

Lucas Rodolfo Inacio da Silva

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira

Coorientadores: Prof. Dr. Cristiano José de Andrade

Prof. Dr. Lindomar Alberto Lerin

Florianópolis
2019

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

Da Silva, Lucas Rodolfo Inacio

Produção de Ácido Giberélico por Fermentação em Estado Sólido a partir de Resíduo Agroindustrial / Lucas Rodolfo Inacio da Silva ; orientadora, Débora de Oliveira ; coorientador, Cristiano José de Andrade ; coorientador, Lindomar Alberto Lerin. Florianópolis, SC, 2019.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Regulador de crescimento. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Fermentação em estado sólido. 5. *Fusarium fujikuroi*. I. De Oliveira, Débora. II. De Andrade, Cristiano José. III. Lerin, Lindomar Alberto. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Lucas Rodolfo Inacio da Silva

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Florianópolis, 09 de maio de 2019.

Prof.^a Cinthia Soares, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Débora de Oliveira, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cristiano José de Andrade, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Lindomar Alberto Lerin, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Patrícia Poletto, Dra.
Membro Externo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Manuela Balen, Dra.
Membro Externo
Universidade Federal de Santa Catarina

A Maria Alves, minha mais que mãe e avó,
pelo incondicional amor, à minha segunda
mãe Ana Maria e tio/pai Ormando (velho)
por tamanho amor e crença em mim.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A gratidão vai muito além de apenas um “obrigado” e ultrapassa interesses. É uma virtude de reconhecer em Deus e no próximo o seu verdadeiro valor assim como o que por você é feito sem necessitar algo em troca. Acredito que só está apto a crescer, quem sabe agradecer.

Agradeço primeiramente a Deus, pela permissão de acordar, levantar e buscar meus sonhos, pela força diária oferecida, pelas oportunidades e pela confiança colocada em minhas mãos, de viver.

Ao término de mais um ciclo, movido por inúmeras dificuldades e vitórias, venho expressar meu profundo agradecimento aos que contribuíram para o êxito deste trabalho.

Inicialmente à minha família. Minhas mães, Maria Alves e Ana Maria, pela educação e instigação a perseguir a aquisição de conhecimento.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Débora de Oliveira, pela orientação, amizade, oportunidades e carinho de mãe pelos seus orientandos, permitindo assim excelência acadêmica e prestígio ao trabalho. Agradeço também aos meus coorientadores Profs. Drs. Cristiano José de Andrade e Lindomar Alberto Lerin.

À minha irmã Gabriella, por ter o melhor de mim guardado com segurança em seu coração, pelo apoio sempre e crença no meu potencial.

Aos meus amigos-irmãos, Kaíque e Joyce Ramos, pelo amor liberado mesmo na distância.

A Cervejaria On Tap, pela presteza e concessão do resíduo.

A Manuela Balen pela paciência e solicitude.

A Leandro Zagonel pela irmandade.

A Jaqueline Siqueira, pelas contribuições.

A Carla Lara, pelo apoio, dúvidas tiradas, amizade, etc.

A Charline Bonatto, pela parceria na obtenção dos resultados.

A Vinicius e Marina pela ajuda no LCP.

A Katyane por sempre oferecer um apoio, uma palavra de ânimo e amizade.

A Lucas Schlindwein, pelos conselhos.

Aos professores pelo aprendizado, lições e por serem base para minhas conquistas.

Aos amigos e colegas de curso Gabriela Oliveira, Gabriela Nayana, Eloise Cordeiro, Ana Claudia, Luiz Paulo, Danyelle Gurgel, Alisson Freire, Carlos Tolentino, Caroline Torres, Janaina Lima, Jéssica

Lira, Ana Paula, Anderson Felipe, Bernardo Araldi, Ana Martins, Ingrid e Jaísia pelas diversas contribuições. Vocês são parte dessa história.

E por último e não menos importante, agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste trabalho bem como pela bolsa de estudos.

O fim de mais uma fase.

RESUMO

O ácido giberélico (GA3) é um fitohormônio – composto de alto valor agregado - que atua como regulador de crescimento, largamente utilizado em formulações agrícolas. A produção de GA3 em escala industrial é realizada via fermentação submersa (Fsub) usando o *Fusarium fujikuroi*. Em geral, quando comparado a fermentação em estado sólido (FES), a Fsub apresenta menor rendimento e maior custo de purificação. Assim, este trabalho objetivou a otimização da produção de GA3 por *F. fujikuroi* via FES, usando resíduo de malte triturado (RMT) como substrato de baixo custo. Foi realizado um planejamento experimental do tipo 2² com triplicata no ponto central. O planejamento foi composto por três níveis, o efeito da umidade entre 60 e 80%, e temperatura entre 28 e 35°C. Uma cinética prévia definiu o tempo de fermentação em 10 dias. O maior rendimento obtido foi de 0,8 g GA3/kg substrato, ensaio realizado com teor de umidade do meio de 80%, e 28°C. Portanto, RMT é um potencial meio de cultura alternativo para produção de GA3, pois a condição otimizada resultou em 0,82 g GA3/kg substrato.

Palavras-chave: Regulador de crescimento. Resíduos agroindustriais. Fermentação em estado sólido. *Fusarium fujikuroi*.

ABSTRACT

Gibberellic acid (GA3) is a phytohormone – composed of high added value - which acts as a growth regulator, widely used in agricultural formulations. The production of GA3 an industrial scale is carried out by submerged fermentation (SmF) using *Fusarium Fujikuroi*. In general, when compared to solid state fermentation (SSF), SmF has lower yield and higher purification cost. Thus, the aim of this work was to optimize the production of GA3 by *F. fujikuroi* by SSF, using crushed malt residue (CMR) as a low-cost substrate. An experimental design of type 2² with triplicate at the central point was carried out. The experimental design was composed by three levels, the effect of humidity between 60 and 80%, and temperature between 28 and 35 ° C. A previous kinetics was used to define the time of fermentation, 10 days. The highest yield obtained was 0.8 g GA3/kg substrate, an experiment that was carried out with 80%, and 28 ° C. Therefore, CMR is a potential alternative culture medium for GA3 production, since the optimized condition reached 0.82 g of GA3/kg of substrate.

Keywords: Growth regulator. Agroindustrial residues. Solid-state fermentation. *Fusarium fujikuroi*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos de produção e isolamento de giberelinas.....	31
Tabela 2 - Utilização comercial e potencial do GA3.....	32
Tabela 3 - Composição do RMT.....	35
Tabela 4 - Composição do meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA).....	41
Tabela 5 - Composição da solução de suplementação.	42
Tabela 6 - Níveis do Planejamento Experimental 2 ²	43
Tabela 7 - Propriedades e composição do RMT.	47
Tabela 8 - Matriz do planejamento 2 ² (valores codificados e reais) com as respostas da produção de GA3 e crescimento micelial por FES.....	51
Tabela 9 - ANOVA para produção de GA3.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura representativa dos principais reguladores de crescimento vegetal.	27
Figura 2 - Estrutura do <i>ent</i> -giberelano (à esquerda) e do 20-nor <i>ent</i> -giberelano (à direita).	29
Figura 3 - Biossíntese de giberelinas em plantas.....	30
Figura 4 - Estrutura do GA3.....	32
Figura 5 - Fluxograma do processo produtivo de fabricação da cerveja.	34
Figura 6 - Etapas do processo de FES para produção do GA3.....	39
Figura 7 - Placa de Petri com meio BDA contendo <i>Fusarium fujikuroi</i> , após período a 30 °C.	41
Figura 8 - Atividade da água (a_w) para o substrato RMT.	48
Figura 9 - Influência do tempo de fermentação na formação de biomassa no meio de fermentação.	49
Figura 10 - Cinética de produção de GA3 (70% U; 31,5 °C).....	50
Figura 11 - Crescimento fúngico em FES após 96 horas.	52
Figura 12 - Gráfico de Pareto.	54
Figura 13 - Gráfico de curvas de contorno para produção de GA3.....	56
Figura 14 - Cinética de Produção de GA3 - Ensaio 2 (80%U; 28 °C) ..	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
atm	Atmosfera
a_w	Atividade da água
BDA	Batata Dextrose Ágar
C	Carbono
Ca	Cálcio
Cu	Cobre
CuSO_4	Sulfato de Cobre
cm	Centímetro
Fe	Ferro
FES	Fermentação em Estado Sólido
FeSO_4	Sulfato de Ferro
Fsub	Fermentação Submersa
<i>F.</i>	<i>Fusarium fujikuroi</i>
g	gramas
GA_3	Ácido Giberélico
GAs	Giberelinas
HCl	Ácido Clorídrico
kg	Quilogramas
K	Potássio
K_2HPO_4	Fosfato de Potássio Dibásico
KCl	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4	Fosfato de Potássio Monobásico
L	Litro
mL	Mililitros
m/v	Massa/Volume
MgSO_4	Sulfato de Magnésio
min	Minutos
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
nm	Nanômetro
N	Nitrogênio
NH_4SO_4	Sulfato de Amônio
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMT	Resíduo de Malte Triturado
rpm	Rotações por Minuto
S	Enxofre
sp.	Espécie Microbiana não Identificada

t	Tonelada
U\$	Dólar
UV	Ultra Violeta
v/v	Fração Volumétrica
Zn	Zinco
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVO GERAL	26
1.1.1 Objetivos Específicos	26
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	27
2.1.1 Giberelinas	27
2.1.1.1 Histórico das giberelinas	28
2.1.1.2 Estrutura das giberelinas	28
2.1.1.3 Biossíntese das giberelinas em plantas.....	29
2.1.1.4 Produção de giberelinas por fungos	30
2.2 ÁCIDO GIBERÉLICO (GA ₃).....	31
2.2.1 Propriedades físicas, químicas e biológicas	31
2.2.2 Utilização do GA₃	32
2.3 PRODUÇÃO DO GA ₃	32
2.3.1 Fermentação em estado sólido	32
2.3.1.1 Substratos	33
2.3.1.1.1 Resíduo de malte triturado	33
2.3.1.2 Produção de GA ₃ por processo de FES a partir de resíduos agroindustriais: Estado da arte	35
2.3.2 Micro-organismos	36
2.3.2.1 <i>Fusarium fujikuroi</i>	36
2.4 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE GA ₃	36
2.4.1 Nitrogênio	36
2.4.2 Carbono	36
2.4.3 Elementos traços	36
2.4.4 pH	36
2.4.5 Temperatura	37
2.4.6 Umidade	37
2.4.7 Atividade da água	37
2.4.8 Aeração	37

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 MATÉRIA-PRIMA	39
3.1.1 Caracterização.....	40
3.2 MICRO-ORGANISMO.....	40
3.2.1 Manutenção da cepa	40
3.2.1.1 Repique do <i>Fusarium fujikuroi</i>	40
3.2.1.2 Preparo do Inóculo.....	41
3.3 PRODUÇÃO DO GA3	42
3.3.1 Preparação do sistema de cultivo.....	42
3.3.2 Otimização da produção de GA3.....	43
3.3.2.1 Cinética prévia para definição do tempo de fermentação	43
3.3.3 Incubação.....	44
3.4 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO	44
3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GA3	44
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE GA3.....	45
3.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GA3.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 COMPOSIÇÃO DO RMT	47
4.2 ATIVIDADE DA ÁGUA PARA O RMT (a_w).....	48
4.3 PREPARO DO INÓCULO	48
4.4 CINÉTICA PARA PRODUÇÃO DE GA3	49
4.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO GA3 POR FES.....	50
4.5.1 Análise qualitativa do crescimento microbiano.....	51
4.5.2 Concentração do GA3.....	53
4.6 PERFIL CINÉTICO DE PRODUÇÃO DE GA3	57
5 CONCLUSÕES.....	59
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

Por quê?

