



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

BRENA FERREIRA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DA FIBRA DO COCO VERDE (*COCUS NUCIFERA L.*) COMO SUBSTRATO
ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES FÚNGICAS**

João Pessoa – PB

2018

BRENA FERREIRA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DA FIBRA DO COCO VERDE (*COCUS NUCIFERA L.*) COMO SUBSTRATO
ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES FÚNGICAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida

João Pessoa – PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237u Santos, Brena Ferreira Dos.

UTILIZAÇÃO DA FIBRA DO COCO VERDE (COCUS NUCIFERA L.)
COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES
FÚNGICAS / Brena Ferreira Dos Santos. - João Pessoa,
2018.

67 f. : il.

Orientação: ANDREA FARIAS DE ALMEIDA.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Fermentação em estado sólido. 2. Aspergillus sp. 3.
Paecilomyces sp. 4. Celulases. 5. Resíduo
Agroindustrial. I. ALMEIDA, ANDREA FARIAS DE. II.
Título.

UFPB/BC

BRENA FERREIRA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DA FIBRA DO COCO VERDE (*COCUS NUCIFERA L.*) COMO SUBSTRATO
ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES FÚNGICAS**

Data da Aprovação: 29 de outubro de 2018

BANCA EXAMINADORA:

Andréa Fariás de Almeida

Prof^a. Dr^a. Andréa Fariás de Almeida - Orientadora

Adna Cristina Barbosa de Sousa

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa - Examinadora

Graciana Clécia Dantas

Dr^a. Graciana Clécia Dantas - (Examinadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele eu não existiria.

Aos meus pais, que me deram a oportunidade de estar neste plano para realizar as minhas tarefas e evoluir conjuntamente com os que me rodeiam.

A todos aqueles que deram suporte emocional durante toda a minha vida, não apenas no âmbito acadêmico, mas no âmbito pessoal, em auxílio à minha evolução, ensinando-me que “Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo, mas qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim” (CHICO XAVIER).

À minha orientadora, que dispôs de muita paciência e compreensão para comigo durante todo esse período de graduação.

Aos meus colegas de curso que tanto me auxiliaram durante os experimentos.

A todos os meus professores, que além de me passarem conhecimento didático moldaram meu caráter e me auxiliaram a ter uma visão realista da vida.

À Doutrina Espírita, que me iluminou com os seus ensinamentos, mostrando-me que “O maior erro de qualquer medicina é trabalhar sozinha” (AMIT GOSWAMI) e ajudando-me a entender o que realmente importa internalizando a seguinte máxima: “De que vale ao homem conquistar todos os tesouros da Terra e perder a sua alma?” (JESUS CRISTO).

*“Genialidade é experiência. Alguns pensam que é uma dádiva ou um talento,
mas é o fruto da longa experiência de muitas vidas.”*

Henry Ford

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países maiores produtores de coco verde. Produção anual em milhões de toneladas.....	16
Figura 2 – Porcentagem da produção mundial de coco verde.....	17
Figura 3 - Produção anual de coco verde no Brasil entre 1990 e 2016.....	17
Figura 4 – Produção anual de coco no Nordeste brasileiro entre 1990 e 2016.....	18
Figura 5 – Produção de coco verde no Estado da Paraíba entre 1990 e 2016.....	18
Figura 6 – Coco verde com sete meses de idade, considerado pronto para uso.....	19
Figura 7 – Potencialidades agroindustriais do coco em estágio de maturação completa.....	20
Figura 8 – Descarte de coco verde no litoral de Fortaleza.....	20
Figura 9 – Estrutura molecular da celulose.....	22
Figura 10 – Estrutura da parede celular da planta e corte transversal das microfibrilas.....	23
Figura 11 – Colônia de <i>Aspergillus niger</i> em placa com ágar-Sabouraud.....	24
Figura 12 – Micrografia ótica de <i>Aspergillus niger</i>	24
Figura 13 – <i>Paecilomyces lilacinus</i> em microscopia ótica.....	25
Figura 14 - <i>Paecilomyces formosus</i> em placa com ágar-Sabouraud.....	25
Figura 15 – Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes áreas.....	27
Figura 16 – <i>Aspergillus</i> sp. cultivado em placa de ágar- Sabouraud.....	33
Figura 17 – Coco verde (<i>Cocos nucifera</i>) <i>in natura</i>	35
Figura 18 – Casca do coco verde desfibrada após a secagem em estufa.....	35
Figura 19 – Pó oriundo da secagem e moagem da casca do coco verde.....	35
Figura 20 – Frascos <i>erlenmeyers</i> com substrato e inóculo dentro da estufa.....	38
Figura 21 – Obtenção do extrato bruto enzimático.....	38
Figura 22 – Tubos de ensaio para determinar atividade celulase total.....	39
Figura 23 – Tubos de ensaio para determinar atividade endoglucanase.....	40
Figura 24 – Soluções tampão utilizadas para a determinação do pH ótimo das enzimas.....	41
Figura 25 – Extrato bruto e as soluções tampão com os diferentes pH.....	41
Figura 26 – Ensaio para determinação de temperatura ótima.....	42

Figura 27 – Mensuração do pH do cultivo de <i>Aspergillus</i> sp. durante 216 horas.....	44
Figura 28 – Mensuração do pH do cultivo de <i>Paecilomyces</i> sp. durante 216 horas.....	45
Figura 29 – Atividade celulolítica total de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Paecilomyces</i> sp. durante fermentação de 216 horas.....	45
Figura 30 – Atividade de endoglucanase de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Paecilomyces</i> sp. durante fermentação de 216 horas.....	47
Figura 31 – Avaliação do pH ótimo para atividade celulolítica total de <i>Aspergillus</i> sp. e de <i>Paecilomyces</i> sp.....	48
Figura 32 – Atividade residual da celulase total de <i>Aspergillus</i> sp. frente à avaliação de pH.....	49
Figura 33 – Atividade residual da celulase total de <i>Paecilomyces</i> sp. frente à avaliação de pH ótimo.....	49
Figura 34 – Avaliação do pH ótimo para atividade da endoglucanase de <i>Aspergillus</i> sp. e de <i>Paecilomyces</i> sp.....	51
Figura 35 – Atividade residual da endoglucanase de <i>Aspergillus</i> sp. frente à avaliação de pH ótimo.....	51
Figura 36 – Atividade residual da endoglucanase de <i>Paecilomyces</i> sp. frente à avaliação de pH ótimo.....	52
Figura 37 – Avaliação da temperatura ótima para atividade celulolíticas totais de <i>Aspergillus</i> sp. e de <i>Paecilomyces</i> sp.....	53
Figura 38 – Atividade residual das celulases totais de <i>Aspergillus</i> sp. frente à avaliação de temperatura ótima.....	54
Figura 39 – Atividade residual das celulases totais de <i>Paecilomyces</i> sp. frente à avaliação de temperatura ótima.....	54
Figura 40 – Avaliação da temperatura ótima para atividade da endoglucanase de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Paecilomyces</i> sp.....	56
Figura 41 – Atividade residual da endoglucanase de <i>Aspergillus</i> sp. frente à avaliação de temperatura ótima.....	56
Figura 42 – Atividade residual da endoglucanase de <i>Paecilomyces</i> sp. frente à avaliação de temperatura ótima.....	57
Figura 43 – Termoestabilidade de endoglucanase de <i>Aspergillus</i> sp. e de <i>Paecilomyces</i> sp.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios das principais propriedades físico-químicas da casca do coco verde.....	22
Tabela 2 – Caracterização físico-química do pó oriundo da casca do coco verde.....	43
Tabela 3 – Comparação da atividade celulolítica total descrita na literatura com as obtidas pelo autor.....	46
Tabela 4 – Comparação da atividade de endoglucanase com os dados da literatura	47
Tabela 5 – Comparação de pH ótimo para atividade de celulase total com os dados da literatura.....	50
Tabela 6 – Comparação de pH ótimo para atividade de endoglucanase com os dados da literatura	52
Tabela 7 – Comparação de temperatura ótima para atividade de celulase total com os dados da literatura	55
Tabela 8 – Comparação de temperatura ótima para atividade de endoglucanase com os dados da literatura	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°brix – Grau brix

ART – Açúcares redutores totais

DNS – Ácido 3,5-dinitro-salicílico

FES – Fermentação em estado sólido

FSS – Fermentação em estado semissólido

NaOH – Hidróxido de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

U – Unidade de atividade enzimática

U/g – Unidade de atividade enzimática por grama

U/mL – Unidade de atividade enzimática por mililitro

As abreviaturas e símbolos citados no trabalho que não constem nessa relação, encontram-se descritas no texto ou são comumente utilizadas.

RESUMO

Com o acentuado crescimento do agronegócio brasileiro há o proporcional crescimento de resíduos agroindustriais remanescentes dos processos de produção, em que sua maioria tem os lixões e aterros sanitários como destinação final, fato este que não contribui positivamente para a manutenção da sustentabilidade. Dessa forma, buscou-se atribuir um uso economicamente atrativo para a fibra da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*), servindo esta de substrato alternativo para fermentação em estado sólido pela ação de fungos como: *Aspergillus sp.* e *Paecilomyces sp.* com a finalidade de produzir enzimas celulolíticas. Para tal, a fibra da casca do coco verde foi preparada com processos de moagem e secagem, e caracterizada quanto ao teor de sólidos solúveis, açúcares redutores totais, pH, umidade e densidade aparente. Subsequentemente, a umidade foi ajustada para 70% e foram inoculados 1×10^7 conídios em suspensão por grama de substrato em 10 frascos de 250mL para cada fungo, contendo 10g de substrato cada durante 216 horas, cada frasco foi coletado a cada 24 horas, para obtenção do extrato enzimático bruto (EB). Os parâmetros do processo (atividade enzimática, temperatura e pH ótimos e termoestabilidade) foram analisados utilizando o EB, no qual alíquotas foram retiradas para determinação da atividade enzimática sacarificante pelo método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). Avaliou-se endoglucanases e celulasas totais, bem como, e verificou-se que a maior atividade enzimática para endoglucanases de *Aspergillus sp.* foi nos períodos de 168 e 192 horas, pH 5 e temperatura de 55°C, e para celulasas totais utilizando o mesmo fungo foi nos períodos de 192 e 216 horas, com pH ótimo de 5 e temperatura ótima de 65°C. Para *Paecilomyces sp.* as celulasas totais tiveram produção ótima em 120 e 192 horas, pH 5 e temperatura de 40°C. As endoglucanases de ambos os fungos mostraram-se termoestáveis. Assim sendo, os resultados obtidos demonstram que a produção enzimática celulolítica foram satisfatórios, quando se pensa em escalonamento para o nível industrial, sendo a fibra da casca do coco verde um potencial candidato a substrato para produção de celulasas fúngicas.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, *Aspergillus sp.*, *Paecilomyces sp.*, Celulasas, Resíduo Agroindustrial.

ABSTRACT

With the strong growth of Brazilian agribusiness there is the proportional growth of remaining agroindustrial residues of the production processes, in which most of them have the landfills and sanitary landfills as final destination, a fact that does not contribute positively to the maintenance of sustainability. In this way, an economically attractive use was made of the fiber of the green coconut shell (*Cocos nucifera L.*), serving as an alternative substrate for solid-state fermentation by fungi such as: *Aspergillus* sp. and *Paecilomyces* sp. with the purpose of producing cellulolytic enzymes. For this, the green coconut shell fiber was prepared with milling and drying processes, and characterized as soluble solids content, total reducing sugars, pH, moisture and apparent density. Subsequently, the moisture was adjusted to 70% and 1×10^7 suspended conidia per gram of substrate was inoculated into 10 250mL vials for each fungus, containing 10g of substrate each for 216 hours, each vial was collected every 24 hours to obtain crude enzyme extract (EB). The process parameters (enzymatic activity, optimum temperature and pH and thermostability) were analyzed using EB, in which aliquots were removed to determine the saccharifying enzymatic activity by the DNS (3,5-dinitro salicylic acid) method. Endoglucanases and total cellulases were evaluated as well, and it was found that the highest enzymatic activity for endoglucanases of *Aspergillus* sp. was in the periods of 168 and 192 hours, pH 5 and temperature of 55 °C, and for total cellulases using the same fungus was in the periods of 192 and 216 hours, with optimum pH of 5 and optimum temperature of 65 °C. For *Paecilomyces* sp. the total cellulases had optimal production in 120 and 192 hours, pH 5 and temperature of 40 °C. Endoglucanases from both fungi were thermostable. Therefore, the results obtained demonstrate that the cellulolytic enzymatic production was satisfactory when it is thought to be staggered at the industrial level, and the green coconut shell fiber is a potential substrate candidate for the production of fungal cellulases.

Key words: Solid-state fermentation, *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., Cellulases, Agroindustrial Residue.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Substrato.....	16
2.1.1 Cocoicultura.....	16
2.1.1.1 Coco verde.....	19
2.1.1.2 Produtos do coco verde.....	19
2.1.1.3 Resíduo do coco verde.....	21
2.1.1.4 Casca do coco verde.....	21
2.1.1.4.1 Celulose.....	22
2.2 Microrganismo para fermentação em estado sólido.....	23
2.2.1 <i>Aspergillus</i> sp.....	23
2.2.2 <i>Peaecilomyces</i> sp.....	25
2.3 Enzimas fúngicas.....	26
2.3.1 Celulases.....	26
2.3.1.1 Celulase totais.....	26
2.3.1.2 Endoglucanases.....	26
2.4 Enzimas na indústria.....	27
2.4.1 Celulases na indústria.....	28
2.5 Fermentação em estado sólido (FES).....	28
2.5.1 Vantagens da fermentação em estado sólido.....	29
2.5.2 Limitações da fermentação em estado sólido.....	29
2.6 Fatores que influenciam o processo fermentativo.....	29
2.6.1 pH.....	29
2.6.2 Temperatura.....	30
2.6.3 Umidade.....	30
2.6.4 inóculo.....	30

2.6.5 Substrato empregado.....	30
3 OBJETIVO.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivo específico.....	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Microrganismo e inóculo.....	33
4.1.1 Microrganismo.....	33
4.1.2 Inóculo.....	34
4.2 Preparo da fibra da casca do coco verde.....	34
4.3 Caracterização da fibra do coco verde.....	36
4.3.1 Teor de sólidos solúveis (°brix).....	36
4.3.2 Densidade aparente.....	36
4.3.3 pH.....	36
4.3.4 Umidade.....	36
4.3.5 Teor de açúcares redutores totais.....	37
4.4 Processo fermentativo.....	37
4.4.1 Obtenção do extrato bruto enzimático.....	37
4.4.2 Análise do extrato bruto enzimático.....	39
4.4.2.1 pH.....	39
4.4.2.2 Determinação da atividade da celulase total.....	39
4.4.2.3 Determinação da atividade da endoglucanase.....	40
4.4.2.4 Determinação de pH ótimo para celulase total.....	40
4.4.2.5 Determinação de temperatura ótima.....	42
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	43
5.1 Caracterização da fibra do coco verde.....	43
5.2 Processo fermentativo.....	43
5.2.1 pH do meio.....	44
5.2.2 Atividade celulolítica total.....	44
5.2.3 Atividade celulolítica CMCase.....	46

5.2.4	Influência do pH na atividade enzimática celulase total.....	48
5.2.5	Influência do pH na atividade enzimática endoglucanase.....	50
5.2.6	Influência da temperatura na atividade celulolítica total.....	53
5.2.7	Influência da temperatura na atividade enzimática endoglucanase.....	55
5.2.8	Avaliação da termoestabilidade.....	58
6	CONCLUSÕES.....	59
7	PERSPECTIVAS.....	60
8	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O acentuado crescimento do agronegócio brasileiro o coloca em posição de destaque no processo de desenvolvimento do país, sendo responsável por 21,6% do PIB em 2017, 43% das exportações e 37% dos empregos (CEPEA, 2018). Os significativos avanços implicaram no aumento do consumo de insumos e da geração de resíduos nas atividades agropecuárias (MATTOS et al. 2011).

Dentro do agronegócio brasileiro, está incluída a produção de coco verde (*Cocos nucifera*), que faz com que o país seja o quarto maior produtor do fruto, com uma produção anual equivalente a 4,6% de um total mundial de 55 milhões de toneladas, atrás apenas de países asiáticos como Indonésia, Filipinas e Índia. Percebe-se que a produção de coco verde, majoritariamente, está atrelada às regiões tropicais, impactando desta forma socioeconomicamente as regiões anteriormente referidas, gerando divisas, empregos, renda e alimentação (FAOSTAT, 2015).

A procura por alimentos naturais, a aplicação de tecnologias de processamento, as novas alternativas de apresentação do produto e a perspectiva de sua exportação contribuem para aumentar o consumo do coco verde e incrementar sua rentabilidade ao longo do ano, culminando em uma natural tendência de aumento da produção, fato que promove uma conseqüente elevação na geração de resíduos sólidos (cascas), pois o coco verde é consumido de diversas formas nos diferentes países, mas várias partes do fruto não são comestíveis e representam cerca de metade do peso do fruto, que geralmente pesa mais de 1 kg em massa fresca, fato que permite afirmar que um copo de 250mL de água de coco gera mais de um quilo de resíduo (SPC, 1983; ARAGÃO et al., 2002; PASSOS; CARDOSO; ARAGÃO, 2009; MATTOS et al. 2011).

O aumento do consumo de água de coco verde e a vocação natural para sua industrialização vêm causando problemas de disposição final do resíduo gerado, ou seja, as cascas do fruto (ROSA, et al. 2001).

