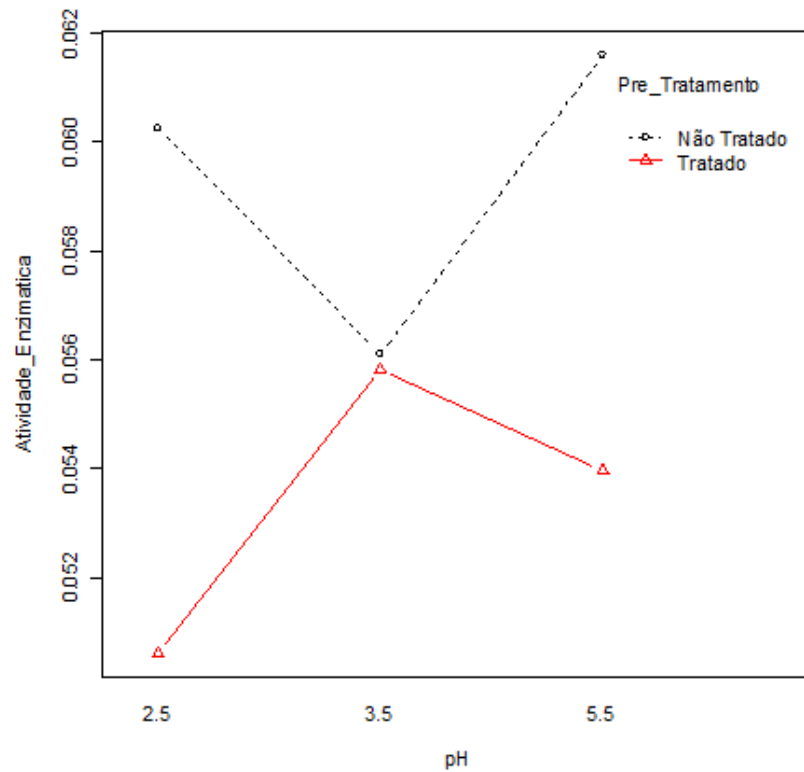
Assim, a presença de concentração maior de lignina no coco pode ter levado a valores menores de atividades enzimáticas em relação ao substrato bagaço de cana, pois além de atuar como uma barreira física, dificultando a ação do micro-organismo sobre a celulose, a lignina pode promover intensa adsorção inespecífica das enzimas utilizadas para hidrólise da celulose, o que pode interferir na detecção da atividade dessas enzimas no meio reacional (SOARES, 2013).

Como já descrito anteriormente, o pré-tratamento químico com hidróxido de sódio não favoreceu a produção da enzima celulase em nenhum dos substratos estudados, principalmente o coco, resíduo que apresenta maior quantidade de lignina em sua composição, e não favoreceu uma maior deslignificação deste substrato, a qual acarretaria na elevação de sua capacidade indutora para produção de celulases, como era esperado (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

