

Beatriz Cavalcanti Amorim de Mélo

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO EM RESÍDUO DE ACEROLA  
(*Malpighia* sp.) UTILIZANDO *Trichoderma reesei***

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schimidell Netto

Coorientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Líbia de Sousa Conrado Oliveira e Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Luciana Cavalcanti de Azevêdo

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

De Mélo, Beatriz Cavalcanti Amorim

Produção de Celulases por Fermentação em Estado Sólido em Resíduo de  
Acerola (*Malpighia* sp.) Utilizando *Trichoderma reesei* / Beatriz Cavalcanti  
Amorim de Mélo ; orientador, Willibaldo Schimidell Netto ; coorientadora, Líbia  
de Sousa Conrado Oliveira ; coorientadora, Luciana Cavalcanti de Azevêdo.  
- Florianópolis, SC, 2016.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro  
Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Celulase. 3. Resíduo agroindustrial. 4.  
Acerola. 5. Fermentação em Estado Sólido. I. Netto, Willibaldo Schimidell. II.  
Oliveira, Líbia de Sousa Conrado. III. D Azevêdo, Luciana Cavalcanti . IV.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química. V. Título.

## Termo de aprovação



Dedico à minha Mãe (*in memoriam*)  
que tanto lutou para viver e ver a  
minha vitória.



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida e de toda minha família, e por me conduzir com forças para enfrentar as dificuldades da vida.

Aos meu pais, Valdiney e Soraia (*in memoriam*), por todo amor dedicado ao longo de minha vida e por terem me guiado para ser uma mulher do bem. Em especial à minha Mãe por ter sido uma mulher guerreira, lutando para viver até o último instante.

Ao meu esposo, João Neto, pelo amor, compreensão, paciência e incentivo para realização desse trabalho e de todos os nossos sonhos.

À minha filha, Maria Carolina, por ser o meu maior amor e por ser sempre o meu motivo de luta.

Ao meu irmão Breno e à minha cunhada Danielle, por serem tão presentes em minha vida e por estarem sempre me incentivando à não desistir.

À toda minha família, pelo amor e compreensão à mim dedicados.

Ao meu orientador, Prof. Willibaldo Schmidell, pela orientação, confiança e paciência dadas, que possibilitaram a realização desse trabalho. Por ser um profissional tão correto e ao mesmo tempo tão humilde e humano.

À minha coorientadora, Líbia Conrado, primeiramente pelo apoio, incentivo, e dedicação à este trabalho. E além de tudo, ao carinho e amizade dedicados à mim.

À minha coorientadora, Luciana Cavalcanti, pela colaboração e apoio para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos pelo desenvolvimento do DINTER, sempre dispostos a ajudar e resolver problemas.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF Sertão-PE) pela oportunidade do DINTER, pela disponibilidade em solucionar os problemas e pelo apoio na conclusão desse trabalho.

À minha amiga Fernanda Granja, pela amizade de tantos anos, além de todo apoio e suporte nos inúmeros desafios da vida.

Aos meus amigos da vida, em especial à Marcella Feitosa e Raphael Eduardo, por se fazerem sempre presentes durante essa fase em minha vida.

Aos meus amigos e colegas de laboratório (LEB-UFCG), em especial à Gustavo Kubo e Rebeca Almeida, por todo apoio prestado durante o desenvolvimento da parte prática desse trabalho.



“A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin, 1997)



## RESUMO

As celulasas são enzimas capazes de hidrolisar a ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica da cadeia da celulose, que é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal. Um dos principais obstáculos para a utilização das celulasas em larga escala é o seu custo de produção que ainda é elevado, e uma alternativa é o cultivo microbiano em resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólido (FES). Com importância ambiental, o resíduo de acerola, rico em materiais lignocelulósicos, apresenta um potencial para a obtenção desse tipo de enzima. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de celulasas por meio do processo de fermentação em estado sólido do resíduo agroindustrial da acerola, utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei*. O resíduo foi caracterizado físico-quimicamente, quanto à granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade do leito, pH, sólidos solúveis, açúcares redutores e redutores totais, pectina, umidade, cinzas, lignina, hemicelulose, alfa-celulose, holocelulose e extrativos. Foram construídas as isotermas de adsorção de umidade do resíduo de acerola para as temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C. Em seguida, realizou-se um estudo da produção de celulasas por FES, avaliando ao longo do tempo, o pH, a umidade, a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase. Avaliou-se também a influência da umidade inicial e concentração da fonte de nitrogênio, sob a atividade enzimática (carboximetilcelulase). Numa etapa seguinte realizou-se um estudo da extração das enzimas avaliando a influência da agitação, do tempo e da proporção massa de fermentado e volume de solvente, sob a atividade enzimática (carboximetilcelulase). Por fim, verificou-se a estabilidade das enzimas produzidas frente a variações da temperatura e do pH. A caracterização físico-química do resíduo de acerola demonstrou a viabilidade de sua utilização no processo de FES para produção de celulasas. Os resultados obtidos no estudo da produção de celulasas apontaram que o ensaio realizado com 45 % de umidade e concentração de nitrogênio de 1,00 %, foi o que apresentou melhor condição, pois, a partir de 120 horas do processo este ensaio obteve os maiores valores para atividade enzimática, chegando a valores acima de 1,25 U.g<sup>-1</sup> em 216 horas de fermentação. Já no estudo de extração das celulasas, destacou-se o ensaio 8 da matriz do delineamento fatorial, no qual utilizou-se uma agitação de 150 rpm, 45 minutos de extração e proporção de massa de fermentado e volume de solvente de 01:45 (g.mL<sup>-1</sup>), condição na qual foi obtida a maior atividade enzimática, com

2,15 U.g<sup>-1</sup>. Por fim, verificou-se que as celulases produzidas com resíduo de acerola apresentaram boa estabilidade térmica até a temperatura de 50 °C, apresentando, no mínimo, 85,42 % da atividade máxima determinada nas condições padrão. Já com relação a variações no pH, as enzimas produzidas nesse estudo são instáveis em pH 2,5 exibindo 51,40 % de sua atividade máxima, mas apresentam boa estabilidade para pH entre 3,5 e 5,5. Os resultados deste estudo forneceram informações importantes para a futura aplicação do resíduo agroindustrial de acerola como substrato para processos de fermentação em estado sólido, objetivando a produção de celulases.

**Palavras-chave:** Celulase. Resíduo agroindustrial. Acerola. Fermentação em Estado Sólido. *Trichoderma reesei*.

## ABSTRACT

Cellulases are enzymes capable of hydrolyzing the bond  $\beta$ -1,4-glycosidic of cellulose chain, which is the main component of the cell wall of biomass. One of the main obstacles to the use of cellulases in large scale is its cost of production that is still high, and an alternative is the microbial cultivation of agro-industrial waste by solid state fermentation (SSF). With environmental importance, the residue of acerola, rich in lignocellulosic materials, presents a potential for obtaining such enzyme. Given this context, this study aimed to study the production of cellulase by the method of solid-state fermentation of agroindustrial waste of acerola, using *Trichoderma reesei* microorganism. The residue was characterized chemically-physical, as the particle size, bulk density, real density, the bed porosity, pH, soluble solids, reducing sugars and total reducing, pectin, moisture, ash, lignin, hemicellulose, alpha-cellulose, holocelulose and extractives . It was constructed the acerola residue moisture adsorption isotherms for temperatures of 25, 30, 35 and 40 ° C. Then, it was made a study of production of cellulases by SSF, evaluating over time, pH, moisture, reducing sugar concentration and enzymatic activity, expressed as carboxymethylcellulase. Also, it was evaluated the influence of the initial moisture content and concentration of nitrogen source in the enzyme activity (carboxymethylcellulase). In a next step it was carried out a study of the extraction of enzymes evaluating the influence of agitation, time and proportion mass fermented and volume of solvent in the enzyme activity (carboxymethylcellulase). Finally, it was found the stability of the enzymes produced against changes in temperature and pH. The physicochemical characterization of acerola residue demonstrated the feasibility of its use in the SSF process for the production of cellulases. The results obtained in the study of cellulase production pointed out that the test carried out with 45% moisture and 1.00% nitrogen concentration, showed the best condition because, from 120 hours to process this test got the greatest values for enzyme activity, reaching above 1,25U.g<sup>-1</sup> values at 216 hours of fermentation. In the study of extraction of cellulases, stood out the test 8 of the factorial design matrix, which used a stirring of 150 rpm, 45 minutes of extraction and mass ratio of fermented volume and solvent 1:45 (g.mL<sup>-1</sup>), a condition in which was obtained the highest enzymatic activity, with 2.15 U.g<sup>-1</sup>. Finally, it was found that cellulases produced from acerola residue showed good thermal stability up to the temperature 50° C, with at least, 85.42% of the determined maximum activity at standard

conditions. In relation to variations in pH, the enzymes produced in this study are unstable at pH 2.5 showing 51.40% of its maximal activity, but exhibit good stability to pH between 3.5 and 5.5. The results of this study provided important information for the future application of agro-industrial acerola waste as a substrate for fermentation processes in solid state, aiming the cellulases production.

**Keywords:** Cellulase. Agroindustrial waste. Acerola. Solid state fermentation. *Trichoderma reesei*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento de fungos utilizando substratos sólidos. ....	33
Figura 2 - Estrutura da molécula de celulose.....	42
Figura 3 - Resíduo de acerola desidratado e moído.....	49
Figura 4- Resíduo de acerola desidratado, moído e embalado a vácuo.	50
Figura 5 - Perfil granulométrico do resíduo de acerola desidratado e moído.....	72
Figura 6 - Isotermas de adsorção de umidade do resíduo de acerola desidratado e moído.....	74
Figura 7 - Umidade do meio fermentativo ao longo do tempo na produção das celulasas. ....	78
Figura 8 - pH do meio fermentativo ao longo do tempo na produção das celulasas.....	80
Figura 9 - Açúcares redutores no meio fermentativo ao longo do tempo na produção das celulasas. ....	82
Figura 10 - Atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase ao longo do tempo.....	84
Figura 11 - Diagrama de Pareto para o planejamento experimental do tipo 2 <sup>2</sup> para a produção das celulasas.....	86
Figura 12 - Superfície de resposta: influência das variáveis umidade inicial (U) e fonte adicional de nitrogênio (N) sobre a atividade enzimática, carboximetilcelulase (CMCase).....	88
Figura 13 - Diagrama de Pareto para o planejamento experimental do tipo 2 <sup>3</sup> para estudo da extração das celulasas.....	90
Figura 14 - Superfície de resposta: influência das variáveis agitação (AGT) e proporção de extração (DIL) sobre a atividade enzimática, carboximetilcelulase (CMCase), fixado o tempo no ponto central 0 (30 minutos).....	92
Figura 15 - Estabilidade das celulasas frente às variações de temperatura.....	93
Figura 16 - Estabilidade das celulasas frente às variações de pH.....	95



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais microrganismos utilizados na fermentação em estado sólido (FES). .....	39
Tabela 2 - Níveis do planejamento experimental da produção de enzimas celulolíticas.....	59
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental fatorial $2^2$ com cinco repetições no ponto central.....	60
Tabela 4 - Composição do meio básico. ....	61
Tabela 5 - Níveis do planejamento experimental do estudo da extração das enzimas.....	67
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental fatorial $2^3$ com três repetições no ponto central.....	68
Tabela 7 - Caracterização físico-química do resíduo de acerola desidratado e moído.....	71
Tabela 8 - Atividade enzimática (CMCase) obtida nos ensaios do planejamento experimental do tipo $2^2$ .....	85
Tabela 9 - ANOVA da resposta atividade enzimática, carboximetilcelulase.....	87
Tabela 10 - Atividade enzimática (CMCase) obtida nos ensaios do planejamento experimental do tipo $2^3$ .....	89
Tabela 11 - ANOVA da resposta atividade enzimática, carboximetilcelulase.....	91
Tabela 12 - Resultados de umidade obtidos durante o processo de produção das celulases. ....	111
Tabela 13 - Resultados de pH obtidos durante o processo de produção das celulases. ....	112
Tabela 14 - Resultados de açúcares redutores obtidos durante o processo de produção das celulases. ....	113
Tabela 15 - Resultados de atividade enzimática obtidos durante o processo de produção das celulases. ....	114
Tabela 16 - Resultados do estudo da termoestabilidade das celulases produzidas.....	115
Tabela 17 - Resultados do estudo da estabilidade das celulases produzidas frente à variações de pH. ....	116



## LISTA DE ABREVIATURAS

aW – atividade de água  
AR – açúcares redutores  
ART – açúcares redutores totais  
BG –  $\beta$ -glicosidase  
°brix – sólidos solúveis  
CBH – celobiohidrolase  
CMCase – carboximetilcelulase  
EnG – endoglucanases  
ExG – exoglucanases  
FES – fermentação em estado sólido  
FS – fermentação Submersa  
GH – glucano-hidrolases  
GP – grau de polimerização  
U – unidade de atividade enzimática  
U<sub>i</sub> – umidade inicial de fermentação  
N – fonte adicional de nitrogênio  
C<sub>esporoso</sub> – concentração de esporos  
V<sub>suspensão</sub> – volume de suspensão de esporos  
m<sub>F</sub> – massa de meio fermentado  
V<sub>S</sub> – volume de solvente  
CV – coeficiente de variação  
SQ – soma quadrática  
GL – grau de liberdade  
MQ – média quadrática



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1 OBJETIVOS .....	27
1.1.1 Objetivo geral.....	27
1.1.2 Objetivos específicos .....	27
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
2.1 ENZIMAS CELULOLÍTICAS .....	29
2.1.1 Classificação das celulases.....	29
2.1.2 Aplicação das celulases .....	30
2.1.3 Produção de celulases por ação microbiana .....	30
2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) .....	31
2.2.1 Definições.....	31
2.2.2 Vantagens e desvantagens .....	33
2.2.3 Aplicações .....	34
2.2.4 Fatores que influenciam na fermentação em estado sólido .....	35
2.2.4.1 Umidade.....	35
2.2.4.2 pH .....	35
2.2.4.3 Temperatura.....	36
2.2.4.4 Aeração.....	36
2.2.4.5 Dimensão das partículas .....	37
2.2.4.6 Pré-tratamento.....	37
2.2.4.7 Microrganismo.....	38
2.2.4.8 Inóculo .....	40
2.2.4.9 Substrato .....	40
2.2.5. Produção de celulases por fermentação em estado sólido (FES).....	41
2.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS .....	42
2.3.1 Resíduos lignocelulósicos.....	42
2.3.2 Resíduo de acerola .....	43
2.4 EXTRAÇÃO DE ENZIMAS.....	44
2.4.1 Definições.....	44

<b>2.4.2 Tipos de solventes .....</b>	<b>44</b>
<b>2.4.3 Fatores que influenciam na extração de enzimas.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5 TRABALHOS DESENVOLVIDOS SOBRE A PRODUÇÃO DE CELULASES .....</b>	<b>45</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 RESÍDUO AGRINDUSTRIAL DE ACEROLA.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RESÍDUO.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.1 Granulometria .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.2 Densidade Aparente .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.3 Densidade Real.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.4 Porosidade do leite.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.5 Umidade .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.6 Cinzas .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.7 Extrativos .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.8 Lignina.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.9 Holocelulose.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.10 Alfa-celulose .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2.11 pH.....</b>	<b>56</b>
<b>3.2.12 Sólidos Solúveis (°brix).....</b>	<b>56</b>
<b>3.2.13 Açúcares Redutores.....</b>	<b>56</b>
<b>3.2.14 Pectina .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE DO RESÍDUO.....</b>	<b>58</b>
<b>3.4 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CELULASES .....</b>	<b>59</b>
<b>3.4.1 Planejamento Experimental para produção de celulases.....</b>	<b>59</b>
<b>3.4.2 Microrganismo e Inóculo .....</b>	<b>60</b>
<b>3.4.2.1 Microrganismo.....</b>	<b>60</b>
<b>3.4.2.2 Inóculo.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4.3 Ensaios de Fermentação.....</b>	<b>63</b>
<b>3.4.4 Análises Periódicas .....</b>	<b>64</b>
<b>3.4.4.1 Umidade .....</b>	<b>64</b>

3.4.4.2 pH .....	64
3.4.4.3 Açúcares Redutores .....	64
3.4.4.4 Extração de Enzimas .....	65
3.4.4.5 Determinação da atividade enzimática.....	66
3.5 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE ENZIMAS .....	67
<b>3.5.1 Planejamento Experimental para a extração das enzimas .....</b>	<b>67</b>
<b>3.5.2 Ensaio de Fermentação .....</b>	<b>68</b>
<b>3.5.3 Extração das Enzimas.....</b>	<b>68</b>
3.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS ENZIMAS .....	69
<b>3.6.1 Produção das enzimas celulolíticas.....</b>	<b>69</b>
<b>3.6.2 Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas.....</b>	<b>69</b>
<b>3.6.3 Efeito do pH na estabilidade das enzimas.....</b>	<b>70</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO .....	71
<b>4.1.1 Granulometria.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.2 Umidade.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1.3 pH.....</b>	<b>74</b>
<b>4.1.4 Sólidos solúveis (°brix).....</b>	<b>75</b>
<b>4.1.5 Extrativos.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1.6 Açúcares redutores .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1.7 Holocelulose e Hemicelulose.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.8 Lignina .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.9 Cinzas.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.10 Pectina.....</b>	<b>77</b>
4.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DAS CELULASES .....	77
<b>4.2.1 Produção das celulases .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2.2 Análise estatística da produção das celulases .....</b>	<b>85</b>
4.3 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DAS CELULASES .....	89
4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS CELULASES .....	93
<b>4.4.1 Estabilidade das celulases frente a variações de temperatura .....</b>	<b>93</b>

<b>4.4.2 Estabilidade das celulases frente à variações de pH .....</b>	<b>94</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO A – Resultados obtidos no processo de produção de celulases com resíduo de acerola.....</b>	<b>111</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os processos industriais geram múltiplas saídas de materiais em forma de resíduos não incorporados no produto final, que geralmente são aceitas como efeito normal no processo de fabricação. Desta forma, milhares de toneladas de resíduos agroindustriais são gerados no processamento de matérias-primas de diversas culturas. Grande parte deste resíduo não tem aplicação, gerando contaminação ambiental originada do tratamento inadequado, como queima a céu aberto, descarte ou enterro desses resíduos.

Representando 5 % da produção mundial de frutas, o Brasil produz anualmente mais de 43 milhões de toneladas, sendo caracterizado como o terceiro produtor mundial. Estes dados trazem como consequência um aumento no número de agroindústrias instaladas no país, o que gera um crescimento na produção de resíduos agroindustriais de origem vegetal (LOUSADA JUNIOR et al., 2005). Desta forma, várias estratégias estão sendo utilizadas para minimizar estes impactos ambientais, como por exemplo agregar valor a estes subprodutos, gerando maior interesse econômico e ambiental (SOUSA et al., 2011b).

Por conta disso, nos últimos anos tem se intensificado o estudo do aproveitamento de resíduos, especialmente os agroindustriais de origem vegetal, tais como polpa e folhas de café, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, etc. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais na produção de álcool, enzimas e ácidos orgânicos, gerando produtos de grande valor econômico e atendendo à proposta ZERI “Zero Emissions Research Initiative”, que estabelece uma mudança de paradigmas no conjunto das atividades econômicas, particularmente dos processos de produção industrial. Essa estratégia objetiva a transformação da matéria-prima em bens úteis sem danificar o meio ambiente, colocando os resíduos e emissões como insumos para outros produtos (ISRAEL, 2005).

Formados principalmente por três componentes, a celulose, a hemicelulose e a lignina, os resíduos agrícolas de origem vegetal, em sua maioria, são materiais lignocelulósicos, que podem ser utilizados naturalmente como fonte de carbono por diversos microrganismos, em diversos processos, como por exemplo na hidrólise da celulose por ação de enzimas, denominadas celulasas (BADHAN et al., 2007).

As celulasas são enzimas capazes de hidrolisar a ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica da cadeia da celulose, que é o principal componente da

parede celular da biomassa vegetal. Essas enzimas têm uma ampla variedade de aplicações industriais, sendo utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, como componente de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal. Atualmente, as celulases têm sido bastante aplicadas na produção de bioetanol durante a etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica para conversão da celulose em glicose. Os principais obstáculos à exploração em potencial da celulase são rendimento, estabilidade, especificidade e custos de produção que ainda é elevado (ALAM et al., 2008).

Uma alternativa para a obtenção de celulases com provável menor custo de produção é o cultivo microbiano em resíduos agroindustriais de origem vegetal por fermentação em estado sólido (FES), que trata-se de um processo em que os microrganismos crescem sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo de líquido ligado a ela está em um nível de atividade de água que assegure o crescimento e o metabolismo das células sem exceder à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001). Devido aos baixos níveis de água nesse tipo de sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas atuais pesquisas, pois apresentam maior capacidade de crescimento em baixas quantidades de água livre, uma vez que se adequam ao meio e excretam grandes quantidades de enzimas nestas condições.

