



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

EMMELY VITÓRIA DE SANTANA CABRAL

**UTILIZAÇÃO DO ENGAÇO DE UVA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
CELULOLÍTICAS E PECTINOLÍTICAS POR *Paecilomyces* sp. TP08**

JOÃO PESSOA

2020

EMMELY VITÓRIA DE SANTANA CABRAL

**UTILIZAÇÃO DO ENGAÇO DE UVA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
CELULOLÍTICAS E PECTINOLÍTICAS POR *Paecilomyces* sp. TP08**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Biotecnologia  
da Universidade Federal da Paraíba,  
como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Farias de  
Almeida.

JOÃO PESSOA

2020

Catálogo na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação

C117u Cabral, Emmely Vitoria de Santana.

UTILIZAÇÃO DO ENGAÇO DE UVA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
CELULOLÍTICAS E PECTINOLÍTICAS POR *Paecilomyces* sp.  
TP08 / Emmely Vitoria de Santana Cabral. - João Pessoa,  
2020.

54 f. : il.

Orientação: Profa Dra Andréa Farias de Almeida.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Engaço. 2. Resíduo Agroindustrial. 3. Fermentação em  
Estado Sólido. 4. Celulases. 5. Pectinases. I. Almeida,  
Profa Dra Andréa Farias de. II. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia



### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e nove dias do mês de julho de 2020, às 15:00h, em sessão pública realizada de forma remota, na Plataforma Google Meet, em atendimento à Portaria N°231/GR/REITORIA/UFPB, de 22 de julho de 2020 e a Resolução Consepe N° 13/2020, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) Professor(a) Dr(a). Andréa Farias de Almeida (DB/CBIOTEC/UFPB) e composta pelo(a)s avaliador(a)s: 1. Prof(a). Dr(a). Adna Cristina Barbosa de Sousa (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Prof(a). Dr(a). Sharline Florentino de Melo Santos (DEQ/CT/UFPB), o(a) discente Emmely Vitória de Santana Cabral, matrícula 11514081, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“UTILIZAÇÃO DO ENGAÇO DE UVA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E PECTINOLÍTICAS POR *Paecilomyces sp.TP08*”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **Aprovação** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a(ao) discente e demais presentes e eu, Andréa Farias de Almeida, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelo(a)s demais avaliador(a)s e pelo(a) discente.

Presidente Coorientador(a)

Avaliador(a) 1

Discente

Avaliador(a) 2

---

João Pessoa/PB, 29 de julho de 2020.

*Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o incentivo e investimento na minha educação desde muito cedo. E às crianças da minha família: Maria Loren, Ester, Arthur, Moisés Henrique e Mauro Roberto. Toda pesquisa científica realizada hoje, terá resultado na formação do mundo que estamos deixando para as futuras gerações.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por seu supremo amor e misericórdia infinita. À Virgem Maria, pela sua intercessão e cuidado.

Agradeço aos meus pais, Ednery e Armando por todo o amor e carinho com os quais me criaram, e por tudo e tanto que investiram em mim, sem medir esforços. Em especial ao meu pai, por sua habilidade de comunicação, sua paciência e disponibilidade, que foram peças fundamentais para realização desse trabalho.

Agradeço a toda minha família, por tanto amor e suporte desde sempre. Em especial a minha prima considerada irmã, Ana Karoline, por estar sempre ao meu lado e me entender tão bem.

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Farias de Almeida, pela oportunidade e confiança, por ter me acolhido em seu laboratório, por toda paciência, dedicação e carinho com os quais me orientou e foram de extrema importância para realização desse trabalho.

Agradeço as pessoas que foram peças chave num caminho interessante percorrido para realização desse trabalho: À Dra Marly e Rogério Beltrão, por terem me apresentado à vinicultura da Paraíba. Ao Sr. Silva, por toda simpatia e ajuda. Ao Sr. Francisco Guerra e Lúcia Guerra por tanto carinho, acolhimento, empenho em ajudar, e à amizade nascida desse encontro. E ao Sr. Pedro Coutinho, Rosa Coutinho e Mariano Cavalcanti por toda a disponibilidade e acolhida! Guardo um carinho especial e muita gratidão a essa família.