5.8 Tratamento estatístico dos dados

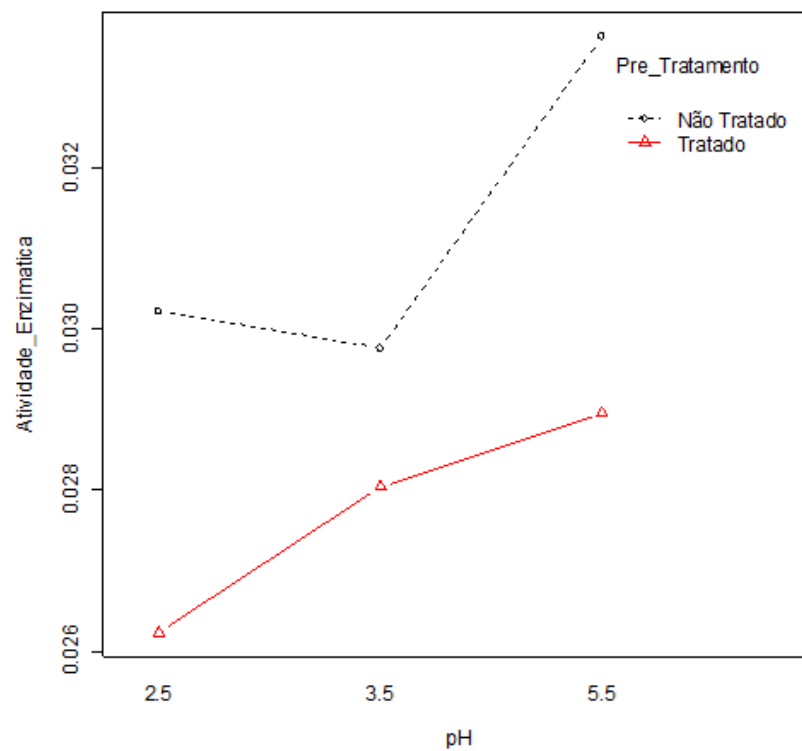
A avaliação estatística dos dados obtidos nos reatores com os diferentes valores de pH inicial e presença e ausência de pré-tratamento dos substratos empregados sobre a atividade enzimática demonstrou a inexistência de interação entre os fatores pH e pré-tratamento, uma vez que não ocorreu interceptação entre as retas que representam os substratos pré-tratado e sem o pré-tratamento (Figuras 24 e 25).

Figura 24 -Gráfico de interação entre os Fatores pH e pré-tratamento para o bagaço de cana.



Fonte: Autor (2016)

Figura 25 - Gráfico de interação entre os Fatores pH e pré-tratamento para a casca do coco.



Fonte: Autor (2016)

Na Tabela 11, observou-se que para o bagaço de cana, a soma de quadrados do Fator A (pH) e do Fator B (pré-tratamento) é bem menor que a soma de quadrados dos Resíduos, o que indica que os valores das atividades enzimáticas não são diferentes, ocorrendo o mesmo em relação à casca do coco (Tabela 12).

Tabela 11 -- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao substrato bagaço de cana levando em consideração os fatores pH (A), pré-tratamento (B) e a interação entre os mesmos (A-B).

Fator	*G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
A	2	0,000024356	0,000012178	0,151959263	0,8601
B	1	0,000205224	0,000205224	2,560837306	0,1269
A-B	2	0,000096833	0,000048417	0,604155500	0,5572
Resíduos	18	0,001442507	0,000080139	-	-

*G.L. – grau de liberdade.

Fonte: Autor (2016)

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao substrato casca de coco levando em consideração os fatores pH (A), pré-tratamento (B) e a interação entre os mesmos (A-B).

Fator	*G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
A	2	0,000041773	0,000020887	1,070222028	0,3638
B	1	0,000072270	0,000072270	3,703094274	0,0703
A-B	2	0,000009579	0,000004789	0,245407331	0,785
Resíduos	18	0,000351291	0,000019516	-	-

*G.L. – grau de liberdade.

Fonte: Autor (2016)

Como o P-valor para ambos os Fatores, em ambos os substratos, foi maior que 0,05 afirma-se que, estatisticamente, não houve diferença significativa nas atividades enzimáticas registradas, endossando que o pH e o pré-tratamento não influenciaram na atividade da celulases nesta pesquisa.

6 CONCLUSÃO

A espécie fúngica utilizada na presente pesquisa mostrou capacidade de se desenvolver em ambos os substratos desprovidos de pré-tratamento químico na ausência da glicose como fonte de carbono de fácil assimilação.

A caracterização química dos substratos mostrou a presença de 15 elementos químicos diferentes, dentre os quais se encontravam presentes em ambos os substratos, em altas concentrações, o cádmio e o chumbo, além de elementos químicos inibidores da atividade de celulasas.

As maiores atividades enzimáticas foram desenvolvidas antes do tempo reacional de 10 dias, porém, não foi observado diferença significativa entre elas a partir do tempo reacional de 2 dias ao se aplicar o tratamento estatístico.

Em relação à umidade, para os substratos empregados, estatisticamente, não houve influência da mesma sobre atividade enzimática do fungo *Aspergillus niger* AN 400, porém em condição de umidade inferior a 95% não foi formado líquido livre, o que era necessário para viabilizar o controle do pH inicial dos reatores.