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. Os resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (ROSA, et al. 2001).

O rejeito da indústria convencional do coco maduro pode ser usado como combustível para caldeiras, ou na manufatura de cordoalha, tapetes, estofamentos e

capachos. Estudos sugerem ainda a utilização do resíduo da casca na agricultura intensiva, principalmente no cultivo de plantas ornamentais e hortaliças (MURRAY, 2001; OHLER, 1986). Já no caso do coco verde, tanto a alta umidade (cerca de 85%) quanto as características da fibra desencorajam algumas aplicações usualmente empregadas com a casca do coco seco, sendo essas fibras descartadas e destinadas a aterros sanitários (ROSA et al., 2001).

Dessa forma, tornar viável o aproveitamento da casca do coco verde, gerado tanto como resíduo industrial quanto como lixo urbano, significaria mais uma alternativa de lucro para os sítios de produção e uma solução para o acúmulo desse resíduo em aterros sanitários. Assim sendo, uma das alternativas para a casca de coco verde é o seu aproveitamento em processos fermentativos, como a produção de enzimas. (COELHO et al., 2001).

Os processos fermentativos que envolvem o crescimento e o metabolismo de microrganismos, como os fungos filamentosos, por exemplo, em um substrato sólido ou suporte, com completa ou parcial ausência de água, são denominados de fermentação em estado sólido (FES) (ROCHA, 2010). Como a maioria dos rejeitos agroindustriais, a fibra do coco verde contém grande quantidade de compostos como celulose, hemicelulose, pectina e outros, não havendo necessidade de grandes complementações nutricionais para o adequado desenvolvimento microbiano e servindo estes compostos como indutores para a produção de enzimas extracelulares, tais como celulasas, xilanasas, pectinases e outras. (COELHO et al., 2001; GONÇALVES et al., 2014, 2015)

As enzimas de uso industrial representam 60% do mercado mundial. Dentre elas se destacam o grande uso de amilases, com uma projeção de 25,4%, celulasas (17,1%) e lipases (7,2%), só para este ano de 2009. (Monteiro & Silva, 2009).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar a produção enzimática pelos fungos *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp. utilizando como substrato a casca do coco verde, sem aditivos nutricionais, pelo sistema de cultivo de fermentação em estado sólido.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Substrato

2.1.1 Cocoicultura

Em 1553, o coqueiro foi introduzido no Brasil pelos portugueses, no estado da Bahia, mas 287 anos depois, em 1840, foram iniciadas plantações para fins comerciais, devido ao desenvolvimento do primeiro processo industrial de fabricação de sabão que demandava óleo de coco (HARRIES, 1978; SIQUEIRA; ARAGÃO; TUPINAMBÁ, 2002; MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

No início do século XX, a cocoicultura expandiu-se mundialmente e o Brasil passou em 1942, de 139 milhões de frutos para 1,3 bilhões de frutos em 2001. (HARRIES, 1978; GUTIÉRREZ-CUENCA; COSTA, 2001).

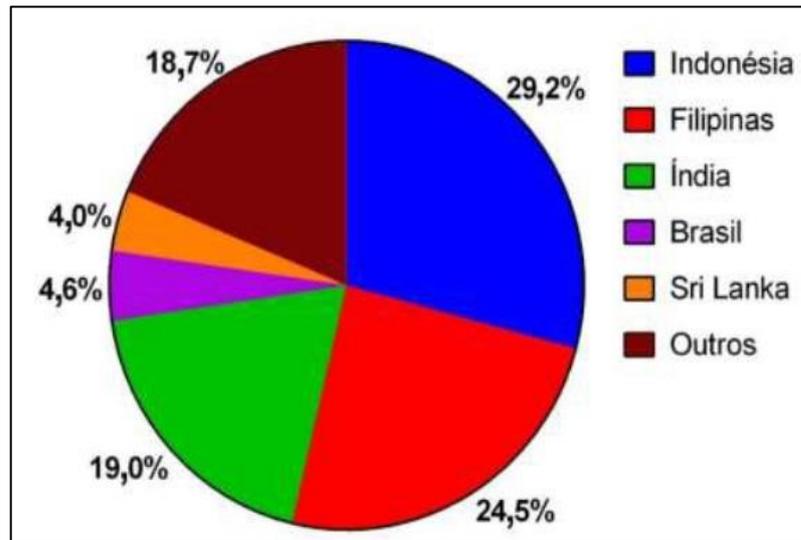
Por se adaptar melhor em áreas tropicais, o coqueiro tem sua maior produtividade em países que possuem esse clima, como mostrado na figura 1, onde o Brasil ocupa o quarto lugar nesse ranking com uma produção de 2,8 milhões de toneladas por ano e responsável por 4,6% da produção mundial de coco verde (Figura 2), sendo o único país dentre os cinco primeiros que não pertence ao continente asiático, onde estes são Indonésia, Filipinas, Índia e Sri Lanka (FAO, 2015).

Figura 1 – Maiores países produtores de coco verde. Produção anual em milhões de toneladas.



Fonte: FAO, 2015.

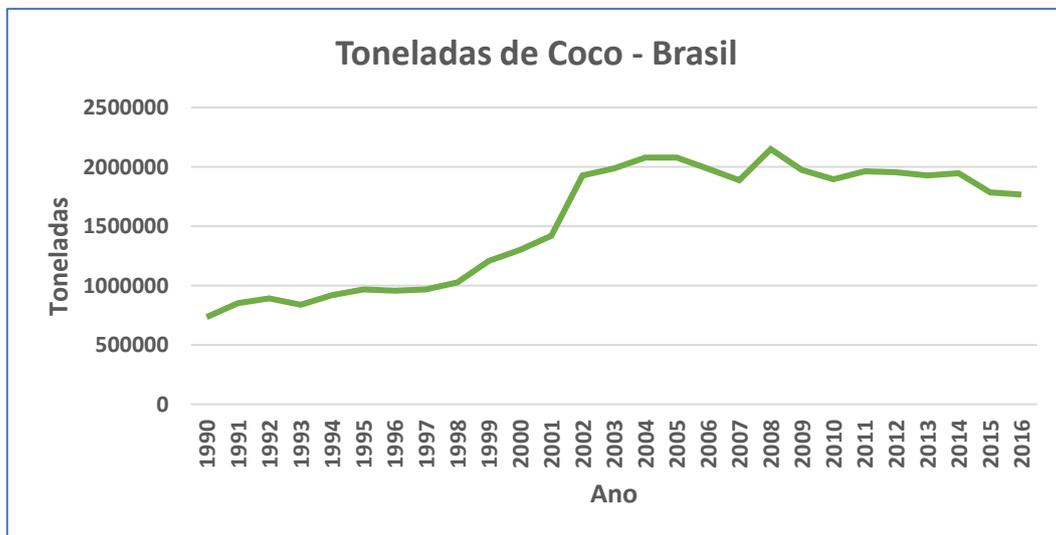
Figura 2 – Porcentagem da produção mundial de coco verde.



Fonte: FAO, 2015.

Percebe-se na figura 3 que a produção de coco no Brasil, desde 1990, está em crescimento contínuo, fato que chama atenção visto a geração de resíduos proporcional ao esse crescimento da produção.

Figura 3 - Produção anual de coco verde no Brasil entre 1990 e 2016.

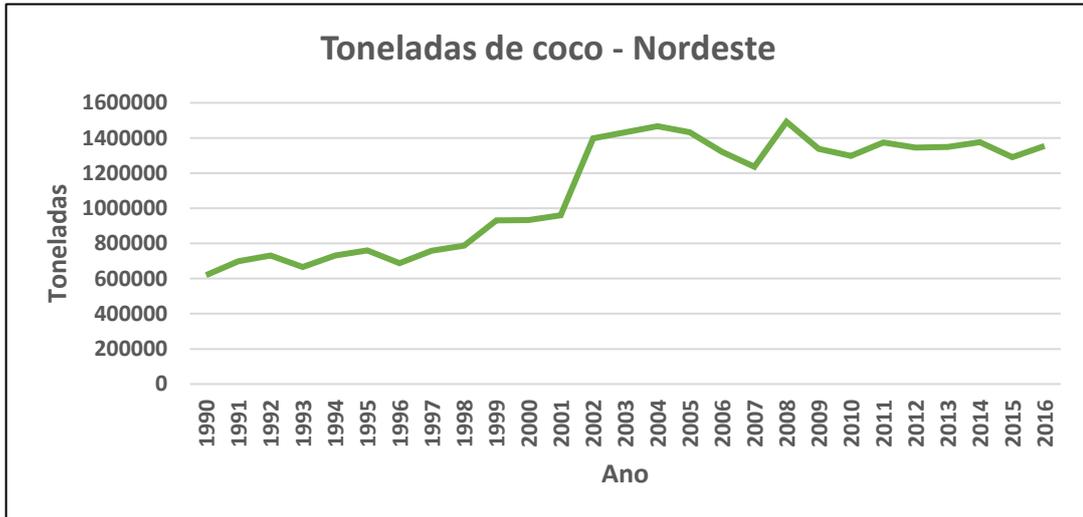


Fonte: IBGE, 2018.

Dentro do Brasil, pode-se dividir a produção de coco entre as grandes regiões, em que o Nordeste se sobressai às demais com uma produção de quase 1.400.000 toneladas de coco verde em 2016 (Figura 4), devido à sua adaptação ao clima tropical.

Quando se nota que a produção de coco verde mundial por ano chegou a 60,7 milhões de toneladas, torna-se preocupante o fato de mais da metade do fruto é descartado como lixo (PASSOS; CARDOSO; ARAGÃO, 2009).

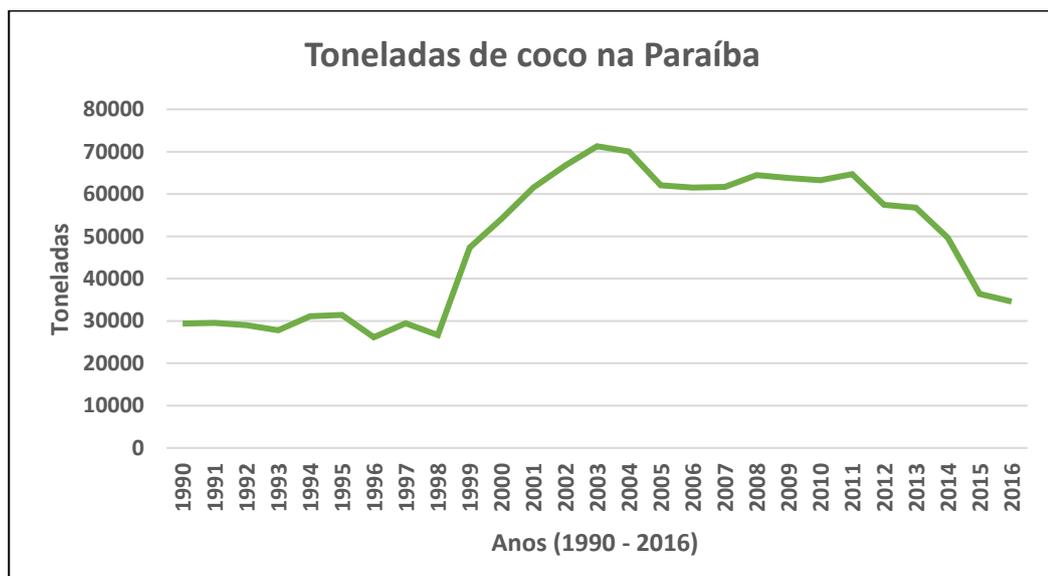
Figura 4 – Produção anual de coco no Nordeste brasileiro entre 1990 e 2016.



Fonte: IBGE, 2018.

A Paraíba ocupa o 8º lugar no *ranking* entre os Estados produtores de coco no Brasil, com uma produção em cerca de 35.000 toneladas de coco em 2016 (Figura 5).

Figura 5 – Produção de coco verde no Estado da Paraíba entre 1990 e 2016.



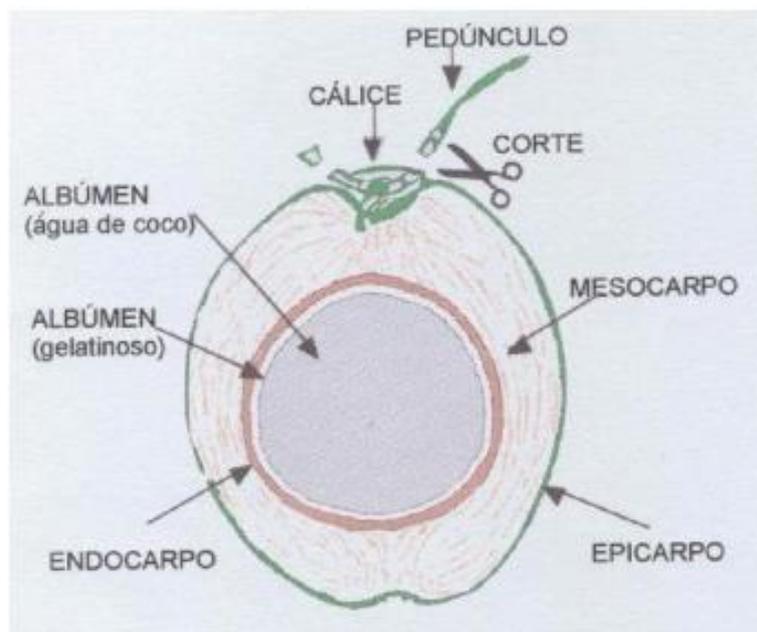
Fonte: IBGE, 2018

2.1.1.1 Coco verde

A espécie *Cocos nucifera* é a única no gênero *Cocos* e pertence à família *Arecaceae* (LIANG et al., 2014). Variedades como *Typica* (var. Gigante) e *Nana* (var. Anã) possuem grande impacto nos âmbitos socioeconômico, agroindustrial e no agronegócio no Brasil e no mundo (FRUTAS DO BRASIL, 2002).

O coco verde (Figura 6) é uma drupa fibrosa. O epicarpo é uma película fina e lisa que envolve externamente o fruto, com coloração variável de verde a marrom. O mesocarpo é caracterizado por uma camada bastante grossa e fibrosa e o endocarpo é lenhoso, duríssimo, de coloração escura e utilizado para fins industrial e artesanal. Entre o endocarpo e o endosperma, existe uma fina camada de coloração marrom (tegumento), aderida fortemente ao albúmen sólido que constitui a polpa (BENASSI et al., 2007).

Figura 6 – Coco verde com sete meses de idade, considerado pronto para uso.

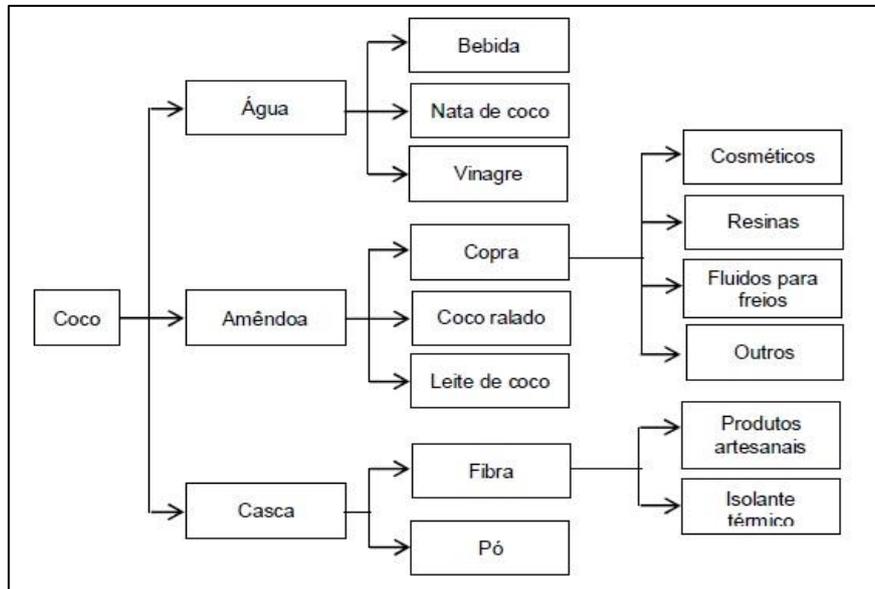


Fonte: Assis et al., 2000.

2.1.1.2 Produtos do coco verde

Do coqueiro é possível manufaturar diferentes partes da planta, obtendo-se produtos dos mais diversos, que podem ser bebidas, alimentos, produtos químicos, óleos e utensílios domésticos (PERSLEY, 1992). Na Figura 7 é possível observar as potencialidades das partes constituintes do coco verde para a produção de produtos.

Figura 7 – Potencialidades agroindustriais do coco em estágio de maturação completa.



Fonte: NUNES, 2002.

Dentre os produtos do coco verde, a água é considerada a mais promissora no mercado brasileiro, com um crescimento estimado de 20% ao ano. Mas, com o aumento do consumo da água de coco aumenta também a geração de casca de coco verde, subproduto que é responsável por 70% do total de lixo gerado no litoral dos grandes centros urbanos (Figura 8) do Brasil, sendo este um resíduo de difícil degradação que acaba por se acumular nos aterros sanitários (BARROSO, 2005).

Figura 8 – Descarte de coco verde no litoral de Fortaleza.



Fonte: Santos, 2003.

2.1.1.3 Resíduo do coco verde

Estima-se que sejam descartados no Brasil cerca de 7 milhões de toneladas de coco por ano, onde a cada 125 cocos descartados, após consumo de sua água, estes ocupam 1 m³ de espaço nos aterros, com um tempo médio de decomposição desses resíduos, provenientes do pós-consumo, de 12 anos (CINTRA et al., 2009; MARTINS; JESUS, Jr, 2011).