- * O ácido giberélico é um regulador de crescimento vegetal amplamente usado em formulações agrícolas;
- * Fermentação em estado sólido permite a valorização de resíduos e possibilita maiores rendimentos do produto de interesse quando comparada a fermentação submersa.

O que foi investigado?

- * Poucos são os trabalhos para produção de ácido giberélico usando resíduo de malte triturado, como Pinheiro (2015) e Werle (2017);
- * Não há na literatura trabalhos para produção de ácido giberélico usando o resíduo de malte triturado como meio de cultura.

Hipóteses?

- * É possível obter ácido giberélico (GA3) a partir de resíduo de malte triturado.

Métodos

- * Extração em tampão fosfato;
- * Purificação por solvente orgânico;
- * Quantificação por método espectrofotométrico;

Respostas

- * GA3.

1 INTRODUÇÃO

É crescente o número de possibilidades oferecidas por processos biotecnológicos apresentando soluções para atender a sociedade nas mais diversas necessidades (energia, alimentos, combustíveis, medicamentos, vestuário), assim como para substituir tecnologias poluentes ou que contribuam para esgotamento de fontes não-renováveis.

No Brasil, grande quantidade de subprodutos como bagaços, cascas e farelos, é produzido em função das atividades agroindustriais e das indústrias de alimentos. Logo, a utilização desses resíduos como meio de cultura alternativo é uma estratégia interessante. Resíduos estes, que são, geralmente, ricos em nutrientes como nitrogênio, sais minerais e carbono; essenciais para o cultivo de fungos e outros microorganismos (CASTILHO et al., 2000; DURAND, 2003).

A FES é um processo que utiliza material não solúvel em estado sólido como suporte físico e fonte de nutrientes, além de minimizar o impacto ambiental (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003), tem por vantagens a alta produtividade e baixo custo de produção em função do crescimento microbiano ocorrer em condições mais próximas às dos habitats naturais, além do tratamento dos resíduos utilizados como meio serem de fácil tratamento (BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2011).

A ação biológica das giberelinas (grupo de reguladores de crescimento vegetal) varia de acordo com sua aplicação. As giberelinas podem alterar a dormência de sementes; acelerar o crescimento caulinar; induzir a floração; aumentar o teor de açúcar da cana-de-açúcar, entre outras (ALEXANDER et al., 1970).

O GA3, um dos membros mais importantes da classe de giberelinas, é produzido em escala industrial via Fsub. Neste sentido, estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de produzir GA3 via FES empregando resíduos agroindustriais como substratos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir GA3 com *F. fujikuroi* via FES usando RMT – substrato alternativo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral produzir GA3 com *F. fujikuroi* via FES usando RMT – substrato alternativo.

1.1.1 Objetivos Específicos

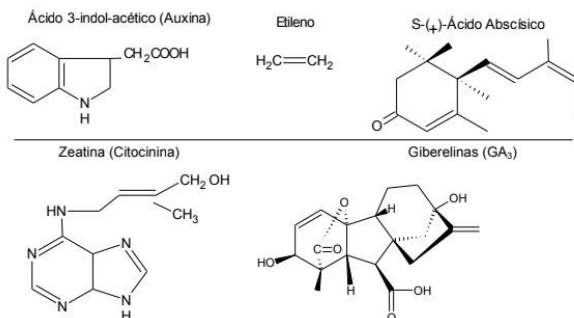
- 1) analisar qualitativamente o crescimento do *F. fujikuroi* no RMT;
- 2) avaliar o efeito da umidade e temperatura, bem como a interação entre esses fatores, na produção de GA3, utilizando planejamento fatorial.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

Reguladores de crescimento são substâncias químicas que causam respostas fisiológicas às plantas (ROSS, 2002). São cinco, os principais reguladores de crescimento: auxinas (IAA), citocininas, gás etileno, ácido abscísico (ABA) e giberelinas (GAs) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura representativa dos principais reguladores de crescimento vegetal.



Fonte: Kende; Zeevart (1997).

2.1.1 Giberelinas

As giberelinas, dentre os principais reguladores de crescimento, destacam-se por ser um hormônio natural em plantas e importante promotores e reguladores de crescimento. As GAs afetam a planta de forma completamente sistêmica, uma vez que aplicadas em uma determinada parte da planta, são carregadas de forma direcionada à regiões de influência regulatória (DAVIES; FIDELIBUS; TEIXEIRA, 2002). As GAs constituem um importante grupo de fitohormônios da família de ácidos diterpenóides, exercendo diversas funções sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas, como: germinação, expansão das folhas, desenvolvimento das flores e, estímulo à atividade de transferência do sistema vascular, causando maior formação de xilema e floema em plantas lenhosas (DAVIES, 2004; ROBERTS; TUCKER, 2000). Essas propriedades, tornaram as GAs indispensáveis à agricultura moderna.

2.1.1.1 Histórico das giberelinas

Kurosawa (1926), ao estudar doenças do cultivo de arroz, observou crescimento excessivo em plantas eivadas por *Gibberella fujikuroi*. Além disso, ao aplicar o extrato desses tecidos em partes ainda não infectadas, notou resposta semelhante. A comprovação de que tratava-se de um regulador e sua purificação, deu-se anos depois, por Yabuta, em 1935 (CARL, 1935). Entre os anos de 1927 e 1940, mais de 50 publicações trataram de propriedades químicas e biológicas das giberelinas (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

Takahashi et al. (1955), na década de 50, obtiveram sucesso na separação da giberelina denominada A, em três componentes, que por ordem cronológica de descoberta receberam a numeração de 1 a 3 subscritamente (A_1 , A_2 e A_3) e ainda na mesma década, Radley (1956) e Kato et al. (1962) comprovaram que as giberelinas são reguladores naturais de desenvolvimento e crescimento vegetal.

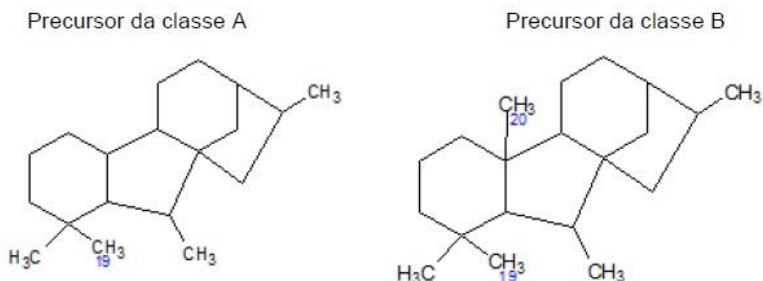
Segundo Fuska et al. (1961), até o final da década de 60 cerca de 27 GAs já haviam sido produzidas via Fsub e em seguida identificadas. As décadas subsequentes (70 e 80) foram marcadas por estudos de produção desse fitohormônio em Fsub, cujos rendimentos obtidos foram 0,5 – 5 g/L (VASS e JEFFERYS, 1979; GOHLWAR et al., 1984; KAHLONK e MALHOTRA, 1986). No final da década de 80, a maioria dos vicultores passaram a aplicar o ácido giberélico em cachos de uvas (CATO, 2002; TERRA, 2003).

Atualmente são conhecidas cerca de 136 tipos de GAs, fundamentais na agricultura moderna (JEFFERYS, 1970; BLAKE et al., 2000; HEDDEN; PHILLIPS, 2000; BÖMKE; TUDZYNSKI, 2009).

2.1.1.2 Estrutura das giberelinas

As GAs, presentes em baixas concentrações nas plantas pertencem ao grupo de diterpenóides tetracíclicos. O esqueleto *ent*-giberelano representado na Figura 2 é o precursor das classes de giberelinas.

Figura 2 - Estrutura do *ent*-giberelano (à esquerda) e do 20-nor *ent*-giberelano (à direita).

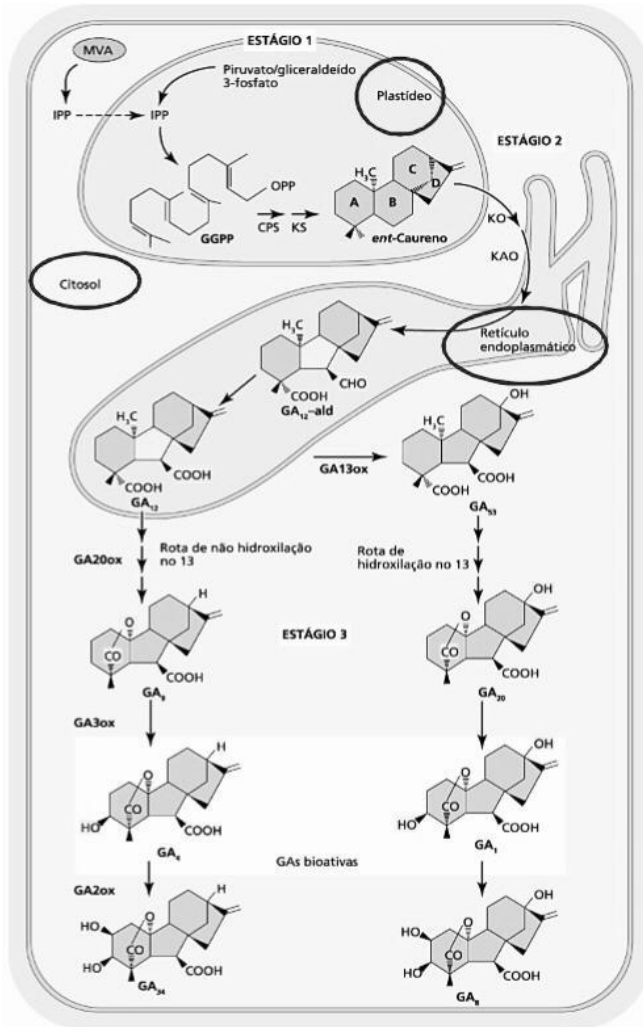


Fonte: Richmann, 1999.