Agradeço a todos os professores do Centro de Biotecnologia, em especial às Professoras Adna, Andréa, Elisângela e Sildivane por todo carinho e compreensão ao longo da minha jornada na graduação. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Paulino, por ter me inspirado em muitas ocasiões, não me deixando desistir de meus sonhos.

Agradeço a todos os meus colegas da Turma Linkage em especial aos amigos: Luana, Amanda, Rayanelle, Rodrigo, Pedro, Anchieta, Guilherme, Natanael, Ana Beatriz, Hércules, Matias e Thales. E a todos os outros amigos que a graduação me presenteou, em especial: Thaísy, Clara, Bianca, Mickael, John Allef e Jacielle.

Agradeço aos meus colegas do LEBp: César, Karla, Édson, Eduarda, Gustavo e Júlio, por toda ajuda e conhecimento compartilhado.

Agradeço a minha banca avaliadora, Professoras Adna e Sharline, pela contribuição e disponibilidade na avaliação e enriquecimento desse trabalho.

*“... este mundo que é caótico e nos traz mudanças que ninguém poderia ter previsto. [...] é preciso estar preparado para as tumultuosas e intermináveis ondas de transformação.” – Elizabeth Gilbert.*

## RESUMO

Com a expansão da vitivinicultura no Brasil, a geração de resíduos por esse setor também tem apresentado crescimento. Nas últimas décadas, o tratamento e reutilização desses subprodutos estão recebendo cada vez mais atenção, seja na perspectiva do aproveitamento rentável ou de preocupações ambientais. O engaço é o primeiro subproduto do processamento da uva, sendo obtido no início da cadeia produtiva na etapa de desengace. Esses resíduos atualmente utilizados como adubo orgânico, possuem composição lignocelulósica com potencial para uso em bioprocessos na geração de bioprodutos de valor agregado, a exemplo das enzimas microbianas de aplicação industrial. Nesse contexto, buscou-se empregar o engaço como substrato alternativo no cultivo em estado sólido pela ação do isolado *Paecilomyces* sp.TP08 para produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas. Para isso, o engaço foi preparado passando por secagem e moagem e caracterizado quanto aos teores de umidade, açúcares redutores totais, pH e porosidade. Em seguida sete frascos, contendo 5g de substrato cada, foram inoculados com uma suspensão de conídios numa concentração de  $1 \times 10^7$  conídios por grama de substrato, e deixados a temperatura ambiente por 120h. Foi realizada uma retirada da amostra a cada 24h para obtenção do extrato bruto enzimático através de filtração. Alíquotas desse extrato bruto foram utilizadas para determinação da atividade enzimática, sendo avaliadas as atividades de celulasas totais e pectinases. Para verificar se houve aumento proteico, foi analisado pelo método de Bradford a quantidade de proteínas totais durante o processo enzimático. Diante dos resultados, foi verificada uma maior atividade de pectinase, com 14,9U/g às 48h. Para as celulasas totais, a maior atividade também foi marcada em 48h, com 0,25U/g, assim como para as endoglucanases com 1,0U/g. Além disso, observou-se um aumento gradual da quantidade de proteínas totais durante o processo, promovendo enriquecimento proteico do engaço de uva. Assim, com os resultados obtidos é possível observar um potencial de produção enzimática pelo emprego do engaço de uva como substrato do cultivo em estado sólido como também a importância de mais estudos acerca das variáveis desse processo.