Em regiões urbanas o lixo proveniente do consumo do coco verde gera transtornos à população, pois este resíduo possui grandes peso e volume, sendo difícil descartá-lo dentro das lixeiras públicas, e quando assim consegue estas muitas vezes são danificadas, extravasando o seu conteúdo e poluindo as vias urbanas, contribuindo com os alagamentos devido ao entupimento das redes de esgoto e sendo vetores para doenças de ampla veiculação (ROSA et al. 2001; SENHORAS, 2004).

Como alternativa para a utilização desse subproduto e de outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais, pode-se utilizá-los como substrato para produção de enzimas na fermentação em estado sólido (FES) que podem ser aplicadas como aditivos de alimentos de ruminantes, nas indústrias têxtil, de alimentos, detergentes e na produção de bioetanol de segunda geração (OJUMU, et al., 2003; GRAMINHA et al., 2008; SINGHANIA et al., 2010).

2.1.1.4 Casca do coco verde

A biomassa lignocelulósica, geralmente contém 30-45% de celulose, 25-30% de hemicelulose e 25-30% de lignina. Esses três principais componentes representam juntos cerca de 90% da massa seca da biomassa. O percentual restante (10%) é constituído por pectina, proteína, cinzas e extrativos (materiais não estruturais solúveis, tais como açúcares não-estruturados, material nitrogenado, clorofila e graxa). A disposição desses três componentes e as suas respectivas proporções tonam os resíduos lignocelulósicos de difícil decomposição pelos microrganismos (GLAZER; NIKAIDO, 2008).

A casca do coco verde é composta de celulose (43%), hemicelulose (12%) e lignina (45%) (Tabela 1). Essa composição inviabiliza a sua utilização nas indústrias de papel e celulose (VAN DAM et al., 2004; ESMERALDO et al., 2010; RENCORET et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014).

Os compostos lignocelulósicos funcionam como indutores para a produção de enzimas extracelulares, tais como celulasas, xilanases, pectinases, dentre outras. Essas enzimas conseguem quebrar a estrutura rígida da matriz lignocelulósica em glicose livre, para que o microrganismo consiga se nutrir desta. Dessa forma, a casca de coco verde se mostra um potencial indutor de enzimas extracelulares devido à sua composição (COELHO et al., 2001; GONÇALVES et al., 2014, 2015).

Tabela 1 - Valores médios das principais propriedades físico-químicas da casca do coco verde.

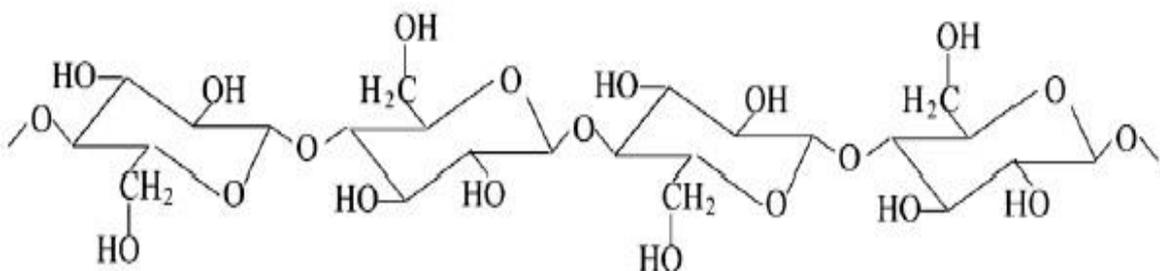
Propriedades	Valores médios
pH	5,4
Condutividade elétrica (dS/m)	1,8
Relação C/N	132
Densidade (g/L)	70
Porosidade total (%)	95,6
Retenção de água (mL/L)	538
Água facilmente assimilável (%)	19,8
Lignina (%)	35 a 45
Celulose (%)	23 a 43
Hemicelulose (%)	3 a 12

Fonte: ARAGÃO, 2007.

2.1.1.4.1 Celulose

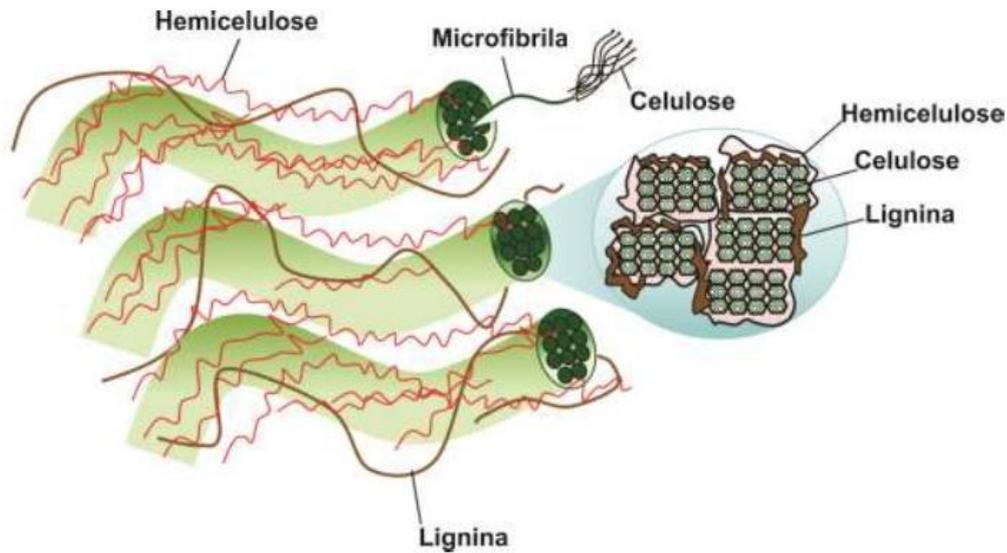
A celulose é um polímero linear de subunidades de D-glicose associadas por ligações β 1-4, sendo a celobiose a unidade do polímero (Figura 9). Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 subunidades de glicose e as cadeias de celulose estão agrupadas formando microfibrilas (Figura 10). Cada microfibrila de celulose é formada por 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular (AGBOR et al., 2011; BARBOSA, 2011).

Figura 9 – Estrutura molecular da celulose



Fonte: FRANCHETTI; MARCONATO, 2006.

Figura 10 – Estrutura da parede celular da planta e corte transversal das microfibrilas.



Fonte: LEE, et al., 2014.

2.2 Microrganismo para fermentação em estado sólido

Os fungos adaptam-se a diversos substratos por possuírem a capacidade de síntese de enzimas que os degradam, onde os substratos podem ser efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agroindustriais e resíduos derivados de petróleo (TAVARES et al., 1998). Devido à sua capacidade de crescer em ambientes com pouca água livre no sistema, os fungos são os melhores que se adaptam à FES, pois esta se assemelha às condições de crescimento natural destes microrganismos. Os gêneros mais utilizados são: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (PANDEY et al., 2003).

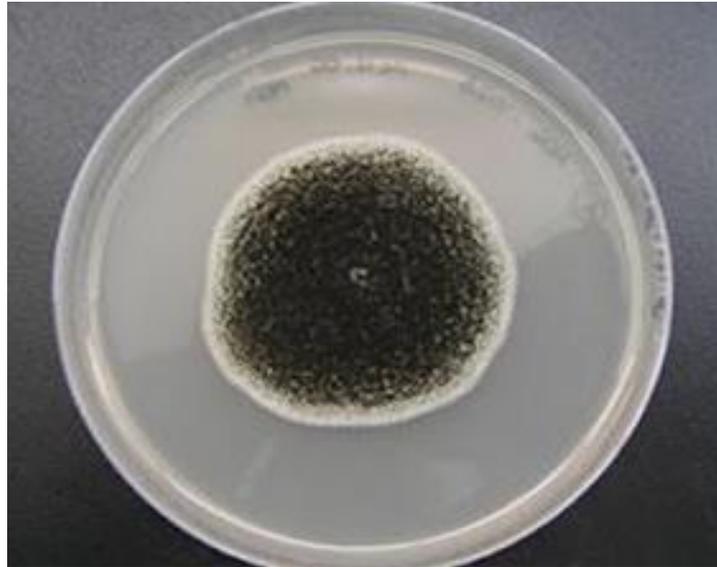
2.2.1 *Aspergillus* sp.

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem ao filo Ascomycota, à classe Ascomycetes e à subclasse *Euascomycetae*, ordem *Eurotiales* e família *Aspergillaceae*. Existem mais de 200 espécies dentro deste gênero, onde a maioria das espécies são saprófitas e crescem em substâncias orgânicas em decomposição, como frutas, legumes, geleias, queijo, madeira, couro e etc. Algumas espécies são parasitas e causam doenças de animais e seres humanos (RICHARDSON; WARNOCK, 2003; KIRK et al., 2008).

Relativamente ao aspecto macroscópico (Figura 11), as colônias apresentam uma superfície de cor branca, na fase inicial de maturação. Dependendo das espécies, a sua cor pode evoluir para verde, amarelo, castanho ou preto. A textura da colônia surge algodoadosa, tornando-se pulverulenta com a produção de esporos, os

quais, podem apresentar rugosidade da parede, característica igualmente importante na identificação de espécie (MURRAY et al, 2006).

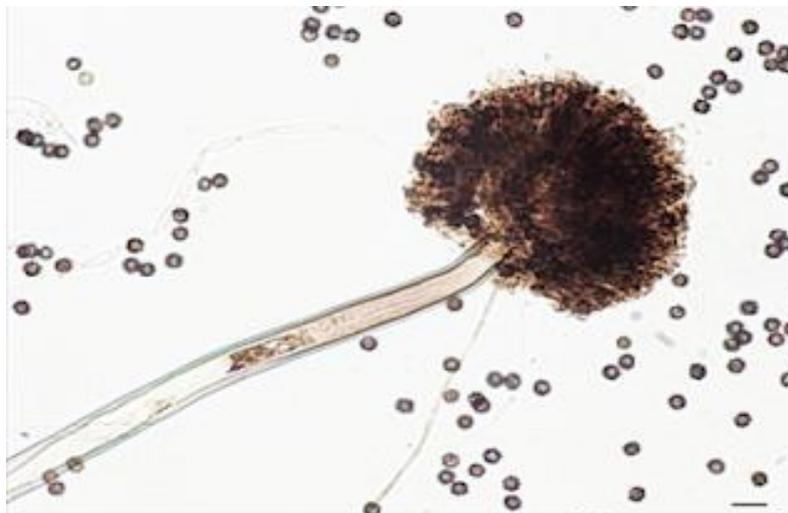
Figura 11 – Colônia de *Aspergillus niger* em placa com ágar-Sabouraud.



Fonte: LIFE, 2018.

A maioria das espécies de *Aspergillus* se reproduz assexuadamente através da produção de conídios (Figura 12) e habitam preferencialmente o solo, mas pode-se encontrá-los em água, ar, plantas e animais (KEARNS; LOUDIS, 2003; DOS SANTOS, 2011).

Figura 12 – Microscopia ótica de *Aspergillus niger*.



Fonte: LIFE, 2018.

2.2.2 *Paecilomyces* sp.

O *Paecilomyces* sp. é um gênero de fungo eucarioto pertencente a classe dos Deuteromicetos. Esse gênero, que está amplamente distribuído na natureza, reúne diversas espécies entomopatogênicas, sendo as mais frequentes *P. farinosus*, *P. tenuipes*, *P. amoeneroseus*, *P. cicadidae* e *P. fumosoroseus*, e por isso, tem um papel chave na hidrólise da cutícula de insetos, sendo desta maneira, muito utilizado como agente de biocontrole (ALVES, 1998).

Os conidióforos de *Paecilomyces* (Figura 13) são simples ou em sinema, verticilados e sustentando fiáides com células pé uninucleadas. Os conídios podem ser elípticos unicelulares, hialinos ou fracamente pigmentados, e as colônias (Figura 14), dependendo da espécie e meio, têm coloração geral branca, amarela, rosa ou avermelhada (ALVES, 1998).

Figura 13 – *Paecilomyces lilacinus* em microscopia ótica.



Fonte: ALCHETRON, 2018.

Figura 14 - *Paecilomyces formosus* em placa com ágar-Sabouraud,



Fonte: GSBTM, 2015.

2.3 Enzimas fúngicas

2.3.1 Celulases

As celulases são enzimas que catalisam a hidrólise da celulose e são produzidas por vários micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; celulase totais, que atuam na região externa da celulose; e b-glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002).

2.3.1.1 Celulase totais

O grupo das celulase totais é constituído por celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) e glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) (LYND, et al., 2002).

Essas enzimas atuam sobre a redução das extremidades da cadeia de celulose e sua classificação é dada de acordo com o produto liberado após sua ação. Quando a enzima libera glicose é nomeada como glucanohidrolase (1,4-b-D-glucana-glucano-hidrolase), e quando libera celobiose recebe o nome de celobiohidrolase (1,4-b-D-glucana-celobio-hidrolase). As celulases totais ou celodextrinases atuam removendo celobiose de celo-oligossacarídeos e geralmente são inativas contra a celulose amorfa ou formas solúveis, como o CMC (LYND et al., 2002; SANDGREN, et al., 2005; SHARMA et al., 2016).

2.3.1.2 Endoglucanases

Endoglucanase ou glucanohidrolase é classificada com o EC (*Enzyme Commission*) 3.2.1.4 e possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 1,4-b-D-glucana-4-glucano-hidrolase. É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica gerando novas extremidades da cadeia e de oligossacarídeos com comprimentos variados, são ativas contra as formas solúveis de celulose, como carboximetilcelulose (CMC) e celulose amorfa (SPREY & BOCHEM, 1992; KLEMAN-LEYER et. al., 1996; SHARMA et al., 2016)

2.4 Enzimas na indústria

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem. Muitas dessas reações são catalisadas por catalisadores químicos que podem ser substituídos por enzimas. As enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, pois são:

- I. São produtos naturais biológicos e biodegradáveis, não sendo passíveis de causar intoxicações;
- II. Têm alta especificidade nas reações, agindo diretamente no substrato desejado, não havendo uma sua ação em outra parte do processo;
- III. Não são consumidas durante o processo, podendo ser reutilizadas em outras ocasiões;
- IV. Aumentam a velocidade das reações por diminuírem a energia de ativação, apenas acelerando um processo que ocorreria naturalmente, mas que levaria um tempo maior para acontecer sem a intervenção enzimática;
- V. Atuam em pH e temperaturas brandas, o que não encarece os processos industriais;
- VI. São ecologicamente mais viáveis, fato que faz com que o viés da sustentabilidade seja, também, um *marketing* da empresa além de contribuir para a não poluição do meio ambiente (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O mercado de enzimas (Figura 15) está dividido em enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). As enzimas de uso industrial representam 60% do mercado mundial. Dentre elas se destacam as amilases, com uma projeção de 25,4%, celulasas (17,1%) e lipases (7,2%) (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Figura 15 – Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes áreas.



Fonte: MONTEIRO; SILVA, 2009.

2.4.1 Celulases na indústria

A investigação ativa das celulases e polissacarídeos relacionados deu-se no início de 1950. A razão desse interesse foi a capacidade das celulases converter lignocelulose, a fonte mais abundante de energia renovável na Terra, em glicose e açúcares solúveis (BHAT, 2000).

Diante disso, a demanda por celulases é consistentemente em ascensão devido a suas diversas aplicações industriais, como no processamento de alimentos e sucos; na indústria de papel de celulose, na biorremediação de poluentes industriais, indústria de lavanderia e detergentes para limpeza de tecidos, e na indústria farmacêutica quando agem na extração de compostos produzidos pelas plantas (SINGHANIA et al., 2009; SHARMA et al., 2016).

Globalmente, existem dois grandes *players* conhecidos para produção de celulase para conversão de biomassa - “Genencor” e “Novozyme”. Ambas as empresas têm desempenhado um papel significativo em reduzir o custo da celulase. Várias vertentes de pesquisas sobre celulases estão continuando a reduzir o custo por adoção de novas tecnologias (SINGHANIA et al., 2009).

2.5 Fermentação em estado sólido (FES)

O termo fermentação em estado sólido ou fermentação semi-sólida ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas, que deve ser suficiente para o desenvolvimento microbiano e formação do produto de interesse, que podem ser inúmeros (RAIMBAULT, 1998; MONTEIRO; SILVA, 2009).

Dependendo da natureza da fase sólida, essa matriz pode ser naturalmente a fonte de nutrientes, ou um suporte fixo que será impregnado de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (SINGHANIA et al., 2009; BARRIOS-GONZÁLES, 2012). Nesse contexto, a matéria orgânica proveniente do substrato é uma interessante fonte de energia para o desenvolvimento do microrganismo, e a fonte de carbono é empregada na síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (MITCHELL; LONSANE, 1992)

Diversos meios de suplementação são usados para suprir os requerimentos nutricionais dos microrganismos, em termos de carbono, nitrogênio, fósforo, vitaminas e minerais. Além disso, o sistema celulolítico da maioria das linhagens fúngicas precisa ser induzido pela presença do substrato (celulose) (VRIES; VISSER, 2001).

No caso do presente trabalho, essa indução pela presença de celulose externa se faz desnecessária, uma vez que o próprio meio de cultura dos fungos é rico quanto ao polissacarídeo referido.