2.1.1.3 Biossíntese das giberelinas em plantas

O passo inicial na biossíntese das giberelinas envolve a conversão do geranyl-difosfato a *ent*-copalil-difosfato. Em seguida, o *ent*-copalil-difosfato é convertido a *ent*-caureno. As enzimas catalisadoras dessas reações são as sintases *ent*-copalil-difosfato e *ent*-caureno, respectivamente (HEDDEN; THOMAS, 2016). A partir do *ent*-caureno, as reações subsequentes catalisadas pela *ent*-caureno oxidase produzem o ácido *ent*-caurenoico e GA₁₂ (HELLIWELL et al., 2001; YAMAGUCHI, 2008). Na etapa final da rota de biossíntese das giberelinas, GA₁₂ é convertida em GA₄ pela oxidação do C-20 e C-3 pela enzima GA 20-oxidase (GA20ox) e GA-3-oxidase (GA3ox), respectivamente, como pode ser observado na Figura 3 (OLSZEWSKI et al., 2002; HEDDEN; SPONSEL, 2015).

Figura 3 - Biossíntese de giberelinas em plantas.



Fonte: Universidade Federal do Ceará, 2012.

2.1.1.4 Produção de giberelinas por fungos

A Tabela 1 apresenta algumas informações relevantes sobre a produção e isolamento de GAs.

Tabela 1 - Estudos de produção e isolamento de giberelinas.

Autores	Estudo realizado
Borrow, Jefferys e Nixon (1960)	Patentaram um método de produção do ácido giberélico em dois ou mais estágios de cultivo.
Fernandes-Martins et al. (2002)	Observaram que a biossíntese de giberelinas, principalmente GA ₃ , ocorre sob condições limitadas de nitrogênio.

Fonte: Autor, 2018.

2.2 ÁCIDO GIBERÉLICO (GA₃)

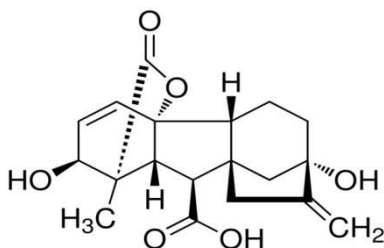
Atualmente, cerca de 136 tipos de GAs foram isoladas. Dentre estas, destaca-se o ácido giberélico, por sua intensiva utilização na agricultura (CROKER, 2000).

2.2.1 Propriedades físicas, químicas e biológicas

O GA₃, caracterizado quimicamente como ácido tetracíclico dihidroxi- γ -lactônico, de fórmula estrutural C₁₉H₂₂O₆, massa molecular de 346,7 g/mol e de ponto de fusão 233 – 235 °C (O'NEIL, 2001), configura um sólido cristalino, estável quando seco, mas instável em soluções aquosas. O GA₃ é pouco solúvel em água, pode atingir \approx 5 g/L (MANDER, 1992; BRÜCKNER; BLECHSCHMIDT, 1991). Ainda segundo estes autores, em soluções aquosas, tem potencial hidrogeniônico ácido (3-4) e meia vida de 14 dias a 20 °C e 2 horas a 50 °C.

A Figura 4 ilustra a estrutura química do GA₃.

Figura 4 - Estrutura do GA3.



Fonte: ANVISA, 2018.

2.2.2 Utilização do GA3

O GA3 é a giberelina mais abundante em plantas. Normalmente, os tecidos vegetais contêm cerca de 0,001 – 1 mg de equivalentes de GA3 por quilograma de peso fresco de matéria vegetal (ESCHEL et al., 2000). Por possuir diversas funções no desenvolvimento das plantas, esse fitohormônio presente nos tecidos vegetais, passou a ser amplamente aplicado em formulações agrícolas.

A Tabela 2 apresenta algumas das aplicações do uso de GA3.

Tabela 2 - Utilização comercial e potencial do GA3.

Autores	Aplicação	Resposta
Gozalez-Rossia et al., (2007)	Pêssegos e nectarina	Inibição da floração
Baumgartner et al., (2008)	Sementes de ervilha	Crescimento dos brotos
Sharma e Singh, (2009)	Morango	Estímulo do crescimento (altura)

Fonte: Autor, 2018.

2.3 PRODUÇÃO DO GA3

2.3.1 Fermentação em estado sólido

A FES consiste no crescimento microbiano a partir de material sólido (substratos insolúveis) (PANDEY et al., 2000). Durante a FES,

diversos metabólitos microbianos são biossintetizado, mais especificamente, o meio de cultura induz a secreção de determinadas moléculas. Além disso, a restrição de água (FES) estimula a produção de metabólitos ímpares cujo, quando comparado com a Fsub (SIGHANIA et al., 2010).

Como supracitado, as GAs são produzidas tradicionalmente via Fsub. Logo, devido as vantagens da FES como menor custo operacional e capital de investimento, simplificação da etapa de purificação, etc a mesma é uma potencial alternativa a Fsub (produção de gliberelinas) (SIGHANIA et al., 2010). Além disso, os substratos utilizados na FES são, geralmente, resíduos agroindustriais como farelos, cascas, bagaços, etc (baixo custo) (PANDEY, 2003).

2.3.1.1 Substratos

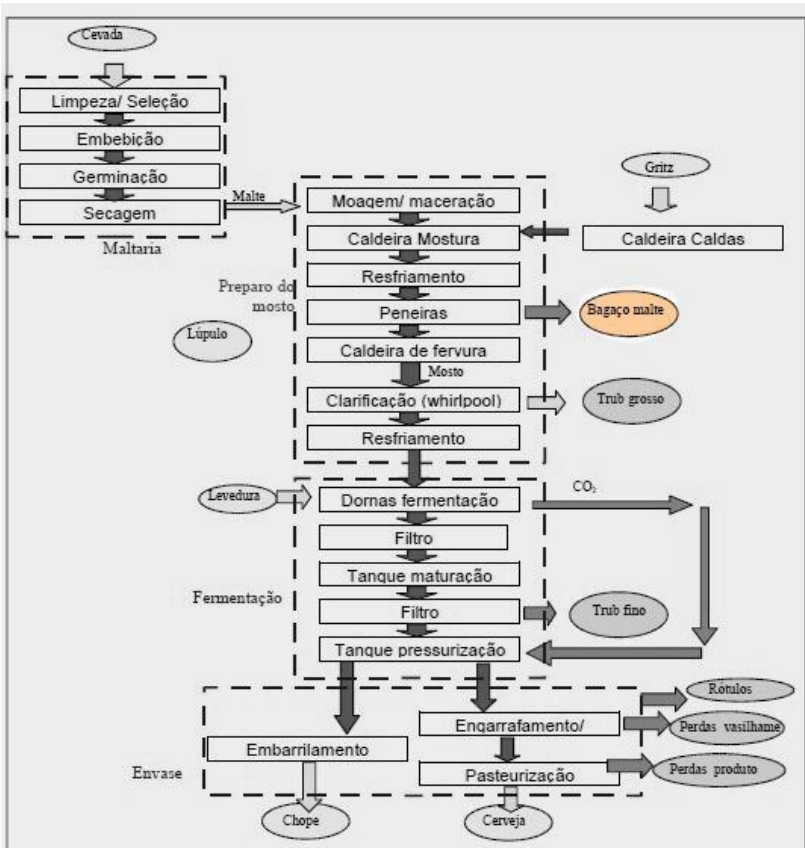
No Brasil, uma grande quantidade de subprodutos como bagaços, cascas e farelos é produzida. Considerando a disponibilidade e alta concentração de nutrientes, esses subprodutos podem ser usados como substrato/suporte em FES. (CASTRO; PEREIRA, 2010).

2.3.1.1.1 Resíduo de malte triturado

Em 2014, o Brasil produziu cerca de 14 bilhões de litros de cerveja, configurando-o como o terceiro maior produtor mundial, (CERVBRASIL, 2015). Nesse sentido, vale ressaltar o número crescente de cervejarias artesanais.

A formação de RMT dá-se durante o processo de fabricação de cerveja, mais especificamente na etapa de peneiração, que segundo Santos e Ribeiro (2005), para 100 litros de cerveja produzidos, geram-se em média 17 kg de RMT. A Figura 5 apresenta o fluxograma do processo de produção de cerveja.

Figura 5 - Fluxograma do processo produtivo de fabricação da cerveja.



Fonte: CETESB, 2005.

A sua composição varia de acordo com a época de colheita, variedade do malte e processo de produção. A Tabela 3 apresenta dados de composição do RMT (Debiagi, 2012).

Tabela 3 - Composição do RMT.

COMPONENTE	COMPOSIÇÃO (%)
Base úmida (água)	60 – 80
Carboidratos	10 – 15
Proteína bruta	2 – 5,5
Gorduras totais	0,5 – 2,5

Fonte: Debiage, 2012.

Devido a sua boa porosidade (alta area superficial), fonte de nutrientes e baixo custo, o RMT vem sendo empregado em diversos processos biotecnológicos (FES) (COSTA et al., 2006; PANDEY, SOCCOL e LARROCHE, 2008).

2.3.1.2 Produção de GA₃ por processo de FES a partir de resíduos agroindustriais: Estado da arte

Machado, Soccol e Pandey (2002) obtiveram, utilizando cinco cepas de *Fusarium fujikuroi* e uma de *Fusarium moniliforme*, produções de ácido giberélico: 0,25, 0,49 e 4,9 g/kg de substrato utilizando 10 g de diferentes resíduos agroindustriais como substrato: mandioca, casca de café e bagaço seco de laranja a 29 °C por 7 dias, em escala laboratorial, respectivamente.