Os processos fermentativos são largamente utilizados para obtenção de celulases e outras enzimas (ORLANDELLI et al., 2012). Os fungos, em função da sua alta capacidade de produzir a celulase, características de reprodução e crescimento, adaptam-se facilmente a diversos substratos, dentre eles os resíduos agrícolas e agroindustriais de origem vegetal (TAVARES et al., 1998). Assim, são capazes de realizar a degradação da celulose, utilizando-a como fonte de carbono (GRIMM et al., 2005).

Os fungos filamentosos apresentam grande distribuição na natureza, e hoje caracterizam-se por uma grande importância comercial. As pesquisas para identificação e isolamento de microrganismos capazes produtores celulases tem crescido nos últimos anos, e os estudos tem utilizado fungos filamentosos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. A espécie *Trichoderma reesei* é a mais utilizada pela elevada produção específica de celulases, principalmente quanto às frações de endoglicanase e celobiohidrolase (SINGHANIA et al., 2010; WEN et al., 2005).

Como um exemplo de um resíduo agroindustrial de origem vegetal com grande potencial biotecnológico, pode-se citar o resíduo de acerola. Com uma produção de mais de 22 mil toneladas no ano de 2006, a produção da acerola (*Malpighia* sp.) no Brasil pode ser relacionada a um grande impacto ambiental, pois desta produção, aproximadamente 53 % é destinado ao processamento, gerando um grande volume de resíduo que não é utilizado na alimentação humana (IBRAF, 2009).

A acerola é originária da América Central, e já foram identificados vários compostos bioativos na sua composição, como malvidina-3,5-diglicosilada, cianidina-3-monoglicosilada, pelargonidina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, quercetina, caempferol,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina (VENDRAMINI e TRUGO, 2004). Além de substâncias com importância nutricional, o resíduo de acerola, rico em materiais lignocelulósicos, apresenta um potencial a ser utilizado como fonte de carbono para a obtenção de enzimas (BADHAN et al., 2007).

Na literatura consultada, ainda não foram encontrados estudos com o objetivo da produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais do processamento da acerola, enfatizando seu potencial inovador. Dentro desse contexto, vislumbra-se a possibilidade de obter concentrados de enzimas celulolíticas por meio do processo de fermentação em estado sólido com o resíduo de acerola utilizando um fungo filamentosos para produção dessas enzimas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Estudar a produção de celulasas por meio de um processo de fermentação em estado sólido do resíduo agroindustrial da acerola, utilizando como agente metabolizador o microrganismo *Trichoderma reesei*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o resíduo de acerola quanto à sua granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade do leito, pH, sólidos solúveis, açúcares redutores, pectina, umidade, cinzas, lignina, hemicelulose, alfa-celulose, holocelulose e extrativos;

- Construir as isotermas de adsorção de umidade do resíduo de acerola;
- Estudar a produção de celulases por fermentação em estado sólido do resíduo de acerola com o microrganismo *Trichoderma reesei*, avaliando ao longo do tempo, o pH, a umidade, a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase;
- Avaliar a influência da umidade inicial de fermentação e a concentração da fonte adicional de nitrogênio, sob a atividade enzimática (carboximetilcelulase);
- Avaliar, na extração da enzima, a influência da agitação, do tempo e da proporção massa de fermentado e volume de solvente, sob a atividade enzimática (carboximetilcelulase);
- Avaliar a estabilidade das enzimas produzidas por fermentação em estado sólido frente à variações da temperatura e do pH.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 ENZIMAS CELULOLÍTICAS**

Enzimas celulolíticas são hidrolases capazes de clivar as ligações *O*-glicosídicas de polímeros presentes nos materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores específicos para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial (CASTRO e PEREIRA-JÚNIOR, 2010).

#### **2.1.1 Classificação das celulases**

Podendo ser definidas como hidrolases que clivam ligações *O*-glicosídicas, as enzimas do complexo celulolítico são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. São divididas em três grandes grupos: as endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e  $\beta$ -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002).

Endoglucanase (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC 3.2.1.4) é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, que atua randomicamente nas regiões internas da fibra celulósica. São liberados oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, por conseguinte, novos terminais (um redutor, quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre e um não redutor, quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente). As carboximetilcelulases estão classificadas como endoglucanases (LYND et al., 2002; FERREIRA et al., 2011).

O grupo das exoglucanases (ExG) é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH) (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010). A CBH (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC 3.2.1.91) participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve ruptura física do substrato, desestratificando as fibras, devido ao aumento das regiões intersticiais. Este fenômeno promove aumento na taxa de hidrólise, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulases (ZHANG e LYND, 2004).

O grupo de enzimas do complexo celulolítico que engloba a  $\beta$ -glicosidase (1,4- $\beta$ -D-glicosidase) é capaz de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND e ZHANG, 2002).

### 2.1.2 Aplicação das celulasas

A utilização de enzimas celulolíticas em processos industriais tem demonstrado grande relevância, desde a sua aplicação no beneficiamento de produtos na indústria farmacêutica, têxtil, de papel, alimentícia, na produção de etanol, dentre outras (FERREIRA et al., 2011).

A produção de celulasas em escala industrial teve seu início na década de 80, sendo aplicada como aditivo para ração animal e como insumo para a indústria de alimentos, e posteriormente foram utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil; nas indústrias de polpa e papel e em lavanderias, amenizando o desgaste das peças (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010; COELHO, 2008).

A partir da década de 90, as celulasas e as hemicelulasas representavam cerca de 20 % do mercado mundial de enzimas (BHAT, 2000). Já no cenário nacional, em 2008, as celulasas movimentaram um montante de aproximadamente USD 1,35 milhão (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010).

O desenvolvimento da tecnologia da produção de celulasas para a sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos tem tido importante papel. Na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, a utilização das celulasas representa grande impacto no processo, podendo representar até 18 % do custo operacional de uma planta, porém estudos aprofundados para o desenvolvimento de processos viáveis para a produção de etanol de segunda geração ainda são necessários (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010).

### 2.1.3 Produção de celulasas por ação microbiana

As investigações que apresentam como objetivos a identificação e isolamento de microrganismos capazes de produzir celulasas têm se intensificado, principalmente sobre o sistema de celulase de fungos filamentosos, como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (AFONSO, 2012). Apresentando elevada produção específica de celulasas, o microrganismo mais estudado é o *Trichoderma reesei*, principalmente quanto às frações de endoglucanase e celobiohidrolase (SINGHANIA et al., 2010; WEN et al., 2005). Já os fungos do gênero *Aspergillus* são conhecidos por produzirem coquetéis enzimáticos com altas concentrações da enzima  $\beta$ -glicosidase. Outros microrganismos como fungos termofílicos aeróbios, fungos mesofílicos anaeróbios,

bactérias termofílicas e mesofílicas, aeróbias e anaeróbias, também são capazes de produzir celulases ativas (GOMES et al., 2009).

As técnicas de isolamento de microrganismos produtores de celulases têm sido estudadas e aprimoradas, principalmente em relação à melhorias no processo de produção e aplicação de celulases, bem como aspectos relativos à clonagem e expressão de genes para aumento da expressão microbiana destas enzimas, bem como à purificação e caracterização de componentes do complexo enzimático. O entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, a determinação das estruturas tridimensionais das celulases e a demonstração do potencial industrial dessas enzimas têm sido o foco de diversos estudos (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010).

## 2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

### 2.2.1 Definições

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como o crescimento de microrganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, no entanto, o substrato deve conter umidade suficiente, existente na forma adsorvida na matriz sólida (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Na FES, a produção de celulases por microrganismos ocorre na ausência ou quase ausência de água livre (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010; PANDEY, 2003). A água possui diversas funções em um bioprocessamento, tais como a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos; e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, da estabilidade da estrutura lamelar e da conservação da permeabilidade da membrana plasmática. A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada adsorvida pela superfície das partículas (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010).

Algumas características da fermentação em estado sólido são: alta produtividade, alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia. Por outro lado, apresentam dificuldades no controle das possíveis variáveis do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Nesse tipo de processo, o principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade,

o que acaba favorecendo o uso de fungos filamentosos no processo, devido os mesmos se adaptarem bem a essa condição (PANDEY, 2003).

A Figura 1 apresenta os processos que ocorrem durante a FES. Após a esporulação, a hifa fúngica é desenvolvida em uma matriz micelial que se espalha pela superfície das partículas que compõem o substrato sólido. A partir da matriz micelial, as hifas aéreas projetam-se no espaço gasoso, enquanto outras penetram no substrato, se desenvolvendo dentro dos poros preenchidos por líquido. Em níveis normais de umidade, os espaços vazios entre as hifas aéreas são mais susceptíveis de ser preenchido com gás, ao passo que os espaços vazios no interior do tapete micelar e dentro do substrato são preenchidos com o líquido. As atividades metabólicas ocorrem principalmente próximo da superfície do substrato e dentro dos poros. Entretanto, regiões expostas ao micélio também apresentam metabolismo e pode haver transporte de substâncias da hifa penetrativa para a aérea (HÖLKER e LANZ, 2005).

As enzimas hidrolíticas que são produzidas pelo micélio, difundem-se para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores, que servem como nutrientes para o fungo. O oxigênio é consumido e são produzidos durante a fermentação o gás carbônico, água, aquecimento e produtos bioquímicos (HÖLKER e LANZ, 2005).

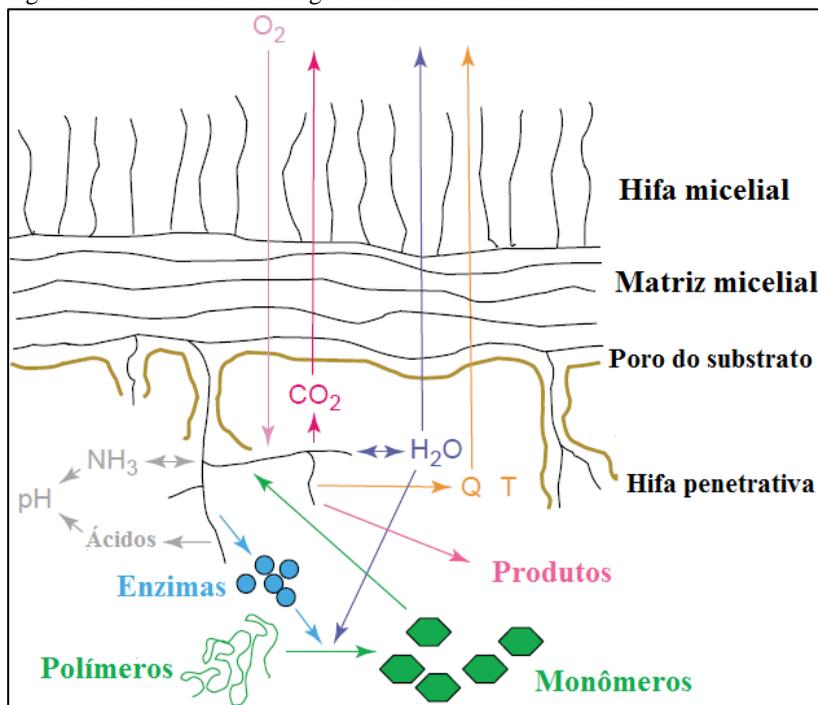
Desta forma, os gradientes se desenvolvem dentro do biofilme que força o oxigênio a se difundir da fase gasosa para as regiões mais profundas do biofilme e o gás carbônico destas regiões para a fase gasosa. O aquecimento gerado leva a um aumento de temperatura, o que é um sério problema durante a FES. O calor é então removido do substrato, não somente pela via de condução, mas também por meio da evaporação, que é parte do equilíbrio complexo de água no sistema (HÖLKER e LANZ, 2005).

Paralelamente à evaporação, o equilíbrio de água inclui a absorção de água pelo micélio durante o crescimento, consumo de água durante as reações de hidrólise e produção de água na respiração (HÖLKER e LANZ, 2005).

Outro fator importante é o pH, que pode ser modificado devido à liberação de ácidos de carbono e a troca de amônia (HÖLKER e LANZ, 2005).

Os produtos bioquímicos de interesse que são liberados na matriz sólida e os espaços preenchidos por líquido podem absorver o sólido e pode ser necessária uma extração no final do processo (HÖLKER e LANZ, 2005).

Figura 1 - Crescimento de fungos utilizando substratos sólidos.



Fonte: Adaptado de HÖLKER e LANZ (2005).

### 2.2.2 Vantagens e desvantagens

A FES, comparada com a fermentação submersa (FS), é preferida devido às vantagens que oferece, tais como: fácil manejo e manutenção, menor custo de operação, maior concentração de produtos formados, facilidade na extração do produto com a utilização de solventes apropriados (geralmente água) e espaço físico reduzido (ALBANO, 2012).

A FES deve ter a capacidade de proporcionar ambiente com umidade adequada ao crescimento microbiano, sendo, portanto, a condição natural de fungos filamentosos, que produzem várias enzimas extracelulares em altas concentrações para hidrolisar os nutrientes da fase sólida (DALSENTER et al., 2005).

Outra vantagem da FES é a possibilidade de se usar resíduos agroindustriais como substratos para obtenção de produtos com valor agregado. Esta utilização apresenta potencial de utilização industrial,

devido à redução de custos na produção em diversos segmentos, principalmente devido à disponibilidade destes resíduos, além representar um problema ambiental se forem descartados de forma inadequada.

Levando em consideração de que cada substrato apresenta características próprias, como retenção de umidade e disponibilidade de nutrientes, a sua escolha está relacionada à capacidade de adequação do microrganismo ao seu ambiente (ALBANO, 2012).

As desvantagens que podem ser citadas para a fermentação em estado sólido são a obtenção de menor gama de produtos e de microrganismos aptos a crescer nessas condições; menor disponibilidade de informações na literatura, no que tange a fenômenos de transporte e cinéticas de crescimento e de produção enzimática; além da maior dificuldade no controle do processo e na adição de soluções desejadas (CASTRO e PEREIRA-JR, 2010). Além disso, outra desvantagem da FES é a dificuldade em homogeneizar o substrato devido à sua elevada heterogeneidade.

### **2.2.3 Aplicações**

O processo de fermentação em estado sólido tem se mostrado muito promissor no desenvolvimento de vários produtos como enzimas (SANTOS, 2007); ácidos orgânicos (RODRIGUES et al., 2007); aromas (UENOJO, 2003), vitaminas, etanol e bioherbicidas (MORAES et al., 2007).

As celulases, devido à sua capacidade de hidrolisar a celulose, são atualmente empregadas principalmente na produção de detergente, na indústria têxtil e de papel e celulose (KIRK et al., 2002). Adicionalmente, estas enzimas têm ganhado destaque na pesquisa da hidrólise de materiais lignocelulósicos para a produção etanol (HIMMEL et al., 1999).

Segundo Castro e Pereira (2010), a partir da década de 80, teve-se início a produção de celulases em escala industrial, com o intuito de ser utilizada como um aditivo para ração animal. Com o objetivo principal de melhorar as propriedades sensoriais de massas, estas enzimas foram utilizadas como insumo na indústria de alimentos, ganhando também atuação no processamento de bebidas, na clarificação de sucos de frutas e vinhos. As enzimas celulolíticas passaram então a ter aplicação na indústria têxtil, nos processos de biopolimento e bioestonagem, na produção de polpa e papel, e em lavanderias.

## 2.2.4 Fatores que influenciam na fermentação em estado sólido

### 2.2.4.1 Umidade

O teor de água do substrato é fator importante na fermentação em estado sólido, e tem efeito sobre a atividade fisiológica dos microrganismos. A limitação de água pode interferir nos processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos. Já o excesso de água, por sua vez, reduz o volume de fase gasosa no interior do substrato, o que aumenta a resistência de transferência de massa de oxigênio e gás carbônico e a possibilidade de contaminação. Em geral, o teor de água nos processos de FES varia entre 50 e 80 % (AFONSO, 2012).

Caracterizada como uma grandeza termodinâmica, a atividade de água (aW) está relacionada ao potencial químico e possibilita avaliar a disponibilidade de água livre suscetível a reações no substrato sólido. A redução de aW aumenta a duração da fase *lag*, diminuindo então a velocidade de crescimento do microrganismo, resultando em baixa quantidade de biomassa produzida (MELLO, 2008). Em FES, em que se faz uso de substratos heterogêneos, a quantidade de água varia conforme o desenvolvimento da cultura, devido a alterações na estrutura do substrato, a liberação de produtos solúveis pelas reações enzimáticas, e a produção de água na respiração celular (AFONSO, 2012).

### 2.2.4.2 pH

Em relação ao cultivo e fermentação microbiana, outro fator que pode ser considerado importante é o pH, podendo haver variação em resposta às atividades metabólicas do microrganismo. Em geral, esta variação ocorre devido à secreção de ácidos orgânicos, o que pode promover redução do pH. Em contrapartida, a assimilação de ácidos orgânicos, além da hidrólise de ureia (fonte de nitrogênio), pode resultar na alcalinização do meio (AFONSO, 2012).

A faixa de pH ideal para o crescimento de um microrganismo é um fator relativo ao microrganismo, sendo caracterizado dentro de um intervalo. A versatilidade do pH ideal para o crescimento dos fungos pode ser empregada para prevenir ou minimizar a contaminação por bactérias (KRISHNA, 2005).

### 2.2.4.3 Temperatura

A temperatura é um fator de grande relevância, podendo ser tratado como um dos fatores mais importantes para o cultivo do microrganismos, pois o crescimento e produção de enzimas ou metabólitos são geralmente sensíveis a esse fator. Da mesma forma que o pH, os fungos podem crescer em uma ampla faixa de temperaturas, a temperatura considerada ótima para seu crescimento pode ser diferente daquela para a formação do produto (AFONSO, 2012).

O calor metabólico liberado pelas células microbianas durante o crescimento faz com que a temperatura do meio de cultura aumente. Na FES, a falta de água livre pode resultar em gradientes de temperatura no meio de cultura. Desta forma, o crescimento de microrganismos em FES pode prosseguir em condições não isotérmicas.

### 2.2.4.4 Aeração

A aeração constitui um fator que apresenta influência em funções básicas como a manutenção de condições aeróbicas; eliminação do dióxido de carbono formado; regulação da temperatura do substrato; ajuste do nível de umidade (CORREIA, 2004). O nível de oxigênio precisa ser mantido de tal forma que seja suficiente para evitar diminuição da respiração normal dos microrganismos. Por outro lado, a demanda de oxigênio varia de acordo com a espécie utilizada, e depende em grande parte das condições utilizadas no processo. Algumas variáveis como agitação e transferência de oxigênio apresentam-se como características específicas do fungo a ser empregado (velocidade de crescimento, morfologia), e, por conta disso, estudos respirométricos são importantes para a determinação da relação entre a quantidade de oxigênio necessária durante o crescimento de determinado microrganismo e a produção de enzimas (ALBANO, 2012).

Os sistemas de FES têm caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato. Como não existe água livre no meio, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio tornam-se fatores cruciais. O nível de oxigênio necessário para a fermentação em estado sólido é esperado ser menor do que na submersa (ALBANO, 2012).

#### 2.2.4.5 Dimensão das partículas

Como mais um fator que pode interferir na fermentação, a dimensão e a forma das partículas afetam a relação entre a área superficial e o volume, além de interferir no tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas. O tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio, facilitando o processo de fermentação. Geralmente, partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Entretanto, uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato, o que pode interferir na respiração microbiana e resultar em baixo crescimento. Por outro lado, partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, mas limitam a superfície para ataque microbiano (PANDEY et al., 2003).

#### 2.2.4.6 Pré-tratamento

Em processos fermentativos que utilizam resíduos agroindustriais, segundo Del Bianchi et al. (2001), é necessário um pré-tratamento do substrato para adequar-se às condições requeridas para o crescimento e metabolismo do microrganismo e facilitar a sua atuação no meio de fermentação. Os pré-tratamentos mais aplicados são: esmagamento, quebra, moagem e peneiramento do substrato, visando obter uma granulometria ideal ao processo; suplementação de nutrientes e correção do pH, para suprir a deficiência de algum nutriente e adequar às condições de crescimento microbiano; hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico buscando favorecer a atuação da enzima; embebição, para regular o teor de umidade inicial do substrato; vaporização ou aquecimento, visando a gelatinização ou inchamento do substrato; adição de agente sequestrante, com o objetivo de remover íon metálicos que podem reduzir o rendimento do processo; e processo de esterilização, buscando reduzir ou eliminar possíveis contaminações.

Na produção de celulasas, o tratamento que tem sido bastante avaliado é a hidrólise ácida ou alcalina do material celulósico buscando remover a lignina presente no substrato para facilitar a atuação do microrganismo e uma consequente síntese da enzima. Aguiar e Menezes (2000) avaliaram o processo de produção de celulasas e xilanasas em bagaço de cana sob três formas: a primeira foi o bagaço de cana sem pré-tratamento, a segunda foi o bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio a 4 % (m.v<sup>-1</sup>) e a terceira foi o bagaço de cana tratado com

hidróxido de sódio 4 % (m.v<sup>-1</sup>), ácido fosfórico PA e vapor. Os autores perceberam que a produção de endoglicosidade não sofreu influência do pré-tratamento e que a utilização de hidróxido de sódio a 4 % (m.v<sup>-1</sup>) promoveu maior indução de síntese de celulase total.