Não houve influência do pH inicial, nos valores testados, sobre a produção de celulasas pelo *A. niger* AN 400 para ambos os substratos com e sem pré-tratamento, o que foi respaldado pelo tratamento estatístico aplicado, no entanto, a condição de pH inicial de 5,5 mostrou-se favorável para diminuir o tempo reacional dos picos de atividade enzimática na maioria das bateladas operadas.

Em relação ao pré-tratamento químico com hidróxido de sódio, o mesmo mostrou-se ineficiente para melhoria da produção de celulasas pelo fungo em estudo, não resultando em melhor atividade de celulase, o que pode ser visto como um fator positivo ao se levar em consideração a redução de custos envolvidos na produção enzimática.

O substrato bagaço de cana proporcionou ao *A. niger* AN 400 melhor atividade de celulase em relação à casca de coco, contudo, a aplicação desta linhagem para produção de celulasas a partir da casca de coco não pode ser descartada, uma vez que houve produção de celulase, indicando que a utilização de fungos para produção enzimática a partir de tal resíduo possa ser alternativa para reduzir a problemática da disposição final do mesmo.

A aplicação de fungos para produção de celulasas é uma alternativa que pode refletir positivamente na redução de custos de indústrias que as utilizam em sua cadeia produtiva, desta forma, é muito importante o desenvolvimento e fortalecimento de pesquisas que visem

obter melhores condições para o desenvolvimento dos fungos de modo a refletir maior produtividade destas enzimas.

7 RECOMENDAÇÕES

A presente pesquisa foi um ponto inicial, tendo relevância devido ao pioneirismo dentro da temática de reaproveitamento e valorização de rejeitos, de modo que foi aberto um leque de propostas de estudos a fim de otimizar as condições envolvidas na produção de celulasas e de outras enzimas pelo fungo *A. niger* AN 400 e por outras espécies. Recomenda-se que sejam testados outros valores de pH iniciais, além de outros substratos e pré-tratamentos mais eficientes que melhor disponibilizem a celulose na forma amorfa para melhor ação do micro-organismo e assim obtenha-se, cada vez mais, melhores resultados e respostas para possíveis questionamentos.

REFERÊNCIAS

- A LAVOURA. **Revista N° 690/2012**. Disponível em: <<http://www.youblisher.com/p/358374-A-LAVOURA-N-690/>>. Acessado em 15 de Abril de 2014.
- ABARCA, M. L. **Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial**. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 17, p. 79-84, 2000.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. **Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar**. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. **Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr)**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007.
- ALI, S.; HAQ, I. **Role of different additives and metallic micro minerals on the enhanced citric acid production by *Aspergillus niger* MNNG-115 using different carbohydrate materials**. *J. Basic Microbiol*, v. 45, n.1, p. 3 – 11, 2005.
- ALMEIDA, M. **Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel-PR, 35 f., 2013.
- ANDRADE, M. V. F.; LEITE, A. C.; SILVA, K. M. L.; SAMPAIO, G.; RODRIGUES, K. **Remoção de corante azo por uso de *Phanerochate chrysosporium* inoculado em reator em batelada**. V CONNEPI, 2010.
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH Y; SURAINI, A. A; MADIHAH, M. S. **Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation**. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 1293–1302, 2013.
- ANJUM, F.; BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; SHAHID, M. **Leaching of metal ions from black shale by organic acids produced by *Aspergillus niger***. *Applied Clay Science*, v. 47, p. 356–36, 2010.
- BANERJEE, R.; PANDEY, A. **A bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective**. *International Sugar Journal*, v.104, n.123, p. 64-67, 2002.
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; GUPTA, J. K.; SONI, S. K.; SONI, R. **A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of industrial depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels**. *Bio Res.* v. 6, p. 552–569, 2011.
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. **Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues**. *Waste Management*, v. 32, p.1341–1346, 2012.

BERGGREN, R.; MOLIN, U.; BERTHOLD, F.; LENNHOLM, H.; LINDSTRON, M. **Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation on molecular mass distributions and fibre strength.** *Carbohydrate Polymers*, v. 51, p. 255–264, 2003.