**Palavras-chave:** Engaço. Resíduo agroindustrial. Fermentação em estado sólido. Celulasas. Pectinases.

## ABSTRACT

With the expansion of viticulture in Brazil, the generation of waste by this sector has also shown growth. In the last few decades, the treatment and reuse of these by-products are receiving more and more attention, whether from the perspective of profitable use or environmental concerns. Stalks are the first by-product of grape processing, obtained at the beginning of the production chain in the destemming stage. These residues currently used as organic fertilizer, have lignocellulosic composition with potential for use in bioprocesses in the generation of added value bioproducts, such as microbial enzymes for industrial application. In this context, we tried to use stalks as an alternative substrate for solid-state cultivation by the action of the isolated *Paecilomyces sp.* TP08 for the production of cellulolytic and pectinolytic enzymes. So, the stalks were prepared by going through drying and grinding and characterized in terms of moisture content, total reducing sugars, pH and porosity. Then seven flasks, containing 5g of substrate each, were inoculated with a suspension of conidia at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia per gram of substrate, and left at room temperature for 120h. A sample was taken every 24 hours to obtain the crude enzymatic extract through filtration. Aliquots of this crude extract were used to determine enzyme activity, and the activities of total cellulases and pectinases were evaluated. To check if there was a protein increase, the amount of total proteins during the enzymatic process was analyzed by the Bradford method. In view of the results, a greater activity of pectinase was verified, with 14.9 U/g at 48h. For total cellulases, the highest activity was also marked in 48h, with 0.25 U/g, as well as for endoglucanases with 1.0 U /g. In addition, there was a gradual increase in the amount of total proteins during the process, promoting protein enrichment of grape stalks. Thus, with the results obtained, it is possible to observe a potential for enzymatic production by using grape stalks as a substrate for solid state cultivation, as well as the importance of further studies on the variables of this process.

**Keywords:** Grape stalks. Agroindustrial residue. Solid state fermentation. Cellulases. Pectinases.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma simples da produção de vinhos, indicando resíduos gerados .....	14
<b>Figura 2</b> – Principais resíduos da indústria vitivinícola. ....	15
<b>Figura 3</b> – Estrutura da parede celular vegetal representando o arranjo das moléculas de pectina e celulose.....	18
<b>Figura 4</b> – Localização do local de coleta.....	22
<b>Figura 5</b> – Engaço lavado.....	23
<b>Figura 6</b> – Determinação da densidade real.....	25
<b>Figura 7</b> – Fungo <i>Paecilomyces</i> sp. cultivado em meio sólido Ágar-Dextrose. ....	27
<b>Figura 8</b> – Cultivos para produção enzimática.....	28
<b>Figura 9</b> – Filtração para obtenção de extrato bruto enzimático. ....	29
<b>Figura 10</b> – Preparo para reação enzimática de determinação de celulases totais. ....	31
<b>Figura 11</b> – Tubos contendo a mistura reacional e DNS, na análise de pectinases. ....	33
<b>Figura 12</b> – Tubos incubados a temperatura ambiente para determinação de proteínas solúveis totais. ....	34
<b>Figura 13</b> – Aspecto visual do substrato ao longo do processo fermentativo. ....	36
<b>Figura 14</b> – Atividade de celulases totais durante o processo de produção enzimática por <i>Paecilomyces</i> sp. TP08.....	37
<b>Figura 15</b> – Atividade endoglucanase durante o processo de produção enzimática por <i>Paecilomyces</i> sp. TP08.....	39
<b>Figura 16</b> – Atividade pectinolítica durante o processo de produção enzimática por <i>Paecilomyces</i> sp. TP08.....	41
<b>Figura 17</b> – Proteínas solúveis totais durante o processo de produção enzimática por <i>Paecilomyces</i> sp TP08.....	42
<b>Figura 18</b> – Curva de crescimento microbiano ao longo do processo de fermentação em estado sólido. ....	43

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1 Vitivinicultura no mundo e no Brasil .....	12
2.2 Resíduos agroindustriais – Engaço de Uva .....	13
2.3 Enzimas hidrolíticas de origem microbiana.....	16
2.3.1 Celulases .....	16
2.3.2 Pectinases .....	17
2.4 Fermentação em Estado Sólido.....	18
2.4.1 Fatores que influenciam o processo .....	19
2.5 <i>Paecilomyces</i> sp. ....	20
3 OBJETIVO.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Coleta e preparo do substrato .....	22
4.2 Caracterização do resíduo do engaço de uva .....	23
4.2.1 Percentual de umidade .....	23
4.2.2 pH.....	24
4.2.3 Densidade aparente .....	24
4.2.4 Densidade real .....	24
4.2.5 Porosidade do leito.....	25
4.2.6 Teor de açúcares redutores totais.....	26
4.3 Processo de produção enzimática .....	26
4.3.1 Microrganismo e inóculo .....	26
4.3.2 Cultivo para produção enzimática .....	28