#### 2.2.4.7 Microrganismo

Na produção de enzimas por FES, a quantidade reduzida de água no substrato limita o número de microrganismos, sendo que os mais utilizados são os fungos, devido a sua capacidade de tolerar ambientes com baixa quantidade de água (Tabela 1) (COUTO e SANRÓMAN, 2005). Desta forma, os fungos são utilizados em vários processos, desde a compostagem até a produção de enzimas, enquanto que leveduras são mais usadas na indústria de alimentos e na produção de etanol.

Tabela 1 - Principais microrganismos utilizados na fermentação em estado sólido (FES).

<b>Microrganismos</b>
<b>Bactérias</b>
<i>Bacillus</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Serratia</i> sp.
<i>Streptococcus</i> sp.
<i>Lactobacillus</i> sp.
<i>Clostridium</i> sp.
<b>Leveduras</b>
<i>Endomicopsis burtonii</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Schwavviomyces Castelli</i>
<b>Fungos</b>
<i>Alternaria</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Fusarium</i> sp.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Trichoderma</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.
<i>Metharizium</i> sp.
<i>Amylomyces rouxii</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Rhizopus oligosporus</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pleurotus oestreatus</i>
<i>Lentinus edodes</i>
<i>Penicilium notatum</i>
<i>Penicilium roqueforti</i>

**Fonte:** COSTA e SANRÓMAN (2005).

De acordo com Pinto (2003), o próprio modo de crescimento dos fungos gera uma vantagem sobre os microrganismos unicelulares. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas

hifas permitem aos fungos uma rápida colonização em substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. De forma coordenada ao crescimento, os metabólitos excretados pelo microrganismo permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes.

#### 2.2.4.8 Inóculo

A concentração de inóculo constitui fator importante no estudo de otimização nas fermentações em estado sólido, segundo Araújo (2004). Este fato pode ser apontado tendo em vista que uma baixa concentração de inóculo pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, o que pode levar à baixa formação de biomassa. Por outro lado, um inóculo com elevada concentração celular pode aumentar o consumo de nutrientes de forma excessiva do meio para a formação de biomassa, reduzindo a quantidade de produto desejado. Caso se deseje a produção de biomassa é recomendado o emprego de inóculo elevado para evitar contaminantes, no entanto, deve-se ter cuidado para não elevar muito o custo de produção com a preparação de inóculo (ARAÚJO, 2004).

Vários estudos que visam a otimização das condições da fermentação em estado sólido preveem o estudo da concentração do inóculo. Rocha (2010) avaliou o uso de resíduos industriais na produção de enzimas em fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*. Os testes realizados forneceram dados para a escolha da melhor linhagem, além da determinação das condições otimizadas de produção das enzimas. Dentre as variáveis estudadas, uma delas foi a concentração do inóculo, sendo que a melhor concentração foi de 0,25 g/100g de substrato e, nesta condição, a atividade celulásica encontrada foi de  $5,98 \pm 0,8 \text{ U.g}^{-1}$ , demonstrando a boa aplicabilidade do modelo estudado.

#### 2.2.4.9 Substrato

O meio de cultura em um processo de fermentação em estado sólido é um fator tão importante quanto os citados nos itens anteriores. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação das enzimas desejadas. A produção otimizada e as possíveis variáveis que afetam a síntese enzimática devem ser investigadas sempre, pois as condições ótimas variam entre

os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas e para os diferentes substratos (BRAVO et al., 2000). Nos últimos anos, estudos vêm mostrando que os resíduos agroindustriais são adequados para processos de fermentação em estado sólido, como, por exemplo, a produção de enzimas. A escolha de um substrato para esta finalidade depende de vários fatores, principalmente relativo ao custo e disponibilidade, envolvendo assim diversos destes resíduos (PANDEY et al., 2003). Em processos de fermentação em estado sólido, o material sólido atua como fonte de nutrientes para a cultura de microrganismos e também como suporte para as células (PANDEY, 2003). Segundo Pinto et al. (2006) farelos, cascas, bagaços de frutas da agroindústria (maça, maracujá, pedúnculo de caju) e outros, são materiais considerados viáveis para a biotransformação, entretanto, em alguns casos, muitos substratos sólidos são complementados com fontes solúveis de nitrogênio durante a sua preparação, já que o nitrogênio é um nutriente importante no desenvolvimento microbiano (MITCHELL et al., 2000). Além do nitrogênio, outras fontes de nutrientes precisam estar presentes no substrato como a glicose, a sacarose, a maltose, e ainda outros compostos orgânicos mais complexos, por exemplo, amido e celulose (PELCZAR et al., 1980). Gong e Tsao (1975) observaram que indutores da síntese de celulasas incluem celulose, derivados de celulose, celobiose, soforose e lactose. A resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo do indutor, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de enzima celulolítica têm duas funções, ou seja, podem servir como fonte de carbono para o crescimento celular, ou mesmo como indutores da síntese enzimática.

### **2.2.5. Produção de celulasas por fermentação em estado sólido (FES)**

Industrialmente, cultivos submersos são utilizados para produção de celulasas. Porém, a baixa eficiência e o custo relativamente alto dessas enzimas têm dificultado sua aplicação na conversão de biomassa (SINGHANIA et al., 2010). Assim, cada vez mais estudos sobre produção de celulasas têm sido realizados, incluindo a produção por FES, visando diminuir o custo da enzima pelo aumento da produtividade e o uso de resíduos agroindustriais como substrato (CAMASSOLA e DILLON, 2010).

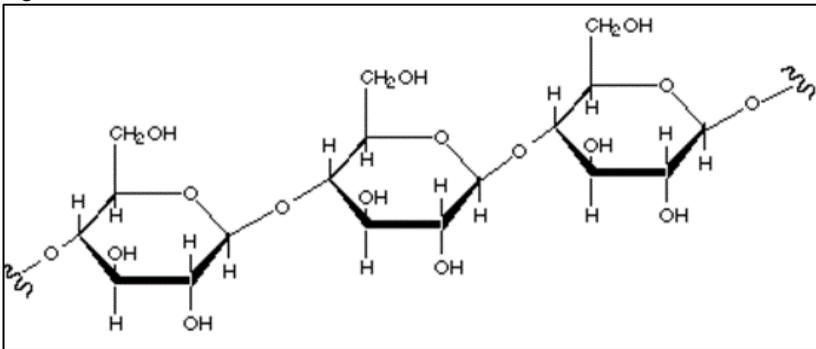
## 2.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

### 2.3.1 Resíduos lignocelulósicos

Os processamentos de matérias-primas de diversas culturas geram todos os anos milhares de toneladas de resíduos agrícolas, gerando problemas ambientais de contaminação provenientes da prática de manejo dos resíduos, como queima a céu aberto, abandono ou enterro. De maneira geral, os resíduos agrícolas são materiais lignocelulósicos, que são formados principalmente por três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN et al., 2007).

A celulose (Figura 2) é um polissacarídeo estrutural derivado da  $\beta$ -glicose de fórmula  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , sendo um polímero de "cadeia longa". A celulose é formada através da união destes monômeros ( $\beta$ -glicose) por meio de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Em termos gerais, a celulose é insolúvel e cristalina, caracterizada por regiões cristalinas em grande parte do seu comprimento, entrecortadas por zonas amorfas. Essa molécula constitui o polissacarídeo predominante nos resíduos vegetais, representando entre 30 e 60 % do seu peso seco total. É o principal componente das paredes celulares, responsáveis pela sustentação vegetal, possuindo uma estrutura altamente resistente (TAVARES, 2009).

Figura 2 - Estrutura da molécula de celulose.



Fonte: TAVARES, 2009

As moléculas de celulose são completamente lineares e têm forte tendência para formar pontes de hidrogênio inter e intramoleculares. Feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas, na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se

alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (TAVARES, 2009).

O reaproveitamento e minimização da emissão de resíduos agroindustriais gerados pelos diferentes bioprocessos tem recebido atenção especial, devido ao impacto ambiental originado do seu tratamento e descarte. Estes materiais, geralmente constituídos de cascas, caroço, sementes e bagaço, podem servir de fonte de matéria orgânica, proteínas, enzimas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e fibras, além de substâncias antioxidantes. Estas fontes podem ser aproveitadas principalmente na indústria alimentícia, cosmética, têxtil e na produção de etanol (MARQUES, 2013).

### **2.3.2 Resíduo de acerola**

A acerola conhecida também como cereja das Antilhas (*Malpighia glabra* L., *Malpighia puniceifolia* L. ou *Malpighia emarginata* DC.) é uma planta que possui origem nas Antilhas, com distribuição no norte da América do Sul e América Central. Possui valor nutricional importante, com alto teor de vitamina C, além de outros nutrientes como carotenoides, tiamina, riboflavina e niacina (ASSIS, LIMA e OLIVEIRA, 2001).

Sendo uma das principais fontes de vitamina C, a acerola é uma fruta que ganhou destaque em função do sabor agradável de seu suco. O sucesso na industrialização da acerola está relacionado à quantidade de polpa que a fruta produz, porém, os resíduos agroindustriais (cascas, sementes e talos) não são aproveitados (AGUIAR et al., 2010).

Os resíduos agroindustriais de acerola destacam-se pela presença de carotenoides e vitamina C, com valores que se aproximam das quantidades encontradas em alimentos que são considerados fontes destes nutrientes. Outras substâncias consideradas antioxidantes são encontradas neste resíduo, como antocianinas, flavonoides e compostos fenólicos totais (SOUSA et al., 2011a).

Em relação ao valor nutricional do resíduo de acerola, quantidades significativas de proteínas, lipídios e carboidratos foram encontradas. Desta forma, este resíduo apresenta valor nutricional e antioxidante, podendo ser utilizado para diversas aplicações biotecnológicas (SOUSA et al., 2011a).

Segundo Martins e Faria (2002), calcula-se que do total de frutas processadas, sejam gerados entre 30 a 40 % de resíduos

agroindustriais. Considerando que mais da metade da produção de acerola anual (aproximadamente 22 mil toneladas em 2006) abastece a indústria de processamento de frutas, a quantidade de resíduos gerados pode ser de grande impacto ambiental (IBRAF, 2009), justificando a sua utilização em processos alternativos que visem agregação de valor e sua reutilização (SOUSA et al., 2011b).

## 2.4 EXTRAÇÃO DE ENZIMAS

### 2.4.1 Definições

Dentre os aspectos relevantes na produção de enzimas por meio de processos fermentativos pode-se destacar a recuperação das biomoléculas produzidas pelos microrganismos. O processo de recuperação é uma combinação específica de operações unitárias necessárias para a obtenção de um grau específico de pureza e rendimento para um soluto específico. Várias operações unitárias podem ser utilizadas para este processo, como filtração, centrifugação, evaporação, cristalização e secagem. Além destas, outras operações também podem fazer parte do processo extrativo, como a filtração por membranas, extração por meio de solventes, além de eletroforese e eletrodiálise. Na extração por meio de solventes, os compostos removidos estabelecem um equilíbrio de distribuição entre solventes imiscíveis, geralmente água, e líquidos orgânicos (DECHOW, 1989).

A lixiviação do material fermentado é um dos métodos extrativos mais utilizados, consistindo na dissolução preferencial de um ou vários solutos de interesse por meio do contato entre um sólido e um solvente líquido (FERNÁNDEZ, 2009). Este método é aplicado como uma etapa inicial para a recuperação de enzimas obtidas, inclusive pela fermentação em estado sólido (SOUZA, 2010).

O processo de extração de enzimas envolve diversos fatores e tipos de solventes que podem ser utilizados, de acordo com características específicas da enzima envolvida, além do processo fermentativo utilizado e fatores que podem influenciar na eficiência do processo de recuperação (SOUSA, 2010).

### 2.4.2 Tipos de solventes

Os solventes mais utilizados na recuperação de enzimas, principalmente no método de lixiviação são a água, tampões, soluções salinas diluídas ou soluções aquosas de glicerol, de modo a obter-se um

extrato enzimático límpido após a operação de separação do tipo sólido-líquido. De forma alternativa, antes da extração, a massa semissólida pode ser submetida à secagem a baixas temperaturas e o material seco pode ser armazenado. O extrato bruto líquido pode também ser concentrado a vácuo ou por ultrafiltração (SOUSA, 2012).

### 2.4.3 Fatores que influenciam na extração de enzimas

Vários fatores influenciam no processo de extração das enzimas e para o desenvolvimento de um processo de recuperação eficiente, como a seleção do equipamento adequado, a preparação dos sólidos, a relação solvente/massa, a temperatura do processo, o pH do solvente, a tensão superficial do líquido, o grau de agitação do sistema e a presença ou não de reação química na extração (FERNÁNDEZ, 2009).

Além do mais, a extração das enzimas deve ser realizada em valores de temperatura e pH onde a estabilidade seja ótima e sua atividade biológica seja igualmente elevada, sem causar danos às biomoléculas ou ao solvente (SOUSA, 2010).

Visando a otimização do processo de extração, vários trabalhos consideraram como fatores a influência da agitação do sistema, o tempo de contato entre o solvente e o substrato fermentado e a relação volume de solvente/massa de substrato (SOUSA et al., 2012).

## 2.5 TRABALHOS DESENVOLVIDOS SOBRE A PRODUÇÃO DE CELULASES

Diversos estudos foram realizados, visando a produção de celulases.

Aleixo-Júnior (2014) obteve celulases a partir do bagaço do pedúnculo do caju utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48 utilizando a fermentação em estado sólido nas condições de 45 % de umidade inicial e 1 % de fonte de nitrogênio, adicionando 0,25 % de carboximetilcelulose por grama de resíduo seco como fonte indutora das enzimas alvo. O estudo foi acompanhado cineticamente com análise de açúcares redutores e atividade enzimática expressa em CMC<sub>ase</sub>, Fpase e celobiase. O pH ótimo e temperatura ótima das enzimas foi determinado. A indução com carboximetilcelulose proporcionou um aumento de atividade em CMC<sub>ase</sub> considerável, comparando com os dados da literatura. As enzimas CMC<sub>ase</sub> e Fpase tiveram atividade ótima em temperatura de 50 °C e pH entre 4,0 e 5,0. A biomassa do resíduo do bagaço do pedúnculo do caju, mostrou ter potencial para ser

utilizado na fermentação para produção de enzimas celulases e, além disso, a indução com carboximetilcelulose mostrou ter um efeito positivo na obtenção de tais enzimas.

Florencio (2011) realizou um estudo com o objetivo de avaliar e selecionar isolados de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, disponíveis nos bancos da Embrapa, capazes de produzir altas concentrações de enzimas do complexo celulolítico. O trabalho foi dividido em quatro etapas até a seleção final das melhores linhagens. Para avaliação da produção enzimática em FES realizou-se inicialmente um planejamento experimental fatorial e as variáveis estudadas foram: concentração do inoculo, umidade e proporção de bagaço de cana (BC), porém apenas a proporção de BC apresentou-se como variável significativa. A partir deste resultado, foi realizado um delineamento composto central rotacional com as variáveis: proporção de BC e umidade. A proporção de BC foi significativa e a atividade enzimática alcançou  $11,16 \text{ UI.g}^{-1}$  de CMCCase. As etapas de seleção avaliadas neste trabalho foram consideradas efetivas e as seleções qualitativas se mostraram rápidas para seleção de um extenso banco de fungos.

Gasparotto e colaboradores, em 2014, estudaram as melhores condições de processo para produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais, e a aplicação do extrato enzimático produzido na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. A produção de exocelulases, endocelulases e xilanases foi avaliada por fermentação em estado sólido. O substrato sólido para a produção da enzima foi composto por bagaço de cana como fonte de carbono principal, suplementadas com farelo de soja e água de maceração de milho. As condições otimizadas foram: 68,6 % de umidade, 0,9 % de farelo de soja, 15 % de água de maceração e milho e quatro dias de fermentação, a 28 °C. O extrato enzimático bruto obtido foi aplicado para a hidrólise do bagaço de cana *in natura* em banho de água com e sem ultrassom, sendo obtidos 229,0 e 224  $\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente, a 43,4 °C e 18,6 % de extrato enzimático, com razão sólido/líquido igual a 0,15 e quatro horas de reação. Os rendimentos obtidos são comparáveis às enzimas comerciais, indicando que as enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* podem ser uma boa alternativa para a sacarificação de material lignocelulósico residual.

Em estudo interessante desenvolvido por Marra et al., em 2015, foram avaliadas diferentes condições de pH, umidade e concentração de indutores na produção de celulases por FES, utilizando *Trichoderma* sp e como substrato bagaço de cana-de-açúcar. Como

resultados, o meio de cultura que forneceu a melhor atividade enzimática (AE), atingindo o valor de  $2,695 \text{ U.g}^{-1}$ , foi preparado em pH 7 e com razão sólido-líquido 1:9. Utilizando o meio de cultura selecionado, os efeitos da presença dos indutores carboximetilcelulose (CMC) e lactose, individualmente, em diferentes concentrações foram avaliados, resultando em níveis de atividade enzimática elevadas consideravelmente para ambos os indutores. A lactose apresentou a maior atividade enzimática, com a concentração de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  ( $22,948 \text{ U.g}^{-1}$ ) e a carboximetilcelulose com concentração de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  ( $18,153 \text{ U.g}^{-1}$ ).

Santos e colaboradores (2014b) avaliaram a utilização de resíduos agroindustriais (folha e pseudocaule de bananeira, casca e coroa do abacaxi e farelo de trigo) como substrato para produção de celulasas por *Trichoderma reesei* em cultivo por fermentação em estado sólido. A temperatura de incubação foi de  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , e o tempo total de fermentação de 5 dias. Retiraram-se amostras a cada 24h, inclusive a 0h, para análise da atividade CMCCase, por dosagem de açúcares redutores liberados da reação do extrato enzimático com soluções de CMC 4 % (m.v<sup>-1</sup>). A atividade CMCCase (endoglucanase) nas folhas de bananeira variou de 0,47 a  $2,86 \text{ U.g}^{-1}$ , sendo que a máxima atividade foi obtida com tempo de fermentação de 96 horas. Para os cultivos realizados com o pseudocaule de bananeira, observou-se que não houve crescimento do microrganismo durante os dias de cultivo. Nos resíduos de abacaxi, observou-se que não houve produção de CMCCase e isso pode ser justificado pelos valores do teor de sólidos solúveis, que foram altos, o que leva a acreditar na presença de glicose nestes resíduos.

Mekala e colaboradores, em 2008, utilizaram o bagaço de cana como substrato para a produção de celulase utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30 por fermentação em estado sólido e os parâmetros da cultura otimizados para melhorar rendimento de celulase foram a temperatura, tempo de incubação e concentração indutora, utilizando o planejamento experimental Box-Behnken. Os parâmetros otimizados demonstraram aumento no rendimento de celulase, e os maiores valores encontrados foram de  $25,6 \text{ FPU.g}^{-1}$  quando a concentração indutora foi de  $0,331 \text{ mL.g}^{-1}$ , e a temperatura e tempo de incubação foi de  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  e 67 horas, respectivamente.

Já no estudo desenvolvido por Maurya e colaboradores, em 2012, a produção de celulase foi avaliada utilizando *T. reesei* NCIM

992 e como substrato da fermentação em estado sólido três resíduos lignocelulolíticos. Vários parâmetros foram avaliados na produção enzimática, como pH, temperatura teor de umidade, tamanho de partícula, e agente umidificante. A produção máxima de celulose foi de  $2,63 \text{ U.mL}^{-1}$  utilizando farelo de trigo como substrato, e as condições otimizadas foram umidade inicial de 70 %, pH médio inicial de 5,0, temperatura de 30 °C, MSS como agente umidificante e tamanho de partícula de 500  $\mu\text{m}$ . O tempo otimizado para incubação foi de seis dias.

Em um outro estudo desenvolvido por Brijwani e colaboradores, em 2010, a fermentação em estado sólido de cascas de soja suplementadas com farelo de trigo utilizando uma co-cultura de *T. reesei* e *Aspergillus oryzae* foi desenvolvida e três parâmetros foram testados – teor de umidade inicial, temperatura de incubação e pH inicial, utilizando a metodologia de superfície resposta. A temperatura de 30 °C, pH de 5,0 e umidade inicial de 70% foram encontrados como sendo as condições otimizadas, valores que estão coerentes com outros estudos (MAURYA et al., 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 RESÍDUO AGRINDUSTRIAL DE ACEROLA

O resíduo de acerola utilizado nesse trabalho foi cedido pela indústria de beneficiamento de frutas NIAGRO - Nichirei do Brasil Agrícola Ltda., localizada no distrito industrial em Petrolina/PE. A coleta do resíduo foi realizada no Decanter modelo SC 4506076 e o mesmo foi transportado imediatamente para o Laboratório Experimental de Alimentos (LEA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF Sertão-PE).