BHAT, M. K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** *Biotechnol*, v. 18, p. 355–383, 2000.

BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. **Otimização da secagem do malte de Zea mays.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n.4, p.787-792, 2006.

BRAGA, R. M.; JUNIOR, G. S. F.; LOPES, V. R. O.; MARTINS, S. C.; MARTINS, C. M.; PINTO, G. A. S. **Avaliação da Produção de Celulase por Cepas de *Fusarium*.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal/Rn. Ago, 2009.

BRÍGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. **Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber.** *Carbohydrate Polymers*, v.79, n.4, p.832–838, 2010.

BUTZKE, A. C.; LINDEMANN, C.; CARVALHO, T.; SCHMIDT, V. W. **Determinação de Açúcares Redutores pelo método do DNS.** Relatório técnico científico, Disciplina de Bioquímica Industrial. Universidade Federal do Rio Grande Escola de Química e Alimentos. Rio Grande, Abril de 2010.

CALVIMONTES, A.; LANT, N. J.; DUTSCHK, V. **Cleanability improvement of cotton fabrics through their topographical changes due to the conditioning with cellulase enzyme.** *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 5, p. 131-137, 2012.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. **Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-State fermentation.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, p. 1889–1900, 2010.

CARDOSO, M. L. **Estudo da produção *in vitro* de enzimas ligninocelulolíticas por fungo basidiomiceto cultivado sob fermentação sólida de resíduos vegetais.** Dissertação (mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Ciências Biológicas, Feira de Santana – BA. 71 f. 2009.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais.** *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CAVACO-PAULO, A. **Mechanism of cellulase action in textile processes.** *Carbohydrate Polymers*, v. 37, p. 273-277, 1998.

CHAMBERGO, F. S.; BONACCORSI, E. D.; FERREIRA, A. J.; RAMOS, A. S.; FERREIRA JÚNIOR, J. R.; ABRAHAO-NETO, J.; FARAH, J. P.; EL-DORRY, H. **Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n.16, p. 13983-13988, 2002.

CHENG, X. Y; LIU, C. Z. **Fungal pretreatment enhances hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk.** *Applied Energy*, v.91, p. 1–6, 2012.

CHERNOGLAZOV, V.; ERNOLOVA, O. V; KLYOSOV, A. A. **Adsorption of high purity endo,1,4-fl-glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic material: cellulose, lignin and xylan.** *Enzyme Microbial Technology*, v. 10, p. 503 – 507, 2008.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. **Aproveitamento dos resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde.** *Boletim CEPPA*, v.19, n.1, Curitiba, p. 33-42, 2001.

COLLARES, D. **Propostas para o aproveitamento do potencial energético da casca do coco-verde.** Embrapa Agroenergia, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3301723/propostas-para-o-aproveitamento-do-potencial-energetico-da-casca-do-coco-verde>>. Acessado em: 24 de janeiro de 2016.

COOLEY, S. N.; THURMAN, D. A.; TOMSETT, A. B. **Molecular mechanisms of heavy-metal tolerance in *Aspergillus nidulans*.** *Heredity*, v.57, p.133-134, 1986.

CORRADINI, E.; ROSA, M. F.; MACEDO, B. P.; PALADIN, P. D.; MATTOSO, L. H. C. **Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde.** *Rev. Bras. Frutic.*, v.31, n.3, p.837-846, Jaboticabal – SP, 2009.

CORSO, C. R., ALMEIDA, A. C. M. **Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae*.** *Microbial Ecology, New York*, v. 57, n. 2, p. 384-390, fev. 2009.

COUTO, L. C; COUTO, L.; WATZLAWICK, L. F.; CÂMARA, C. **Vias de valorização energética da biomassa.** *Biomassa & Energia*, v. 1, n. 1, p.71-92, 2004.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C.; **Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK 2010 under solid state fermentation.** *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 6065–6072, 2011.

DEVI, R. S.; KANNAN, V. R.; NIVAS, D.; KANNAN, K.; CHANDRU, S.; ANTONY, A. R. **Biodegradation of HDPE by *Aspergillus* spp. from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India.** *Marine Pollution Bulletin*, v. 96, p. 32–40, 2015.