Estudos empregando farelo de trigo e pinhão manso seco obtiveram resultados expressivos em reator de 50 L de capacidade, tendo como agente metabolizador o *Fusarium fujikuroi* ATCC 12616, em sistema laboratorial de colunas, alcançando valor com 5 g de ???/kg e 105 g de GA₃ produzidos por kg de substrato, por *Fusarium moniliforme* a 30 °C por 10 dias e 150 rpm (CORONA, SANCHEZ e AUGUSTIN, 2005; RANGASWAMY, 2012).

Resíduos como bagaço de coco verde, farelo de arroz bruto e cascas de café e amendoim, com potencial de utilização nos processos de FES, assim como o RMT, foram estudados, comprovando sua potencialidade. Mas, em se tratando de produção de GA₃, pouco ainda foi estudado utilizando esse resíduo (SANTOS, 2008).

2.3.2 Micro-organismos

Os principais produtores de giberelinas são: *Gibberella fujikuroi* (renomeado de *Fusarium fujikuroi*), *Fusarium moniliforme*, *Sphaceloma* sp., *Phaeosphaeria* sp., e *Neurospora* sp. (NCBI, 2010).

2.3.2.1 *Fusarium fujikuroi*

O fungo ascomiceto, *Gibberella fujikuroi* (recentemente renomeado de *Fusarium fujikuroi*) é, industrialmente, o mais utilizado para produção do fitohormônio (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991). Em meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar), o cultivo dos micro-organismos desse gênero apresenta inicialmente coloração branca, podendo, com o passar do tempo, apresentar coloração cinza, púrpura ou laranja (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

2.4 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE GA3

2.4.1 Nitrogênio

Geralmente, a restrição de nitrogênio no meio de cultura induz a altas produções de GA3 Segundo (Bu'Lock et al., 1974; Candau et al., 1992).

2.4.2 Carbono

A fonte de carbono é essencial para o metabolismo energético central. A combinação de açúcares fermentáveis como glicose e frutose, com fontes de carbono de assimilação lenta como óleos ou amido, é uma boa estratégia para a produção de fitohormônio como o GA3 (BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1996; RANGASWAMY, 2012 e MACHADO, SOCCOL E PANDEY, 2002).

2.4.3 Elementos traços

Os seguintes minerais Fe, Cu, Mn, Zn, Al, Mg, K, P, S, Ca, além das vitaminas são requeridos em processos fermentativos de produção de GA3 (MACHADO et al., 2001).

2.4.4 pH

Há poucos trabalhos que sugeriram valores de pH na produção de GA3 em FES. Segundo Gelmi et al. (2000), a faixa de pH recomendada está entre 4,5 – 5,5. Ferreira-Leitão et al. (2010) afirmam que os valores ótimos de pH para produção de GA3 estão na faixa ácida.

2.4.5 Temperatura

A maioria dos estudos desenvolvidos, utilizando cepas de *Fusarium fujikuroi* como agente metabolizador, descrevem uma faixa de temperatura entre 25 °C (GELMI et al., 2002) e 30 °C (SHUKLA et al., 2005). Temperaturas elevadas (acima da faixa descrita) afetam consideravelmente o desenvolvimento do microrganismo assim como a produção do produto de interesse podendo ocasionar perda da cepa (OLIVEIRA, 2010).

2.4.6 Umidade

A umidade do substrato em uma FES, é uma das principais variáveis que influenciam esse bioprocessos (SINGHANIA et al., 2009). Na FES, o teor de umidade é limitante, uma vez que a quantidade máxima de água no meio, é função da capacidade de absorção do substrato, o que não pode ser abundante para não reduzir a porosidade e, conseqüentemente, as trocas gasosas do meio. Em geral, dependendo do substrato, para produção de GA3, a literatura aborda teores de umidade que variam entre 30 e 85% (OLIVEIRA, 2010).

2.4.7 Atividade da água

A atividade de água (a_w) de um meio é importante na transferência de massa de água e solutos através da membrana celular (MAGAN, 2001; PASCUAL et al., 1999). Os estudos realizados para a produção do ácido giberélico, mostram que existe uma faixa ótima de a_w entre 0,98 e 0,999 (CORONA, DORIS e AGOSTIN, 2004).

2.4.8 Aeração

Para produção de GA3 empregando processos de FES, na literatura, são encontradas velocidades muito variadas, compreendendo valores desde 0,18 até 1,8 L de ar/ hora.kg de substrato (RODRIGUES, 2010). Devido ao fato do processo de biossíntese do fungo *Fusarium fujikuroi* compreender várias etapas oxidativas, a aeração é um fator crítico. A síntese de polissacarídeos e o espessamento do meio pela biomassa, afetam a produção de GAs, pois tendem a diminuir a transferência de oxigênio (BANDELIER et al, 1996).

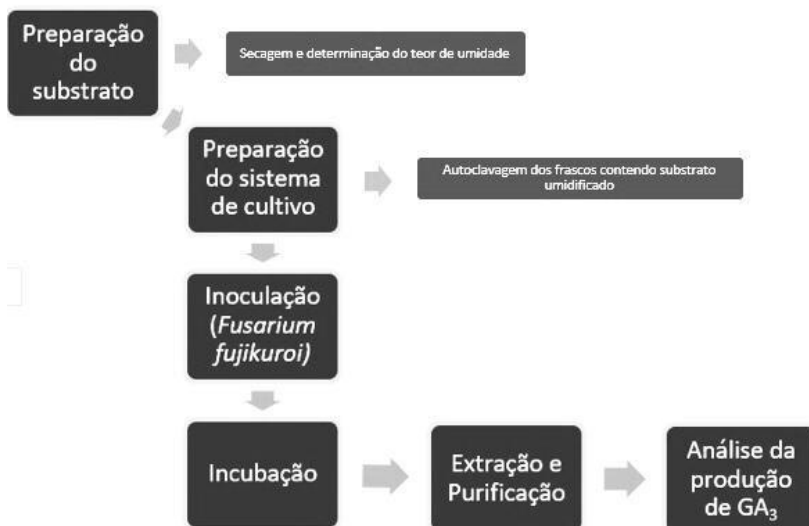
2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, devido a importância dos fitohormônios na agricultura, a redução do custo de produção de GA3 (fitohormônio) através, por exemplo, da substituição da Fsub por FES é de grande interesse industrial. Neste sentido, o processo de FES pode utilizar resíduos agroindustriais como meio de cultura, reduzindo ainda mais o custo de produção. Além disso, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato minimiza o impacto ambiental – *concept of green chemistry*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa (setor de Microbiologia) da Central de Laboratórios do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis – Santa Catarina. As etapas necessárias para a produção do GA3 estão apresentadas no fluxograma apresentado a seguir (Figura 6).

Figura 6 - Etapas do processo de FES para produção do GA3.



Fonte: Autor, 2018.

3.1 MATÉRIA-PRIMA

O substrato alternativo utilizado neste trabalho foi o RMT, cedido, gentilmente, pela indústria de cerveja artesanal *On Tap*, localizada em São José/SC Brasil. RMT foi coletado imediatamente após a peneiração. Em seguida, RMT peneirado foi seco em estufa horizontal com circulação de ar a 50°C até massa constante. Após

secagem, foi armazenado em sacos hermeticamente fechados para posterior uso.

3.1.1 Caracterização

Para determinar a umidade, uma amostra (20 g) do material foi seca em estufa a 60 °C. Após a secagem, foi determinado a massa da amostra seca, e então calculada a umidade. Os testes foram realizados em triplicata.

A umidade foi ajustada pela adição de água destilada, calculada utilizando a equação apresentada a seguir:

$$V_{aa} = M_{aa} = m_i * [(V_2 - V_1) / (1 - V_2)]$$

Sendo:

V_{aa} = volume de água a ser adicionado;

M_{aa} = massa de água adicionada;

m_i = quantidade de substrato utilizado;

V_2 = umidade desejada;

V_1 = umidade encontrada.

A caracterização do substrato, em relação a matéria seca, proteínas, extrato etéreo, teor de amido e açúcares foi realizada segundo a metodologia descrita por Helrich (1990).

3.2 MICRO-ORGANISMO

Para o desenvolvimento do presente trabalho foi utilizado o *F. fujikuroi* IOC 4380 cedido, gentilmente pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS).

3.2.1 Manutenção da cepa

3.2.1.1 Repique do *Fusarium fujikuroi*

- a. **Preparo do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA):** para a preparação deste meio, foi utilizado um liofilizado comercial. A preparação final foi esterilizada por 20 min a 121°C e 1 atm. A composição do meio de cultura é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA).

COMPONENTE	QUANTIDADE
Batata	200 g
Glicose	20 g
Ágar	20 g
Água Destilada Esterilizada	q.s.p.* 1 L

(*) q.s.p.= quantidade suficiente para.

Fonte: Autor, 2018.

- b. **Repique do fungo:** a partir do tubo de ensaio contendo o fungo em água destilada foi realizado o primeiro repique. Uma alça de platina foi colocada em contato com a suspensão de esporos do tubo e em seguida transferida para o centro das placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubadas à temperatura de 28 °C por um período de aproximadamente 10 dias, como ilustrado pela Figura 7.

Figura 7 - Placa de Petri com meio BDA contendo *Fusarium fujikuroi*, após período a 30 °C.



Fonte: Autor, 2018.

3.2.1.2 Preparo do Inóculo

Composição (g/L): (200) batata, (20) dextrose, (20) peptona, (7,5) extrato de levedura, (2,0) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (1,0) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e (0,5) MgSO_4 e pH 5 -5,5, após período de 10 dias de cultivo da cepa do *F. fujikuroi*, discos de 12 mm de diâmetro foram colocados em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de solução. Na sequência, o inóculo foi incubado em agitador orbital

(TECNAL, TE-240, Brasil) a 28 °C e 120 rpm. De forma a definir o tempo e quantidade de discos a serem utilizados para a preparação do inóculo foram realizados ensaios em Erlenmeyer de 100 mL. O inóculo foi preparado com 30 mL do meio descrito e para tanto foram depositados cerca de 3 discos retirados do cultivo do *F. fujikuroi* em BDA. Após isso, os ensaios foram conduzidos em estufa durante o período compreendido entre 24 a 96 horas. A biomassa foi determinada pela metodologia de matéria seca, no qual o fermentado foi filtrado em papel filtro quantitativo e seco a 80 °C até peso constante.