Neste laboratório o resíduo foi submetido à três etapas de preparo: secagem, moagem e armazenamento. A secagem foi realizada em um secador de bandejas com circulação forçada de ar a uma temperatura de 55 °C até que fosse atingida massa constante, o que levou aproximadamente 8 horas. Após o processo de secagem, o resíduo foi então moído em um moinho de facas (Figura 3) e por fim foi embalado a vácuo em embalagens de polietileno de alta densidade (Figura 4).

Figura 3 - Resíduo de acerola desidratado e moído.



Figura 4- Resíduo de acerola desidratado, moído e embalado a vácuo.



### 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RESÍDUO

Como etapa inicial do trabalho, foi realizada uma caracterização físico-química do resíduo de acerola, na sua forma desidratada e moída, com o objetivo de avaliar quais são os componentes presentes no material, de forma que fosse verificada a possibilidade desse resíduo ser utilizado como substrato na fermentação em estado sólido para produção de enzimas celulolíticas.

A caracterização físico-química do resíduo de acerola foi realizada quanto à granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade do leito formado pelo resíduo, umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, hemicelulose, pH, sólidos solúveis, açúcares redutores e pectina, de acordo com as metodologias descritas a seguir. As análises foram realizadas em cinco repetições para que fosse possível a determinação do valor médio, do desvio padrão e do coeficiente de variação.

### 3.2.1 Granulometria

O perfil granulométrico do resíduo foi determinado seguindo as recomendações da NBR – 7181 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1984).

Para isso, foram pesados 50 g do resíduo em uma balança analítica, transferindo-os para um agitador de peneiras PRODUTEST e submetido a uma frequência de 50 rpm por treze minutos, em jogo constituído por sete peneiras: 18 mesh (1,000 mm), 20 mesh (0,850 mm), 30 mesh (0,595 mm), 50 mesh (0,297 mm), 60 mesh (0,250 mm), 70 mesh (0,210 mm), 80 mesh (0,177 mm) e 100 mesh (0,150 mm). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados foram expressos percentualmente em relação ao peso da amostra analisada.

### 3.2.2 Densidade Aparente

A densidade aparente do material foi determinada seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005), na qual foram pesados 100 g ( $m_A$ ) do material, sendo a massa colocada em uma proveta, sem que houvesse compactação, para determinar o volume ( $V$ ) ocupado pela amostra. A densidade aparente foi determinada seguindo a Equação 1.

$$\text{Densidade Aparente (g / cm}^3\text{)} = \frac{m_A}{V} \quad (1)$$

### 3.2.3 Densidade Real

A densidade real foi determinada também pela metodologia descrita em Brasil (2005), a partir da relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra, através do deslocamento de um fluido de volume conhecido, que nesse caso foi o óleo de soja comercial. Inicialmente colocou-se o óleo em uma proveta e mediu-se o seu volume ( $V_1$ ), em seguida adicionou-se uma massa conhecida do resíduo ( $m_A$ ) e esperou-se que a mesma se depositasse totalmente no fundo da proveta. Por fim, mediu-se novamente o volume indicado na proveta ( $V_2$ ), e o volume real ocupado pelo resíduo foi determinado pela diferença entre esses volumes ( $V_2 - V_1$ ). A densidade real foi determinada pela Equação 2.

$$Densidade\ Real\ (g/cm^3) = \frac{m_A}{(V_2 - V_1)} \quad (2)$$

### 3.2.4 Porosidade do leito

A porosidade do leito formado pelo resíduo foi determinada seguindo a metodologia descrita por Keey (1991), como mostrado na Equação 3.

$$Porosidade = 1 - \frac{Densidade\ Aparente}{Densidade\ Real} \quad (3)$$

### 3.2.5 Umidade

A determinação da umidade (U (%)) do material foi realizada seguindo-se a metodologia descrita em Moraes et al. (2010).

Para o desenvolvimento da metodologia foram pesados aproximadamente 3 g do resíduo ( $m_A$ ) em um cadinho de porcelana previamente seco e pesado ( $m_C$ ). Em seguida, a amostra foi levada a uma estufa sem circulação forçada de ar a uma temperatura de 105 °C até atingir massa constante. Após a secagem, o material foi colocado em um dessecador no qual permaneceu até resfriamento total da amostra e, por fim, pesou-se o cadinho com a amostra seca ( $m_{AS105}$ ). A umidade foi determinada seguindo a Equação 4.

$$U(\%) = \frac{m_{AS105} - m_C}{m_A} * 100 \quad (4)$$

### 3.2.6 Cinzas

O teor de cinzas contidos no resíduo foi determinado seguindo a metodologia descrita em Moraes et al. (2010). Um cadinho de porcelana foi colocado em uma mufla a uma temperatura de 600 °C por aproximadamente 1 hora. Após esse tempo, o cadinho foi colocado em um dessecador até total resfriamento e pesado ( $m_C$ ). Em seguida, pesou-se aproximadamente 3 g do material a ser analisado ( $m_A$ ) e levou-se para uma estufa a 105 °C por 24 horas. Após esse tempo o cadinho com a amostra foi levado para a mufla e submetido à um aquecimento

gradativo com uma velocidade máxima de  $9,6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até alcançar  $600 \text{ }^\circ\text{C}$ . O material foi mantido nessa temperatura por um período de 3 horas e, em seguida, a temperatura do equipamento foi diminuída de forma que alcançasse  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  em 2 horas. Por fim, a amostra foi colocada em um dessecador contendo sílica gel até total resfriamento e pesada ( $m_{AS600}$ ). O teor de cinzas foi calculado seguindo a Equação 5.

$$\text{Cinzas}(\%) = \frac{m_{AS600} - m_C}{m_A} * 100 \quad (5)$$

### 3.2.7 Extrativos

O teor de extrativos contidos no resíduo de acerola foi determinado seguindo também a metodologia descrita em Moraes et al. (2010).

Inicialmente, pesou-se um papel de filtro qualitativo ( $m_P$ ) previamente seco à  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas e resfriado à temperatura ambiente. Nesse mesmo papel de filtro foram pesados aproximadamente 5 g do resíduo de acerola seco ( $m_A$ ). Em seguida o conjunto papel-amostra foi dobrado, formando um cartucho para ser depositado dentro de um aparelho Soxhlet.

Paralelamente, foi montado um sistema de extração unindo-se um aparelho de Soxhlet a um condensador de bolas e a um balão de fundo redondo de 250 mL. No balão de fundo redondo foram colocados 100 mL de álcool etílico e 100 mL de hexano e no aparelho de soxhlet foi acondicionado o cartucho feito da amostra. Todo o conjunto foi então colocado em uma manta aquecedora, permanecendo assim por um período de 6 horas em um sistema de refluxo.

Após esse tempo, o balão contendo o solvente com os extrativos foi removido e o solvente foi recuperado para ser utilizado em outras análises. O cartucho contendo a amostra isenta de extrativos foi levado à estufa à  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  por um período de 24 horas e, por fim, foi pesado ( $m_{A-E}$ ), após resfriamento total em dessecador.

O teor de extrativos contidos no resíduo de acerola foi determinado por meio da Equação 6, na qual, utiliza-se como denominador da equação a massa do resíduo corrigida devido ao fato da amostra utilizada ter sido submetida ao processo de secagem.

$$E(\%) = \frac{m_A - (m_{A-E} - m_P)}{m_A} * 100 \quad (6)$$

$$(1-U)$$

### 3.2.8 Lignina

O teor de lignina foi determinado seguindo a metodologia descrita em Moraes et al. (2010). Para o desenvolvimento da metodologia, foi pesado aproximadamente 1 g do resíduo de acerola ( $m_A$ ), seco e na sua forma sem extrativos, e adicionados exatos 17,00 mL de ácido sulfúrico à 72 % ( $m.m^{-1}$ ). Com o auxílio de um pistilo, todas as partículas do resíduo foram maceradas até total digestão e a mistura foi deixada em descanso por 24 horas. Após esse tempo, o ácido foi diluído a 4 % ( $m.m^{-1}$ ) pela adição de exatos 306 mL de água destilada.

Em seguida, a mistura foi transferida quantitativamente para um balão de 500 mL e levada a um sistema de refluxo com a adaptação de um condensador de bolas, permanecendo esse sistema ligado à uma manta aquecedora. O material foi aquecido e deixado em refluxo por 4 horas. Por fim, a amostra foi filtrada com o auxílio de uma bomba à vácuo e de um funil de vidro sinterizado – ASTM tipo F previamente seco e pesado ( $m_F$ ). A amostra foi lavada com água destilada até que o pH da água de lavagem estivesse próximo ao da água destilada. Por fim, o sistema funil-lignina foi levado à estufa à 105 °C por um período de 24 horas, sendo pesado após total resfriamento ( $m_{AS}$ ).

A concentração de lignina foi determinada com base na Equação 7, na qual “U” refere-se à umidade e “E” ao teor de extrativos do resíduo de acerola.

$$L(\%) = \frac{m_{AS} - m_F}{m_A} * 100 \quad (7)$$

$$(1-U)(1-E)$$

### 3.2.9 Holocelulose

O teor de holocelulose contido no resíduo de acerola foi determinado seguindo também a metodologia descrita em Moraes et al. (2010). Para o desenvolvimento da metodologia, foram pesados, em um

erlenmeyer de 500 mL, aproximadamente 3 g do resíduo de acerola ( $m_A$ ), seco e na sua forma sem extrativos. O sistema foi colocado em um banho-maria com temperatura em torno de 70 °C e sob um agitador magnético para que a reação ocorresse sob agitação. Ao erlenmeyer foi adicionado 2,5 g de clorito de sódio, com pureza aproximada de 80 % ( $m.m^{-1}$ ), e 1 mL de ácido acético glacial com pureza mínima de 99,85 % ( $v.v^{-1}$ ). Com o sistema aquecido e em agitação, tampou-se o frasco com um erlenmeyer de 25 mL, por 1 hora. Após esse tempo, foi adicionado mais 1 mL de ácido acético glacial e deixou-se a reação ocorrer por mais uma hora. Em seguida, adicionou-se mais 1 mL de ácido acético glacial e deixou-se o sistema sob aquecimento e agitação por mais 3 horas.

Em seguida, com o auxílio de um sistema de filtração a vácuo com um funil de vidro sinterizado previamente seco e pesado ( $m_F$ ), filtrou-se toda amostra e o sistema funil-amostra foi levado à estufa à 105 °C por um período de 24 horas. Após esse tempo, o funil foi resfriado em um dessecador contendo sílica gel e pesado ( $m_{AS}$ ).

A quantificação da holocelulose contida no resíduo de acerola seguiu a Equação 8.

$$H(\%) = \frac{m_{AS} - m_F}{m_A} * 100 \quad (8)$$

$$(1 - U)(1 - E)$$

### 3.2.10 Alfa-celulose

O teor de  $\alpha$ -celulose contido no resíduo de acerola foi determinado também seguindo a metodologia descrita em Moraes et al. (2010). Para o desenvolvimento da metodologia, foi pesado 1 g da amostra ( $m_A$ ) obtida após a análise de holocelulose e adicionados 15 mL de hidróxido de sódio a 17,5 % ( $m.v^{-1}$ ). Após 2 minutos de contato em repouso, triturou-se o material, com o auxílio de um pistilo, por exatos 8 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 40 mL de água destilada e a mistura foi filtrada com um funil de vidro sinterizado, previamente seco e pesado ( $m_F$ ), em um sistema de filtração à vácuo.

Após a filtração, o sistema funil- $\alpha$ -celulose foi levado à estufa a 105 °C por um período de 24 horas. Passadas as 24 horas de secagem, o sistema foi resfriado em dessecador com sílica gel e pesado em balança analítica ( $m_{AS}$ ).

A concentração de  $\alpha$ -celulose contida no resíduo de acerola foi determinada seguindo a Equação 9.

$$\alpha C(\%) = \frac{m_{AS} - m_F}{\frac{m_A}{(1-U)(1-E)(1-H)}} * 100 \quad (9)$$

### 3.2.11 pH

O pH do resíduo de acerola foi determinado seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005), na qual foi preparada uma suspensão de 4 g de amostra com 40 mL de água destilada. Após completa homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e em seguida o pH foi medido diretamente em um potenciômetro digital, previamente calibrado.

### 3.2.12 Sólidos Solúveis (°Brix)

O teor de sólidos solúveis contidos no resíduo de acerola foi determinado seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005), na qual uma amostra de 1 g foi misturada a um volume de água destilada ( $V_{H_2O}$ ) que fornecesse uma leitura dentro das limitações do equipamento. Após completa homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e filtrada em papel de filtro qualitativo. Por fim, foi realizada a leitura do °brix em um refratômetro de Abbe e o teor de sólidos solúveis do material em análise foi determinado multiplicando o teor obtido na leitura do equipamento pelo fator de diluição, seguindo a Equação 10.

$$^{\circ}Brix(\%) = ^{\circ}Brix_{Equip} * V_{H_2O} \quad (10)$$

### 3.2.13 Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), com algumas adaptações, a qual se baseia na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 3-amino-5-nitrosalicílico, simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Para o desenvolvimento da metodologia, inicialmente preparou-se um extrato de açúcares por meio da imersão de uma amostra do

resíduo em água destilada. Para isso, foi pesada uma massa da amostra ( $m_A$ ) em balança analítica e adicionado um volume de água destilada ( $V_A$ ) de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração para que a concentração de açúcares redutores pudesse ser calculada com base no fator de conversão ( $F_C$ ) da curva de calibração realizada previamente.

Para a determinação dos açúcares redutores, 1 mL do extrato de açúcares foi colocado em um tubo de ensaio com 1 mL do DNS e levados à fervura em banho-maria por exatos 5 minutos. Em seguida, o tubo de ensaio foi resfriado em água fria e adicionou-se 8 mL de água destilada. A leitura da absorbância da amostra foi então realizada em um espectrofotômetro UV-Vis em um comprimento de onda de 540 nm, previamente zerado com uma amostra em branco que foi submetida ao mesmo procedimento, mas ao invés de 1 mL de extrato de açúcares, foi utilizado 1 mL de água destilada que foi o fluido utilizado na extração dos açúcares presentes na amostra a ser analisada.

Os resultados de açúcares redutores foram expressos em gramas de açúcares redutores por grama de amostra, seguindo a Equação 11.

$$AR(g_{AR} / g_A) = \frac{\text{Absorbância} * F_C * V_A}{m_A} \quad (11)$$

### 3.2.14 Pectina

A concentração de pectina contida no resíduo de acerola foi determinada seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005).

Uma amostra de 20 g de resíduo ( $m_A$ ) foi adicionada em 400 mL de ácido clorídrico à 0,05 N e levada à fervura por um período de 2 horas. Após esse tempo, a mistura foi resfriada totalmente e seu volume foi completado para 500 mL. Após ser filtrada, 200 mL da mistura ( $V_F$ ) foram diluídos em 250 mL de água destilada e foram neutralizados com o auxílio de hidróxido de sódio 1 N. Após passar uma noite em repouso, foram adicionados 50 mL de ácido acético 1 N e após 5 minutos 25 mL de cloreto de cálcio 1 N. A amostra foi levada à ebulição por 2 minutos e deixada em repouso por 3 horas. Após esse tempo, a amostra foi filtrada, com o auxílio de uma bomba à vácuo, em papel de filtro qualitativo previamente seco e pesado ( $m_P$ ).

Em seguida, o papel de filtro contendo o pectato de cálcio foi levado à estufa a 105 °C por um período de aproximadamente 14 horas até alcançar massa constante. Por fim, o papel de filtro contendo o

pectato seco foi resfriado em um dessecador com sílica gel e pesado em balança analítica ( $m_{AS}$ ).

O teor de pectina contido no resíduo de acerola foi calculado com base na Equação 12.

$$P(\%) = \frac{(m_{AS} - m_P) * 500}{m_A * V_F} * 100 \quad (12)$$

### 3.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE DO RESÍDUO

Para o levantamento das isotermas de adsorção de água do resíduo de acerola foram preparadas diversas amostras do resíduo com umidades diferentes, de forma a obter-se diferentes atividades de água no mesmo material. Dessa forma, foram preparadas amostras de 5 g de resíduo com diferentes volumes de água destilada, variando de 0 a 5 mL de água destilada para cada 5 g de resíduo, de modo a simular as condições de incubação de uma fermentação em estado sólido. Após ser umedecida, cada amostra preparada foi levada à geladeira em recipientes herméticos e deixados por um período de 24 horas em repouso para uniformizar o meio.

Após as 24 horas, as amostras foram retiradas da geladeira, deixadas em um dessecador para atingir a temperatura ambiente e em seguida foram realizadas as análises de atividade de água e de umidade de equilíbrio do material.

A determinação da atividade de água das diversas amostras foi realizada no equipamento Termoconstanter Novasina TH200, instrumento projetado para a medida de atividade de água. Neste equipamento, a temperatura da câmara de medição onde foram colocadas as amostras é regulada por meio de um controlador localizado na frente do mesmo, que serve para fixar o valor da temperatura desejada com variação menor que 0,2 °C, em toda a sua área de trabalho, que é de 0 a 50 °C. A referida câmara, combinada com o regulador de temperatura, forma um mini gabinete climático e é equipada com um sensor de umidade e de temperatura – enBSK Novasina. Este sensor mede a atividade e temperatura de quantidades de amostras pequenas, como pós, granulados, pastas e líquidos. Este equipamento possui o transmissor RTD-200, que converte os sinais da célula de medição em valores de umidade relativa (atividade de água) e de temperatura.

A atividade de água das amostras foi analisada à 20, 25, 30 e 35 °C e as análises de umidade de equilíbrio foram realizadas seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005), como citado no item 3.2.5 da caracterização físico-química. A partir dos dados de atividade de água e da umidade de equilíbrio, foram construídas as isotermas de sorção do material.

### 3.4 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CELULASES

#### 3.4.1 Planejamento Experimental para produção de celulases

Para o estudo da produção de celulases por fermentação em estado sólido, foi realizado um planejamento fatorial do tipo  $2^2$  com cinco repetições no ponto central, totalizando 9 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória.

No planejamento experimental, as variáveis independentes foram a umidade inicial do material a ser fermentado ( $U_i$ ) e a concentração da fonte adicional de nitrogênio (sulfato de amônio), por ser este um nutriente importante no desenvolvimento microbiano. A variável dependente avaliada foi a atividade celulolítica, expressa em carboximetilcelulase. Os valores adotados para as variáveis foram baseados em valores estudados por Tavares (2009), Amorim (2010) e Lins (2012) na produção de celulases com diferentes resíduos agroindustriais.

O estudo seguiu os níveis estipulados na Tabela 2 e a matriz do planejamento está apresentada na Tabela 3 que apresenta as variáveis utilizadas no planejamento, bem como suas codificações e seus níveis. A análise do planejamento experimental foi realizada utilizando-se o software Statistica 12.0.

Tabela 2 - Níveis do planejamento experimental da produção de enzimas celulolíticas.

<b>Variável</b>	<b>(-1)</b>	<b>(0)</b>	<b>(+1)</b>
$U_i$ (% , m.m <sup>-1</sup> )	45,00	55,00	65,00
N (% , m.m <sup>-1</sup> )	0,50	0,75	1,00

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental fatorial  $2^2$  com cinco repetições no ponto central.

Ensaio	U (% , m.m <sup>-1</sup> )	N (% , m.m <sup>-1</sup> )
1	-1 (45,00)	-1 (0,50)
2	+1 (65,00)	-1 (0,50)
3	-1 (45,00)	+1 (1,00)
4	+1 (65,00)	+1 (1,00)
5	0 (55,00)	0 (0,75)
6	0 (55,00)	0 (0,75)
7	0 (55,00)	0 (0,75)
8	0 (55,00)	0 (0,75)
9	0 (55,00)	0 (0,75)

### 3.4.2 Microrganismo e Inóculo

#### 3.4.2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo lignocelulolítico *Trichoderma reesei* (LCB 48), presente no estoque de culturas da Embrapa Semiárido, localizada em Petrolina, Pernambuco. O *Trichoderma reesei* foi mantido em tubos tipo eppendorf em blocos de ágar de 4-6 mm<sup>3</sup>, na presença de água estéril, e estocados a temperatura de 8 °C (CASTELLANI, 1939). A conservação de fungos em frascos com água destilada estéril é de fácil manejo, armazenamento e transporte, além de ser uma forma de armazenamento mais econômica do que o método tradicional de repiques sucessivos. Esse método mantém a atividade enzimática natural dos fungos, já que a constante repicagem dos fungos em diferentes meios pode resultar em uma alteração genética. Diogo et al. (2005), ao estudar a preservação de fungos em água estéril, observou que a preservação das cepas pelo método possibilitou, por 12 meses, a manutenção da viabilidade e capacidade de esporulação de diversos fungos.

Utilizando o tubo tipo eppendorf contendo o fungo em água estéril, foi realizado o primeiro repique. Para tal, foram retiradas algumas gotas da suspensão de esporos e transferidas para placas de Petri contendo meio básico formulado pelo laboratório do CTAA (Embrapa Agroindústria de Alimentos), no qual a pectina é a única fonte de carbono, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do meio básico.