EL-RAHIM, W. M.; EL-ARDY, O. A. M.; FATMA H. A.; MOHAMMAD, F. H. A. M. **The effect of pH on bioremediation potential for the removal of direct violet textile dye by *Aspergillus niger*.** *Desalination*. v. 249, p. 1206–1211, 2009.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 58 f., 2009.

FERREIRA, A.N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. **Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá.** *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 207-213, abr./jun. 2011.

FURTADO, C.F.C.; GADELHA, M.A.C. **Os impactos ambientais do consumo do coco verde na praia do Futuro em Fortaleza-ce.** Faculdade Integrada da Grande Fortaleza, 2012.

GALAN, H. E; ROMERO, B. A. **Contaminación de suelos por setales pesados.** Conferencia Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*, v. 10, p. 48-60, 2008.

GAO, J; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F. X. Y. **Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover.** *Bioresource Technology* . v. 99, p. 7623–7629, 2008.

GARCIA-UBASART, J.; TORRES, A. L.; VILA, C.; PASTOR, F. I. J.; VIDAL, T. **Biomodification of cellulose flax fibers by a new cellulase.** *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 71– 76, 2013.

GHOSE, T.K. **Measurement of cellulase activities.** *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n.1, p.257-268, 1987.

GIRELLI, C. W. **Formulação de detergentes enzimáticos utilizando o Planejamento de Experimentos.** Monografia (Graduação em Engenharia Bioquímica), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 72 f. 2013.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology.** New York: Wiley-Liss, 458 p., 1994.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. **Morphology and productivity of filamentous fungi.** *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 69, p. 375-384, 2005.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. **Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications.** *Chemical Reviews*, v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010.

HEREDIA, A.; JIMENEZ, A.; GUILLEN, R. **Review composition of plant cell walls.** *Lebensm Unters Forsch*, v. 200, p. 24-31, 1995.

HU, H. L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; WOSTEN, H. A. B.; GU, J. B.; DE VRIES, R. P. **Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi.** *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.65, p.248-252, 2011.

IDOETA, P. A. **Indústria do coco cresce, mas alto desperdício gera desafio tecnológico.** British Broadcasting Corporation Brasil, São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/02/140207_coco_reciclagem_abre_pai>. Acessado em: 10 de junho de 2015.

JOHNSON, E. A. **Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 97, p. 7563–7577, 2013.

- JÚNIOR, S. D. O. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substrato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de engenharia química. Universidade Federal do Rio Grand do Norte, Natal-Rn. 103 f., 2014.
- JUTURU, V.; WU, J. C. **Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications.** *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 1219–1227, 2012.
- KABATA-PENDIAS, A; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants 4Ed.** *Taylor and Francis Group*, CRC Press, p. 505, Boca Raton, Florida, 2011.
- KADLA, J. F.; GILBERT, R. D. **Cellulose structure: a review.** *Cellulose Chemical Technology, Roma*, v. 34, p.197, 2000.
- KARMAKAR M.; RAY, R. R. **Current trends in research and application of microbial cellulases.** *Research Journal Microbiology*, v. 6, p. 41–53, 2011.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. **Process optimization for efficient dye removal by *Aspergillus lentulus* FJ172995.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 185, p. 837–843, 2011.
- KHELIFI, E.; AYED, L.; BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HAMDI, M. **Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C.** *J Hazard Mater*, v. 163, p. 2-3, 2009.
- KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F. **Degradation of cellulose under alkaline conditions.** *Carbohydrate Polymers*, v. 51, p. 281 – 300, 2003.
- LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; VICTOR HABER PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. **Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental.** *Quim. Nova*, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.
- LAVELLE, P. **Ecological challenges for soil science.** *Soil Science*, v. 165, n.1, p. 73-86, 2000.
- LI, Y., LIU, H., TIAN, Z., ZHU, L., WU, Y., TANG H. **Diesel Pollution Biodegradation: Synergetic Effect of *Mycobacterium* and Filamentous Fungi.** *Biomedical and Environmental sciences*, v. 21, p.181-187, 2008.
- LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. ***Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 272-277, 2005.
- LIMA, J. S; MOTTA, C. M. S. **Seleção de espécies de *Penicillium* da micoteca URM, para produção de tanase através de fermentação em estado sólido de resíduos agroindustrias.** XIX Congresso de Iniciação Científica (CONIC), III Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CONITI), VII Jornada de Iniciação Científica da Fundação Joaquim Nabuco (JOIC). Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