3.3 PRODUÇÃO DO GA3

3.3.1 Preparação do sistema de cultivo

Em frascos uniformes, com capacidade de 500 mL, foram colocados 50 g de RMT na umidade inicial pré-determinada e solução de suplementação, elaborada de acordo com a composição descrita (Tabela 5) e auto clavados por 1 hora (devido aos interstícios e natureza do substrato) a 121 °C e 1 atm e levados à câmara de fluxo para inoculação. O inóculo, preparado conforme item 3.2.1.2. Foi adicionado ao sistema de fermentação a quantidade de inóculo correspondente a uma razão de 15% (v/m) (KUMAR e LOSANE, 1990; RODRIGUES et al., 2009).

Tabela 5 - Composição da solução de suplementação.

Substrato	Concentração g/L
FeSO ₄ .H ₂ O	1,0
MgSO ₄	0,5
MnSO ₄ .H ₂ O	1,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,2

Fonte: Yu et al., (1998); Selbmann et al., (2002); Parra et al., (2005); Zhang et al., (2012); Klaić, (2014).

Os ensaios realizados com RMT foram processados em uma BOD nas temperaturas descritas na matriz do planejamento. Com o objetivo de manter a umidade elevada dentro da BOD, foi realizado insuflamento de ar borbulhado em recipiente contendo água destilada.

A a_w foi medida empregando o equipamento AquaLab Series 3TE. Essa variável foi avaliada para teores de umidade do substrato

entre 60 e 80%. Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada frasco contendo RMT, foi deixado de repouso por 24 horas, contendo água, e após as amostras foram retiradas e analisadas no equipamento supracitado.

3.3.2 Otimização da produção de GA3

O estudo da produção do GA3 por FES foi realizado utilizando-se um planejamento experimental 2^2 com triplicata no ponto central, totalizando 7 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória, para avaliar o efeito da umidade inicial do meio (U) e a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de incubação na produção do GA3.

O software online Protimiza Experimental Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br/>) foi usado para calcular os efeitos das variáveis avaliadas, bem como das interações entre elas, e para realizar a análise de Variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta foi usada para fornecer um modelo matemático adequado para o processo.

Os níveis utilizados no planejamento estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Níveis do Planejamento Experimental 2^2 .

Variáveis	-1	0	1
U (%)	60,00	70,00	80,00
T ($^{\circ}\text{C}$)	28,00	31,50	35,00

Fonte: Autor, 2018.

3.3.2.1 Cinética prévia para definição do tempo de fermentação

De modo a obter-se o melhor resultado no planejamento experimental proposto, foi realizada a cinética da produção de GA3 por FES, para definir o tempo do processo, em meio de fermentação constituído pelo substrato RMT, através de experimentos em duplicata, por dez dias, a $31,5^{\circ}\text{C}$ e teor de umidade do meio de 70%. As primeiras amostras foram analisadas em 24 horas de processo, compondo um total de 20 análises.

3.3.3 Incubação

Aos frascos contendo RMT esterilizado e umidificado foi adicionado 15% (v/m) de inóculo fúngico preparado nas condições descritas na seção 3.2.1.2. Os frascos foram incubados nas temperaturas descritas no planejamento de experimentos. A incubação da FES foi interrompida pela adição de tampão fosfato (3:1) (v/m).

3.4 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

O desenvolvimento micelial foi determinado por meio da observação visual do resíduo de cervejaria úmido triturado submetido à FES de acordo com o padrão adaptado da ASTM (*American Society for Testing Materials*), Standard Methods G21-90 (1990), apresentando as seguintes faixas de crescimento:

- (-) ausência de crescimento;
- (+) pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio;
- (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio;
- (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo frasco.

3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GA3

A extração do metabólito, objeto deste estudo, foi realizada pela adição de tampão fosfato, pH 7,4 (3:1) (v/m), agitação a 120 rpm por 20 minutos, filtrado e centrifugado (MACHADO et al., 2004).

Em seguida, acetato de etila foi adicionado (1:1) (v/v), em funis de separação até que as duas fases bem distintas fossem formadas: a fase aquosa com a solução tampão e a fase leve contendo acetato e o composto de interesse. Após separação, em rota- evaporador foi evaporado o solvente, a 40 °C e 8 rpm até que restasse 5% do volume inicial, em forma cristalizada (RODRIGUES, 2009). Na sequência, foram adicionados 10 mL de etanol ao conteúdo do balão.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE GA3

Após etapas de extração e purificação, 1 mL da amostra foi transferido para balão volumétrico de 10 mL, avolumado com 9 mL de HCl a 3,75 M. Após 1 hora, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 254 nm em espectrofotômetro UV-visível Shimadzu (HOLDBROOK, EDGE e BAILY, 1961; BERRIOS, ILLANES e AROCA, 2004; PINHEIRO, 2015; WERLE, 2017). O branco consistiu em 1 mL de etanol, avolumado em balão volumétrico de 10 mL com 9 mL de HCl a 3,75 M. Os cálculos foram feitos a partir da construção de uma curva de calibração de GA3 na concentração de 0 – 1.

3.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GA3

Os experimentos foram preparados de acordo com o melhor resultado obtido no planejamento experimental proposto, na condição de teor de umidade de 80% a uma temperatura de 28 °C num processo de 96 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o estudo da produção de GA3, os resultados foram obtidos através de um planejamento experimental definido de modo a investigar a influência das variáveis de interesse no processo de fermentação em estado sólido na produção de GA3.

As investigações envolveram, além dos ensaios de FES, a extração, purificação e análise - supracitadas.

4.1 COMPOSIÇÃO DO RMT

Os dados da Tabela 7 foram obtidos por meio de análises específicas no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI), UFSC, segundo metodologia de Helrich (1990).

Tabela 7 - Propriedades e composição do RMT.

Propriedades	Composição (%)
Matéria seca	92,05
Proteínas	19,42
Extrato etéreo	14,32
Teor de amido	15,90
Açúcares totais	12,86

FONTE: Autor, 2019.

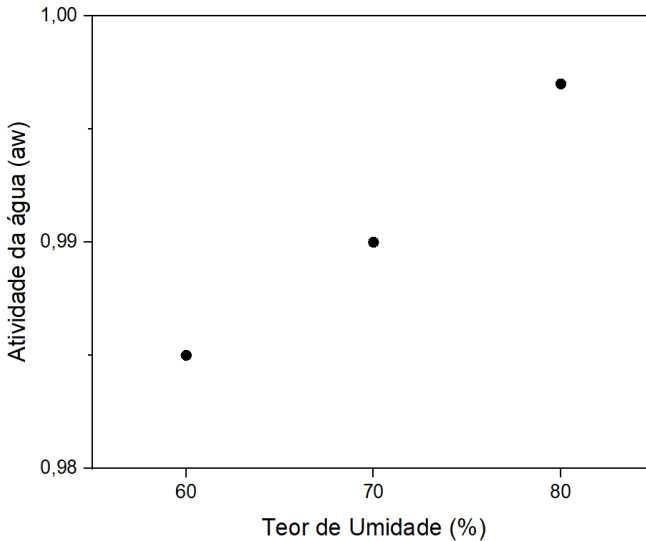
Após mosturação e obtenção da solução aquosa de açúcares, aminoácidos, peptídeos, sais de cálcio, e pH ligeiramente ácido, que é o mosto, são obtidos cerca de 65% de sólidos totais do malte. O bagaço do malte, é constituído basicamente pelas cascas da cevada malteada, em sua matéria seca, cerca de 92%.

Na produção de ácido giberélico, a principal fonte de energia do agente metabolizador são os polissacarídeos, neste caso o amido, do qual é rico o RMT (15,9%). O extrato etéreo, que representa todos os componentes solúveis em éter, apresentou quantidade significativa (14,32%). Além destes, as proteínas (19,42%) e açúcares (12,86%) tornam o RMT uma ótima matéria-prima para processos industriais.

4.2 ATIVIDADE DA ÁGUA PARA O RMT (a_w)

A atividade da água para RMT está demonstrada na Figura 8.

Figura 8 - Atividade da água (a_w) para o substrato RMT.



Fonte: Autor, 2019.

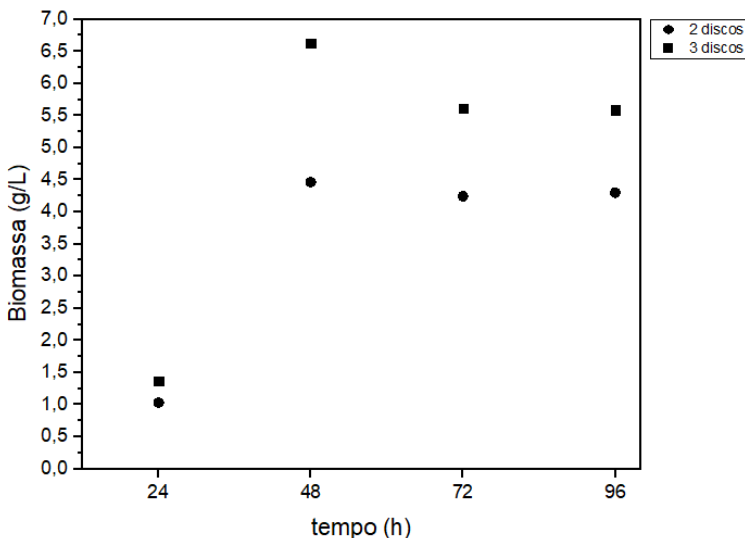
Os resultados de atividade da água são apresentados em função do teor de umidade presente nas amostras. Consta-se que para todas as amostras, a a_w foi $> 98,5$, corroborando o resultado proposto por Pinheiro (2015) e Werle (2017) para análise de a_w e umidade de substratos sólidos.

4.3 PREPARO DO INÓCULO

A partir dos valores obtidos de massa seca formada por litro de meio fermentado, empregando dois e três discos, foi calculada a quantidade de biomassa seca. Segundo Machado (2004), nos ensaios de FES foi padronizado que a quantidade de massa seca no inóculo deve ser de no mínimo 6,0 gramas por litro.