COMPONENTES (GRAU p.a.)	CONCENTRAÇÃO (g.L <sup>-1</sup> )
Pectina Cítrica	10,00
NaNO <sub>3</sub>	3,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
MgSO <sub>4</sub>	0,50
KCl	0,50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Agar-Agar	20,00
Água destilada	q.s.p.

Fonte: COURI (1993).

Após inocular o fungo *Trichoderma reesei* em placas de Petri, as mesmas foram incubadas a 28 °C por um período de 10 a 12 dias, ou tempo necessário para que as placas fossem totalmente cobertas por esporos. Após esse tempo, as placas foram mantidas sob refrigeração até o momento do segundo repique.

A partir do repique em placas de Petri, foi realizado o repique em arroz. O arroz foi usado como substrato devido o fungo poder crescer em uma superfície maior e, conseqüentemente, aumentar sua esporulação. Chávez (2006), estudando a otimização da produção de esporos do fungo *Trichoderma*, empregando diferentes substratos como arroz, aveia, soja, trigo, cevada entre outros, obteve como melhor substrato o arroz (umedecido em água destilada). Tal substrato proporcionou melhor recuperação dos conídios ( $45 \times 10^{18}$  conídios.mL<sup>-1</sup>) e pureza estimada de 92,1 %.

Este meio de cultura à base de arroz foi preparado segundo protocolo da EMBRAPA/CPATSA. Para isto, uma quantidade de arroz suficiente para realizar o repique (aproximadamente 150 g) foi umidificada com água destilada numa quantidade suficiente para cobrir o arroz. Deixou-se o arroz imerso na água por aproximadamente 30 minutos e, com auxílio de peneira, retirou-se o excesso de água. Em seguida, erlenmeyers de 250 mL, contendo 15 g do arroz previamente umedecido, foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C e, após resfriamento total do arroz, o microrganismo foi inoculado.

Para inoculação do *Trichoderma reesei* no arroz, foram adicionados, a cada placa de Petri contendo o microrganismo, 10 mL de espessante (Tween 80 à 0,3 % (v.v<sup>-1</sup>)) e, com o auxílio da alça de platina, foi feito o desprendimento dos esporos contidos no meio de cultivo, deixando a suspensão homogênea. Com o auxílio de um

pipetador automático, inoculou-se 1 mL dessa suspensão de esporos em cada erlenmeyer contendo arroz úmido e esterilizado. Em seguida, os frascos foram fechados com tampão de gaze e algodão e incubados a 28 °C por período de 10 a 12 dias, ou até que todo o arroz estivesse coberto de esporos. Após o período de cultivo, os frascos foram mantidos sob refrigeração por período máximo de 3 meses e utilizados na preparação do inóculo nos ensaios de fermentação.

### 3.4.2.2 Inóculo

O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado adicionando-se 60 mL de espessante (Tween 80 a 0,3 % (v.v<sup>-1</sup>)) nos frascos de arroz contendo os esporos. Após agitação, a suspensão foi filtrada com auxílio de gaze e algodão estéreis, sendo realizada a contagem dos esporos e a incubação.

A quantificação da suspensão de esporos obtida foi feita por meio de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer espelhada e o volume de suspensão de esporos a ser adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se um inóculo de 10<sup>7</sup> esporos por grama de substrato sólido fixada nos 9 ensaios listados na matriz do planejamento (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

A concentração de esporos do inóculo foi calculada seguindo a Equação 13 e o volume de suspensão a ser inoculada foi calculado por meio da Equação 14.

$$C_{Esporos}(esporos/mL) = \bar{E} * 25 * 10^4 * F_D \quad (13)$$

$$V_{Suspensão}(mL) = \frac{C_{Inoculo}(esporos/g) * m(g)}{C_{Esporos}(esporos/mL)} \quad (14)$$

Onde:

$C_{Esporos}$  – concentração de esporos na suspensão (esporos.mL<sup>-1</sup>);

$\bar{E}$  – média de esporos contados na Câmara de Neubauer;

$F_D$  – fator de diluição para contagem na Câmara de Neubauer;

$C_{Inóculo}$  – concentração de inóculo desejada para a fermentação;

$m$  – massa de substrato a ser fermentada.

### 3.4.3 Ensaios de Fermentação

As fermentações em estado sólido foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo o substrato previamente umidificado, de acordo com as condições do planejamento experimental.

A umidade inicial do meio foi ajustada para 45, 55 e 65 % ( $\text{m.m}^{-1}$ ) (base úmida) pela adição de um volume definido de água destilada, que foi determinado por meio de um balanço de massa, seguindo a Equação 15, a qual leva em consideração que a densidade da água é igual a  $1,00 \text{ g.cm}^{-3}$  (à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ):

$$V_{AA} = m_{AA} = \frac{m_i(U_2 - U_1)}{(1 - U_2)} \quad (15)$$

Onde:

$V_{AA}$  – volume de água a ser adicionada ao meio;

$m_{AA}$  – massa de água a ser adicionada ao meio;

$m_i$  – massa de meio a ser umidificado;

$U_1$  – umidade natural do meio;

$U_2$  – umidade do meio desejada;

A umidade relativa dentro da estufa durante o processo fermentativo foi mantida constante por meio da evaporação da água contida em um recipiente colocado dentro da estufa.

A suplementação do substrato com a fonte de nitrogênio foi realizada adicionando-se sulfato de amônio a 0,50, 0,75 e 1,00 % ( $\text{m.m}^{-1}$ ) que são as concentrações a serem estudadas no planejamento. Para isso, a massa de nitrogênio foi pesada e diluída no volume de água calculado pelo balanço de massa, citado anteriormente. Por fim, adicionou-se ao substrato a água já com o suplemento de nitrogênio efetuando-se a homogeneização da mistura. O meio foi deixado em repouso em geladeira por 24 horas em recipientes herméticos.

Após 24 horas, 20,00 g do substrato foram colocados em erlenmeyers de 250 mL, vedados com tampões de gaze e algodão, e em seguida, autoclavados por 15 minutos a 1 atm.

Para realização das fermentações, o microrganismo foi inoculado no meio com uma concentração de  $10^7$  esporos. $\text{g}^{-1}$  de substrato úmido e incubados em estufa a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . As amostras foram retiradas a cada 24 horas durante um período de 15 dias, determinando-

se a umidade do meio, o pH, os açúcares redutores e a atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase (endoglicanases). Para a realização das análises periódicas e para a extração das enzimas, cada frasco coletado foi submetido a uma homogeneização do meio fermentado de forma a obter amostras reprodutivas e minimizar os erros de amostragem.

### 3.4.4 Análises Periódicas

#### 3.4.4.1 Umidade

A determinação da umidade ao longo do processo foi realizada, semelhantemente à caracterização físico-química, como citado no item 3.2.5, seguindo-se a metodologia descrita em Moraes et al. (2010).

Para o desenvolvimento da metodologia foram pesados aproximadamente 3 g do meio fermentado ( $m_A$ ) em um cadinho de porcelana previamente seco e pesado ( $m_C$ ). Em seguida, a amostra foi levada a uma estufa sem circulação forçada de ar a uma temperatura de 105 °C até atingir massa constante. Após a secagem, o material foi colocado em um dessecador, no qual permaneceu até resfriamento total da amostra e, por fim, pesou-se o cadinho com a amostra seca ( $m_{AS105}$ ). A umidade foi determinada seguindo a Equação 16.

$$U(\%) = \frac{m_{AS105} - m_C}{m_A} * 100 \quad (16)$$

#### 3.4.4.2 pH

O pH do meio fermentativo foi determinado seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005). Para isso, foi preparada uma suspensão de 1 g de amostra com 10 mL de água destilada. Após completa homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e em seguida o pH foi medido diretamente em um potenciômetro digital, previamente calibrado.

#### 3.4.4.3 Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), com algumas adaptações, a qual se baseia na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 3-

amino-5-nitrosalicílico, simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Para o desenvolvimento da metodologia foi pesada uma massa da amostra ( $m_A$ ) em balança analítica e adicionado um volume de água destilada ( $V_A$ ) de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração para que a concentração de açúcares redutores pudesse ser calculada com base no fator de conversão ( $F_C$ ) da curva de calibração realizada previamente.

Para a determinação dos açúcares redutores, 1 mL do extrato de açúcares foi colocado em um tubo de ensaio com 1 mL do DNS e levados à fervura em banho maria por exatos 5 minutos. Em seguida, o tubo de ensaio foi resfriado em água e adicionou-se 8 mL de água destilada. A leitura da absorbância da amostra foi então realizada em um espectrofotômetro UV-Vis em um comprimento de onda de 540 nm, previamente zerado com uma amostra em branco que foi submetida ao mesmo procedimento, mas ao invés de 1 mL de extrato de açúcares, foi utilizado 1 mL de água destilada que foi o fluido utilizado na extração dos açúcares presentes na amostra a ser analisada.

Os resultados de açúcares redutores foram expressos em gramas de açúcares redutores por grama de amostra analisada, seguindo a Equação 17.

$$AR(g_{AR} / g_A) = \frac{\text{Absorbância} * F_C * V_A}{m_A} \quad (17)$$

Onde:

- $V_A$ : volume de água destilada utilizado na diluição da amostra;
- $F_C$ : fator de conversão da absorbância em g de AR por litro de solução;
- $m_A$ : massa da amostra.

#### 3.4.4.4 Extração de Enzimas

A extração das enzimas foi realizada seguindo o procedimento descrito por Israel (2005). A extração foi feita pela suspensão de 1 g do meio fermentado com 20 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, na temperatura de 30 °C, sob agitação de 150 rpm, por 30 minutos. Por fim, a amostra foi filtrada com papel de filtro qualitativo. O extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase, em cinco repetições.

### 3.4.4.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade celulolítica expressa em endoglicanases, carboximetilcelulases (CMCase), foi determinada seguindo uma adaptação do procedimento descrito em Ghose (1987), que baseia-se na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de carboximetilcelulose devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose.

Para a análise, uma alíquota de 0,5 mL do extrato enzimático foi adicionada a um tubo de ensaio que continha 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 2 % (m.v<sup>-1</sup>), preparada em tampão citrato de sódio (50 mM; pH 4,8), sendo incubada em banho termostático a 50 °C por exatos 60 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação adicionando 1 mL de DNS e, por fim, determinou-se o teor de açúcares redutores da amostra de forma semelhante que na caracterização físico-química (Miller, 1959).

Uma amostra em branco foi realizada para cada análise substituindo a solução de carboximetilcelulose por tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8). Dessa forma, determinou-se a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático sem a presença da carboximetilcelulose ( $AR_{Sem\ CMC}$ ) e a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático após incubação com a fonte de celulose ( $AR_{Com\ CMC}$ ).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose, por minuto, a 50 °C. Neste trabalho, a atividade enzimática de carboximetilcelulase (CMCase) foi expressa U.g<sup>-1</sup>, a qual foi calculada seguindo a Equação 18.

$$CMCase(U.g^{-1}) = \frac{AR_{Liberado} * 10^6}{180 * 60} = \frac{(AR_{ComCMC} - AR_{SemCMC}) * 10^6}{180 * 60} \quad (18)$$

Onde:

- $AR_{ComCMC}$ : concentração da amostra com carboximetilcelulose (g de AR liberado.g de meio fermentado<sup>-1</sup>);
- $AR_{SemCMC}$ : concentração da amostra sem carboximetilcelulose (g de AR liberado.g de meio fermentado<sup>-1</sup>);
- 180: fator de conversão de gramas de glicose para mols de glicose;
- 10<sup>6</sup>: fator de conversão de mols de glicose para μmol de glicose;
- 60: fator de conversão do resultado para ser expresso por minuto.

### 3.5 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE ENZIMAS

#### 3.5.1 Planejamento Experimental para a extração das enzimas

Para o estudo da extração das celulasas produzidas por fermentação em estado sólido do resíduo agroindustrial de acerola foi realizado um planejamento fatorial do tipo  $2^3$  com cinco repetições no ponto central, totalizando 13 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória.

No planejamento experimental, as variáveis independentes foram a velocidade de agitação (rpm), o tempo de extração (minutos) e a relação entre massa de fermentado ( $m_F$ ) e o volume de solvente ( $V_S$ ).

O planejamento experimental seguiu os níveis estipulados na Tabela 5 e a matriz do planejamento está apresentada na Tabela 6 que apresenta as variáveis utilizadas no planejamento, bem como suas codificações e seus níveis. A análise do planejamento experimental foi realizada utilizando-se o software Statistica 12.0.

Tabela 5 - Níveis do planejamento experimental do estudo da extração das enzimas.

Variável	(-1)	(0)	(+1)
Velocidade de agitação (rpm)	50	100	150
Tempo (minutos)	15	30	45
$m_F:V_S$	01:15	01:30	01:45

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental fatorial  $2^3$  com três repetições no ponto central.

Ensaio	Agitação (rpm)	Tempo (min)	$m_F:V_S$ (g:mL)
1	- 1 (50)	- 1 (15)	- 1 (01:15)
2	+ 1 (150)	- 1 (15)	- 1 (01:15)
3	- 1 (50)	+ 1 (45)	- 1 (01:15)
4	+ 1 (150)	+ 1 (45)	- 1 (01:15)
5	- 1 (50)	- 1 (15)	+ 1 (01:45)
6	+ 1 (150)	- 1 (15)	+ 1 (01:45)
7	- 1 (50)	+ 1 (45)	+ 1 (01:45)
8	+ 1 (150)	+ 1 (45)	+ 1 (01:45)
9	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)
10	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)
11	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)
12	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)
13	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)

### 3.5.2 Ensaios de Fermentação

Para o estudo da extração das enzimas celulolíticas produzidas por fermentação em estado sólido, foram realizadas fermentações de forma semelhante à etapa de estudo de produção da enzima, sendo algumas condições fixadas com base no melhor resultado obtido no estudo da produção das enzimas (item 3.4 deste trabalho).

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo 20,00 g do substrato com percentuais de umidade inicial e fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) baseados nos resultados obtidos na etapa de estudo da produção das enzimas, com uma concentração de esporos de *Trichoderma reesei* de  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> de fermentado e a uma temperatura de incubação de 30 °C em estufa sem circulação forçada de ar. Após o tempo de fermentação, os frascos foram retirados da estufa para realização dos ensaios de extração da enzima seguindo a matriz do planejamento fatorial, aleatoriamente.

### 3.5.3 Extração das Enzimas

Após a produção das enzimas conforme a metodologia citada no item 3.5.2, cada frasco foi retirado da estufa e submetido ao processo

de extração em uma incubadora tipo *shaker* nas condições prefixadas na matriz do planejamento fatorial.

Por fim, cada amostra foi filtrada em papel de filtro qualitativo e o extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase, ambos em cinco repetições, seguindo as mesmas metodologias descritas na etapa de determinação das enzimas durante o estudo de produção das enzimas, no item 3.4.4.5.

### 3.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS ENZIMAS

Nesta etapa do trabalho estudou-se a estabilidade térmica e a estabilidade frente às variações de pH das enzimas endoglucanases contidas no extrato enzimático bruto. Para tal finalidade foi utilizada uma metodologia baseada na descrita por Zheng e Shetty (2000).

Definida a condição de maior produção das enzimas (item 3.4) e a melhor condição de extração (item 3.5), foi realizada uma nova fermentação e extração para obtenção do extrato enzimático bruto e avaliação da sua estabilidade.

#### 3.6.1 Produção das enzimas celulolíticas

Nessa etapa do trabalho, foi preparado um extrato enzimático bruto nas condições otimizadas tanto da produção das enzimas (item 3.4) como na extração (item 3.5).

O ensaio de fermentação foi realizado em um erlenmeyer de 250 mL contendo 20,00 g do substrato, concentração de esporos de *Trichoderma reesei* de  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> de fermentado e a 30 °C em estufa sem circulação forçada de ar. Após o período de fermentação, os frascos foram retirados da estufa para realização da extração das enzimas.

#### 3.6.2 Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas

Para o estudo da termoestabilidade das enzimas, a extração foi realizada seguindo as melhores condições encontradas no estudo da extração das enzimas mostrado no item 3.5 deste trabalho. Assim, foi realizada a incubação do meio fermentado no tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, na temperatura de 30 °C, sob agitação em uma incubadora tipo *shaker*. Ao final da incubação, a amostra foi filtrada em

papel de filtro qualitativo e o extrato enzimático bruto foi utilizado para o estudo da termoestabilidade das enzimas produzidas.

A estabilidade das enzimas frente à variação da temperatura foi avaliada incubando o extrato em temperaturas de 10 a 90 °C, em intervalos de 10 °C, por 20 minutos e, após esse tempo, foi analisada a atividade de carboximetilcelulases, seguindo a metodologia descrita no item 3.4.4.5. Os resultados foram expressos em termos da atividade residual (%), a partir da Equação 19.

$$\text{Atividade residual}(\%) = \frac{\text{atividade}_{\text{incubação}}}{\text{atividade}_{\text{padrão}}} * 100 \quad (19)$$

Onde:

Atividade<sub>incubação</sub> – atividade de CMCCase após a incubação;

atividade<sub>padrão</sub> – atividade máxima de CMCCase na condição de 30 °C.

### 3.6.3 Efeito do pH na estabilidade das enzimas

No estudo do efeito do pH na estabilidade das enzimas produzidas com o resíduo de acerola, as enzimas foram produzidas seguindo a mesma metodologia descrita na termoestabilidade (item 3.6.2) e a extração das enzimas foi realizada nas condições também otimizadas mas utilizando os seguintes tampões: 0,1 M glicina-HCl para pH em 2,5; tampão acetato de sódio 200 mM para pH numa faixa de 3,5 – 6,5; 0,1 M Tris-HCl para faixas de 7,5 – 8,5 e para a faixa de pH 9,5 – 10,5 utilizou-se 0,1 M glicina-NaOH.

Após a extração, foi analisada a atividade de carboximetilcelulases, seguindo a mesma metodologia utilizada nas outras etapas deste trabalho. Os resultados foram expressos em termos da atividade residual (%), a partir da Equação 20.

$$\text{Atividade residual}(\%) = \frac{\text{atividade}_{\text{incubação}}}{\text{atividade}_{\text{padrão}}} * 100 \quad (20)$$

Onde:

Atividade<sub>incubação</sub> – valor da atividade de CMCCase obtida após ser submetida à extração em meios com diferentes valores de pH

atividade<sub>padrão</sub> – valor da atividade máxima de CMCCase determinada na condição padrão de pH (5,00).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

Com o objetivo de conhecer a composição do resíduo de acerola, a sua caracterização físico-química foi realizada avaliando diversas características desse resíduo, assim como dados importantes a respeito do conteúdo de nutrientes que são importantes na síntese de celulases, como o percentual de celulose e açúcares redutores, bem como grandezas que afetam o processo de fermentação em estado sólido, como o pH, umidade, granulometria e atividade de água. Os resultados obtidos com as análises físico-químicas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização físico-química do resíduo de acerola desidratado e moído.

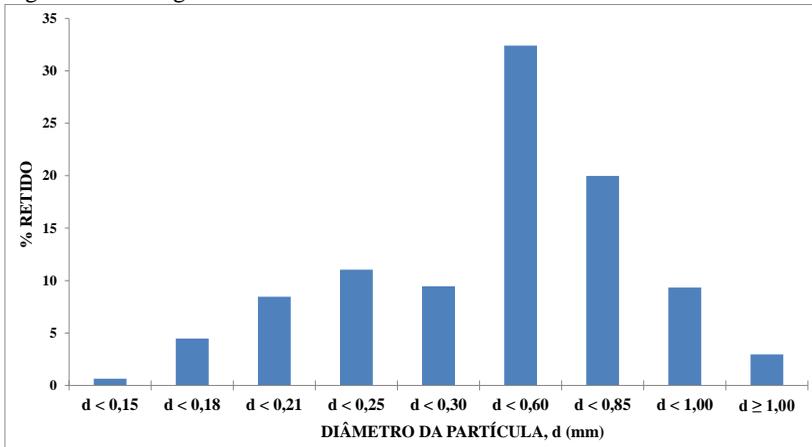
ANÁLISE	VALORES	CV* (%)
Densidade Aparente ( $\text{g.cm}^{-3}$ )	$0,26 \pm 0,00$	0,98
Densidade Real ( $\text{g.cm}^{-3}$ )	$1,00 \pm 0,00$	0,00
Porosidade do leito	$0,74 \pm 0,00$	0,00
pH	$3,54 \pm 0,01$	0,24
$^{\circ}$ brix (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$2,13 \pm 0,08$	3,76
AR** (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$0,87 \pm 0,01$	1,15
Pectina (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$7,15 \pm 0,11$	1,50
Umidade (b.u.) (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$7,98 \pm 0,21$	2,69
Cinzas (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$2,36 \pm 0,05$	2,29
Extrativos (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$14,89 \pm 0,95$	6,41
Lignina (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$28,03 \pm 0,68$	2,42
Holocelulose (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$44,30 \pm 0,65$	1,47
$\alpha$ -celulose (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	$43,82 \pm 3,31$	7,54
Hemicelulose (% , $\text{m.m}^{-1}$ )	0,48	

\*CV – Coeficiente de Variação (%); \*\*AR - Açúcares Redutores.