LIMA, S. L. T.; JESUS, M. B.; SOUSA, R. R. R.; OKAMOTO, A. K.; LIMA, R.; FRACETO L. F. **Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos.** *Química Nova na Escola*, n. 28, maio 2008.

LOPES C. S. D. **Análise ambiental da fase de acabamento do jeans.** *Interfacehs, Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 6, n. 3, 2011.

LOPES, D. O.; CELLIGOI, M. A. P.C.; VARGAS, L. H. M.; BUZZATO, J. B. **Produção de celulasas por *Trichoderma* da Amazônia T676 em fermentação em estado sólido de bagaço de cana.** In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8., 2008, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008. p. 168-169.

LOPES, M. S. S.; OLIVEIRA, P. C. C.; ANDRADE, M. V. F.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Remoção de macronutrientes de efluente da indústria de castanha de caju por uso de reator aeróbio em batelada com inóculo fúngico.** *Rev. Eng Sanit Abient*, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2011.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J. D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C. E. **How biotech can transform biofuels.** *Nat Biotechnol*, v. 26, p. 169-172, 2008.

MACHADO, K. C.; DAMM, D. D.; JUNIOR, C. C. M. F. **Reaproveitamento tecnológico de resíduo orgânico: casca de coco verde na produção de gabinetes ecológicos de computadores.** 2º Forum Internacional de Resíduos Sólidos – julho 2009.

MAGNO, G. A. M.; MACHADO, S. L.; PORTELLA, R. B. **Conteúdo de Cd e Pb em alimentos vegetais e gramíneas no município de Santo Amaro–BA.** Anais do VII Congresso Brasileiro de Geotecnia Ambiental e VI Simpósio Brasileiro de Geossintético REGEO/Geossintéticos 2011 – Belo Horizonte, MG, Brasil, 21 a 24 de novembro de 2011

MAIOLINI, R. S. S. **Aplicações das enzimas em diagnóstico Molecular: desenvolvimento de um reagente enzimático para determinação de lactato em fluidos biológicos.** Monografia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Lavras. 36 f., Minas Gerais, 2009.

MARQUES, M. P. **Estudo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por fungos filamentosos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. 77 f, 2010.

MARTINS, C. R.; JÚNIOR, L. A. J. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010.** Documentos 164, ISSN 1678-1953. Aracaju SE, Junho, 2011.

MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. **Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates.** *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1417–1424, 2008.

MARYAN, A. S.; MONTAZER, M. **A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase.** *Journal of Cleaner Production*, v. 57, p. 320-326, 2013.

MENDOZA, D. P. G. **Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília. Brasília -D.F, 66f., 2009.

MILALA, M. A.; SHUGABA, A.; GIDADO, A.; ENE, A. C.; WAFER, J. A. **Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme productions by *Aspergillus niger*.** *Res. J. Agric. Biol.* v. 1, p. 325–328, 2005.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORE, T. T.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R.Y. **Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7691–7700, 2010.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, 2005.

MURUGAN S.; ARNOLD D.; PONGIYA U. D.; NARAYANAN P. M. **Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 Using Saw Dust As Substrate under Solid State Fermentation.** *Enzyme Res.* 2011.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. **Enzimas, poderosas ferramentas na indústria.** *Ciência hoje*, v. 41, n. 242, p. 28 – 23, out. de 2007.

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. **Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*.** *Journal Fermentation Technology*, v. 60, n. 4, p. 311 – 319, 1982.

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

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) de etanol e obtenção de do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilooligômeros.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 136 f., 2011.