2.5.1 Vantagens da fermentação em estado sólido

A FES apresenta menor risco de contaminação, devido à baixa umidade do meio; é de fácil preparo, pois, normalmente, necessita apenas do substrato principal e de água para umedecer; há uma ampla possibilidade de emprego de resíduos de baixo valor agregado; não é necessário muito espaço para desenvolver o cultivo de FES; o crescimento microbiano ocorre em condições próximas ao *habitat* natural proporcionando baixo consumo de água; volume reduzido de meio e as etapas de purificação do bioproduto são facilitadas (PALMA, 2003; SANTOS, 2007; MONTEIRO; SILVA, 2009; SINGHANIA et al., 2009).

2.5.2 Limitações da fermentação em estado sólido

Algumas limitações são apresentadas, como a heterogeneidade do meio da FES, que dificulta o controle do crescimento celular, entre outros parâmetros como pH, agitação, concentração de nutrientes e produtos. A difícil canalização do calor que foi gerado em consequência do metabolismo microbiano, podendo afetar a umidade do meio, e também a restrição da variedade de produtos que podem ser gerados devido aos microrganismos que restritamente são selecionados pelo seu desenvolvimento apenas em baixos níveis de umidade (DEMAIN *et al.* 1999; PALMA, 2003).

2.6 Fatores que influenciam o processo fermentativo

Alguns fatores como temperatura, pH, umidade e atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos são considerados no processo de FES, pois podem afetar o crescimento celular e a formação do produto final (DOELLE et al., 1992).

2.6.1 pH

O pH é um fator de extrema relevância para a otimização dos processos em estado sólido, onde pode ocorrer variações em resposta às atividades metabólicas do microrganismo. Entretanto, o controle e monitoramento deste parâmetro, durante a FES, não é fácil de ser realizado devido à característica do processo, sendo realizada com precisão apenas no início e no final do processo fermentativo (DEL BIANCHI et al., 2001; ROCHA, 2010).

A faixa de pH ideal para o crescimento de um microrganismo é um fator relativo, sendo caracterizado dentro de um intervalo, que varia de acordo com cada microrganismo. A versatilidade do pH ideal para o crescimento dos fungos,

especificamente, pode ser empregada para prevenir ou minimizar a contaminação por bactérias (DE MELO, 2016).

2.6.2 Temperatura

A FES é caracterizada por ser exotérmica, onde grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do microrganismo. A temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos por fungos filamentosos. Além do acúmulo do calor metabólico gerado, há dificuldade de mistura do meio sólido, pois a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos dependendo dos parâmetros de controle do sistema, afetando negativamente a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (ROCHA, 2010).

2.6.3 Umidade

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do microrganismo. Baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, à ineficiente utilização do substrato. Em contrapartida, o excesso de umidade resulta na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas que prejudicam a respiração microbiana (HOLKER et al., 2004; ROCHA, 2010).

O teor de umidade do substrato contribui diretamente na disponibilidade de água livre no meio e também na dilatação do substrato promovendo a penetração do micélio, o que afeta o crescimento microbiano e conseqüentemente a formação do produto (MURTHY et al., 1993).

2.6.4 inóculo

A concentração de inóculo constitui um fator importante no estudo de otimização nas FES, pois 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 (DE MELO, 2016).

2.6.5 Substrato empregado

Os substratos sólidos devem ser constituídos basicamente de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de

promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares, além de serem capazes de induzir a produção do bioproduto de desejo (COSTA, 1996; SPIER, 2005).

O substrato lignocelulósico ideal precisa ser barato, bem processado, avaliado em grandes quantidades e, para que ocorra sua hidrólise e produção enzimática desejada, a composição também precisa ser ajustada (JUHÁSZ et al., 2005).

A opção por materiais agroindustriais deve-se ao fato de possuírem as seguintes características: são recursos renováveis: sua produção depende de outra atividade produtiva; muitas vezes é um subproduto ou produto secundário, sendo produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (SINGHANIA et al., 2008).

O meio fermentativo deve conter todos os elementos essenciais à síntese de material celular e formação de produto, além de serem economicamente viáveis. Quando o produto de interesse é um metabólito celular, como enzimas, a constituição do meio se associa, sempre, ao comportamento de produção desta substância em relação ao crescimento celular. Se a formação do produto estiver associada ao crescimento, o meio deve satisfazer tanto as necessidades para a multiplicação celular quanto para a geração do metabólito. No caso em que o produto é formado numa fase pós-exponencial, o meio deve ser composto de forma a controlar a composição nutritiva e os fatores ambientais, a fim de que a duração do período de formação do produto seja controlada (SANTOS, 2007).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas celulolíticas (CMCase e celulasas totais) e proteolíticas dos fungos *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp, utilizando a fermentação em estado sólido (FES), tendo como substrato a fibra *in natura* do coco verde, sem aditivos nutricionais.

3.2 Objetivo específico

Caracterizar a fibra do coco verde quanto ao pH, densidade aparente, açúcares redutores totais, sólidos solúveis totais e umidade;

Avaliar a produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus* sp.e *Paecilomyces* sp.;

Determinar pH e temperatura ótimos das enzimas produzidas durante o cultivo dos fungos;

Avaliar a termoestabilidade das enzimas produzidas.

4 METODOLOGIA

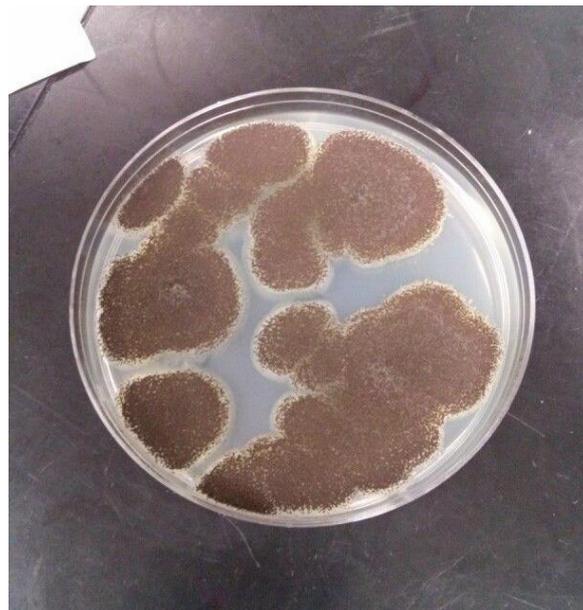
4.1 Microrganismo e inóculo

4.1.1 Microrganismo

Os microrganismos empregados foram *Aspergillus* sp e *Paecilomyces* sp. Os isolados foram mantidos em meio sólido ágar-Sabouraud em placas de Petri.

O fungo *Aspergillus* sp. utilizado nesse experimento (Figura 16) foi isolado de peças anatômicas conservadas em formol 10% do complexo de Laboratórios de Anatomia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e cedido pelo Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia da mesma instituição.

Figura 16 – *Aspergillus* sp. cultivado em placa de ágar- Sabouraud.



Fonte: Autor, 2018.

O *Paecilomyces* sp. TP08 foi isolado de óleo diesel oriundo de posto de gasolina da cidade de João Pessoa, na Paraíba e cedido pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

A manutenção das células foi feita periodicamente, a cada 30 dias, realizada por repique em meio ágar-Sabouraud e incubadas a 30°C durante 5 dias. Em seguida foram armazenadas a 4°C.

4.1.2 Inóculo

O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado adicionando-se 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3% (v/v) nos tubos e placas com conídios. Após agitação, os conídios foram transferidos para *erlenmeyer* estéril com auxílio de gaze e algodão estéril para a contagem e posteriormente ser incubado. A quantificação da suspensão de conídios obtida foi feita através de contagem dos conídios em Câmara de Neubauer espelhada e o volume de suspensão de conídios a ser adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se um inóculo de 1×10^7 conídios por grama de substrato sólido.

A concentração de conídios do inóculo foi calculada seguinte a Equação (1) e o volume de suspensão a ser inoculada foi calculado através da Equação (2):

$$C_{conídios} \text{ (conídios/mL)} = \bar{E} \times 25 \times 10 \times 10^4 \times F_D \quad \text{Eq. (1)}$$

$$V_{Suspensão} \text{ (mL)} = \frac{\text{Concentração de inóculo (conídios)} \times m \text{ (g)}}{\text{Concentração de esporos (conídios/mL)}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que:

$C_{conídios}$ – Concentração de conídios na suspensão;

\bar{E} – Média de conídios contados na Câmara de Neubauer;

F_D – Fator de diluição para contagem na Câmara de Neubauer;

A concentração de inóculo desejada para a fermentação é 10^7 ;

m – Massa de substrato utilizada.

4.2 Preparo da fibra da casca do coco verde

A casca do coco verde foi utilizada como substrato para produção de enzimas celulolíticas em cultivo sólido. Este resíduo foi coletado do comércio de rua da cidade de João Pessoa – PB (Figura 17).

O coco verde *in natura* foi selecionado, aberto, obtendo-se apenas o mesocarpo do coco, e desfibrado com a utilização de faca. Em seguida foi lavado com água destilada e seco em estufa durante 48h, a 70°C (Figura 18).

A moagem foi feita em moinho de facas (TECNAL) até se obter o pó. Como o substrato, naturalmente, apresenta uma concentração de glicose livre muito alta, foram realizadas três lavagens do pó resultante com água destilada, com posterior secagem em estufa durante 48h a 70°C (Figura 19).

Figura 17 – Coco verde (*Cocos nucifera*) *in natura*.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 18 – Casca do coco verde desfibrada após a secagem em estufa.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 19 – Pó oriundo da secagem e moagem da casca do coco verde.



Fonte: Autor, 2018

4.3 Caracterização da fibra do coco verde

A caracterização físico-química do resíduo quanto ao teor de sólidos solúveis, densidade aparente, pH, umidade e açúcares redutores totais, foi realizada com base nas metodologias descritas a seguir:

4.3.1 Teor de sólidos solúveis (°brix)

Para determinação do teor de açúcares presente na casca do coco verde foram adicionados 9mL de água destilada a 1g do substrato em *erlenmeyer* de 125mL. A suspensão permaneceu em mesa agitadora por uma hora sob agitação de 200rpm. Seguida de filtração a vácuo, em funil de Büchner, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o bagaço do sobrenadante. A leitura foi realizada em refratômetro. Esse procedimento foi adaptado da metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.3.2 Densidade aparente

Para determinação da densidade aparente pesou-se 100g do substrato que foi colocado em proveta, sem compactá-lo, para verificar o volume ocupado (Correia, 2004). A densidade aparente é expressa conforme a equação (3):

$$Densidade\ aparente = \frac{massa\ (g)}{volume\ ocupado\ (mL)} \quad Eq.\ (3)$$

4.3.3 pH

Preparou-se uma suspensão com 100mL de água e 10g do substrato. Após homogeneização, determinou-se o pH com potenciômetro digital previamente calibrado com soluções padrões (Instituto Adolf Lutz, 2005).

4.3.4 Umidade

A umidade é representada pelo teor de água presente na amostra. Para análise da umidade, pesou-se aproximadamente 2,0g da amostra em placa de petri previamente seca e tarada. Em seguida, o conjunto amostra-recipientes foi colocado em estufa a 105±2°C durante 24 horas e pesado novamente após. O procedimento foi realizado em triplicata (EMBRAPA, 2010) e calculado conforme a equação (4):

$$Umidade = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad Eq.\ (4)$$

4.3.5 Teor de açúcares redutores totais

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Embrapa Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540nm.

Foram pesados 1g do substrato em frasco *erlenmeyer* de 125mL, adicionado 9mL de água destilada e 5mL de HCl 1N. A mistura permaneceu em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) a 200rpm durante uma hora. Posteriormente, foi adicionado 2mL de NaOH 1N. A mistura foi filtrada com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o bagaço da solução contendo os açúcares. Tomou-se 0,5mL da solução e adicionou 2,5mL do reagente DNS (em triplicata). Os tubos foram aquecidos a 100°C por cinco minutos e resfriados em banho de gelo por mais cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 3mL de água destilada, homogeneizados e feita a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION) a 540nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/ g amostra).

4.4 Processo fermentativo

O experimento foi realizado com dois fungos: o *Aspergillus* sp. e o *Paecilomyces* sp. Para cada fungo foram destinados 10 frascos *erlenmeyers* de 250 mL, contendo 10g do substrato com teor de umidade de 70%. Os frascos foram autoclavados a 1 atm e 121°C por 20 minutos. Cada frasco foi inoculado com uma suspensão de conídios (1×10^7 conídios/g de substrato) e incubado a 30°C durante 10 dias (Figura 20). A cada 24 horas, um frasco de cada fungo recebeu 100 mL de tampão citrato pH 5 para a quantificação das variáveis de processo.

4.4.1 Obtenção do extrato bruto enzimático

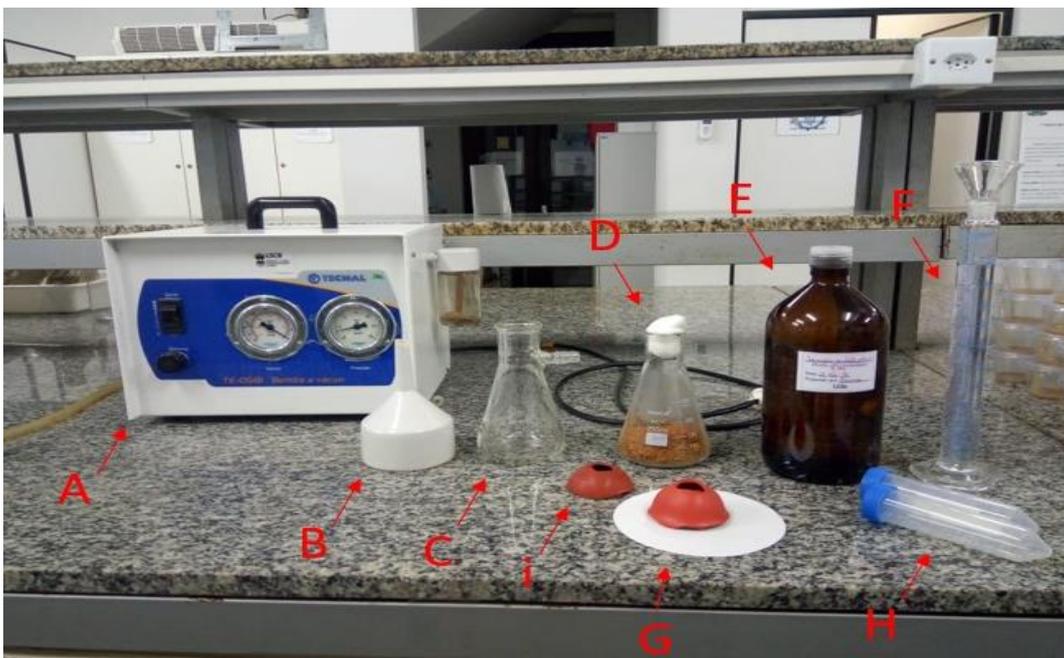
O extrato enzimático bruto foi obtido através da adição de 100mL de água destilada aos 10g de amostra fermentada de cada frasco. Essa suspensão permaneceu sob agitação contínua em *shaker* de bancada durante 30 minutos a 200 rpm. Em seguida, foi feita a filtração a vácuo, utilizando papel de filtro qualitativo (Whatman nº1) para remoção dos sólidos. O filtrado foi denominado de extrato enzimático bruto (EB).

Figura 20 – Frascos *erlenmeyers* com substrato e inóculo dentro da estufa.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 21 – Obtenção do extrato bruto enzimático



(A) bomba a vácuo; (B) funil; (C) Kitassato; (D) *Erlenmeyer* com meio de cultivo inoculado; (E) tampão citrato; (F) proveta; (G) filtro de papel; (H) tubo falcon para armazenamento do EB; (I) suporte de borracha. Fonte: Autor, 2018.

4.4.2 Análise do extrato bruto enzimático

O extrato enzimático bruto de ambos os fungos foi analisado quanto ao pH, atividade celulolítica, temperatura e pH ótimos de atividade das enzimas e termoestabilidade da endoglucanase.

4.4.2.1 pH

O pH do extrato enzimático bruto foi determinado com o auxílio de um potenciômetro digital (AKSO - AK 90) previamente calibrado com soluções padrões.

4.4.2.2 Determinação da atividade da celulase total

Para determinação da atividade de celulase total (FPase) foi utilizada a metodologia descrita por Ghose (1987), empregando-se como substrato o papel de filtro Whatman n°1 cortado em tiras de 1 x 6cm. Cada tubo de ensaio recebeu uma tira de papel. Em seguida, adicionou-se 1mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8, e 0,5mL do extrato enzimático (Figura 22). A reação enzimática ocorreu a 50°C durante 60 minutos em banho Maria. Por fim, transferiu-se 0,5mL da mistura reacional para tubos de ensaio e 0,5mL do reagente DNS. Os tubos seguiram para o banho Maria a 100°C por 10 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 3mL de água destilada e homogeneizadas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. Uma unidade da atividade da celulase é definida pela quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose por minuto.

Figura 22 – Tubos de ensaio para determinar atividade celulase total.



Tubos de ensaio contendo o EB, tampão e tira de papel filtro. Fonte: Autor, 2018.

Figura 24 – Soluções tampão utilizadas para a determinação do pH ótimo das enzimas.



Soluções tampão de pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Fonte: Autor, 2018.

Figura 25 – Extrato bruto e as soluções tampão com os diferentes pH.