### 4.1.1 Granulometria

Com o intuito de avaliar a área superficial acessível ao microrganismo e para uma posterior etapa de extração da enzima, a caracterização da estrutura física do substrato foi realizada, seguindo a metodologia descrita no item 3.2.1. Maior área superficial para o ataque microbiano pode ser oferecida por partículas de tamanho reduzido, que, entretanto, tendem à fácil compactação, o que pode comprometer a aeração do sistema e a respiração (PINTO et al., 2006). Por conta disso, o perfil granulométrico do resíduo de acerola foi avaliado em relação à porosidade do leito formado pelo resíduo e ao tamanho das partículas, apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Perfil granulométrico do resíduo de acerola desidratado e moído.



A distribuição granulométrica do resíduo de acerola, conforme apresentado na Figura 5, apresenta a maioria das partículas com diâmetro entre 0,3 e 0,85 mm, o que representa tamanho satisfatório para a fermentação em estado sólido com fungos filamentosos. Correia (2004) trabalhou com o resíduo de abacaxi com partículas de tamanho maior que 0,42 mm, e Souza et al. (2008), estudando a produção de enzimas pectinolíticas por fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*, trabalharam com partículas que apresentavam tamanhos entre 0,42 e 0,85 mm. Outros estudos visando a produção de celulases por fermentação em estado sólido em bagaço de caju utilizaram o substrato com partículas de, em média, 0,42 mm (TAVARES, 2009; AMORIM, 2010).

### 4.1.2 Umidade

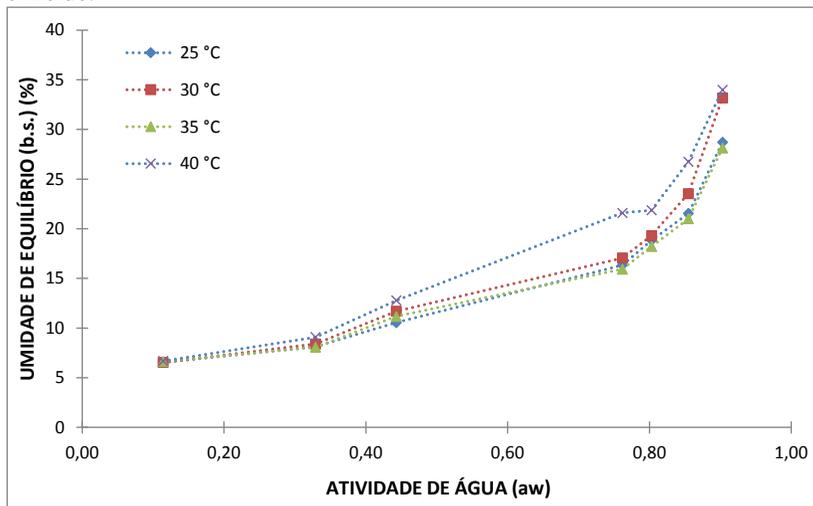
Os processos da fermentação em estado sólido ocorrem na ausência de água livre, que se encontra complexada com a matriz sólida de substrato, ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Umidades elevadas resultam em baixa difusão de oxigênio, aumento do risco de contaminação, diminuição da porosidade, além da redução no volume de gás, e a conseqüente redução das trocas gasosas. Já a limitação de água pode reduzir o crescimento microbiano, e conseqüentemente a redução da utilização do substrato e o aumento do período de aclimatação celular (CASTRO e PEREIRA-JÚNIOR, 2010).

Em geral, no processo de fermentação em estado sólido, o teor de umidade varia entre 30-85 % e a atividade de água típica vai de 0,40-0,90. Estas condições podem simular aquelas encontradas na natureza, possibilitando o processo de fermentação (ROBINSON e NIGAM, 2003).

Por conta disso, isotermas de adsorção de umidade do resíduo de acerola foram construídas, com o intuito de correlacionar a atividade de água do material e a umidade de equilíbrio, possibilitando a determinação da umidade inicial na qual o microrganismo deve ser inoculado, proporcionando quantidade de água suficiente para adaptação, crescimento e metabolismo do *Trichoderma reesei* para a produção de celulases por fermentação em estado sólido.

A Figura 6 apresenta as isotermas de adsorção de umidade do bagaço de acerola a 25, 30, 35 e 40 °C.

Figura 6 - Isotermas de adsorção de umidade do resíduo de acerola desidratado e moído.



Nas faixas de umidade abaixo de 12,78 %, a atividade de água para todas as temperaturas foi abaixo de 0,7, valor crítico para o desenvolvimento de bolores, e ideal para seu armazenamento, pois proporciona diminuição da proliferação de microrganismos e manutenção da estabilidade química, físico-química e bioquímica originais do bagaço em estudo.

Já nas faixas de umidade acima de 16,34 % para todas as temperaturas, as atividades de água foram encontradas acima de 0,7, o que pode ser suficiente para o crescimento de microrganismos. Dessa forma, o estudo da produção das enzimas celulolíticas deve ser realizado com umidades iniciais de fermentação acima de 16,34 %.

A umidade encontrada no resíduo de acerola foi de 7,98 %, o que é ideal para o armazenamento do material e posteriores reumidificação do meio para os ensaios de fermentação.

### 4.1.3 pH

Caracterizada como uma variável importante para os processos bioquímicos, o pH é um fator imprescindível que deve ser levado em consideração para o estudo de processos de fermentação, principalmente devido ao fato de que cada microrganismo apresenta um pH mínimo, ótimo e máximo para o seu desenvolvimento. Os fungos apresentam

como condições favoráveis de desenvolvimento, um pH baixo, entre 3,00 e 5,00 (SANTOS, 2007). O resíduo de acerola apresentou pH de 3,54, valor que está de acordo com outros estudos que utilizaram resíduos de outras frutas como substrato para processos fermentativos (SOUZA, 2008; AMORIM, 2010; CAMPOS, 2003).

#### **4.1.4 Sólidos solúveis (°brix)**

O °Brix representa a porcentagem de sólidos solúveis, e para esta grandeza, o resíduo de acerola apresentou 2,13 %. É provável que o tratamento industrial da acerola, do qual resultou o resíduo de acerola, pode ter impacto na concentração de sólidos solúveis do material em questão, além da concentração de açúcares redutores, que interfere neste resultado.

#### **4.1.5 Extrativos**

O teor de extrativos obtido com o resíduo agroindustrial de acerola foi de 14,89 %, valor semelhante ao encontrados em outros resíduos (AMORIM, 2010 e RUEDA, 2010). A extração com solventes orgânicos possibilitou a remoção de extrativos, dentre os quais estão incluídas as lignanas, terpenos, flavonoides, além de outros compostos aromáticos. Esses compostos podem condensar com a lignina insolúvel, o que pode interferir na análise (MARABEZI, 2009).

#### **4.1.6 Açúcares redutores**

A glicose costuma ser a principal fonte de carbono para os processos de fermentação, porém outros açúcares podem ser utilizados, como sacarose e maltose, além de outros compostos orgânicos complexos, como o amido e a celulose. Para isso, a glicose deve estar em quantidade suficiente para proporcionar um crescimento inicial, mas não o suficiente para impedir a capacidade do microrganismo de metabolizar a fonte indutora, que é a celulose. Esta fonte indutora, por outro lado, não deve estar em valores acentuados, de maneira que impeça a excreção da enzima pelo microrganismo.

O resíduo de acerola apresentou um baixo teor de açúcares redutores (0,87 %), fato este que pode não ser limitador ao processo de produção de celulases à depender de outros fatores como a presença de fontes de celulose que induzam a excreção das enzimas.

#### **4.1.7 Holocelulose e Hemicelulose**

O teor de holocelulose encontrado no resíduo agroindustrial de acerola utilizado no estudo foi de 44,30 %, valor semelhante ao encontrado em outros resíduos agroindustriais que posteriormente foram submetidos à fermentação ou extração de celulases, como fibra bruta do pseudocaulo da bananeira com 43,25 % (PEREIRA et al., 2010), bagaço de cana-de-açúcar com teor de 46,62 % de holocelulose, farelo de soja com 34,59 % (RODRIGUES-ZÚÑIGA et al., 2011). Além disso, percebe-se uma quantidade satisfatória da fonte indutora para produção das enzimas celulolíticas.

Já o teor de hemicelulose encontrado no resíduo estudado apresentou baixo valor (0,48 %) em relação à literatura consultada (PEREIRA et al., 2010; RODRIGUES-ZÚÑIGA et al., 2011), resultado que demonstra o aumento da quantidade de celulose disponível como fonte indutora, o que pode proporcionar um possível aumento da produção de celulases pelo microrganismo utilizado no processo de fermentação.

#### **4.1.8 Lignina**

O percentual de lignina no resíduo de acerola foi de 28,03 %, valor este considerado moderado para esse tipo de estudo, tendo em vista que a lignina pode dificultar o ataque microbiano à fonte indutora presente no resíduo. Apesar disso, nesse trabalho optou-se por realizar a produção das enzimas sem um pré-tratamento do material para deslignificar o substrato, com o objetivo de analisar a produção da enzima no substrato com sua estrutura não modificada, da forma em que o mesmo é disposto no meio ambiente, com mínimo de manipulação possível.

#### **4.1.9 Cinzas**

O percentual de cinzas encontrado no resíduo de acerola foi de 2,36 %, valor um pouco acima de outros trabalhos com resíduos agroindustriais como o resíduo de cana-de-açúcar (RUEDA, 2010) e resíduo de caju (AMORIM, 2010).

#### **4.1.10 Pectina**

As pectinas são uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos de constituição complexa (OLIVEIRA, 2013), e formam um grupo heterogêneo com diferentes massas moleculares e graus de esterificação, responsáveis pela rigidez e proteção à célula vegetal (KOBLOITZ, 2010). As cascas de frutas cítricas e o bagaço de maçã têm sido explorados comercialmente para a extração de pectinas (VRIESMANN et al., 2011), com teores na casca de laranja e limão, por exemplo, encontra-se na faixa de 25-30 % (m.m<sup>-1</sup>), em base seca (BAGHERIAN et al., 2011).

O teor de pectina encontrado no resíduo estudado foi de 7,15 %, demonstrando o baixo potencial para a extração desta substância no resíduo a ser estudado.

### **4.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DAS CELULASES**

#### **4.2.1 Produção das celulases**

As Figuras 7, 8, 9 e 10 apresentam os resultados obtidos para a umidade, pH, açúcares redutores e atividade enzimática (carboximetilcelulase), respectivamente, durante os 9 ensaios realizados para o estudo da produção das celulases conforme a Tabela 3 apresentada no item 3.4.1 deste trabalho. Os valores correspondentes a cada análise apresentada nas figuras a seguir estão apresentados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15 contidas no Anexo A deste trabalho.



Conforme os resultados apresentados na Figura 7, a umidade manteve-se praticamente constante nas primeiras 216 horas do processo fermentativo e, a partir deste tempo, o seu teor decresceu até o final do processo, provavelmente devido às atividades microbianas ocorridas ao longo do processo fermentativo. Nos ensaios 3 e 4, o decréscimo foi mais evidente provavelmente devido à sua maior concentração de nitrogênio (1,00 %), e conseqüentemente uma maior utilização de água por conta de maiores atividades metabólicas, visto que o nitrogênio é um fator importante de crescimento.

A Figura 8 apresenta os resultados obtidos de pH para os 9 ensaios realizados no estudo da produção das enzimas.



Através da Figura 8 percebe-se um leve aumento do pH na maioria dos ensaios a partir de 72 horas do processo fermentativo. Já no ensaio 4 esse aumento foi iniciado logo com 48 horas processo.

É possível perceber também um comportamento diferenciado no pH do ensaio 2 que apresentou um aumento no seu valor a partir de 48 horas e atingiu uma faixa de pH em torno de 4,8. O comportamento diferenciado nos valores de pH para o ensaio 2 pode ser justificado pelas condições de 65 % de umidade e 0,50 % de fonte adicional de nitrogênio, o que pode ter induzido uma maior assimilação de ácidos orgânicos pelo microrganismo.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos de açúcares redutores (AR) para os 9 ensaios realizados no estudo da produção das enzimas.



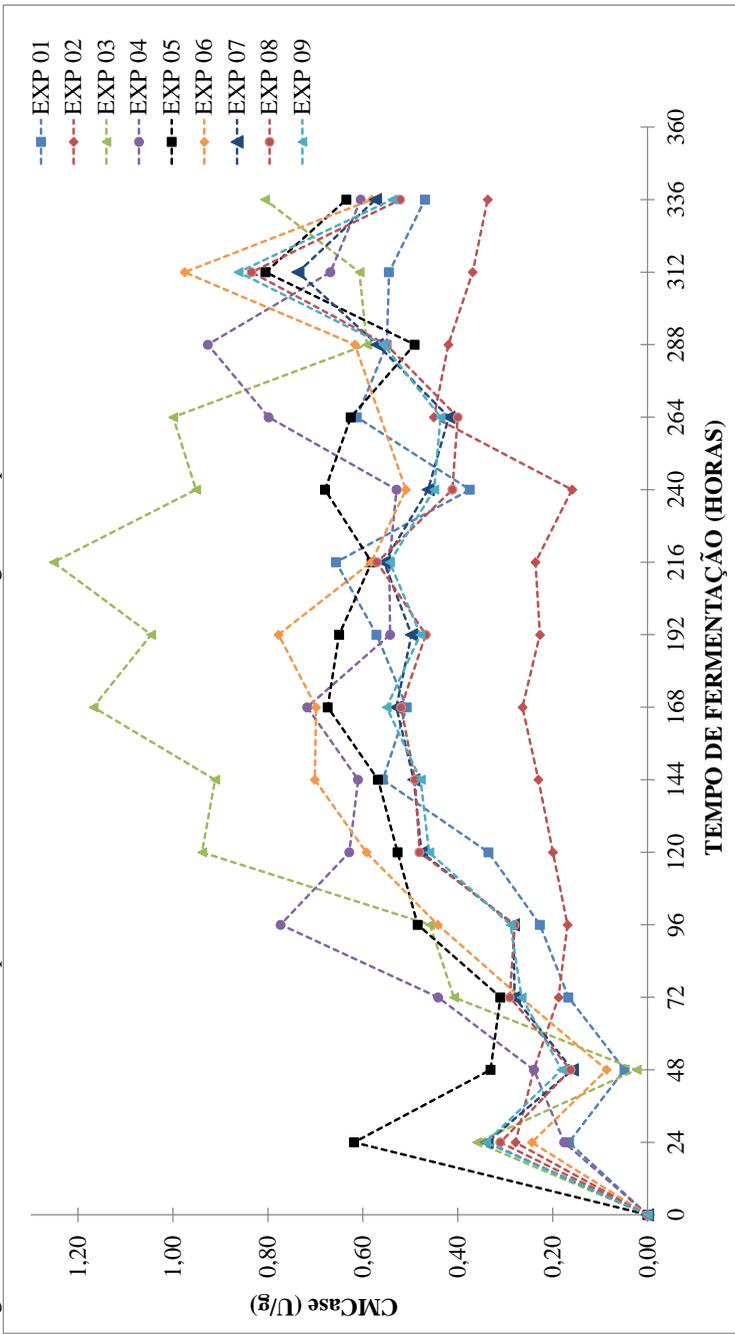
A Figura 9 mostra que, desde o início do processo de produção das enzimas, houve um decréscimo nos açúcares redutores do meio devido às atividades metabólicas do microrganismo que utiliza esses açúcares como fonte energética para o seu desenvolvimento.

É possível perceber que os ensaios 1 e 3 apresentaram uma redução mais lenta dos açúcares, provavelmente devido ao fato de nesses ensaios as umidades iniciais terem sido de apenas 45 %, de forma que o microrganismo passa por uma maior fase de adaptação ao meio. Já nos ensaios 2 e 4, percebe-se uma maior velocidade de consumo dos açúcares e, por conseguinte, uma menor fase de adaptação desse microrganismo.

Além disso, percebe-se que em todos os ensaios, após 120 horas de fermentação não houve mais variação na concentração de açúcares redutores.

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos de atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase (CMCase) para os 9 ensaios realizados no estudo da produção das enzimas.

Figura 10 - Atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase ao longo do tempo.



Através da Figura 10 percebe-se que em todos os ensaios houve um aumento na atividade enzimática, demonstrando a possibilidade de produção desse tipo de enzima com o resíduo de acerola. Dentre as condições estudadas, o ensaio que apresentou uma maior produção das enzimas foi o ensaio 3 que foi conduzido com 45 % de umidade e concentração de nitrogênio de 1,00 %, alcançando uma atividade celulolítica de  $1,25 \text{ U.g}^{-1}$  após 216 horas de fermentação.

É possível perceber também que houve uma pequena discrepância entre os pontos centrais, o que pode ser justificado pelo fato de que o processo foi conduzido em estado sólido e com elevada heterogeneidade, o que pode dificultar a reprodutibilidade de ensaios bem como o processo de amostragem.

#### 4.2.2 Análise estatística da produção das celulases

Para a análise estatística da produção das celulases, foi considerado o fato de que a maior atividade enzimática obtida foi no ensaio 3 em 216 horas de fermentação e, por isso, os resultados analisados estatisticamente foram os valores obtidos para cada ensaio nesse mesmo tempo.

A Tabela 8 apresenta os valores obtidos de carboximetilcelulase (CMCase), em  $\text{U.g}^{-1}$ , com 216 horas de fermentação do resíduo de acerola tendo como microrganismo metabolizador o *Trichoderma reesei*.

Tabela 8 - Atividade enzimática (CMCase) obtida nos ensaios do planejamento experimental do tipo  $2^2$ .

Ensaio	U (%)	N (%)	CMCase ( $\text{U.g}^{-1}$ )
1	-1 (45,00)	-1 (0,50)	0,6565
2	+1 (65,00)	-1 (0,50)	0,2362
3	-1 (45,00)	+1 (1,00)	1,2517
4	+1 (65,00)	+1 (1,00)	0,5444
5	0 (55,00)	0 (0,75)	0,4813
6	0 (55,00)	0 (0,75)	0,5823
7	0 (55,00)	0 (0,75)	0,5553
8	0 (55,00)	0 (0,75)	0,5102
9	0 (55,00)	0 (0,75)	0,5432

Dentre os ensaios realizados, destaca-se o ensaio 3, no qual utilizou-se uma umidade inicial do meio fermentativo de 45 % e adição

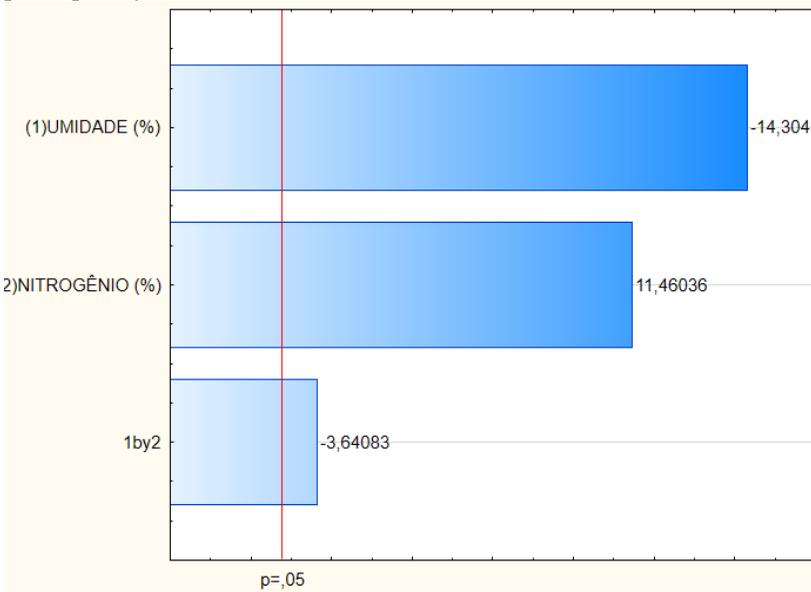
de 1,00 % de fonte de nitrogênio e que foi alcançada a maior atividade enzimática, com 1,25 U.g<sup>-1</sup>.

Os valores obtidos foram analisados no programa STATISTICA 12.0. A Equação 21 apresenta o modelo da resposta atividade enzimática, carboximetilcelulase, e é dada em função dos valores codificados das variáveis umidade (U) e fonte adicional de nitrogênio (N). Os coeficientes em negrito são os que possuem significância para um nível de 95 % de confiança.

$$\text{CMCase (U.g}^{-1}\text{)} = \mathbf{0,595678} - \mathbf{0,563800*U} + \mathbf{0,451700*N} - 0,143500*U*N \quad (21)$$

A Figura 11 apresenta o Diagrama de Pareto para a avaliação da influência das variáveis independentes sob a variável dependente, carboximetilcelulase.