NIRANJANE, A. P.; MADHOU, P.; STEVENSON T. W. **The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, n.6, p.464–468, 2007.

NOVOTNY, C., DIAS, N., KAPANEN, A., MALACHOVA, K.; VANDROVCOVA, M., ITAVAARA, M. **Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo - and anthraquinone dyes.** *Chemosphere*, v. 63, p.1436–42, 2006.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulasas**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 64 f., 2010.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. **Enzyme Microb. Technol.** v. 18, n. 312, 1996.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.1, p. 81–84, 2000.

PAPAGIANNI, M. **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes**. *Biotechnology Advances*, v. 22, p.189–259, 2004.

PARSHETTI, G. K.; KALME, S. D.; GOMARE, S. S.; GOVINDWAR, S. P. **Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146**. *Bioresource Technology*, v. 98 p. 3638–3642, 2007.

PELIZER, L. H. P; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. **Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental**. *Journal of Technology Management & Innovation*. v. 2, ed. 1, 2007.

PEREIRA, A. L., PITA J. R. **Alexander Fleming, (1881-1955) da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio nobel (1945)**. *Revista da Faculdade de Letras, História*. Porto, III Série, v. 6, p.129-151, 2005.

PINTO, P. A.; DIAS, A. A.; FRAGA, I.; MARQUES, G.; RODRIGUES, M. A. M.; COLAÇO, J.; SAMPAIO, A.; BEZERRA, R. M. F. **Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment**. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 261–267, 2012.

PURI, M., BANERJEE, A.; BANERJEE, U. C. **Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344**. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 195–201, 2005.

PUTZKE, J., PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do sul: EDUNISC. p. 829, v.2, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. E.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal, 6a. ed.** Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – Brasil. 2001.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; SILVA DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. C.; DILLON, A. J. P. **Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture**. *Bioresource Technology*, v.146, p. 597–603, 2013.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 136 f., 2010.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP, 145 p., 2006.

RODRIGUES, K. A.; SAMPAIO, G. M. M. S.; ZAIAT, M.; SANTAELLA, S. T. **Influência da glicose sobre o consumo de fenol por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelada.** *Eng. sanit. ambient.*, v.12, n. 2, p. 222-228, 2007.

RODRIGUES, K. A.; SILVA, K. M. L.; SILVA, G. M. M.; LIMA, P. C. C. **Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN 400 em reator em bateladas sequenciais.** *Quim. Nova*, v. 34, n. 7, p. 1119-1123, 2011.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Ambiental e Aplicada). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São José do Rio Preto, 77 f., 2014.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R. C. **Valorização de resíduos da agroindústria.** II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA 15 a 17 de março de 2011 - Foz do Iguaçu, PR Volume I – Palestras.

ROUCHES, E.; ZHOU, S.; STEYER, J. P.; CARRERE, H. **White-Rot Fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation.** *Process Biochemistry*, 2016.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins.** São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUTSATZ, M. D. **Cultivo em estado sólido: modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado.** Dissertação (mestrado em Engenharia). Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 105 f., 2006.

SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. **Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*.** *Pesq. agropec. bras.*, v.45, n.11, p.1290-1296, Brasília, 2010.

SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores com fungos.** Tese de Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 140 p., 2005

SANCHÉS, C. **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** *Biotechnology Advances*, v. 27, p.185-194, 2009.

SANTANA, R. M.; GONÇALVES, Z. S.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. **Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira.** *Revista Caatinga*, v. 25, n.1, p.188-193, 2012.

SANTOS, T. A.; GOMES, T. C. A.; LIMA, C. C. **Alterações em características químicas de amostras de compostos de bagaço de coco-verde resultantes do método de estocagem.** FERTBIO, Maceió (AL), 17 a 21 de setembro, 2012.

SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. **Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate.** *Ciência Rural*, v.41, n.12, p. 2210-2216, 2011.

SANTOS, T. C.; FILHO, G. A.; ROCHA, T. J. H.; FERREIRA, A. N.; DINIZ, G. A.; FRANCO, M. **Produção e quantificação de celulasas por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais.** *Scientia Agraria Paranaensis – SAP Mal. Cdo. Rondon*, v. 12, n. 2, abr./jun., p.115-123, 2013.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview.** *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.