Na Figura 9 são apresentados os valores de massa seca obtidos nos ensaios, empregando 2 e 3 discos, em tempos de fermentação na faixa de 24 a 96 horas.

Figura 9 - Influência do tempo de fermentação na formação de biomassa no meio de fermentação.



Fonte: Autor, 2019.

É possível observar que o número de discos empregados no processo de determinação do inóculo afeta a quantidade de biomassa obtida, para todos os tempos de fermentação.

Werle (2017) em sua investigação, assim como este presente trabalho, obteve a condição para obtenção do inóculo em 48 horas de fermentação pelo emprego de 3 discos de 12 mm de diâmetro obtidos da placa de Petri com o fungo *F. fujikuroi* cultivado em meio BDA.

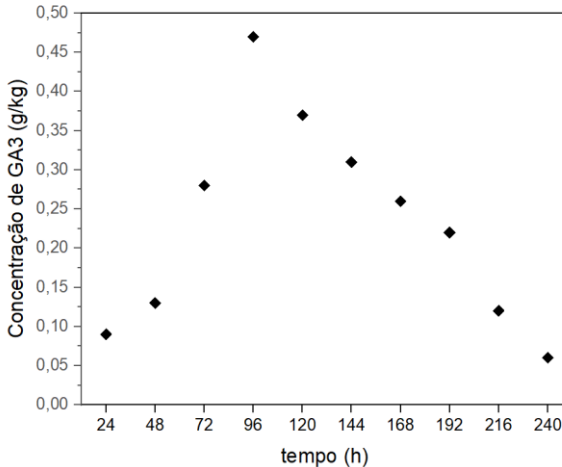
4.4 CINÉTICA PARA PRODUÇÃO DE GA3

A cinética realizada (Figura 10) sob umidade de 70% e temperatura de 31,5 °C de modo a definir o tempo de incubação do processo de fermentação para produção de GA3, demonstrou que nos primeiros 4 dias de fermentação, a produção do ácido giberélico

aumentou gradativamente até 0,46 g/kg, seguida de queda (0,362 g/kg) até o décimo dia de análise (0,055 g/kg).

Na Figura 10 é possível verificar este comportamento cinético da atividade expressa em produção de GA3.

Figura 10 - Cinética de produção de GA3 (70% U; 31,5 °C).



Fonte: Autor, 2019.

Bandelier et al., (1996), observou perfil cinético semelhante, com queda a partir do décimo dia de processo. Gelmi et al., (2002), atribui esse perfil cinético característico a instabilidade do GA3.

Assim, o tempo de processo para produção otimizada de GA3, ficou definido como sendo 96 horas.

4.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO GA3 POR FES

A umidade relativa (U_R) do ar no sistema de incubação foi de 76,8% mensurada pelo equipamento Testo 610. A Tabela 8 apresenta o planejamento experimental, conjuntamente com a concentração de GA3 formado e análise qualitativa do crescimento do micro-organismo.

Tabela 8 - Matriz do planejamento 2² (valores codificados e reais) com as respostas da produção de GA3 e crescimento micelial por FES.

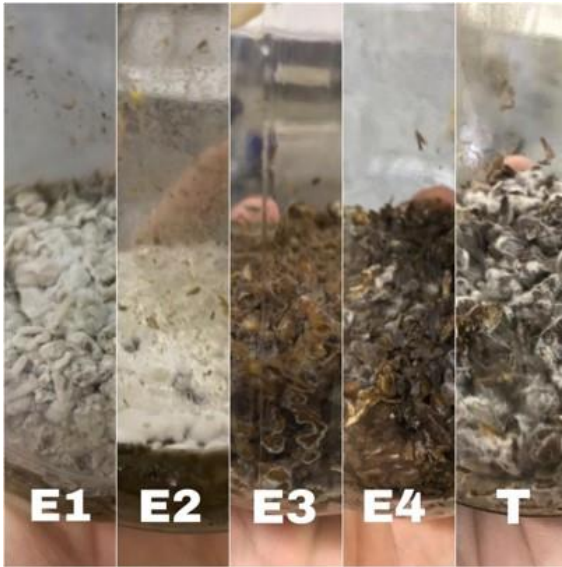
Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Produção do GA3 (g/kg)	Crescimento microbiano
1	-1 (60)	-1 (28,0)	0,54	++
1'	-1 (60)	-1 (28,0)	0,53	++
2	1 (80)	-1 (28,0)	0,80	+++
2'	1 (80)	-1 (28,0)	0,82	+++
3	-1 (60)	1 (35,0)	0,45	+
3'	-1 (60)	1 (35,0)	0,44	+
4	1 (80)	1 (35,0)	0,37	+
4'	1 (80)	1 (35,0)	0,38	+
5	0 (70)	0 (31,5)	0,46	++
6	0 (70)	0 (31,5)	0,47	++
7	0 (70)	0 (31,5)	0,47	++

Fonte: Autor, 2019.

4.5.1 Análise qualitativa do crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi determinado de acordo com o padrão adaptado da ASTM (*American Society for Testing Materials*), STANDARD METHODS G21-90 (1990). A característica visual do crescimento microbiano pode ser visualizada na Figura 11.

Figura 11 - Crescimento fúngico em FES após 96 horas.



FONTE: Autor, 2018. (E1 – Ensaio 1 (U% 60; T 28 °C), E2 – Ensaio 2 (U% 80; T 28 °C), E3 – Ensaio 3 (U% 60; T 35 °C), E4 – Ensaio 4 (U% 80; T 35 °C), T – Triplicata Ensaio 5, 6 e 7 (U% 70; T 31,5 °C)

Nos Ensaio 1 (Figura 11 E1) e 2 (Figura 11 E2) (28 °C e umidades de 60% e 80%, respectivamente), o crescimento foi definido como moderado visto que houve formação de *pellet* na superfície do meio e ótimo desenvolvimento micelial, respectivamente, o que corrobora com o estudo de Werle (2017), que verificou maior crescimento micelial em teor de umidade de 80% a 28 °C.

No Ensaio 3 (Figura 11 E3) e 4 (Figura 11 E4) (35 °C e umidades 60% e 80%, respectivamente) observou-se a colonização do substrato em 96 h de fermentação com pouco crescimento e turvação de pequenos fragmentos de micélio, indicando que as condições de temperatura e umidade não foram propícias para o crescimento do *F. fujikuroi*.

Nos pontos centrais - Ensaio 5, 6 e 7 (Figura 11 T) a 31,5 °C e 70% de umidade, observou-se moderado crescimento, indicando que as variáveis temperatura e umidade influenciaram no desenvolvimento do fungo.

Independentemente dos teores de umidade e temperaturas empregadas, pela análise visual, é possível afirmar que o micro-organismo foi capaz de crescer no RMT.

4.5.2 Concentração do GA3

No Ensaio 01 (Tabela 8), à temperatura de 28 °C e teor de umidade de 60%, observou-se uma produção de 0,53 g GA3/kg. O valor encontrado neste trabalho foi maior que o relatado por Machado et al. (2001) e Machado, Soccol e Pandey (2002) que utilizaram mandioca e casca de café como substrato e obtiveram 0,38 e 0,49 g/kg de GA3, respectivamente.

Ainda a 28 °C e 80% de umidade, foi obtida uma produção de 0,8 g de GA3 por kg de RMT. Constatou-se ainda que para essa temperatura, o aumento da umidade do meio favoreceu a formação do GA₃ no meio de fermentação. Ensaio este, que apresentou maior produção de GA₃. Por outro lado, Kumar e Losane (1990), reportaram que a maior produtividade de GA3, foi obtida com 50% de teor de umidade, usando farelo de trigo. Pinheiro (2015) e Werle (2017) reportaram a produção de GA3 por *F. fujikuroi* usando como substrato uma , cuja a maior produção de GA3 foi obtida com o maior teor (80%) de umidade do meio estudado e igual temperatura (28 °C), em 7 dias, com valores de produção de 10,1 e 0,934 g/kg, respectivamente.

No ensaio 03, a 35 °C e 60% de umidade, foi obtida produção de 0,45 g de GA3/kg de substrato. Em condição semelhante, Werle (2017) obteve produção de 0,415 para uma composição de farelo de arroz e RMT.

Na condição do ensaio 04, temperatura de 35 °C e teor de umidade de 80%, observou-se que o aumento da umidade e maior temperatura suscitou uma ligeira queda de produção (0,36 g/kg), possivelmente pelo aumento da temperatura, indicando que o aumento da temperatura, neste caso, foi desfavorável para a produção do metabólito ou em função da instabilidade da molécula a elevadas temperaturas.

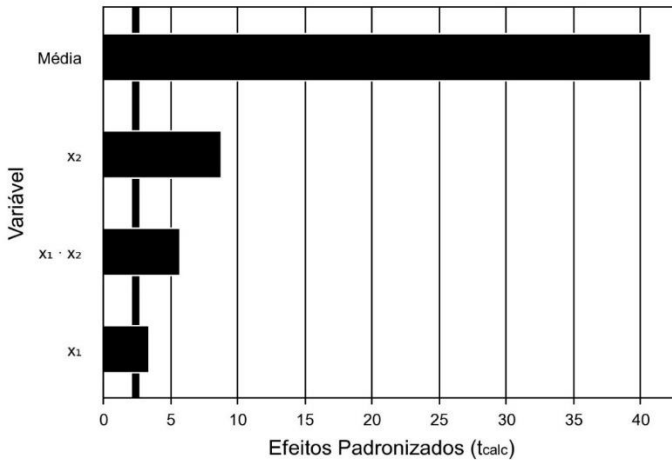
Nos pontos centrais (31,5 °C e 60%) observou-se que estes seguem os parâmetros dos demais ensaios, a máxima produção foi de 0,47 g/kg em 96 horas de fermentação.

De modo a fazer uma abordagem comparativa, Borrow et al. (1964) utilizando 40 g/L de sacarose e Berrios, Pyle e Aroca (2010) utilizando como substrato glicose, água de maceração de milho, NH₄SO₄, KH₂PO₄ e K₂SO₄ por processo de FSub, obtiveram, para

produção de ácido giberélico, valores de 0,2 g/L e 0,66 g/L, respectivamente. Estudos esses, corroboram a patente do *Council of Scientific and Industrial Research* (2008): que reporta que processo de FES pode atingir resultados de 2 – 8 vezes maiores que a FSub, em termos de produção do metabólito em estudo.