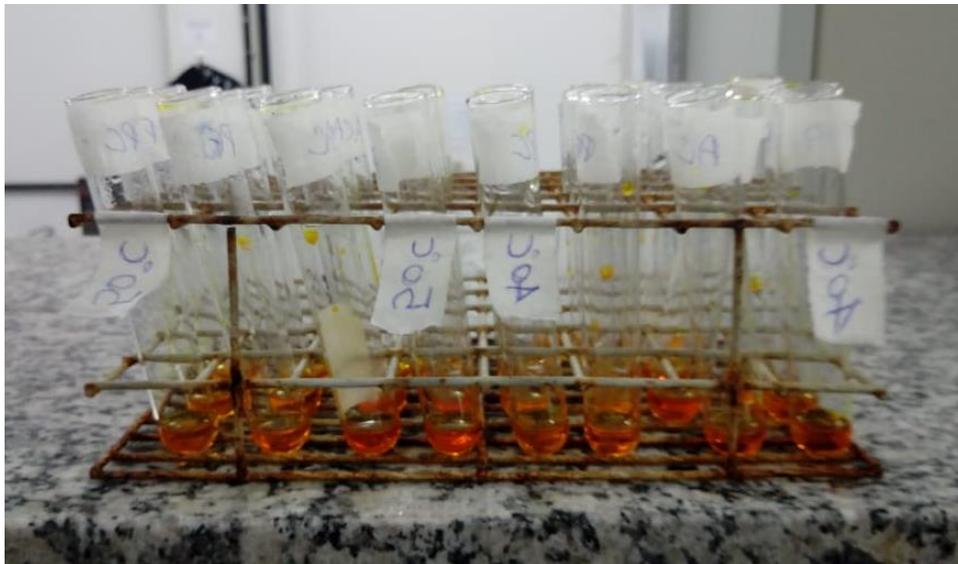


A – *Aspergillus* sp. P – *Paecilomyces* sp.; C – CMCase; F – FPase. Os números correspondem aos pH das soluções tampão. Fonte: Autor, 2018.

4.4.2.5 Determinação de temperatura ótima

A temperatura ótima foi determinada incubando-se 1mL do extrato enzimático em 1 mL de tampão fosfato 0,5 M e pH 5,0. Após, incubou-se as amostras nas temperaturas de 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80°C. Em seguida foi feita a leitura através com o método do ácido 3,5 - dinitrosalicílico (MILLER, 1959) para determinação da atividade de celulase total (FPase), descrita no item 4.4.2.2 e, para determinação da atividade de endoglucanase (CMCase), foi aplicada a metodologia descrita no item 4.4.2.3.

Figura 26 – Ensaio para determinação de temperatura ótima.



Tubos já submetidos às temperaturas citadas na metodologia e adicionados de DNS. A imagem representa as temperaturas de 40°C e 50°C. Fonte: Autor, 2018.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da fibra da casca do coco verde

A casca do coco verde possui um teor de açúcares redutores totais de 0,113 mg de ART/g de amostra (tabela 2), diferentemente do obtido por Gervásio, 2017, que apresentou um teor de açúcares redutores igual a 17,622 mg de ART/g de amostra, valor bem superior ao obtido neste trabalho. Isso se deve ao fato de terem sido feitas três lavagens do pó da casca do coco verde com água destilada, justamente com o intuito de diminuir a concentração de glicose livre, visto que, esta, quando em altas concentrações, não estimula o microrganismo à produção enzimática devido à alta oferta de açúcar biodisponível.

Tabela 2 – Caracterização físico-química do pó oriundo da casca do coco verde.

Parâmetro analisado	Resultado
Sólidos solúveis	1,6 °Brix
Açúcar Redutor Total	0,113 mg ART/g amostra
Densidade aparente	0,666 g/mL
pH	5,46

Fonte: Autor, 2018.

A densidade aparente mostra um substrato não tão compacto, que proporciona uma maior aeração do meio, permitindo a melhor absorção de oxigênio pelo microrganismo. O pH interfere diretamente na atividade enzimática e no crescimento do microrganismo, inibindo-as, quando em seus extremos. O pH obtido, de 5,46 não distoa muito do pH da polpa (6,5) apresentado por Kanzawa e Ditchfield (2010). A sua diminuição pode estar atrelada aos processos de sucessivas lavagens e secagens que sofreu.

O resultado de sólidos solúveis obtido, de 1,6 °Brix ficou distante da concentração encontrada na polpa (6,60 °brix) descrita por Kanzawa e Ditchfield (2010). A possível motivação para tal se justifica pelos processos de lavagem e consequente redução da concentração de açúcares do resíduo.

5.2 Processo fermentativo

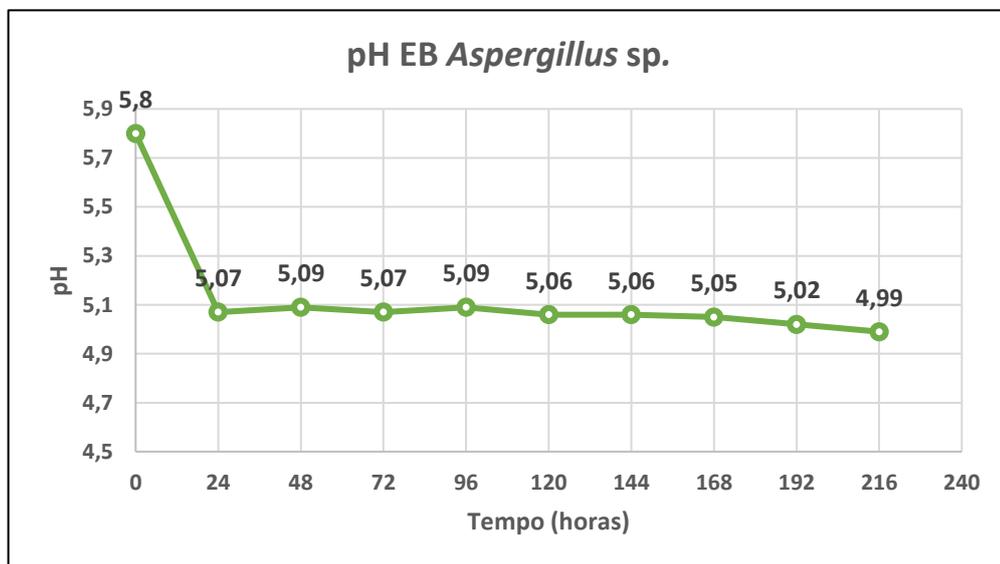
A fermentação fúngica, que ocorreu de forma excelente, sendo possível a visualização da parte aérea do microrganismo (micélios) macroscopicamente através da mudança de coloração da parte superficial do meio no cultivo do *Aspergillus* sp. No cultivo do *Paecilomyces* sp. não foi possível observar de forma macroscópica o seu

crescimento, devido às próprias características do fungo, pois este apresentou uma leve coloração pálida entre tons de amarelo e branco, mas o seu desenvolvimento ocorreu, devido às análises que comprovaram a produção enzimática do fungo.

5.2.1 pH do meio

A mensuração do pH do cultivo de *Aspergillus* sp. (Figura 27) mostra uma excelente adaptação do fungo ao substrato, onde este diminuiu o pH do meio já nas primeiras horas de fermentação, mantendo-o estável ao longo do processo.

Figura 27 – Mensuração do pH do cultivo de *Aspergillus* sp. durante 216 horas.



Fonte: Autor, 2018.

A mensuração do pH do cultivo de *Paecilomyces* sp. (Figura 28) mostrou que o fungo manteve o pH relativamente estável, oscilando entre 4,8 e 5,1.

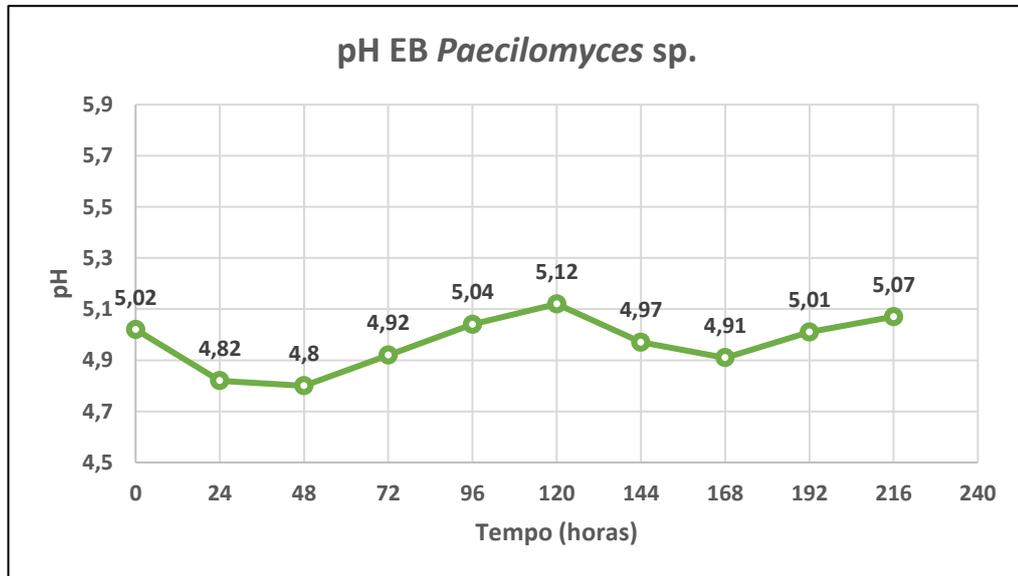
5.2.2 Atividade celulolítica total

A atividade celulolítica total de *Aspergillus* sp. (Figura 29) teve sua melhor atuação nos últimos pontos da fermentação, 192 e 216 horas, com uma média de 20,70 U/g (U = 0,18016 mg de glicose). Percebe-se que a atividade enzimática cresceu constantemente, com algumas oscilações que são explicáveis pela disponibilidade de glicose livre no meio.

A atividade celulolítica de *Paecilomyces* sp. teve a sua melhor atuação também no final da fermentação, porém com destaque para o tempo de 196 horas, onde teve uma atividade de 33,1 U/g. Porém, percebe-se que a atividade enzimática se manteve quase constante a partir das 120 horas de fermentação.

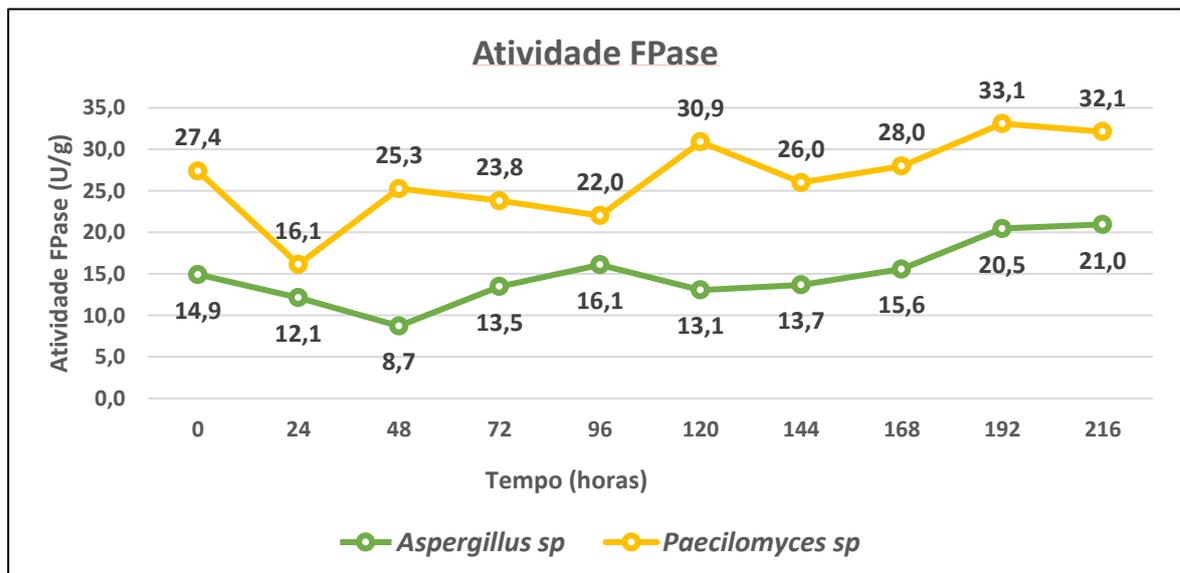
Diante disso, verifica-se que o tempo de 196 horas foi ótimo para ambos fungos produzirem celulases totais.

Figura 28 – Mensuração do pH do cultivo de *Paecilomyces* sp. durante 216 horas.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 29 – Atividade celulolítica total de *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp. durante fermentação de 216 horas.



Fonte: Autor, 2018.

Quando compara-se com os resultados obtidos na literatura para produção de celulases totais (Tabela 3), verifica-se que ambos os fungos obtiveram uma excelente produção enzimática em um meio de cultivo sem adição de nutrientes, fato que agrega

valor aos resultados obtidos, com destaque para o *Paecilomyces* sp. que teve a sua atividade maior que o dobro obtido por Gervásio (2017) que utilizou um isolado de *Aspergillus* sp.

Tabela 3 – Comparação da atividade celulolítica total com os dados da literatura.

Referência	Enzima	M.O.	Cultivo	Tempo	Produção (U/g)
Autor, 2018	FPase	<i>Aspergillus</i> sp.	FES + casca de coco verde	10 dias	20,95
Autor, 2018	FPase	<i>Paecilomyces</i> sp.	FES + casca de coco verde	9 dias	33,10
Zuñiga et al., (2009)	FPase	<i>Aspergillus niger</i>	FES + nutrientes	3 dias	0,59
Gervásio (2017)	FPase	<i>Aspergillus</i> sp.	FES + nutrientes	9 dias	15,773

Fonte: Autor, 2018.

5.2.3 Atividade celulolítica CMCase

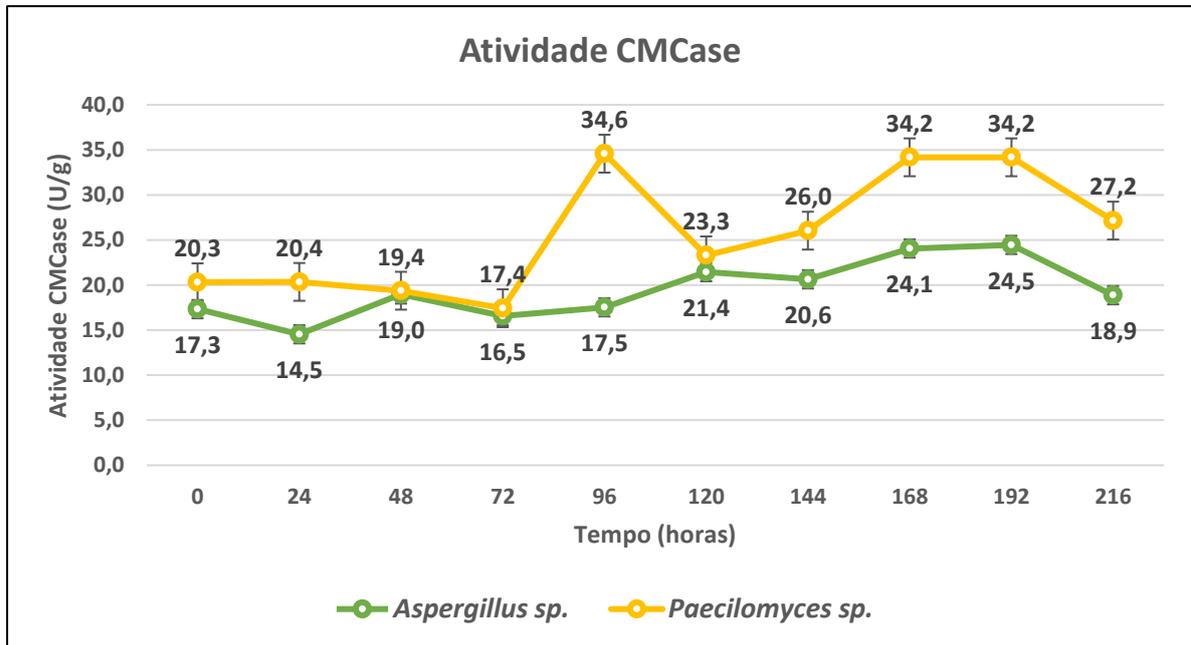
A atividade de endoglucanase de *Aspergillus* sp. (Figura 30) foi maior no tempo de 192 horas (24,46 U/g) mas manteve-se relativamente estável a partir de 120 a 192 horas, com atividade média de 22,65 U/g, indicando uma maior produção enzimática nesses tempos.

A atividade de endoglucanase de *Paecilomyces* sp. teve seu auge no tempo de 96, 168 e 192 horas, com atividade de 34,6 U/g, 34,2 U/g e 34,2 U/g, respectivamente, mantendo-se acima de 23 U/g a partir de 96 horas de fermentação.

Diante disso, percebe-se que para a enzima CMCase, ambos fungos tiveram sua produção ótima nos tempos de 168 e 192 horas e que a CMCase produzida por *Paecilomyces* sp. mostrou-se mais ativa do que a produzida por *Aspergillus* sp.

Quando comparado com a literatura (Tabela 4), verifica-se que a produção enzimática ficou aquém das descritas por Ang et al. (2013) e Silva et al. (2005), porém superior à descrita por Shenef et al. (2010), que utilizou um meio suplementado com nutrientes.

Figura 30 – Atividade de endoglucanase de *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp. durante fermentação de 216 horas.



Fonte: Autor, 2018.