Figura 11 - Diagrama de Pareto para o planejamento experimental do tipo 2<sup>2</sup> para a produção das celulasas.



O diagrama de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes, considerando os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória (CALADO e

MONTGOMERY, 2003). Avaliando o diagrama percebe-se que tanto as variáveis independentes, umidade inicial e fonte adicional de nitrogênio, como a interação entre elas, apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a variável de estudo, carboximetilcelulase.

A Tabela 9 apresenta a ANOVA da resposta atividade enzimática, carboximetilcelulase.

Tabela 9 - ANOVA da resposta atividade enzimática, carboximetilcelulase.

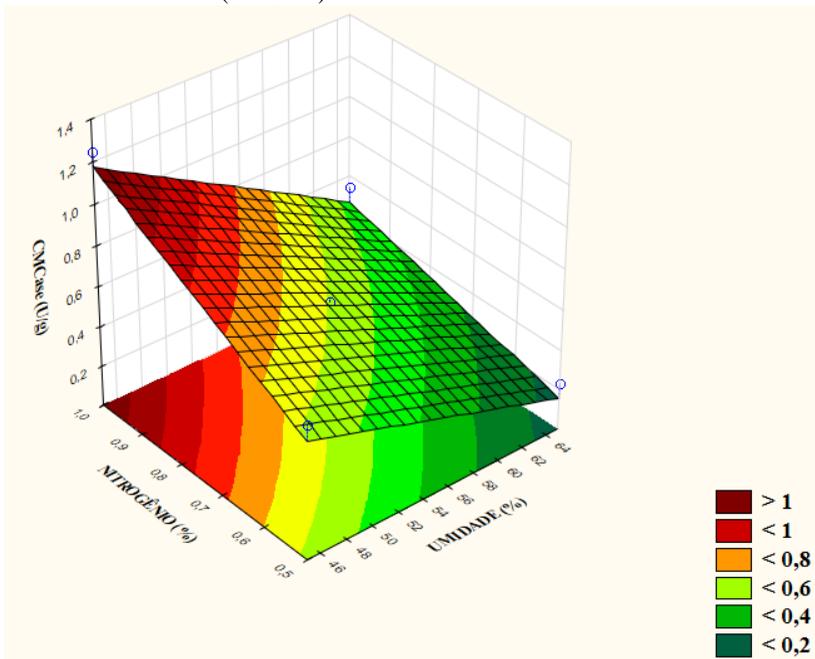
<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos quadrados (SQ)</b>	<b>Graus de liberdade (GL)</b>	<b>Média quadrática (MQ)</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>
Regressão	0,542495	3	0,18083167	18,69
Resíduo	0,048375	5	0,009675	
Total	0,590870	8		

\* $R^2 = 91,81\%$  ;  $F_{\text{tabelado}} = 5,409$

Os dados da Tabela 9 mostram que o modelo é estatisticamente significativo, ao nível de 95 % de confiança, pois a razão de  $F_{\text{calculado}}$  por  $F_{\text{tabelado}}$  é igual a 3,46, estando acima de 1,0 (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Sendo o modelo da resposta em estudo estatisticamente significativo, pode-se construir a superfície de resposta, apresentada na Figura 12.

Figura 12 - Superfície de resposta: influência das variáveis umidade inicial (U) e fonte adicional de nitrogênio (N) sobre a atividade enzimática, carboximetilcelulase (CMCase).



Analisando a Figura 12, observa-se que a diminuição da umidade e o aumento da fonte adicional de nitrogênio propicia um aumento na atividade enzimática, onde se operando nos níveis -1 (45 %) e +1 (1,00 %) para estas variáveis, respectivamente, obtém-se atividades enzimáticas acima de  $1,25 \text{ U.g}^{-1}$ .

Oliveira-Júnior (2014) obteve seus melhores resultados para a atividade enzimática (expressa em CMCase) de  $0,294 \text{ UI.mL}^{-1}$ , na fermentação em estado sólido com os substratos bagaço de coco e pedúnculo do caju e o microrganismo *Penicillium chrysogenum*. Amorim (2010) estudando a produção de enzimas celulolíticas (expressas em carboximetilcelulase) por fermentação em estado sólido com resíduo de caju, utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp., apresentou maior valor dessa atividade para o resíduo de caju lavado, quando se utilizou 45 % de umidade inicial e 1,00 % de adição de fonte de nitrogênio com um pico de atividade de  $1,173 \text{ U.g}^{-1}$  em 42 horas de fermentação.

Já no trabalho de Aleixo-Júnior (2014), utilizando como substrato o resíduo de caju e o microrganismo *Trichoderma reesei*, obteve o seu melhor resultado de atividade enzimática (expressa como CMCase) com 3,068 U.g<sup>-1</sup> nas condições de 45 % de umidade, 1,00 % de concentração de nitrogênio e 0,25 % de carboximetilcelulose. Santos (2007) encontrou picos de atividades enzimáticas utilizando dois resíduos de pedúnculo de caju com 40 % de umidade e 1 % de concentração de nitrogênio.

Na maioria desses trabalhos citados na literatura os resultados obtidos foram semelhantes ao encontrado nesse trabalho para a faixa estudada, evidenciando o potencial do resíduo agroindustrial de acerola como substrato para a produção de enzimas celulolíticas.

#### 4.3 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DAS CELULASES

O estudo da extração das enzimas produzidas por fermentação em estado sólido foi realizado por meio de um planejamento fatorial do tipo 2<sup>3</sup> com cinco repetições no ponto central, e a Tabela 10 apresenta os resultados obtidos de carboximetilcelulase (CMCase), em U.g<sup>-1</sup>, nas diferentes condições de extração conforme as Tabelas 5 e 6 apresentadas no item 3.5.1 deste trabalho.

Tabela 10 - Atividade enzimática (CMCase) obtida nos ensaios do planejamento experimental do tipo 2<sup>3</sup>.

Ensaio	Agitação	Tempo	m <sub>F</sub> :V <sub>S</sub>	CMCase (U.g <sup>-1</sup> )
1	- 1 (50)	- 1 (15)	- 1 (01:15)	1,1682
2	+ 1 (150)	- 1 (15)	- 1 (01:15)	1,2020
3	- 1 (50)	+ 1 (45)	- 1 (01:15)	0,9157
4	+ 1 (150)	+ 1 (45)	- 1 (01:15)	1,0956
5	- 1 (50)	- 1 (15)	+ 1 (01:45)	2,0697
6	+ 1 (150)	- 1 (15)	+ 1 (01:45)	2,0771
7	- 1 (50)	+ 1 (45)	+ 1 (01:45)	1,8976
8	+ 1 (150)	+ 1 (45)	+ 1 (01:45)	2,1497
9	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)	1,5469
10	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)	1,4695
11	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)	1,5247
12	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)	1,4348
13	0 (100)	0 (30)	0 (01:30)	1,5789

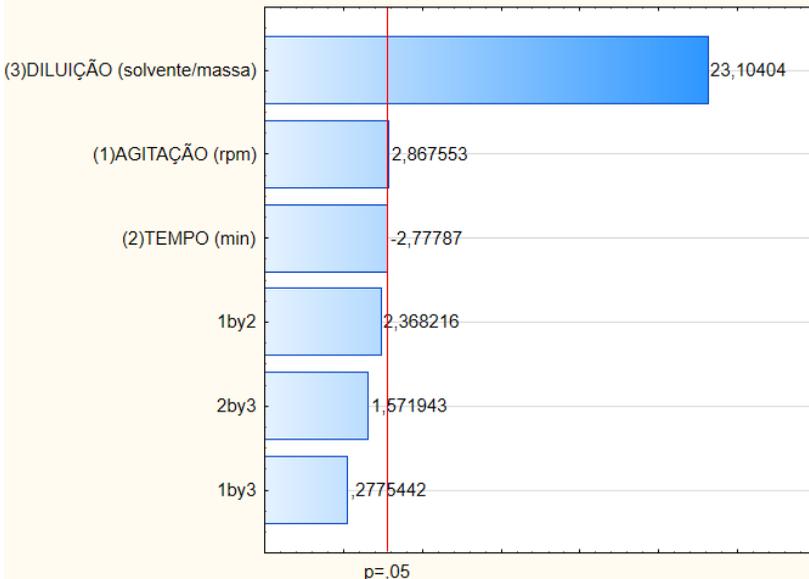
Dentre os ensaios realizados, destaca-se o ensaio 8, no qual utilizou-se uma agitação de 150 rpm, 45 minutos de extração e proporção de extração de 01:45 apresentando  $2,15 \text{ U.g}^{-1}$  de atividade enzimática.

Os valores obtidos foram analisados no programa STATISTICA 12.0. A Equação 22 apresenta o modelo da resposta da atividade enzimática, carboximetilcelulase, e é dada em função dos valores codificados das variáveis agitação (AGT), tempo de extração (T) e proporção de extração (DIL). Os coeficientes em negrito são os que possuem significância para um nível de 90 % de confiança, como podem ser observados no Diagrama de Pareto (Figura 13).

$$\text{CMCase (U.g}^{-1}\text{)} = \mathbf{1,548492} + \mathbf{0,1183*AGT} - \mathbf{0,1146*TEMPO} + \mathbf{0,953150*DIL} + 0,0977*AGT*TEMPO + 0,01145*AGT*DIL + 0,06485*TEMPO*DIL \quad (22)$$

A Figura 13 apresenta o Diagrama de Pareto para a avaliação da influência das variáveis independentes sob a variável dependente, carboximetilcelulase.

Figura 13 - Diagrama de Pareto para o planejamento experimental do tipo  $2^3$  para estudo da extração das celulases.



Percebe-se no diagrama que todas as variáveis independentes apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a variável resposta estudada, carboximetilcelulase, sendo a variável com maior influência a taxa de diluição (solvente/massa). Apesar das variáveis independentes apresentarem influência estatisticamente significativa sobre a variável resposta, a interação entre essas variáveis não apresenta esse tipo de influência.

A Tabela 11 apresenta a ANOVA da resposta atividade enzimática, carboximetilcelulase.

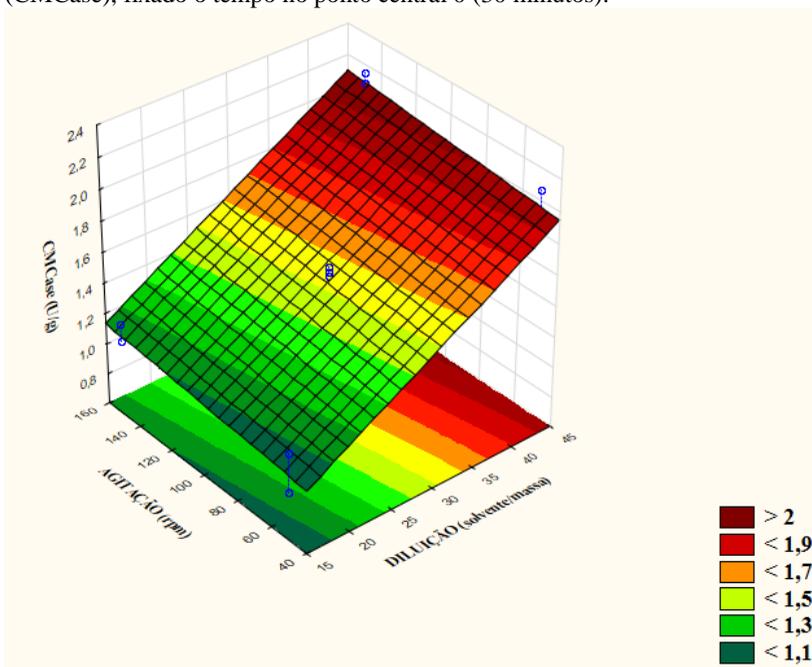
Tabela 11 - ANOVA da resposta atividade enzimática, carboximetilcelulase.

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	F <sub>calculado</sub>
Regressão	1,89901	6	0,31650167	72,27
Resíduo	0,026276	6	0,00437933	
Total	1,925286	12		

\* $R^2 = 98,64\%$  ;  $F_{\text{tabelado}} = 4,284$

Os dados da Tabela 11 mostram que o modelo é estatisticamente significativo, ao nível de 90 % de confiança, pois a razão de  $F_{\text{calculado}}$  por  $F_{\text{tabelado}}$  é igual a 16,87, estando acima de 1,0 (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Sendo o modelo da resposta estatisticamente significativo, pode-se construir a superfície de resposta, Figura 14, e avaliar influência das variáveis independentes sobre a resposta.

Figura 14 - Superfície de resposta: influência das variáveis agitação (AGT) e proporção de extração (DIL) sobre a atividade enzimática, carboximetilcelulase (CMCase), fixado o tempo no ponto central 0 (30 minutos).



Analisando a Figura 14, observa-se que a agitação apresenta uma pequena influência na atividade enzimática, corroborando com a análise do diagrama de Pareto, e que quanto maior for o volume de solvente (para uma mesma massa de fermentado) durante a extração, maior é a atividade enzimática obtida, pois se operando no nível +1 (01:45), obtém-se atividades enzimáticas acima de  $2,15 \text{ U.g}^{-1}$ .

Fernández (2009) desenvolvendo um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial estudou o processo de extração de fitase, xilanase e pectinase e verificou que o pH e a agitação como fatores independentes não obtiveram nenhuma influência na extração da enzima pectinase. Já Poletto (2015) avaliou o tempo, temperatura e razão sólido/líquido como condições de extração de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF, e apenas a razão sólido/líquido foi estatisticamente significativa, com os melhores valores para pectinases totais nas razões de 1/30 e 1/45, valores semelhantes aos encontrados neste estudo.

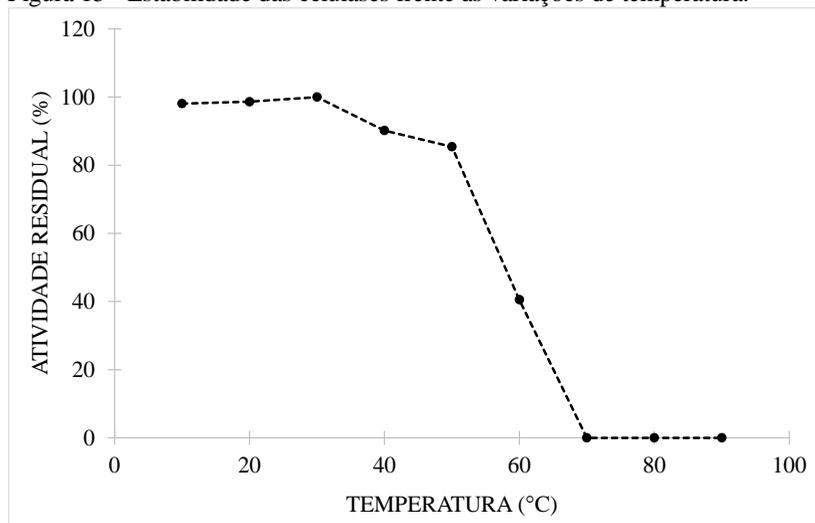
#### 4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS CELULASES

Conforme mencionado no item 3.6 deste trabalho, estudos foram efetuados para avaliar a estabilidade das enzimas celulolíticas produzidas neste trabalho frente à variações da temperatura e do pH.

##### 4.4.1 Estabilidade das celulases frente a variações de temperatura

A Figura 15 apresenta os resultados obtidos na avaliação da estabilidade das celulases produzidas por FES com resíduo de acerola frente a variações na temperatura conforme citado no item 3.6.2. Os valores correspondentes a cada análise apresentada na figura a seguir estão apresentados na Tabela 16 contida no Anexo A deste trabalho.

Figura 15 - Estabilidade das celulases frente às variações de temperatura.



Conforme apresentado na Figura 15, percebe-se que as celulases produzidas apresentaram boa estabilidade térmica até a temperatura de 50 °C apresentando 85,42 % da atividade máxima determinada nas condições padronizadas (pH 4,5 e temperatura de 30 °C). Quando exposta a 60 °C, manteve 40,52 % dessa atividade, decaindo seu valor e chegando a 0 % a partir de 70 °C.

Gomes et al. (2007) afirmam que enzimas que apresentam estabilidade em temperaturas acima de 40 °C são ditas como termoestáveis, sendo comum encontrar microrganismos mesófilos que

crecem em temperatura de 28 e 32°C e produzem enzimas que atuam a temperatura de 60 °C como, por exemplo, glicocamilase de *Neosartorya fischeri* e *Aspergillus fumigatus*.

No estudo realizado por Santana (2010), celulases foram produzidas de *Moniliophthora perniciosa* e mostraram-se termoestáveis com retenção da sua atividade padrão à um nível de 99 % à 60 °C, 95,05 % à 70 °C, 94,80 % à 80 °C e 88,66 % à 90 °C após 30 minutos de incubação.

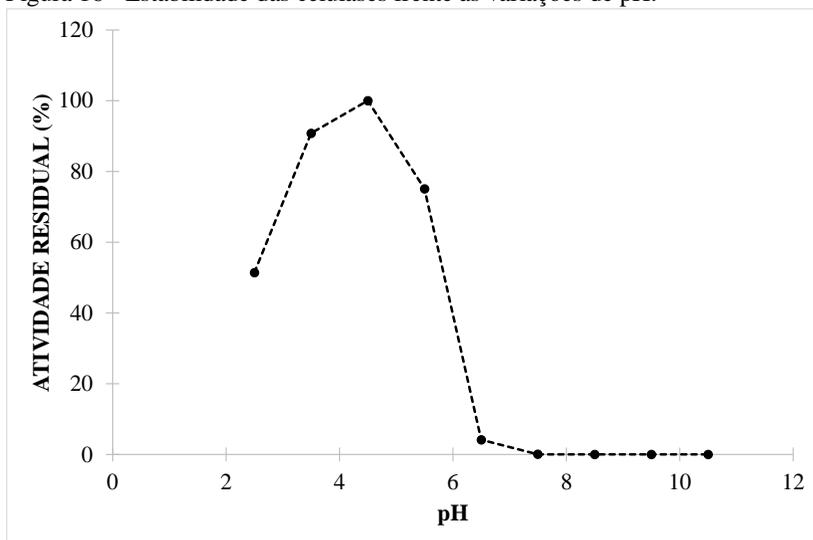
Silva et al. (2013) em um estudo que avaliou a estabilidade térmica de celulases em extratos aquosos de sementes de *Libidibia ferrea*, encontrou celulases termoestáveis a 80 °C, com atividade enzimática de 1,45 mUA.mL<sup>-1</sup>. Já no estudo de Kronbauer et al. (2007), que investigou a produção de xilanases por *Aspergillus casielus*, encontrou enzimas termoestáveis a 45 °C.

Salamoni (2005), avaliando a produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp., verificou que a temperatura ótima para a atividade de hidrólise das celulases foi de 50 °C, e o valor ótimo de pH foi de 9,0. Estes trabalhos encontrados na literatura mostram a importância do estudo da estabilidade das celulases encontradas neste estudo, visando sua futura aplicação em processos biotecnológicos.

#### **4.4.2 Estabilidade das celulases frente à variações de pH**

A Figura 16 apresenta os resultados obtidos na avaliação da estabilidade das celulases produzidas por FES com resíduo de acerola frente à variações no pH. Os valores correspondentes a cada análise apresentada na figura a seguir estão apresentados na Tabela 17 contida no Anexo A deste trabalho.

Figura 16 - Estabilidade das celulasas frente às variações de pH.



Observa-se na Figura 16 que as enzimas produzidas nesse estudo são instáveis em pH 2,5 exibindo apenas 51,40 % de sua atividade máxima. No entanto, apresentou boa tolerância a valores de pH entre 3,5 e 5,5, e considerando que o pH natural de sucos é ácido, esta enzima poderá ser utilizada nos processos industriais de extração e clarificação destes, sem perda considerável de sua estabilidade. A partir do pH 6,5 não foi detectada atividade enzimática, mostrando instabilidade das enzimas para meios básicos.

O estudo de estabilidade de carboximetilcelulasas realizado por Albano (2012) mostrou que as enzimas produzidas por fermentação em estado sólido apresentaram alta estabilidade em pH 3,00 e moderada estabilidade com pH entre 4,00 e 8,00, mantendo 70 % da atividade residual em pH de 4,00 e 5,00, e 56 % em pH 7,00 e 8,00.

Santos et al. (2014a), estudando a produção de celulasas estáveis à temperatura e pH a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira, encontraram enzimas com grande tolerância a exposição em ampla faixa de temperatura (0 a 80 °C) e a faixa de pH tolerada pelas enzimas foi de 3 a 9, com atividades superiores a 50 % durante 150 minutos. No estudo de Casciatori et al. (2014), foi avaliada a estabilidade ao pH e à temperatura e efeito de íons sobre a atividade de endoglucanase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp., e a atividade enzimática foi maior em pH 4,5 e na temperatura de 55 °C.

Estes resultados corroboram os dados de estabilidade térmica e de pH, para as celulasas obtidas a partir da fermentação em estado sólido do resíduo agroindustrial de acerola, demonstrando um potencial para sua aplicação industrial, o que deve ocorrer com um planejamento baseado em estudos mais aprofundados, visando a viabilidade do processo.