4.4 Extração e caracterização do complexo enzimático .....	29
4.4.1 Obtenção do extrato enzimático bruto.....	29
4.4.2 Análises do extrato enzimático bruto.....	30
4.4.2.1 Determinação da atividade de celulases totais (FPase) .....	30
4.4.2.2 Determinação da atividade de endoglucanases (CMCase).....	31
4.4.2.3 Determinação da atividade de pectinases .....	32
4.4.2.4 Proteínas solúveis totais.....	34
4.5 Avaliação do crescimento microbiano.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Caracterização do resíduo de engaço de uva .....	35
5.2 Processo de produção enzimática .....	36
5.3 Atividade de celulases totais (FPase).....	37
5.4 Atividade endoglucanases (CMCase).....	39
5.5 Atividade Pectinolítica.....	40
5.6 Proteínas solúveis totais do extrato enzimático .....	41
5.7 Avaliação do crescimento microbiano.....	43
6 CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos gera grande quantidade de resíduos que representam perdas de materiais de grande valor bioquímico, além de acarretar problemas ambientais, logísticos e econômicos, se não gerenciados corretamente (MATEO, 2015).

A produção de vinhos, historicamente concentrada nos países Europeus, sofreu mudanças importantes com o aparecimento de novos pólos vinícolas nas últimas décadas, principalmente quanto ao aumento da competitividade do setor e mudanças na demanda, como também um novo olhar sobre a produção, que antes era baseada na tradição de cada região, passando a ter em vista agora as tecnologias que podem ser aplicadas (BONATO, 2020). E dentre essas tecnologias, estão àquelas voltadas para o reaproveitamento de resíduos gerados nas indústrias. O processamento da uva, seja para produção de vinhos, sucos ou polpas gera uma grande quantidade de subprodutos, sendo o engaço o primeiro a ser gerado e que se encontra em maior quantidade (CUNHA, 2018).

Nesse contexto, vários bioprocessos têm sido empregados utilizando esses resíduos como substratos na produção de diversos bioprodutos de valor agregado, como por exemplo, enzimas microbianas.

As enzimas representam um dos produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, sendo largamente utilizadas no processamento de alimentos até produção de produtos de limpeza, desde a indústria têxtil até farmacêutica (SEJAS, 2002). Dentre os bioprocessos empregados na produção de enzimas e no reaproveitamento de resíduos agroindustriais, os processos em estado sólido têm destaque. Estes envolvem o emprego de um substrato sólido para o crescimento de fungos, em geral, filamentosos (SANTOS, 2018).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção enzimática de um isolado de *Paecilomyces* sp.TP08 utilizando o engaço de uva como substrato em cultivo em estado sólido.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Vitivinicultura no mundo e no Brasil

No ramo da vitivinicultura, as regiões produtoras de vinho são segmentadas a partir de denominações dadas pelas épocas de consolidação de suas produções no mercado. O chamado “velho mundo” é uma região antiga de produção implantada a partir da expansão do império romano, implicando em séculos de tradição e cultura na produção de vinhos. O “novo mundo”, por sua vez, é composto por países de origem mais recente, por volta do século XIX, onde colônias britânicas e espanholas introduziram certas tecnologias de vinificação em países como Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos e Chile (LI et al., 2018). Publicada num relatório de 2009 do CCEF (Comitê National Des Conseillers Du Commerce Extérieur De La France), a denominação mais recente chamada de “novo novo mundo” compreende países que estão em desenvolvimento gradual da sua produção, como China, Brasil e Índia.

Com isso, pode-se observar um crescimento da produção de vinho em regiões climáticas não tradicionais com a exploração de regiões tropicais, a exemplo da Índia e do Vale do Rio São Francisco no Brasil (CCEF, 2009; TONIETTO, 2011). Assim, a produção de vinhos antes concentrada nos países Europeus, sofreu mudanças importantes com o aparecimento de novos pólos vinícolas, principalmente quanto ao aumento da competitividade do setor e mudanças na demanda, como também um novo olhar sobre a produção, que antes era baseada na tradição de cada região, passando a ter em vista agora as tecnologias que podem ser aplicadas (BONATO, 2020).