A Tabela 8 foi utilizada para avaliar os efeitos das variáveis independentes (umidade e temperatura) considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico de Pareto.



Fonte: Autor, 2019.

Ao analisar o gráfico, é possível verificar que umidade (X_1) e temperatura (X_2) apresentaram efeitos significantes ($p < 0,05$). À medida que há diminuição da temperatura, há melhor resposta, o que significa que a temperatura possui um efeito linear negativo. A umidade também apresentou efeito significativo, o que leva a inferir que esta variável possui efeito linear positivo, uma vez que o aumento da umidade responde com um aumento no rendimento de GA3, o que também foi verificado por Werle (2017) e Pinheiro (2015).

A análise do gráfico de Pareto revela qual variável tem maior influência sobre a produção em questão. A interação entre as variáveis também foi estatisticamente significativa para o rendimento de GA3.

Para otimizar a condição experimental de produção de GA3, é apresentado o modelo na Equação 1.

$$Y_1 = 0,52 + 0,05 X_1 - 0,13 X_2 - 0,09 X_1 X_2 \quad (1)$$

Onde Y_1 é a produção de GA3 e X_1 e X_2 são as variáveis codificadas para umidade e temperatura, respectivamente.

Este modelo foi validado por análise de variância (ANOVA) (Tabela 9). O teste F calculado é cerca de 9,35 vezes maior que o F tabulado para um nível de significância em $p=0,05$ e a determinação do coeficiente (R^2) foi 0,945

Tabela 9 - ANOVA para produção de GA3.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{cal}	p-valor
Regressão	0,218	3	0,072	40,58	0,00008
Resíduos	0,012	7	0,001		
Total	0,231	10			

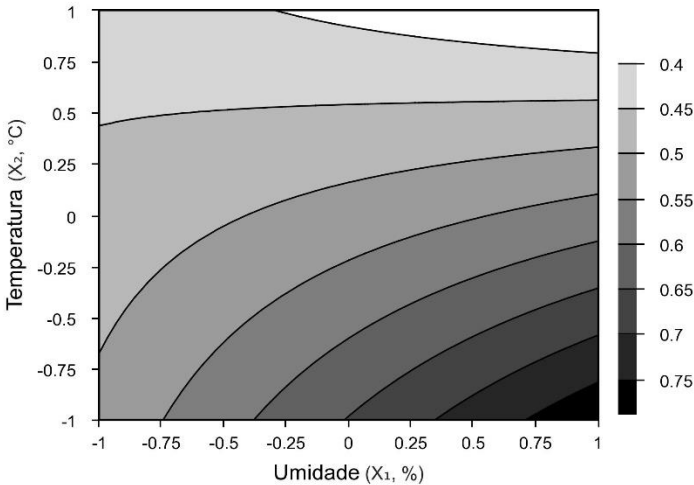
$$F_{\text{tab}} = 4,34$$

Fonte: Autor, 2019.

O alto valor R^2 indica boa adaptação dos dados experimentais, permitindo o uso do modelo para prever o desempenho do processo, bem como utilizá-los como ferramenta para otimização de processos.

A Figura 13 mostra por meio do gráfico de contorno, a influência da umidade e temperatura na produção do GA3.

Figura 13 - Gráfico de curvas de contorno para produção de GA3.



Fonte: Autor, 2019.

Por meio do gráfico de curvas de contorno (Figura 13), é evidente que, tomando um nível alto de umidade (80%) e um nível baixo de temperatura (28 °C), foram obtidos rendimentos otimizados (Tabela 08).

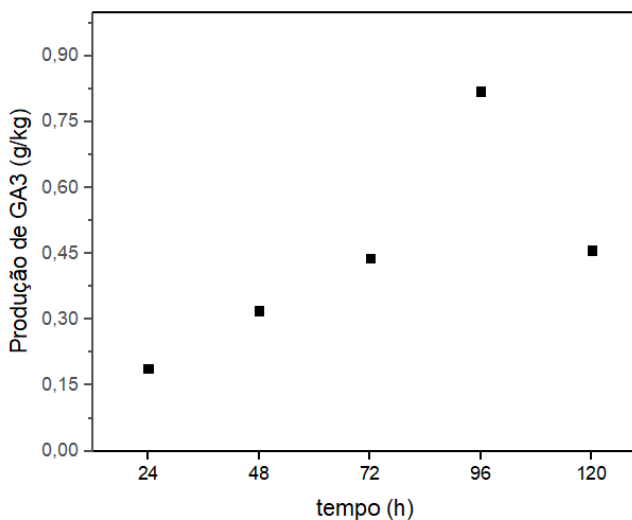
Os resultados supracitados são semelhantes aos reportados por Gelmi, Perez-Correa e Agosin (2002) para produção do GA3 utilizando *F. fujikuroi* (antes nomeado *Giberella fujikuroi*). Rodrigues et al. (2009) detalharam as curvas de produção de GA3 apresentando rápido aumento na sua produção nos seis primeiros dias (3 – 9,9 g/kg) seguido de uma tendência à diminuição do GA3 presente no meio.

Na investigação de Pinheiro (2015), assim como na patente requerida por *Reliance Life Science Privat Limited* (2008) observa-se aspecto visual semelhante do gráfico de curvas, utilizando também o *F. fujikuroi* com produção máxima de GA3 entre 6 e 8 dias. As produções destes foram de 10,1 e 39 g/kg de substrato contendo em sua composição farelo de trigo. Neste último caso (*Reliance Life Science Privat Limited*), as produções atingiram 225 g/kg quando usada torta de pinhão-manso como substrato alternativo.

4.6 PERFIL CINÉTICO DE PRODUÇÃO DE GA3

A cinética de produção de GA3 foi avaliada em melhor condição experimental do planejamento (80% U; 28 °C) corroborando com a concentração de produto obtida pela otimização do processo. A Figura 14 ilustra que nos primeiros dias de fermentação, uma lenta produção de GA3 foi observada, em seguida houve um incremento significativo no quarto dia de processo – o pico de produção máxima, atingindo aproximadamente 0,82 g de GA3/kg de substrato.

Figura 14 - Cinética de Produção de GA3 - Ensaio 2 (80% U; 28 °C)



Fonte: Autor, 2019.

5 CONCLUSÕES

O RMT é um potencial substrato alternativo na produção de GA3 por *F. fujikuroi*. A produção otimizada de GA3 foi de 0,8 g de GA3/kg de substrato (80% de umidade e 28 °C)

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para este mesmo substrato, estudar a otimização de outras variáveis como teor de glicose e nitrato que influenciam no processo de produção de GA3;

Estudar a extração de GA3 produzido com meio ácido e a purificação com extração em meio sólido, como o carvão ativado que abrange vários seguimentos da indústria como remoção de contaminantes e purificação de ácidos e análise por CLAE devido sua alta resolução e sensibilidade e menor tempo de análise, embora haja o desafio de uma metodologia de extração e purificação compatível com este método.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – **Produtos Agrícolas**. 2009. Disponível em:

<<http://www.anvisa.gov.br/produtosagricolas/00.html>> Acesso em: 05 de março de 2018.

ALEXANDER, A. G.; MONTALVO-ZAPATA, R.; KUMAR, A.; **J. Agric.** Univ. Porto Rico, 54, 477. 1970.

ANDOLFI, L.; CECCARINI, L.; MACCHIA, M. Bio-agronomic characteristics of *Stevia rebaudiana*. **Informatore-Agrario**, Italy, v. 23, n. 58, p. 48-51. 2002

BANDELIER, S.; RENAUD, R.; DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-bach solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. **J. Process Biochemistry**. V32(2), p.141-145, 1996.

BAUMGARTNER, S.; SHAH, D.; SCHALLER, J.; KÄMPFER U.; THURNEYSEN, A.; HEUSSER, P. Reproducibility of dwarf pea shoot growth stimulation by homeopathic potencies of gibberellic acid. **Complementary Therapies in Medicine**; 16:183-91. 2008.

BERRÍOS, J.; ILLANES, A.; AROCA, G. Spectrophotometric method for determinig gibberellic acid in fermentation broths. **Biotechnology Letters**, 26:67-70. 2004.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1º Edição. São Paulo: Editora Edgard Ltda. 2001, v.2, cap 4, p. 39-62.

BLAKE, P. S.; TAYLOR, D. R.; CRISP, C. M.; Identification of endogenous gibberellins in strawberry, including the novel gibberellins GA123, GA124 and GA125. **Phytochemistry**, 55: 887-90. 2000.

BÖMKE, C.; TUDZYNSKI, B. Diversity, regulation and evolution of the gibberellin biosynthetic path away in fungi compared to plants and bactéria. **Phytochemistry**, 70: 1876-1893. 2009.

BORROW, A.; JEFFERYS, E.G.; NIXON, I.S. **Process for the production of gibberellic acid**. PO. 838.033. I. C.: C12d. 22 jun. 1960.

BRIGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohyd Polym**; 79: 832-8. 2010.

BRÜCKNER, B.; BLECHSCHMIDT, D. The gibberellin fermentation. **Critical Reviews in Biotechnology**; 11:163-92. 1991.

BU'LOCK, J.D.; DETROY, R.; HOSTELAK, Z.; MUNIN-AL-SHAKARDU, A. Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v. 62, p. 377-389, 1974.

CANDAU, R.; AVALOS, J.; CERDA-OLMEDO, E. Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **Plant. Physiol**, 100, 1184-1188.1992.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. V. 71, p 45-50, 2000.

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

CELIK, I.; TURKER, M.; TULUCE, Y. Abscisic acid and gibberellic acid cause increased lipid peroxidation and fluctuated antioxidant defense systems of various tissues in rats. **Journal of Hazardous Materials**; 30:623. 2007.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria de Cerveja. **Anuário Estatístico**. 2015. Disponível em http://www.cervbrasil.orh.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB_pdf. Acessado em 21.10.2018.

CHIMELLI, M. **Obtenção de giberelinas por biotransformação fúngica do esteviosídeo: etapa de deglicolização**. 2003, 189p. Tese

(Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2003.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Nota técnica sobre tecnologia de controle: Fabricação de cervejas e refrigerantes**, NT- 24, CETESB, São Paulo, 1992.- 27p.

CORONA, A.; SANCHEZ D.; AGOSTIN E. **Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions**. *Process Biochemistry*, 40:2655-58. 2005.