## 5 CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho foi possível analisar a viabilidade de produzir celulasas por meio de um processo de fermentação em estado sólido com resíduo agroindustrial de acerola, utilizando como agente metabolizador o microrganismo *Trichoderma reesei*.

A caracterização físico-química do resíduo foi realizada avaliando diversas grandezas importantes para a elucidação do conteúdo de nutrientes que são importantes na síntese de celulasas, bem como as condições necessárias para o processo de fermentação em estado sólido. Com os resultados da caracterização percebeu-se que este resíduo possui características necessárias para a produção da enzima com fonte energética na forma de açúcares redutores (0,87 %) e fonte indutora na forma de celulose (44,30 %). Além disso, o resíduo apresentou condições ideais para o processo de fermentação em estado sólido como pH ácido (3,54) e tamanhos de partículas entre 0,3 e 0,85 mm.

O estudo da produção das enzimas carboximetilcelulase mostrou que sua maior produção ocorreu no ensaio em que se utilizou 45 % de umidade inicial do meio e 1,00 % de fonte adicional de nitrogênio, e a maior atividade enzimática obtida foi 1,25 U.g<sup>-1</sup> em 216 horas de fermentação do resíduo de acerola.

Uma avaliação estatística dos resultados obtidos de atividade enzimática mostrou que tanto as variáveis independentes, umidade inicial e fonte adicional de nitrogênio, quanto a interação entre elas apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a variável resposta estudada, carboximetilcelulase, a um nível de 95 % de confiabilidade, de forma que a diminuição da umidade e o aumento da fonte adicional de nitrogênio propicia um aumento na atividade enzimática, de tal forma que se operando nos níveis -1 (45 %) e +1 (1,00 %) para estas variáveis, respectivamente, obtém-se atividades enzimáticas acima de 1,25 U.g<sup>-1</sup>.

No estudo estatístico da extração das celulasas percebeu-se que todas as variáveis independentes (agitação, tempo e taxa de diluição) apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a variável resposta, carboximetilcelulase, a um nível de 90 % de confiabilidade, sendo a taxa de diluição a variável que apresentou maior influência. Além disso, a interação entre as variáveis independentes não apresentaram influência sobre a variável dependente. Constatou-se que, dentro da faixa estudada, quanto maior for o volume de solvente (para uma mesma massa de fermentado) durante a extração, maior é a

atividade enzimática obtida, e que foram alcançadas maiores atividades enzimáticas quando a extração aconteceu sob uma agitação de 150 rpm, com um tempo de 45 minutos e uma proporção de extração de 01:45, obtendo uma maior atividade enzimática com  $2,15 \text{ U.g}^{-1}$ .

Na avaliação da estabilidade das enzimas produzidas, percebeu-se que as celulasas produzidas apresentaram boa estabilidade térmica até a temperatura de  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , apresentando 85,42 % da atividade máxima determinada nas condições padrão. Já em relação à mudanças no pH, as enzimas produzidas nesse estudo são estáveis em uma faixa de pH entre 3,5 e 5,5 e instáveis em pH de 2,5 exibindo apenas 51,40 % de sua atividade máxima, e praticamente nula em pH acima de 6,5.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181: Solo - Análise Granulométrica**, 1984.

AFONSO, L. C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Engenharia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

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 e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

AGUIAR-FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2008.

AGUIAR, T. M.; RODRIGUES, F. S.; SANTOS, E. R.; SABAA-SRUR, A. U. O. Chemical characterization and evaluation of the nutritional value of *Malpighia puniceifolia* seeds. **Journal of Brazilian Society for Food and Nutrition**, v. 35, n. 2, p. 91-102, 2010.

ALAM, M. Z.; MAMUNA, A. A.; QUDSIEHA, I. Y.; MUYIBIA, S. A.; SALLEHA, H. M.; OMARA, N. M. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 1, p. 61-64, 2008.

ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. Dissertação - Programa de pós-graduação em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2012.

ALEIXO-JÚNIOR, M. E. **Obtenção de celulases por fermentação semissólida do resíduo agroindustrial do caju lavado usando carboximetilcelulose como fonte indutora**. 2014. 40f. Monografia (Graduação em Química Industrial), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

AMORIM, B. C. **Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium Orcidentalle* Lineu) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp..** 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento protéico do mandacará sem espinhos e palma forrageira por fermentação em estado sólido.** Tese de doutorado - Programa de pós-graduação em Engenharia de Processos. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2004.

ASSIS, S. A.; LIMA, D. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 133-137, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181:** Solo - Análise Granulométrica. Rio de Janeiro, 1984.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, K. M. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504–510, 2007.

BAGHERIAN, H.; ASHTIANI, F. Z.; FOULADITAJAR, A.; MOHTASHAMY, M. Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. **Chemical Engineering and Processing**, v. 50, n. 11-12, p. 1237-1243, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brasília: Editora MS, p. 1017, 2005.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 120–128, 2010.

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.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; SILVA, R.; THOMÉO, J. C. Estabilidade ao pH e à temperatura e efeito de íons sobre a atividade de endoglucanase produzida por fungo termofílico em cultivo sólido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. **Anais...**, Florianópolis, 2014.

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

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**, 1ª ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduos de abacaxi**. Tese – Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2004.

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

DALSENTER, F. D. H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido**. Tese – Programa de pós-graduação em Ciências. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

DECHOW, F. J. **Separation and purification techniques in biotechnology**. Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey, 1989.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Biocologia industrial, Fermentação em Estado Sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, v. 2, 2001.

DEMIATE, I. M.; WOSIAKYI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Analysis of total and reducing sugar in foods. A comparative studies between colorimetric and titration techniques. **Exact and Soil Sciences, Agrarian and S. Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65-78, 2002.

FERNÁNDEZ, D. E. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação e em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial.** Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 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. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 09, n. 2, p. 207-213, 2011.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulasas:** seleção de isolados de *Trichoderma* spp. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade de São Carlos. São Carlos, 2011.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI, M. A.; MAZUTTI, M. A.; JAHN, S. L. Produção de enzimas celulíticas de *Trichoderma reesei* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na hidrólise enzimática de biomassa. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...**, Florianópolis, 2014.

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

GONG, C. S.; TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Process**, v. 3, p. 111-139, 1975.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; BOSCOLO, M.; CARVALHO, C. C.; SILVA, R.; BONFÁ, M. R. B. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 31-39, 2009.

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

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p. 358-364, 1999.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v, 8, p. 301-306, 2005.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345–351, 2002.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems — An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1–30, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS – IBRAF. **Frutas brasileiras em ascensão.** Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/imprensa/0901\\_FrutasBrasileirasAscensao.asp](http://www.ibraf.org.br/imprensa/0901_FrutasBrasileirasAscensao.asp)>. Acesso em: 15 mar. 2016.

ISRAEL M. C. **Utilização do Resíduo do Processamento do Palmeiro para a Produção de Enzimas Hidrolíticas por Fungos do Gênero *Polyporus*.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.

KEEY, R. B. **Drying of loose and particulate materials.** New York: Hemisphere, p. 57, 1991.

KOBLITZ, M. G. **Bioquímica de alimentos:** teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.

LIMA, C. A. F. **Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de cultivo em meio sólido.** Dissertação – Escola Politécnica, Mestrado em Engenharia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

LINS, S. A. S. **Produção de celulasas por fermentação semi-sólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48.** 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p.506-577, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p.467-475, 2002.

LOUSADA JUNIOR, J. E.; NEIVA, J. N. N.; RODRIGUEZ, N. M.; PIMENTEL, J. C. M. P., LÔBO, R. N. B. Consumo e Digestibilidade de Subprodutos do Processamento de Frutas em Ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 659-669, 2005.

MARQUES, T. R. **Aproveitamento tecnológico de resíduos de acerola**: Farinhas e barra de cereais. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.

MARRA, I.F.; SILVA, T.B.; SCHEUFELE, F.B.; GEBERT, D.G.C.; LANGARO, C.; FIORESE, M.L.; HASAN, S.D.M. efeito do pH, umidade e indutores sobre a produção de celulases por *Trichoderma* sp. em fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 2, p. 125-131, 2015.

MARTINS, C.R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.83-93, 2002.

MAURYA, D.P.; SINGH, D.; PRATAP, D.; MAURYA, J.P. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p. 5-8, 2012.

MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia ambiental. **Embrapa - Meio Ambiente**, v. 2, p. 304-319, 2008.

MEKALA, N.K.; SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 122-131, 2008.

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

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; MORAES, R. O. Bioprodutos para agricultura orgânica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., Curitiba, 2007. **Anais...** Curitiba: 2007.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Documento 236, p.54, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

OLIVEIRA, A. N. **Pectinas de casca de manga (*Mangifera indica* L.) cv. ubá: otimização da extração, caracterização físico-química e avaliação das propriedades espessantes e gelificantes**. Tese – Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

OLIVEIRA-JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando o bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. 2014. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA-JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 2, p. 193-200, 2012.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia I**. São Paulo: Mc Graw – Hill, v. 1, 1980.

PEREIRA, A. L. S.; CORDEIRO, E. M. S.; NASCIMENTO, D.M.; MORAIS, J. P. S.; SOUSA, M. S. M.; ROSA, M. F. Extração e caracterização de nanocelulose de fibras do pseudocaule da bananeira. In: Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação, 10, 2010, Maceió. **Anais...**, Maceió: 2010.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese - Escola de Química, Doutorado em Ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H., SANTOS, S. F. M., MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v. 74, p. 17-20, 2006.

POLETTI, P. **Produção, recuperação e avaliação de Pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo**. 2015. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

RAJEEV K. S.; REETA R. S.; GINCY M. M.; PANDEY A. Biotechnology Division, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology. **Renewable Energy**, p. 421–424, 2009.

ROBINSON, T.; NIGAM, P.; *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 197.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Casa do Pão Editora, 325p., 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª edição. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade, Fé e Amor. 2009.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; BOZA, A. P. O.; TEORDORO, J.; MIAYOKA, M.; SOCCOL, C. R. Optimization of Citric Acid Production by Solid State Fermentation Using Citric Pulp as Substrate. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16, 2007, Curitiba. **Anais...**, Curitiba: 2007.

RODRIGUES-ZUÑIGA, U. F.; FARINAS, C.S.; BERTUCCI-NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n. 8, p. 912-919, 2011.

SALAMONI, S. P. **Produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp. isolado de processo de compostagem**. 2005. 96f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SANTANA, M. L. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***. Dissertação – Programa de pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2010.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese – Programa de Pós-graduação Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2007.

SANTOS, T. C.; DINIZ, G. A.; SANTOS, D. C.; SANTOS, I. P. C.; FRANCO, M. Produção de celulases estáveis a temperatura e pH a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. **Anais...**, Florianópolis, 2014a.

SANTOS, F.A.; MELO, A.L.M.; BONFIM, K.S.; BARROS, T.V.F.; SANTOS, S.F.M. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei* em cultivo semissólido. **Revista Saúde e Ciência On line**, v. 3, n. 3, p. 150-163, 2014.

SILVA, L. J. C.; OLIVEIRA, T. R.; SOUZA, E. M.; LIMA, T. C.; SALLES, H. O.; ANDRADE, L. B. S. Estabilidade térmica de celulases em extratos aquosos de sementes de *Libidibia férrea* (Mart.) L.P. Queiroz. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE, 1., 2013. **Anais...**, Parnaíba, 2013.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541 - 549, 2010.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v.100, p.6679 - 6681, 2009.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

SOUSA, C. A. B. **Recuperação de poligalacturonases produzidas pela fermentação em estado sólido do resíduo agrícola do maracujá amarelo empregando sistema aquoso bifásico**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.

SOUZA, R. L. A.; CONRADO, L. S.; SILVA, F. L. H. DA.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.987-992, 2010.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; SILVA, M.J.M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011a.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas

tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011b.

SOUSA, C. A. B.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S. Lixiviação de poligalacturonases obtidas pela fermentação em estado sólido da casca e albedo do maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.7, p.790–794, 2012.

TAVARES, V.B.; SIVIERI, K.; CERON, C.R.; SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, p. 722-725, 1998.

TAVARES, M. B. R. **Estudo da produção da enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica bagaço do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger***. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2009.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. Dissertação – Programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

VENDRAMINI, A. L. A.; TRUGO L. C. Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v.15, n.4, p. 664-8, 2004.

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1230-1236, 2011.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3087–3094, 2005.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, p.797-824, 2004.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 323-329, 2000.

## ANEXO A – Resultados obtidos no processo de produção de celulases com resíduo de acerola.

Tabela 12 - Resultados de umidade obtidos durante o processo de produção das celulases.

Tempo de fermentação (horas)	UMIDADE (b.u.) (%)									
	EXP 01	EXP 02	EXP 03	EXP 04	EXP 05	EXP 06	EXP 07	EXP 08	EXP 09	
0	47,26	65,20	48,42	65,33	56,80	55,97	54,91	55,56	54,89	
24	44,79	64,36	44,47	65,00	53,31	54,06	53,60	53,12	53,78	
48	43,19	65,67	43,78	65,92	51,85	53,55	52,46	51,99	52,61	
72	40,96	64,96	42,19	65,16	50,63	52,22	51,00	50,98	51,84	
96	42,14	64,14	40,67	64,95	49,29	51,74	50,56	50,11	49,43	
120	41,39	63,12	40,93	65,96	49,85	50,76	50,74	49,66	50,12	
144	43,44	60,62	37,50	63,54	45,78	49,63	49,28	49,43	49,11	
168	38,92	61,27	36,23	60,30	48,24	48,16	48,25	48,01	48,34	
192	38,12	58,46	38,32	61,97	43,66	46,57	46,42	46,21	45,87	
216	33,74	56,51	31,04	54,53	41,71	43,72	41,40	42,13	41,99	
240	38,05	51,53	19,19	47,53	36,74	36,78	24,34	34,87	35,22	
264	22,08	42,66	12,96	53,09	37,13	-	21,91	27,58	25,98	
288	17,32	48,15	12,83	36,27	23,56	24,82	18,72	20,17	19,33	
312	16,15	45,28	9,35	39,39	25,50	18,72	13,79	15,63	14,97	
336	15,37	20,20	8,98	50,42	26,20	17,33	12,93	13,18	16,89	

Tabela 13 - Resultados de pH obtidos durante o processo de produção das celulases.

Tempo de fermentação (horas)	pH									
	EXP 01	EXP 02	EXP 03	EXP 04	EXP 05	EXP 06	EXP 07	EXP 08	EXP 09	
0	3,43	3,51	3,59	3,52	3,45	3,54	3,58	3,51	3,48	
24	3,53	3,55	3,53	3,53	3,47	3,52	3,52	3,54	3,50	
48	3,55	3,93	3,57	3,89	3,45	3,48	3,50	3,52	3,47	
72	3,52	4,15	3,51	3,97	3,39	3,48	3,47	3,51	3,48	
96	3,70	4,50	3,61	4,07	3,50	3,65	3,67	3,58	3,61	
120	3,87	4,45	3,69	4,04	3,71	3,75	3,74	3,79	3,82	
144	4,03	4,56	3,80	4,07	3,84	3,97	3,91	3,89	3,94	
168	4,06	4,61	3,88	4,09	3,94	3,98	4,01	3,91	3,97	
192	4,09	4,68	3,90	4,15	3,91	3,98	4,00	3,89	3,96	
216	4,12	4,75	3,91	4,14	3,95	4,00	3,88	3,88	3,98	
240	4,11	4,57	3,91	4,07	4,04	4,06	3,92	4,02	3,99	
264	4,11	4,64	3,77	4,22	4,04	-	3,76	4,03	3,98	
288	4,15	4,74	3,80	4,17	4,00	4,07	3,82	3,99	3,89	
312	4,20	4,76	3,84	4,11	4,07	3,94	3,85	3,95	4,02	
336	4,20	4,76	3,88	4,20	4,02	4,24	4,05	4,01	4,03	

Tabela 14 - Resultados de açúcares redutores obtidos durante o processo de produção das celulasas.

Tempo de fermentação (horas)	AR (g.g <sup>-1</sup> )									
	EXP 01	EXP 02	EXP 03	EXP 04	EXP 05	EXP 06	EXP 07	EXP 08	EXP 09	
0	0,0980	0,0980	0,0980	0,0980	0,0980	0,0980	0,0980	0,0980	0,0980	0,0980
24	0,0594	0,0353	0,0632	0,0375	0,0481	0,0482	0,0496	0,0499	0,0400	0,0400
48	0,0606	0,0132	0,0573	0,0114	0,0459	0,0446	0,0440	0,0447	0,0444	0,0444
72	0,0541	0,0127	0,0429	0,0124	0,0365	0,0358	0,0296	0,0339	0,0341	0,0341
96	0,0326	0,0134	0,0336	0,0149	0,0275	0,0236	0,0245	0,0251	0,0238	0,0238
120	0,0277	0,0123	0,0243	0,0136	0,0193	0,0177	0,0189	0,0181	0,0188	0,0188
144	0,0251	0,0139	0,0235	0,0159	0,0183	0,0173	0,0166	0,0180	0,0178	0,0178
168	0,0262	0,0144	0,0225	0,0159	0,0178	0,0151	0,0166	0,0157	0,0161	0,0161
192	0,0231	0,0143	0,0219	0,0188	0,0168	0,0129	0,0147	0,0154	0,0159	0,0159
216	0,0238	0,0120	0,0200	0,0157	0,0143	0,0146	0,0182	0,0151	0,0148	0,0148
240	0,0188	0,0103	0,0205	0,0144	0,0156	0,0159	0,0240	0,0176	0,0155	0,0155
264	0,0250	0,0156	0,0296	0,0146	0,0160	-	0,0285	0,0167	0,0158	0,0158
288	0,0262	0,0134	0,0282	0,0198	0,0187	0,0153	0,0189	0,0179	0,0181	0,0181
312	0,0244	0,0134	0,0277	0,0180	0,0161	0,0231	0,0309	0,0228	0,0238	0,0238
336	0,0237	0,0148	0,0286	0,0142	0,0181	0,0170	0,0225	0,0189	0,0182	0,0182

Tabela 15 - Resultados de atividade enzimática obtidos durante o processo de produção das celulasas.

Tempo de fermentação (horas)	CMCase (U.g <sup>-1</sup> )									
	EXP 01	EXP 02	EXP 03	EXP 04	EXP 05	EXP 06	EXP 07	EXP 08	EXP 09	
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0	0	
24	0,1656	0,2785	0,3594	0,1757	0,6184	0,2440	0,3382	0,3102	0,3402	
48	0,0485	0,2395	0,0232	0,2395	0,3309	0,0864	0,1585	0,1621	0,1812	
72	0,1667	0,1876	0,4082	0,4415	0,3100	0,2680	0,2804	0,2903	0,2655	
96	0,2268	0,1687	0,4586	0,7730	0,4843	0,4423	0,2825	0,2799	0,2889	
120	0,3353	0,1995	0,9387	0,6284	0,5267	0,5927	0,4764	0,4805	0,4602	
144	0,5576	0,2302	0,9113	0,6099	0,5680	0,7011	0,4925	0,4901	0,4782	
168	0,5074	0,2636	1,1677	0,7171	0,6740	0,6987	0,5295	0,5193	0,5501	
192	0,5710	0,2270	1,0460	0,5424	0,6499	0,7778	0,4974	0,4673	0,4788	
216	0,6565	0,2362	1,2517	0,5444	0,4813	0,5823	0,5553	0,5102	0,5432	
240	0,3743	0,1591	0,9515	0,5289	0,6797	0,5093	0,4624	0,4113	0,4497	
264	0,6127	0,4504	0,9998	0,7984	0,6252	-	0,4187	0,3999	0,4365	
288	0,5496	0,4199	0,5916	0,9265	0,4908	0,6167	0,5697	0,551	0,5566	
312	0,5448	0,3686	0,6070	0,6683	0,8048	0,9754	0,7366	0,8344	0,8621	
336	0,4690	0,3370	0,8062	0,6045	0,6345	0,5811	0,5735	0,5211	0,5381	

Tabela 16 - Resultados do estudo da termoestabilidade das celulases produzidas.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura</b>	<b>CMCase (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade Residual (%)</b>
1	10	2,0988	98,08
2	20	2,1109	98,64
3	30	2,1399	100,00
4	40	1,9301	90,20
5	50	1,8279	85,42
6	60	0,8671	40,52
7	70	0	0,00
8	80	0	0,00
9	90	0	0,00

Tabela 17 - Resultados do estudo da estabilidade das celulases produzidas frente à variações de pH.

<b>Ensaio</b>	<b>pH</b>	<b>CMCase (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade Residual (%)</b>
1	2,5	1,0953	51,40
2	3,5	1,9341	90,77
3	4,5	2,1308	100,00
4	5,5	1,5997	75,08
5	6,5	0,0881	4,13
6	7,5	0	0,00
7	8,5	0	0,00
8	9,5	0	0,00
9	10,5	0	0,00