Após algumas décadas da chegada da produção vitivinícola no país, o Brasil obteve o reconhecimento dos seus produtos e qualidade no mercado internacional. Em 2018, o Brasil produziu 3,4 milhões de hectolitros de vinho, ocupando a décima quinta posição como produtor de vinhos a nível mundial (OIV, 2018). Neste mesmo ano, a produção de uvas no país chegou a 1.592.242 toneladas. Sendo 58,91% provenientes da região sul e 31,52% do nordeste, que representam, respectivamente 73,35% e 14,87% da área de videiras total. A maior produtividade observada nas áreas da região nordeste deve-se ao seu clima favorável à

possibilidade de se ter até 2,5 safras ao ano. Ainda no ano de 2018, das uvas plantadas, 51,39% foram destinados para o processamento. No Rio Grande do Sul, cerca de 44,65% dos produtos processados foram vinhos de mesa, espumantes e finos e cerca de 55,40% foram sucos de uva (MELLO, 2019).

Estima-se que existam no Brasil 1,1mil vinícolas, onde 90% são empresas de pequeno e médio porte. E este mercado vem sofrendo algumas alterações nos últimos anos, relacionadas à adoção de práticas e processos sustentáveis, expansão para novas regiões, aplicação de novas tecnologias e diversificação da produção (IBRAVIN, 2018; MELLO, 2019).

## 2.2 Resíduos agroindustriais – Engaço de Uva

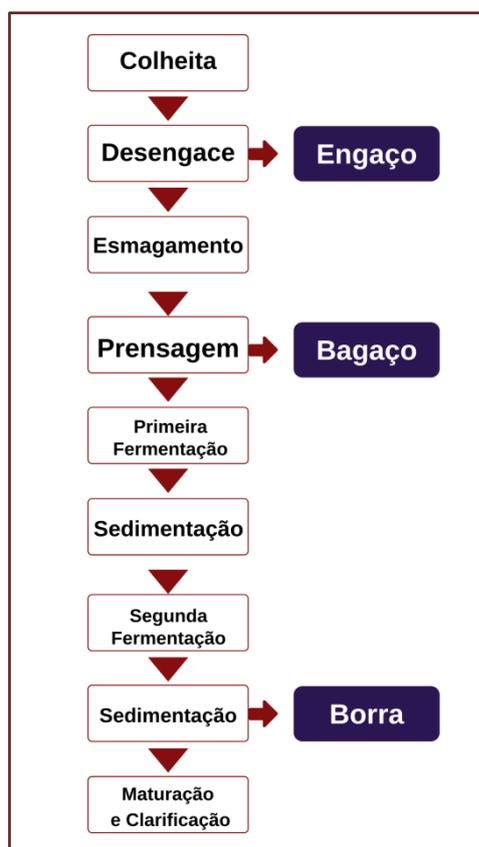
Os resíduos agroindustriais são gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas. A agroindústria gera quantidades significativas de resíduos, normalmente sem aplicação direta e com pouco ou nenhum valor econômico atribuído e que, em geral, não oferecem riscos, mas que seu acúmulo e má destinação podem gerar problemas ambientais. Estes resíduos, porém, possuem alto conteúdo de matéria orgânica, tornando-os potenciais fontes de nutrientes alternativas empregadas em bioprocessos. Na composição desses resíduos são comumente encontrados compostos como açúcares, fibras, proteínas e minerais (PING, 2001; SANTOS, 2018).

Sua composição rica em açúcares fermentáveis e nutrientes permite que esses resíduos sejam utilizados como substratos para microrganismos que podem convertê-los em vários produtos de importância industrial, como enzimas. A substituição dos substratos convencionais e não renováveis empregados nos bioprocessos por resíduos agroindustriais além de promover uma redução nos custos de produção dos bioprodutos contribui para redução do acúmulo desses materiais no ambiente, garantindo também que esse substrato alternativo mantenha um rendimento proporcional ao dos substratos sintéticos (SANTOS, 2018). Assim, é possível afirmar que a utilização eficiente dos resíduos da agroindústria é uma importante prática, não apenas para minimizar o impacto ambiental, mas também para uma maior geração de lucros.