CROKER, D. 2000. Disponível em <<<http://www.plant-hormones.bbsrc.ac.uk/education/Keng.htm>>> Acessado em: 05 de março de 2018.

DAVIES, F. S.; FIDEBILUS, M. W.; TEIXEIRA, A. A. Mechanical Properties of Orange Peel and Fruit Treated Pre-Harvest with Gibberellic Acid. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. ISSN: 0001-2351. 2002.

DAVIES, P. J. (Ed). **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!**. Kluwer Academic, Netherlands, 2004.

DEBIAGI, F.; IVANO, P. F. M. L. R.; NASCIMENTO, P. H. A.; MALI, S. Embalagens biodegradáveis de amido reforçadas com fibras lignocelulósicas provenientes de resíduos agroindustriais. **Biochemistry and Biotchnology Reports**, v1, n2, p.57, 2012.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochem Eng J**, v. 13, p 113-125, 2003.

ESCHEL, D.; BEN-ARIE, R.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *alternaria alternate* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4-bglucanase. **Phytopathology**, v. 90, p. 1256-62, 2000.

FERNANDES-MARTINS, R.E. Ent-Kaurene and squalene synthesis in *Fusarium fujikuroi* cell-free extracts. **Phytochemistry**, England, v. 54, p. 723-728, 2000.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass residues in Brazil; availability and potential uses. **Waste Biomass Valor.** 1: 65-75. 2010.

FIDELIBUS, M.W.; TEIXEIRA, A.A.; DAVIES, F.S. Mechanical properties of orange peel and fruit treated pre-harvest with gibberellic acid. **Transaction of the Asae**, v. 45, n. 4, p. 1057-1062, jul-ago. 2002.

FUSKA, J.; KUHR, I.; PODOJIL, M.; SEVCIK, V. The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*. **Folia Microbiol.** V. 6 p. 18, 1961.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, M.; AGOSIN, E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**; 35:1227-33. 2000.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E. Modeling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry.** V.37, p. 1033-40. 2002.

GOHLWAR, C. S.; SETHI, R. P.; MARWAHA, S. S.; SEGHAL., V. K. Gibberellic acid biosynthesis from whey and simulation of cultural parameters. **Enzyme Microb, Technol.**, v.6, p. 312-16. 1984.

GONZÁLEZ-ROSSIA, D.; REIG, C.; JUAN, M.; AGUSTI, M. Horticultural factors regulating effectiveness of GA3 inhibiting flowering in peaches and nectarines (*Prunus persica L. Batsch*). **Scientia Horticulturae.**111:352–57. 2007.

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A. L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science**, 5: 523-29. 2000.

HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A Century of Gibberellin Research. **J. Plant Growth Regul.** 34: 740–760. 2015.

HEDDEN, P.; THOMAS, S.G. The Gibberellins. **Annual Plant Reviews**. 470p. 2016.

HELLIWELL, C. A.; CHANDLER, P. M.; POOLE, A.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 98: 2065-2070. 2001.

HOLDBROK, A.; EDGE, W.; BAILEY, F. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. **Adv. Chem. Ser.** V. 28., p. 159-167, 1961.

JEFFERYS, E. G. The gibberellin fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, 13: 283-316. 1970.

KAHLON, S. S.; MALHOTRA, S. Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate. **Enzyme Microb. Technol.** V.8, p. 613-616, 1986.

KATO, J.; PURVES, W. K.; PHINNEY, B. O. Gibberelin-like substances in plants. **Nature** 196, 687-688, 1962.

KLAIC, R. **Produção de Bioherbicida por Processos de Fermentação a partir do Fungo *Phoma* sp.** Santa Maria, 2014, 123f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

KUMAR P.K.R.; LONSANE B.K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**; 34:29-139. 1989.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual.** Ed Wiley-Blackwell, 2006.

MANDER, L. N. The chemistry of gibberellins: an overview. **Chem Ver**, v.92, p.573-612, 1992.

MACHADO, C. M. M.; OISHI, B.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production

by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. **Biotechnology Progress**, 2004; 20:1449-53.

MACHADO, C. M. M.; OLIVEIRA, B. H.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. In: Sera, T., Soccol, C.R., Pandey, A. and Roussos, S. **Book on Coffee Biotechnology and Quality**, Kluwer Academic Publishers, Dorrecht; p 401-8, 2001.

MACHADO, C. M. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk: **Applied Biochemistry an Biotechnology**, 102-192, 2002.

MAGALHÃES, P. G.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P. Fisiologia do milho. **Circular Técnica**, n. 22, Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS, p. 15-48, 2002.

MERTZ, D. Light-stimulated incorporation of l-leucine into the gibberellin of *Gibberella fujikuroi*. **Plant & Cell Physiology**, v. 11, p. 273-279, 1970.

NCBI – **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=40576&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
Acessado em: 12 de março de 2018.

NEPRON- UEM (NÚCLEO DE ESTUDOS DE PRODUTOS NATURAIS – Universidade Estadual de Maringá). **Projeto de pesquisa "Estudos Biotecnológicos de Stevia rebaudiana Bert Bertoni**. Disponível em: <<http://www.dbq.uem.br/index-nepron.html>>
Acesso em: 10 março 2018.

OLIVEIRA, J. **Produção de Ácido Giberélico por Fermentação Submersa e por Fermentação no Estado Semissólido em diferentes modelos de biorreatores utilizando polpa cítrica**. Curitiba, 2010, 129f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

OLSZEWSKI, N.; SUN, T.P.; GUBLER, F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. **Plant Cell** 14 (Suppl.): S61-80. 2002.

O'NEIL, M. J. **The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. Ed 13. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., p785, 2001.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.81-84. 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1135-1169, 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current Developments in Solid-state Fermentation**. 1^a Ed, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, 2008.

PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 37, p. 704-711, 2005.

PENSACK, J.M.; CHORNOCK, F.W. **Improvements in nor relating to Animal Feed Supplements**. Int. A23k n. 860,765. Feb. 8, 1961.

PINHEIRO, U. V. **Produção de Ácido Giberélico por Fermentação em Estado Sólido Empregando Substratos Agroindustriais**. 2015. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

RADLEY, M. Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. **Nature** v. 178, p 1070-1071, 1956.

RANGASWAMY, V.; MUMBAI, N.; BALU, G. Process for Gibberellic acid production with Fusarium moniliforme strains. **United States Patent Application Publication**. 2008. Apr. 10. n US2008/0085543 A1.

RANGASWAMY, V. Improved Production of Gibberellic Acid by *Fusarium moniliforme*, **Journal of Microbiology Research**, v2(3), p. 51-55, 2012.

RELIANCE LIFE SCIENCE PRIVATE LIMITED. RANGASWAMY, V.; GUDURI, B. **Process for Gibberelic Acid Production with *Fusarium moniliforme* Strains**. Int. C12P17/04. US 435/126. US n. 2008008554A1. 12 Sept. 2007. 10 Apr. 2008, Washington, DC.

RODRIGUES, C. **Produção, Extração e Purificação de Hormônio vegetal (Ácido Giberélico) por Fermentação no Estado Sólido em polpa cítrica e Utilização de extrato em meio de cultivo de Bromélias *in vitro***. 2010. 180f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

RODRIGUES, O. et al. **Redutores de crescimento**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003. (Circular técnica, 14).

RODRIGUES, C.; VANDENBERGUE, L. P. S.; OLIVEIRA, J.; SOCCOL, C. R. New perspectives of gibberellic acid production: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, p1-11, 2011.

ROSS, J. J. Auxin-Gibberellin interactions and their role in plant growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, n. 4, p. 185-195, 2002.

SANTOS, J.A.F. **Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de laranja e de cerveja para obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, SP, 2008.

SANTOS, M. S., RIBEIRO, F. M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf. Acessado em 09.09.2018.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, 153, p. 585-592. 2002.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. 2009; 55:358-64.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. 2003; 13:205-18.

SHARMA, R. R.; SINGH, R. Gibberellic acid influences the production of malformed and button berries, and fruit yield and quality in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). **Scientia Horticulturae**, 119, 430–433. 2009.

SHRESTHA, P.; KHANAL, S. K.; POMETOIII, A. L.; VAN LEEUWEN, J. H. Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, v.57, p. 4156-4161.

SHUKLA, R.; CHAND, S.; SRIVASTAVA, A. K. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**; 36:492-7. 2005.

SIGHANIA, 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.

TEIXEIRA, F. A.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos (Sugarcane pulp in the feeding of bovine). REDVET. **Revista eletrônica de Veterinaria** 1695-7504. 2007; vol VIII; n 6. Disponível em:<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607.html>. Acessado em: 08 março 2018.

TUCKER, G. A.; ROBERTS, J. A. (Eds.). Plant Hormone Protocols. **Humana Press Inc.**, Totowa, NJ; 2000.

TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 298-310, 1999.

TERRA, M. M. Nutrição, calagem e adubação. **Uva: tecnologia de produção, pós colheita**, Mercado. 1 ed. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 405-476, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Soccol, Carlos Ricardo, *et al.*, Processo de Produção e Purificação de Ácido Giberélico: Seu uso e Aplicações. Int. C12P27/00 A C12P1/06. BR n. 102012008883-5A2. 16 abr, 2012. 03 dez. 2013. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual**. Brasília, DF, 2012.

VANDENBERGHE, L. P. S; SOCCOL, C. R; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, 74, n.2, 175-178. 2000.

VASS, R. C., JEFFERYS, E. G. Gibberellic Acid, In: **Economic microbiology: secondary products of metabolism**. Vol. 3, AH Rose (ed), Academic Press, p. 421-33, 1979.

WERLE, L. B. **Obtenção de Ácido Giberélico por Fermentação em Estado Sólido Empregando Resíduo de Cervejaria e Farelo de Arroz Bruto como Substratos**. 2017. 51f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

YAMAGUCHI, S. **Gibberellin metabolism and its regulation**. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 225-251. 2008.

YU, X.; HALLET, S. G.; SHEPPARD, J.; WATSON, A. K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes* X yu1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p.333-38, 1998.

ZHANG, L.; WANG, S-Q.; LI, X-J; ZHANG, A-L.; ZHANG, Q.; GAO, J-M. New insight Into the stereochemistry of botryosphaeridione

from a Phoma endophyte. **Journal of Molecular Structure**, 1016, p. 72-75, 2012.