SEIBOTH, B.; HAKOLA, S.; MACH, R.L.; SUOMINEN, P.; KUBICEK, C.P. **Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*.** *Journal of Bacteriology*, v.179, p.5318-5320, 1997.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. **Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity.** *Pak. J. Bot.*, v.41, n.2, p. 897-905, 2009.

SHARMA, R.; RAWAT, R.; BHOGAL, R. S.; OBEROI, H. S. **Multi-component thermostable cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger* HN-1 using pea pod waste: Appraisal of hydrolyticpotential with lignocellulosic biomass.** *Process Biochemistry*, v. 50, p. 696–704, 2015.

SHEEHAN J.; HIMMEL M. **Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US Department of Energy's research and development activities for bioethanol.** *Biotechnol Prog*, v. 15, p. 817-827, 1999.

SILVA, A. L.; COSTA JÚNIOR, A. E.; NASCIMENTO, D. M.; ROSA, M. F.; FECHINE, P. B. A.; MAZZETTO, S. E. **Efeito do tratamento alcalino e branqueamento na morfologia e no índice de cristalinidade da fibra de bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).** 53º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro/RJ, de 14 a 18 de Outubro de 2013.

SILVA, K. M. L.; MARINHO, G.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Degradação de corante azo em efluente sintético de indústria têxtil por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelada.** *Conex. Ci. e Tecnol.* Fortaleza/CE, v. 4, n. 1, p. 24-33, nov. 2010.

SILVA, L. A. D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*.** Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola e Ambiental). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 105 p., 2008.

SILVA, R. R., COELHO, G. D. **Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas.** Instituto de botânica – IBt Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de capacitação de monitores e educadores, 2006.

SILVEIRA, J. M. F. J.; BORGES, I. C.; BUAINAIN, A. M. **Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação.** *São Paulo em perspectiva*. São Paulo, v. 19, n 2, p. 101-114, 2005.

SILVEIRA, M. S. **Aproveitamento das cascas de coco verde para produção de briquete em salvador – Ba.** Dissertação (Mestrado em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo – Ênfase em Produção Limpa). Universidade Federal da Bahia. Salvador-BA, 163 f., 2008.

SOARES, M. L. **Efeitos do teor de lignina na sacarificação e fermentação simultânea do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 54 f., 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

TEERI, T. T. **Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases.** *Trends Biotechnology*. v. 15, p. 160–167, 1997.

TEIXEIRA, E. M.; BONDANCIA, T. J.; TEODORO, K. B. R.; CORRÊA, A. C.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. **Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations.** *Industrial Crops and Products*, v.33, n.1, 2011, p. 63–66, 2011.

VALENTIN, L.; FEIJOO, G. M. T.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 58, p. 15–21, 2006.

VRIES, R.P. de; VISSER, J. **Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 497-522, 2001.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. **Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure.** *Bioresour Technol*, v. 96, n. 4, p. 491- 499, 2005.

WILSON, D. B. **Cellulases and biofuels.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 295–299, 2009.

WU, J.; XIAO, Y. Z.; YU, H. Q. **Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm.** *Bioresource Technology* , v.96, p. 1357–1363, 2005.

XAVIER M. O.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; CABANA, A. L.; SILVA FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. **Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos.** *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2008.

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

ZAMPIERI, D.; GUERRA, L.; CAMASSOLA, M.; DILLON A. J. P. **Secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources.** *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 882-886, 2013.

ZENG L. S; LIAO, M; CHEN, C. L; HUANG, C. Y. **Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil-lead-rice(*Oryza sativa* L.) system.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 67, p. 67–74, 2007.

ZÚÑIGA, U, F. **Desenvolvimento de um bioprocesso para Produção de celulasas específicas na cadeia Produtiva do etanol de segunda geração.** Tese (doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 197 f. São Carlos, 2010.

ZÚÑIGA, U, F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B. COURI, S; CRESTANA, S. **Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido.** *Pesq. agropec. bras.*, v.46, n.8, p.912-919, Brasília, 2011.