Tabela 4 – Comparação da atividade endoglucanase com os dados da literatura

Referência	Enzima	M.O.	Cultivo	Tempo	Produção (U/g)
Autor	CMCase	<i>Aspergillus</i> sp.	FES + casca de coco verde	9 dias	24,46
Autor	CMCase	<i>Paecilomyces</i> sp.	FES + casca de coco verde	4 dias	34,58
Shenef et al. (2010)	CMCase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	FSS + farelo de trigo e arroz	4 dias	9,65
Ang et al. (2013)	CMCase	<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	FSS	11 dias	54,27
Ang et al. (2013)	CMCase	<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	FSS	3 dias	59,2
Silva et al. (2005)	CMCase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	FSS + farelo de trigo	4 dias	300

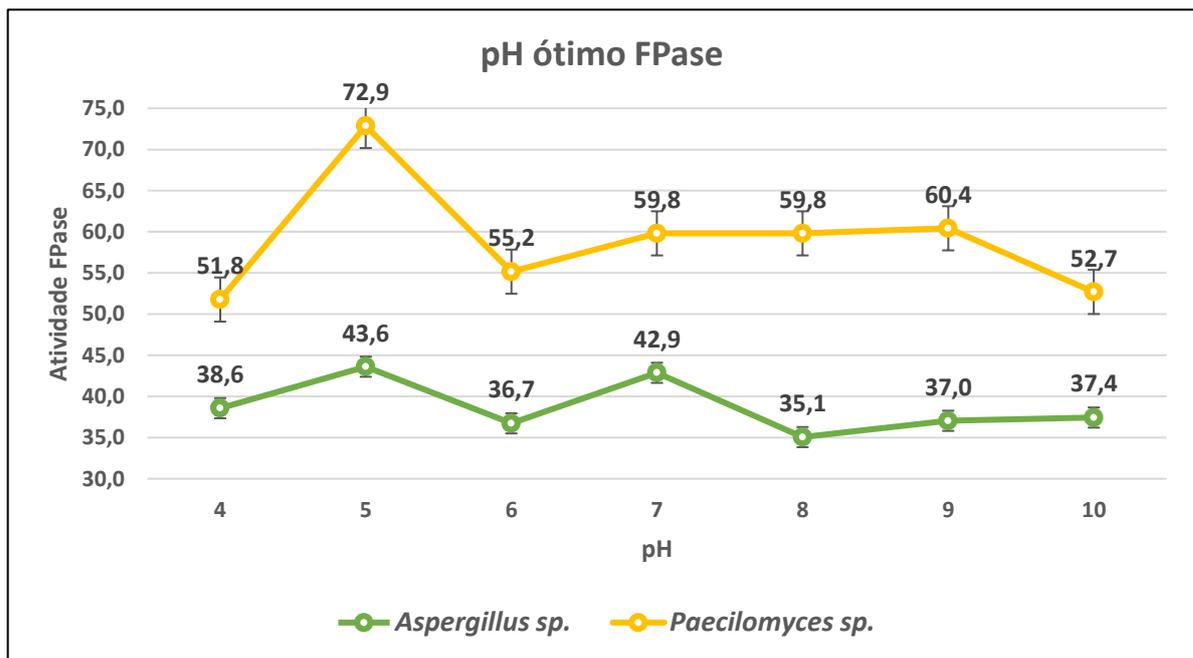
Fonte: Autor, 2018.

5.2.4 Influência do pH na atividade enzimática celulase total

Com relação ao pH da FPase de *Aspergillus* sp., observa-se um padrão irregular na figura 31. Isso se deve ao fato das celulases totais serem várias enzimas e não apenas uma. Como estas não foram expostas a um substrato específico para cada enzima do complexo das celulases totais, ambas atuaram no filtro de papel, e a oscilação presente no gráfico se deve ao fato das enzimas possuírem pH ótimos diferentes, tendo, assim, picos de atividade em pH diferentes, como ocorreu nos pH 5 e 7.

Já em relação à FPase de *Paecilomyces* sp., verifica-se uma curva bem delineada de atividade enzimática, onde a maior atividade ocorreu no pH 5 (72,9 U/g) e foi decaído à medida que o pH tornava-se mais alcalino, mantendo-se sempre com uma atividade superior à FPase de *Aspergillus* sp.

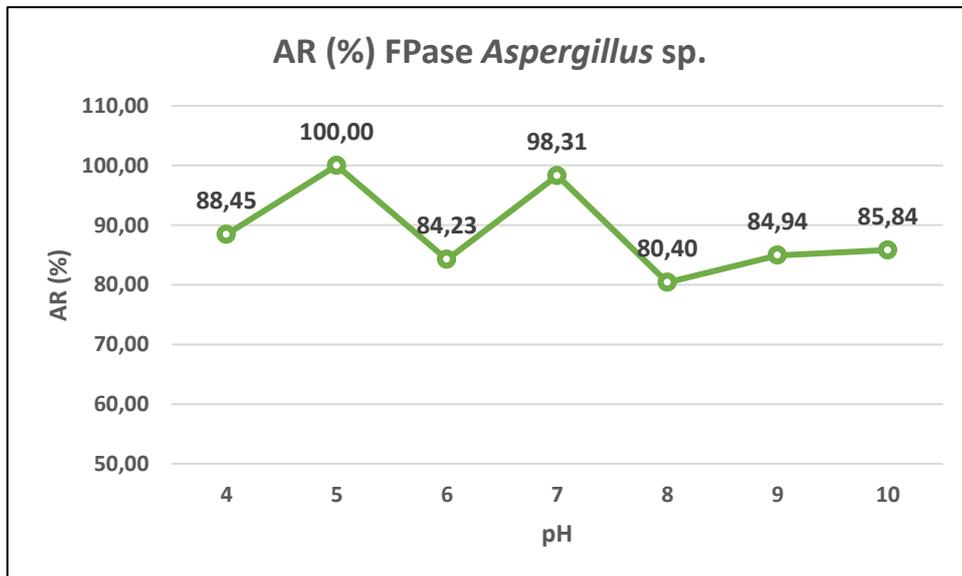
Figura 31 – Avaliação do pH ótimo para atividade celulolítica total de *Aspergillus* sp. e de *Paecilomyces* sp.



Fonte: Autor, 2018.

Um fato interessante é que as enzimas celulolíticas totais do *Aspergillus* sp. se mantiveram estáveis em relação à variação de pH (Figura 32), pois considerando-se a maior atividade obtida como 100%, verifica-se que a menor atividade que ocorreu na variação de pH de 4 a 10 foi de 80,40%, constatando-se que a enzima permaneceu próxima da sua atividade total durante o experimento.

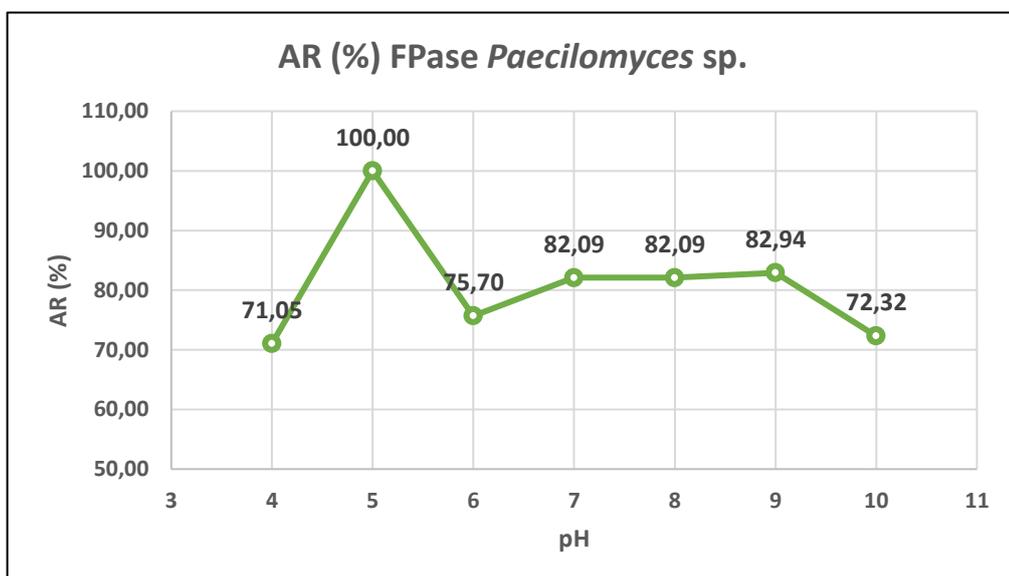
Figura 32 – Atividade residual da celulase total de *Aspergillus* sp. frente à avaliação de pH ótimo.



Fonte: Autor, 2018

Quando analisa-se a atividade celulolítica total de *Paecilomyces* sp. (Figura 33), verifica-se também uma estabilidade com relação à variação de pH, sendo esta estabilidade um pouco menor quando comparada à encontrada na FPase de *Aspergillus* sp., mas ainda assim as enzimas mantiveram uma atividade constante, pois considerando-se o máximo de atividade 100%, verificou-se que o mínimo foi de 71,05%.

Figura 33 – Atividade residual da celulase total de *Paecilomyces* sp. frente à avaliação de pH ótimo.



Fonte: Autor, 2018.

Ao comparar os resultados obtidos com os já existentes na literatura (Tabela 5) verificou-se que a faixa ótima de pH manteve-se dentro da descrita por Ang et al. (2013), apesar deste ter considerado o pH 3 como ótimo também, e por Gama (2016), que obteve pH ótimo de 4 e 6.

Tabela 5 – Comparação de pH ótimo para atividade celulase total com os dados da literatura

Referência	Enzima	M.O.	Cultivo	pH ótimo
Autor	FPase	<i>Aspergillus</i> sp.	FES + casca de coco verde	5,0 e 7,0
Autor	FPase	<i>Paecilomyces</i> sp.	FES + casca de coco verde	5,0
Ang et al. (2013)	FPase	<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	FSS	3,0 – 5,0
Gama (2016)	FPase	<i>Streptomyces thermocerradoensis</i> I3	FSS + farelo de trigo	4,0 e 6,0

Fonte: Autor, 2018.

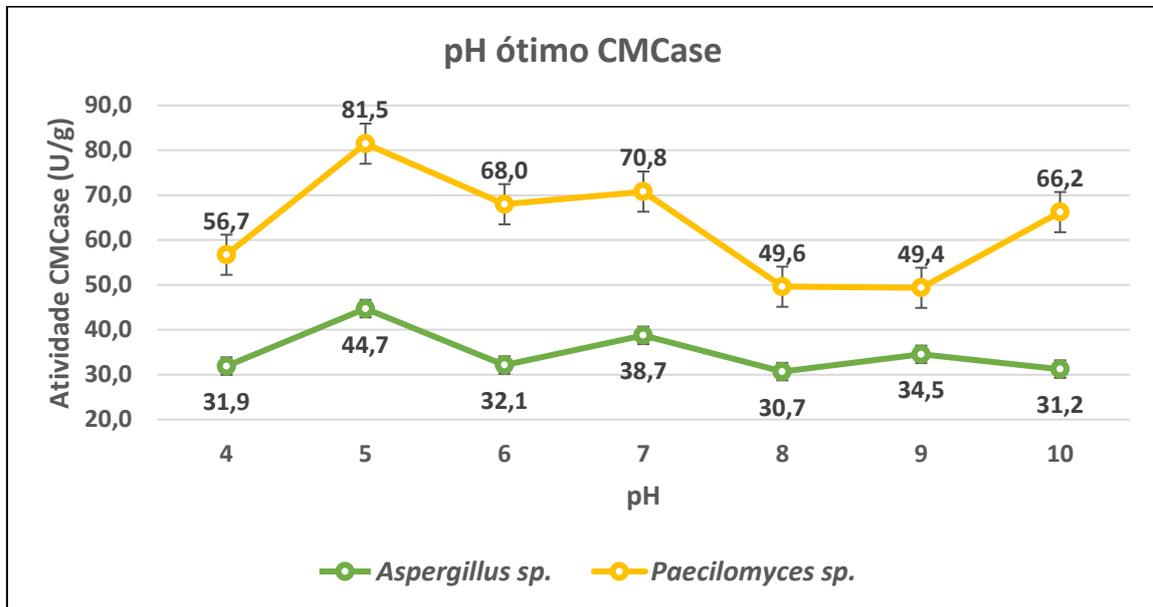
5.2.5 Influência do pH na atividade enzimática endoglucanase

Com relação ao pH ótimo de atividade da CMCase oriunda de *Aspergillus* sp. (Figura 34), verificou-se um pico de atividade no pH 5 (44,71 U/g) seguido de outro pico de menor intensidade no pH 7 (38,74 U/g) e outro menor no pH 9 (34,51 U/g), sendo o pH 5 o melhor para a atividade da enzima, não sendo uma condição extrema e muito favorável para aplicação industrial pois é muito próximo do pH encontrado na caracterização físico-química da casca do coco verde, não necessitando de muitos processos para correção do pH, e, conseqüentemente, não tornando o processo mais dispendioso.

A CMCase oriunda de *Paecilomyces* sp. frente às variações de pH, possui uma alta atividade no pH 5 (81,48 U/g), mantendo-se acima de 67 U/g nos pH 6, e 10. A atividade expressa no pH 5 foi 236% maior do que a atividade obtida durante a fermentação, o que implica dizer que o pH 5 potencializou a atividade da enzima.

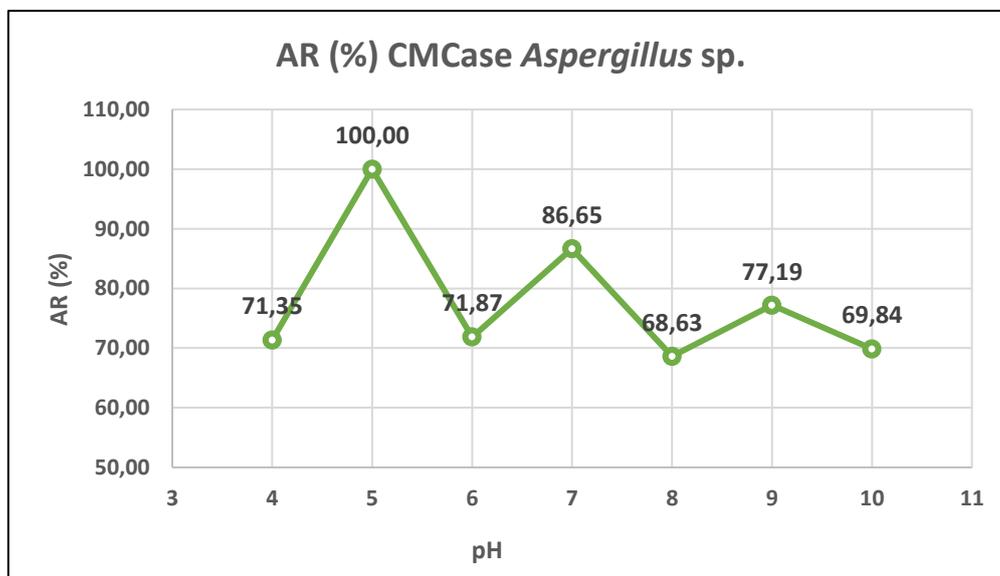
A atividade residual da CMCase de *Aspergillus* sp. (Figura 35) mostrou-se relativamente estável, com uma atividade residual mínima entre 70% nos dois pH extremos, 4 e 10.

Figura 34 – Avaliação do pH ótimo para atividade da endoglucanase de *Aspergillus* sp. e de *Paecilomyces* sp.



Fonte: Autor, 2018.

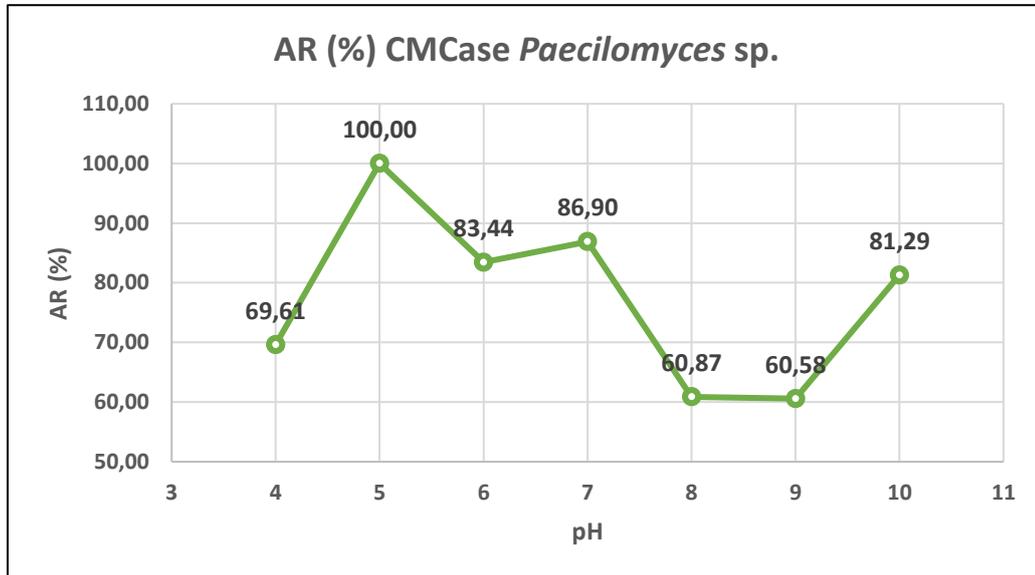
Figura 35 – Atividade residual da endoglucanase de *Aspergillus* sp. frente à avaliação de pH ótimo.



Fonte: Autor, 2018.

De acordo com a atividade residual da endoglucanase de *Paecilomyces* sp. (Figura 36), verifica-se que esta foi levemente menor do que a obtida pela mesma enzima do *Aspergillus* sp., mas ainda assim manteve a sua atividade acima de 60% nos pH de menor desempenho.

Figura 36 – Atividade residual da endoglucanase de *Paecilomyces* sp. frente à avaliação de pH ótimo.



Fonte: Autor, 2018.

Comparando com os resultados obtido por Silva et al. (2005) e Gama, 2016 (tabela 6), verifica-se que o pH ótimo para atuação da CMCCase obtido no presente trabalho está dentro da faixa ótima de pH, entre 5,0 – 5,5.

Tabela 6 – Comparação de pH ótimo para atividade endoglucanase com os dados da literatura

Referência	Enzima	M.O.	Cultivo	pH ótimo
Autor	CMCase	<i>Aspergillus</i> sp.	FES + casca de coco verde	5
Autor	CMCase	<i>Paecilomyces</i> sp.	FES + casca de coco verde	5
Silva et al. (2005)	CMCase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	FSS + farelo de trigo	5,0 – 5,5
Gama (2016)	CMCase	<i>Streptomyces thermocerradoensis</i> I3	FSS + farelo de trigo	5,0 – 5,5

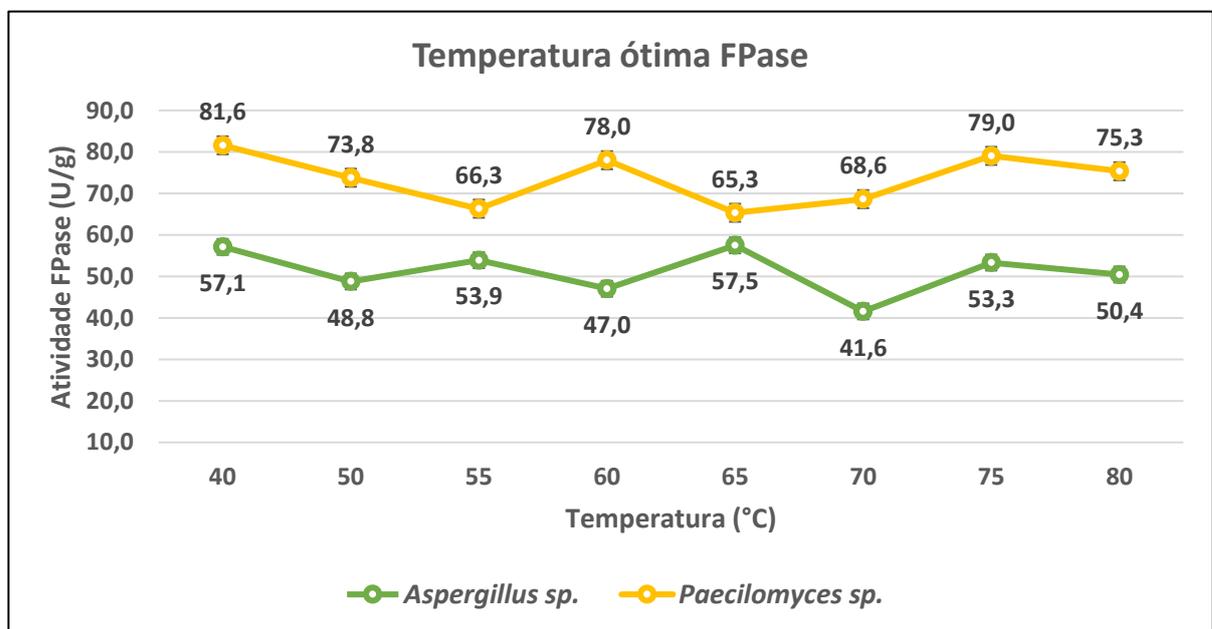
Fonte: Autor, 2018.

5.2.6 Influência da temperatura na atividade celulolítica total

Da mesma forma que no pH, na temperatura também verifica-se a oscilação das celulasas totais na figura 37, com picos semelhantes nas temperaturas de 40, 55, 65 e 75°C para *Aspergillus* sp. Devido a essa oscilação, não foi realizado o ensaio de termoestabilidade para essa enzima.

Para as celulasas totais de *Paecilomyces* sp. há um destaque para as temperaturas de 40, 60 e 75°C, com uma produção de 81,60 U/g, 78,00 U/g e 79,05 U/g, respectivamente.

Figura 37 – Avaliação da temperatura ótima para atividade celulolíticas totais de *Aspergillus* sp. e de *Paecilomyces* sp.

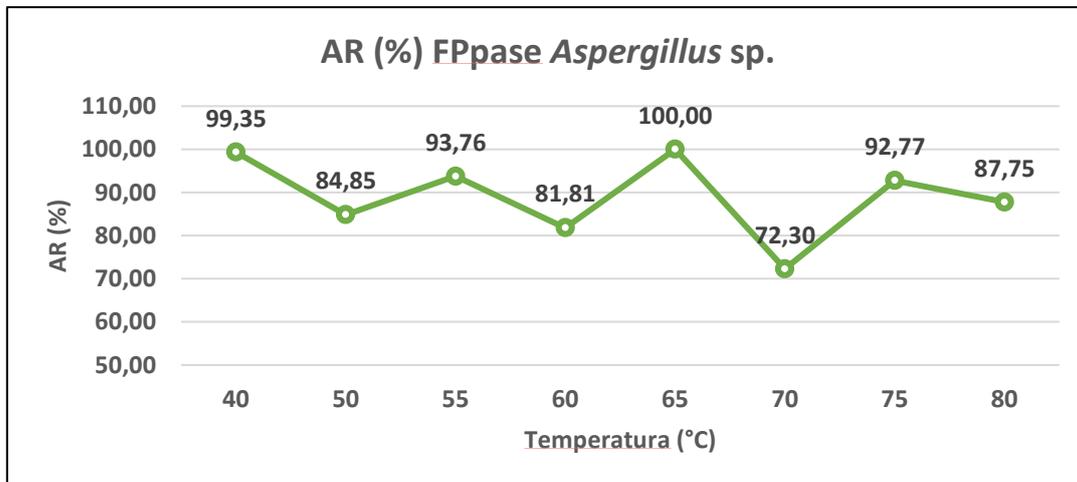


Fonte: Autor, 2018.

Ao analisar a atividade residual das FPases advindas de *Aspergillus* sp. (Figura 38) verifica-se a constância da atividade enzimática, que decai abaixo de 75% a 70°C mas que se mantém acima de 85% a 80°C.

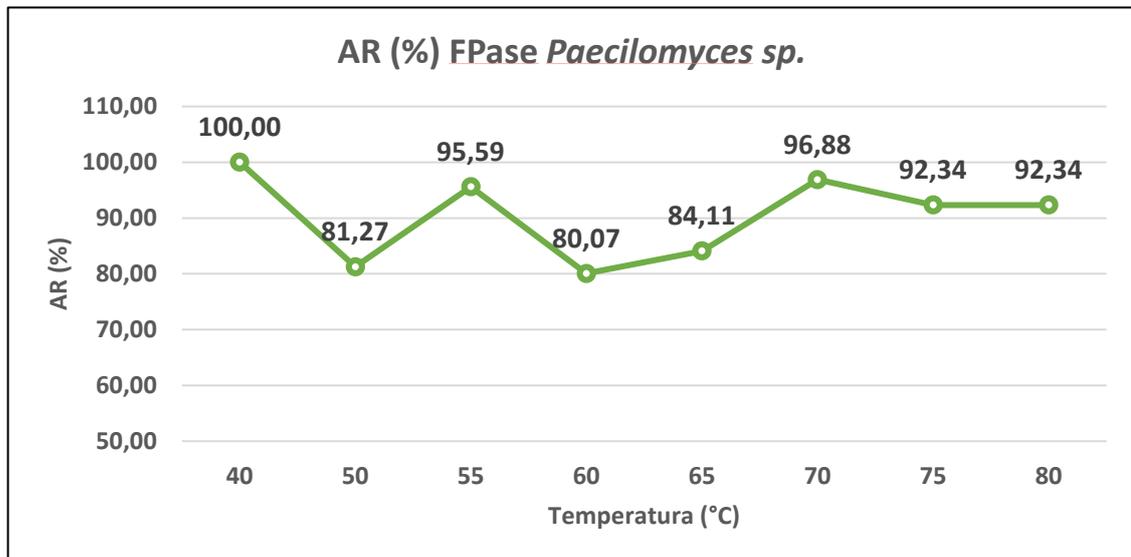
A FPase de *Paecilomyces* sp. (Figura 39) também apresentou uma estabilidade acima de 80%, sendo que na temperatura de 80°C ela possui uma atividade residual de 92,34%, mostrando que a enzima tem capacidade de atuação em temperaturas extremas.

Figura 38 – Atividade residual das celulases totais de *Aspergillus sp.* frente à avaliação de temperatura ótima.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 39 – Atividade residual das celulases totais de *Paecilomyces sp.* frente à avaliação de temperatura ótima.



Fonte: Autor, 2018.

Quando comparado com os dados da literatura (Tabela 7), verifica-se que a FPase de *Paecilomyces sp.* possui uma temperatura ótima de atuação bem abaixo das descritas por Gama (2016) e Ang et al. (2013), 55 e 60°C, respectivamente.

Tabela 7 – Comparação de temperatura ótima para atividade celulolítica total com os dados da literatura

Referência	Enzima	M.O.	Cultivo	Temperatura ótima
Autor	FPase	<i>Aspergillus sp.</i>	FES + casca de coco verde	65°C
Autor	FPase	<i>Paecilomyces sp.</i>	FES + casca de coco verde	40°C
Gama, 2016	FPase	<i>Streptomyces thermocerradoensis</i> I3	FSS + farelo de trigo	55°C
Ang et al. (2013)	FPase	<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	FSS	60°C

Fonte: Autor, 2018.

5.2.7 Influência da temperatura na atividade enzimática endoglucanase

Na CMCase de *Aspergillus sp.* (Figura 40), verifica-se uma temperatura ótima de atuação bem definida, em 55°C com uma atividade de 68,23 U/g. Podemos inferir que a temperatura otimizou a atividade da enzima, pois em condições normais de cultivo a enzima apresentou atividade de 24,46 U/g, sendo esse valor considerado mais de 270% inferior à obtida com a temperatura ótima.

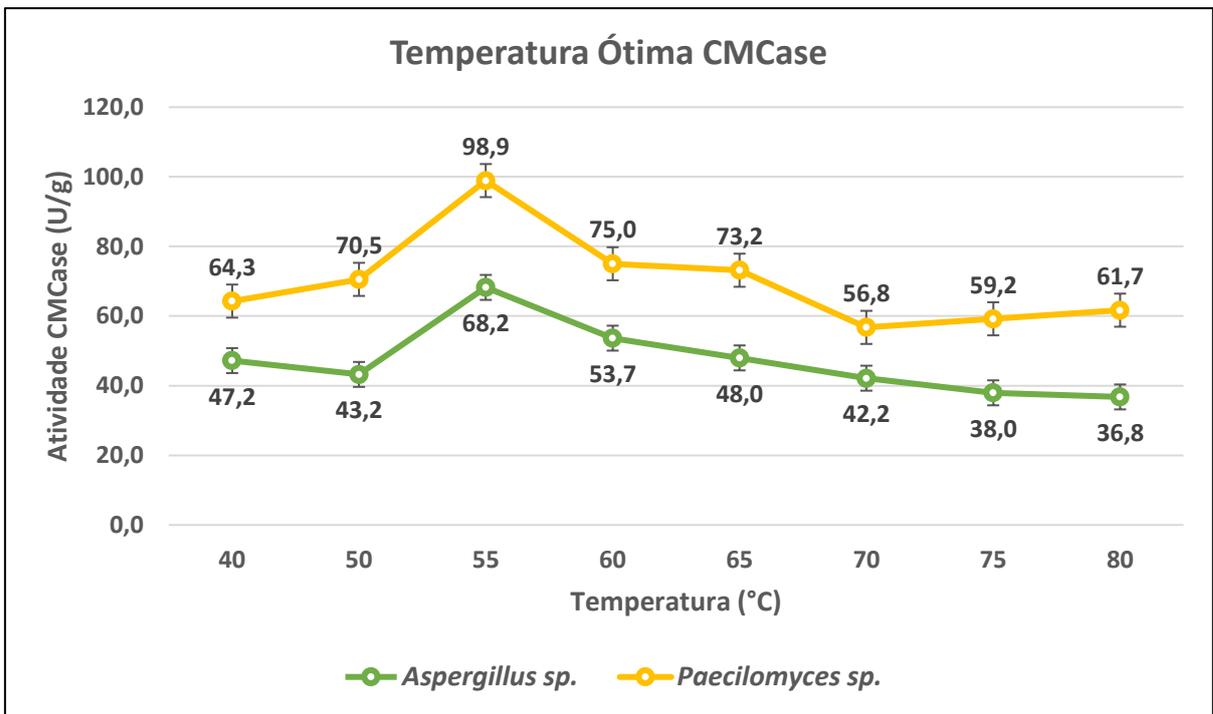
A CMCase de *Paecilomyces sp.* mostrou o mesmo comportamento da CMCase de *Aspergillus sp.*, porém com uma atividade muito maior, chegando a 98,92 U/g.

Mesmo em condições extremas, verifica-se que a CMCase de *Aspergillus sp.* (Figura 41) se mantém com atividade residual acima de 50% na temperatura de 80°C, fato que demonstra a estabilidade da enzima produzida.

Já a atividade residual da CMCase, oriunda de *Paecilomyces sp.* (Figura 42) se mostra levemente mais ativa em temperaturas mais extremas, com atividade residual sempre superior a 57%.

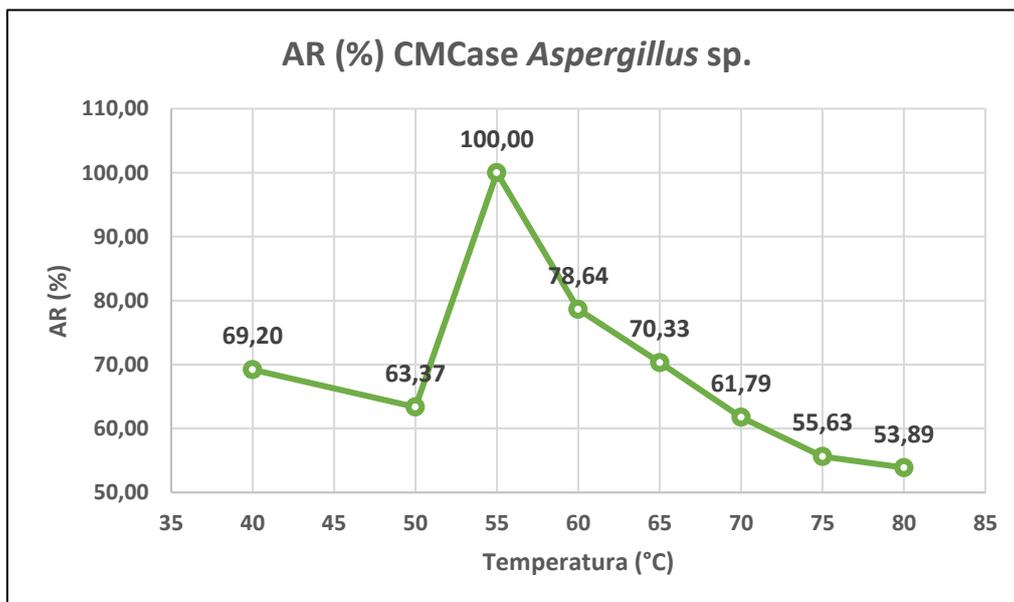
Em comparação com a literatura (Tabela 8) verifica-se que a temperatura ótima aferida está dentro dos padrões de CMCase, à exceção da enzima testada por SILVA et al., (2005) oriunda do *Thermoascus aurantiacus*, que teve a temperatura ótima entre 75 e 85°C.

Figura 40 – Avaliação da temperatura ótima para atividade da endoglucanase de *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp.



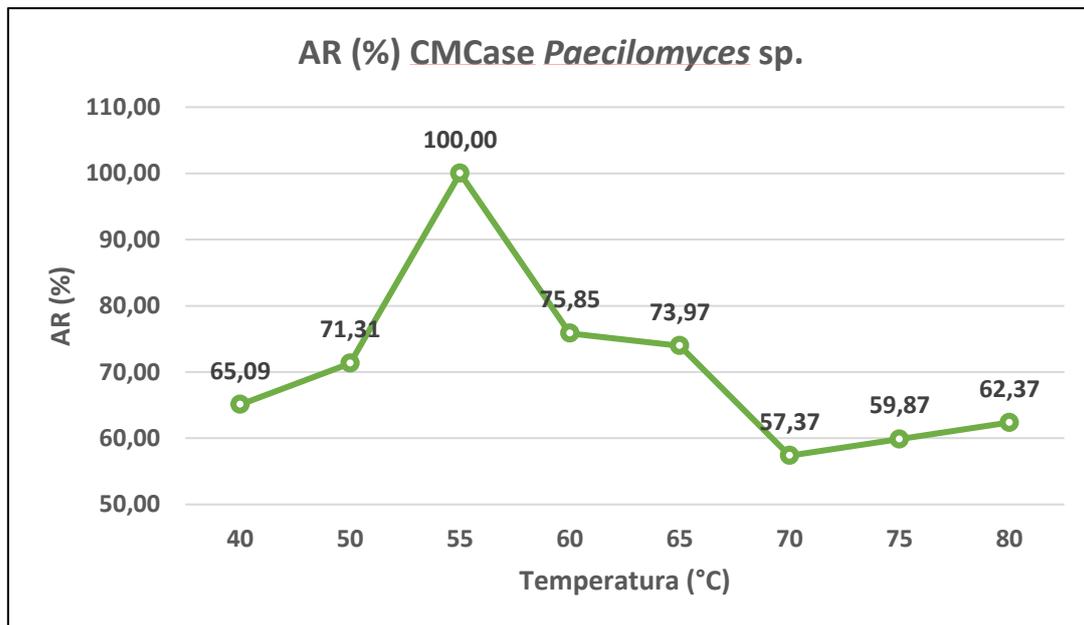
Fonte: Autor, 2018.

Figura 41 – Atividade residual da endoglucanase de *Aspergillus* sp. frente à avaliação de temperatura ótima.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 42 – Atividade residual da endoglucanase de *Paecilomyces* sp. frente à avaliação de temperatura ótima.



Fonte: Autor, 2018.

Tabela 8 – Comparação de temperatura ótima para atividade endoglucanase com os dados da literatura

Referência	Enzima	M.O.	Cultivo	Temperatura ótima
Autor	CMCase	<i>Aspergillus</i> sp.	FES + casca de coco verde	55°C
Autor	CMCase	<i>Paecilomyces</i> sp.	FES+ casca de coco verde	55°C
SILVA et al., 2005	CMCase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	FSS + farelo de trigo	75°C – 85°C
AHMED et al., 2016	CMCase	<i>Trichoderma harzianum</i>	FSS	50°C
Gama, 2016	CMCase	<i>Streptomyces thermocerradoensis</i> I3	FSS + farelo de trigo	55°C

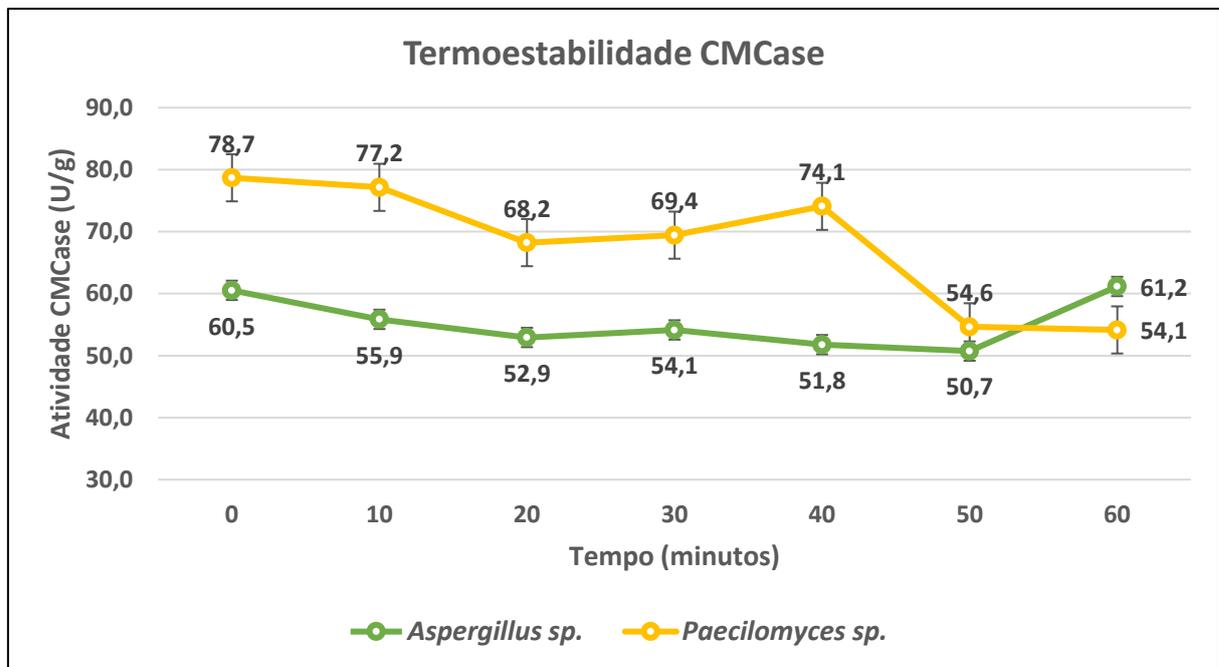
Fonte: Autor, 2018.

5.2.8 Avaliação da termoestabilidade

Em relação à termoestabilidade, não foram realizados experimentos com as FPases por motivos já citados. Diante disso, verifica-se que a CMCase de *Aspergillus* sp. (Figura 43) se mostrou estável diante da exposição prolongada à temperatura ótima, mantendo uma atividade praticamente constante.

Já a CMCase oriunda de *Paecilomyces* sp. não se mostrou tão estável quanto a de *Aspergillus* sp., mas mesmo assim manteve uma atividade constante até 40 minutos de exposição, diminuindo em seguida, mas se mantendo constante pelos 20 minutos restantes.

Figura 43 – Termoestabilidade de endoglucanase de *Aspergillus* sp. e de *Paecilomyces* sp.



Fonte: Autor, 2018.

6 CONCLUSÕES

Tanto o *Aspergillus* sp. quanto o *Paecilomyces* sp. adaptaram-se bem ao substrato, mesmo este não possuindo suplementação nutricional externa. Houve alta produção enzimática de celulases, o que demonstra a boa capacidade de adaptação dos fungos ao novo substrato.

Com relação à fibra de coco verde, esta mostrou-se um potencial indutor de produção de enzimas celulolíticas, devido à alta concentração de celulose na fibra.

As condições ótimas de atuação das CMCase e das celulases totais foram determinadas quanto a pH e temperatura, fato que contribui para ser ponto de partida para próximos trabalhos otimizarem o processo.

7 PERSPECTIVAS

Como forma de otimizar o presente trabalho, ficam como perspectivas de experimentos:

- Avaliar a adaptação e conseguinte produção enzimática de outros microrganismos à casca do coco verde como meio de cultura
- Avaliar a produção enzimática, tanto de celulases quanto de xilanases e pectinases, pela fermentação em estado sólido utilizando a casca do coco verde acrescida de aditivos nutricionais, que podem ser soluções nutrientes ou outros resíduos agroindustriais;
- Determinar a atividade enzimática específica de cada enzima constituinte das celulases totais;
- Purificar as enzimas produzidas utilizando métodos cromatográficos para que dessa forma possa-se determinar a atividade enzimática da endoglucanase e das celulases totais de forma mais precisa;
- Avaliar a termoestabilidade das enzimas por um período maior.

8 REFERÊNCIAS

AGBOR, V. B. CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. 29:675–685, 2011.

ALCHETRON. *Paecilomyces*. Disponível em: < <https://alchetron.com/Paecilomyces>> Acesso em: 31 de outubro de 2018.

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos, 1163p. Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo: Brazil, 1998.

ANG SK, SHAZA EM, ADIBAH Y, SURAINI AA, MADIHAH MS. Production of cellulases and xylanases by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry*. v. 9, p. 1293-1302, 2013.

ARAGÃO, W.M.; CRUZ, E.M. de O.; HELVÉCIO, J.S. Caracterização morfológica do fruto e química da água de coco em cultivares de coqueiro anão. EMBRAPA. Aracaju. 2002.

ASSIS, J. S. de; RESENDE, J. M.; SILVA, F. O.; SANTOS, C. R.; NUNES, F. Técnicas para colheita e pós-colheita do coco verde. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 6 p. Comunicado eletrônico, 2000.

BARBOSA, A. L. dos S. Avaliação de um sistema de colunas de leito fixo utilizando xisto retornado e pó da casca de coco para remoção de óleos e graxas e arsênio de efluente industrial. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BARRIOS-GONZÁLES, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*. v. 47, p. 175-185, 2012.

BARROSO, T. Fortaleza ganha primeira unidade de beneficiamento de casca de coco verde do Nordeste, 2005. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17985683/fortaleza-ganha-primeira-unidade-de-beneficiamento-de-casca-de-coco-verde-do-nordeste>> Acesso em: 17 de outubro de 2018.

BENASSI, A. C.; RUGGIERO, C.; MARTINS, A. B. G.; ALBERTO DA SILVA, J. A. Caracterização biométrica de frutos de coqueiro, *Cocos nucifera* L. variedade anã-verde, em diferentes estádios de desenvolvimento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. 2007, v. 29, n. 2, p. 302-307.

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

CEPEA. PIB Agro CEPEA-USP/CNA. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indices-de-exportacao-do-agronegocio.aspx>. Acesso em: 11 de agosto de 2018.

CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M. et al. (Ed.). Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 232 p. p. 37-60, 2009.

COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. Boletim Ceppa, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

COSTA, J.A.V. Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p. 203, 1996.

DE MELO, B. C. A. Produção de Celulases por Fermentação em Estado Sólido em Resíduo de Acerola (*Malpighia* sp.) Utilizando *Trichoderma reesei*. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

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

DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. ATLAS, R. M.; COHEN, G.; HERSHBERGER, C. L.; HU, W. S.; SHERMAN, D. H.; WILLSON, R. C.; WU, J. H. D. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Ed. 2, p.94-102, 1999.

DOELLE, H. W; MITCHELL, D. A; ROLZ, C. E. Solid substrate cultivation. Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

DOS SANTOS, G. J. Levantamento de *Aspergillus fumigatus* e *Stronglroides* sp. em jabutis mantidos em cativeiro no bosque municipal Dr. Belino Guimarães Brandão – Zoológico Municipal da cidade de Garça – SP. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. ISSN: 1679-7353, Garça – SP. Nº 26. 2011. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria16/artigos/art10pdf> Acesso em: 15 de outubro de 2018.

FAOSTAT. Coconut production in 2015. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E>. Acesso em: 10 de outubro de 2018.

FRANCHETTI, S.M.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. Quim. Nova, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FRUTAS DO BRASIL. Coco. Pós colheita. Editor técnico Wilson Menezes Aragão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 76 p, 2002.

GAMA, A. R. Produção e caracterização de celulases e xilanases produzidas por *Streptomyces thermocerradoensis* I3 em fermentação semi-sólida. 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

GERVÁSIO, D. K. L. Utilização do resíduo do coco verde para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2017.

GLAZER, A, NIKAIDO, H. Biomass, In: Microbial Biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. p. 430-455, 2008.

GONÇALVES, F. A., RUIZ, H. A., DOS SANTOS, E. S., TEIXEIRA, J. A., DE MACEDO, G. R. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuelethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. Fuel, v. 131, p. 66–76, 2014.

GONÇALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; NOGUEIRA, C. DA C.; SANTOS, E. S. DOS; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, G. R. Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. Industrial Crops and Products, v. 77, p. 1–12, 2015.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Animal feed Science and technology. v. 144 p. 1-22, 2008.

GSBTM. Gujarat Biodiversity Gene Bank, 2015. Disponível em: http://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=571760 Acesso em: 31 de outubro de 2018.

GUTIÉRREZ-CUENCA, M. A.; COSTA, W. V. Estatísticas da cocoicultura no Brasil - 1942/2001. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001.

HARRIES, H. C. The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. The Botanical Review, v. 44, n. 3, p. 265–319, jul. 1978.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, v.64, p.175-186, 2004.

IBGE, Séries estatísticas, 2018. Disponível em: <https://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=PA9&t=lavour-a-permanente-quantidade-produzida> Acesso em: 12 de outubro de 2018.

JOO, H.S.; CHANG, C.S.; KUMAR, C.G. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. Journal of Applied Microbiology, Oxford, UK, v.95, p.267-272, 2003.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochemistry, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KANZAWA, C. Y.; DITCHFIELD, C. Propriedades físico-químicas e microbiológicas da polpa de coco verde (*Cocos nucifera* Linn.). Anais. São Paulo: USP, 1 2AD.

KEARNS, K. S.; LOUDIS, B. Aspergilosis aviar. In: Recent Advances in Avian Infectious Diseases, Internacional Veterinary Information Service. Ithaca – NY 2003. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em 09 de outubro de 2018.

KIRK, P. M. et al. Dictionary of the Fungi. 10^a ed. Wallingford. CAB International, 2008.

KLEMAN-LEYER, K. M.; SILKA-AHO, M.; TEERI, T. T.; KIRK, T. K.; App. Environ. Microbiol. v. 62, p. 2883, 1996.

LIANG, Y., YUAN, Y., LIU, T., MAO, W., ZHENG, Y., LI, D. Identification and computational annotation of genes differentially expressed in pulp development of *Cocos nucifera* L. by suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology*, v. 14, n. 1, p. 205, 2014.

LIFE. *Aspergillus niger*. Disponível em: < <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/aspergillus-niger>>. Acesso em 31 de outubro de 2018.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; van ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 66, p. 506, 2002.

MARTINS, C. R.; JESUS Jr. L. A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional. Documentos 164. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju. 2011.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. D. Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.

MATTOŞ, A. L. A.; ROSA, M. de F.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de; MORAIS, J. P. S.; ARAÚJO JÚNIOR, C. P.de, Painéis elaborados com resíduos de casca de coco, 2011. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-depublicacoes/-/publicacao/917915/paineis-elaborados-com-residuos-da-casca-de-coco-verde>> Acesso em: 11 de agosto de 2018.

MITCHELL, D.A., LONSANE, B.K. Definition, characterization and economic evaluation. In: *Solid Substrate Cultivatlon*, Elsevier, London, 1992.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*. v.3, n.5, p.9-23, jan/jun, 2009.

MURRAY, N. P. Caracterización y evaluación agronómica del residuo de fibra de coco: un nuevo material para el cultivo en sustrato. Valencia, 2001. 228 p. Tesis (Doctorales) en Ciencias Químicas, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

MURRAY, P. R., Rossenthal, K. S. e Pfaller, M. A. *Microbiologia: Médica*, 5ª edição, Elsevier Editora Ltda, p. 770-773, 2006.

MURTHY, R.M.V.; KARANTH, N.G; RAO, R.K.S. Biochemical engineering aspects of solidstate fermentation. *Advances in Applied Microbiology*. v.38, p.99-149, 1993.

NUNES, M. U. C. Fibra e pó da casca do coco: produtos de grande importância para indústria e agricultura. In: ARAGÃO, W. M. *Coco. Pós-colheita*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 66 – 71, 2002.

OHLEER, J. G. *El cocotero: árbol de la vida*. Roma: FAO, 1986. 348 p. (Estudios FAO de Producción y Protección Vegetal, n. 57).

OJUMU T.V.; SOLOMON, B.O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S. K.; AMIGUN, B. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *African Journal of Biotechnology*. v. 2 p.150–152, 2003.

PALMA, M. B., Produção de Xilanases em *Thermoascus aurantiacus* Cultivo em Meio Sólido. 2003. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

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

PASSOS, E. E. M.; CARDOSO, B. T.; ARAGÃO, W. M. Qualidade do fruto de três cultivares de coqueiro. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009.

SPC, S. P. C. Coconut, South Pacific foods leaflet 8. South Pacific Commission, 1983.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Eletronic Journal of Biotechnology, v.1, n.3, 1998.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, Set. 1998.

Richardson, M. D. e Warnock, D. W. (2003). Fungal Infection Diagnosis and Management, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.

ROCHA, C.P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROSA, M. F. et al. Utilização da casca de coco como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa, 2001. 22 p. Documentos 52. Disponível em: http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2842.pdf. Acesso em: 11 de agosto de 2018.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH Family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. Progress in Biophysics and Molecular Biology. v. 89 p. 246–291, 2005.

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Studies in Mycology 6. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 116 pp, 1974.

SANTOS, J. J. A. Aproveitamento dos resíduos do coco será discutido em Fortaleza, 2003. Disponível em: <https://sustentando-profanselmo.blogspot.com/2013/08/aproveitamento-dos-residuos-do-coco.html>
Acesso em: 16 de outubro de 2018.

SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese (Doutorado) – Programa de Pósgraduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2007.

SENHORAS, E. M. Oportunidades da cadeia agroindustrial do coco verde: do coco nada se perde, tudo se desfruta. 2004. Portal Urutágua. Disponível em:

http://www.urutagua.uem.br/005/22eco_senhoras.html#_ftn/. Acesso em: 10 de outubro de 2018.

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S. S.; SONI, R.; SONI, S. K. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. Appl Biochem Biotechnol, 2016.

SHENEF, A. A., EI-TANASH, A.B.; ATIA, N. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. Research Journal of Microbiol. v. 3, p. 199- 211, 2010.

SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. Brazilian Journal of Microbiology. v. 36, p. 235-241, 2005.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 44, p. 13- 18, 2009.

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 celulasas. Enzyme and Microbial Technology. p. 541-549, 2010.

SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.

SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amilogucosidase por fermentação no estado sólido. 155 p. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SREY, B.; BOCHEM, H. P. Effect of endoglucanase and cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* on cellulose microfibril structure. FEMS Microbiol. v. 97 p. 113–118, 1992.

TAVARES, V. B. et al. 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, n. 6, p. 722 – 725, 1998.

VIJAYARAGHAVAN, P.; ARUN, A.; AL-DHABI, N. A.; VICENT, S. G. P.; ARASU, M. V.; CHOI, K. C. Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulose and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation. Biotechnology for Biofuels, v. 9, n.73, p. 1-13, 2016.

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

ZUÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; GONÇALVES, F. M. N.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Influência do Meio Nutricional na Produção de Celulasas em

Fermentação Semi-Sólida do Bagaço de Cana-de-açúcar por *Aspergillus niger*. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.