Dentre os diversos resíduos gerados pela agroindústria brasileira, destacam-se os subprodutos das vinícolas (GONZÁLES-PARAMÁS, 2004). Juntamente com a expansão da vitivinicultura, a geração de resíduos pelo setor também tem crescido, pois cerca de 50% das uvas plantadas no país são destinadas ao processamento, sendo o vinho o principal produto (BARCIA, 2014).

Durante a elaboração de sucos e vinhos, ocorre a geração de resíduos, inerentes ao processo (Figura 1). As vinícolas estão entre as indústrias que mais sofrem com o acúmulo de resíduos orgânicos gerados, e entre as que estão em busca de novas tecnologias para agregar valor aos seus resíduos, e assim diminuir o impacto ambiental (CATANEO, 2008). Os principais resíduos da indústria vitivinícola são o bagaço, o engaço, e a borra (Figura 2).

**Figura 1** – Fluxograma simples da produção de vinhos, indicando resíduos gerados.



Fonte: CUNHA (2018), adaptado.

**Figura 2** – Principais resíduos da indústria vitivinícola.



(A) Engaçço de uva; (B) Bagaço de uva; (C) Borra;

Fonte: voltface-winesofchange.blogs.sapo.pt, 2013; g1.globo.com, 2017; REIS, 2016. Adaptado.

O primeiro subproduto gerado durante a vinificação é o engaço, que é o esqueleto do cacho de uvas e consiste em tecidos lignificados (Figura 2A). O engaço da uva é matéria-prima interessante para processos de bioconversão industrial, uma vez que possui um alto teor de biomoléculas como lignina (17-18%), celulose (30-31%) e hemicelulose (21%). Esse subproduto consiste em cerca de 4,5% da massa total da vindima (CUNHA, 2018; PING 2001).

O engaço é obtido no início da vinificação, na etapa de desengace, que consiste na separação das bagas (uvas) e ráquis (engaço) para evitar um efeito negativo nas características sensoriais do produto final, uma vez que em sua composição há compostos como as proantocianinas, taninos que conferem uma adstringência indesejada (PING, 2001).

Atualmente, o resíduo do engaço é usado basicamente como biofertilizante, tendo em vista sua composição rica em minerais. Porém, sua lenta

biodegradabilidade e a possível alteração na composição química do solo, fazem com que este seja um biofertilizante de baixa qualidade. Em alguns casos, é usado também como alimento animal, mas não é recomendado para este fim por possuir baixo valor nutritivo (PORTINHO, 2016).

### 2.3 Enzimas hidrolíticas de origem microbiana

Enzimas são proteínas catalisadoras de reações bioquímicas que atuam no metabolismo, e possuem um importante papel na degradação de matéria orgânica para obtenção de novos produtos, sendo uma de suas características mais notáveis sua alta especificidade pelo substrato das reações bioquímicas que irá promover (LEHNINGER et al, 1995).

Inúmeros processos industriais utilizam a biotecnologia das enzimas em suas etapas, sendo as hidrolíticas as mais utilizadas nesses processos, aplicadas na degradação de diversas substâncias químicas (OLIVEIRA, 2006). Com isso, os processos de produção dessas enzimas de origem microbiana são de alto interesse, principalmente aqueles em que há a produção a partir de resíduos agroindustriais. As vantagens dessa produção pela reutilização de subprodutos vão desde o baixo custo, à minimização dos impactos ambientais relacionados ao acúmulo ou má direcionamento desses resíduos (GERVÁSIO, 2017).

#### 2.3.1 Celulases

As celulases pertencem à classe das hidrolases, enzimas que atuam sobre materiais celulósicos promovendo sua hidrólise liberando açúcares dentre os quais, a glicose, que desperta grande interesse industrial por suas possibilidades de conversão em produtos de valor agregado (GALINDO, 2016).

Essas enzimas são produzidas por muitos microrganismos, dentre eles os fungos, e são classificadas de acordo com os seus mecanismos de ação em endoglucanases ou exoglucanases. Sendo as endoglucanases enzimas que rompem a cadeia da celulose internamente de forma aleatória, gerando novas extremidades e liberando glicose, celobiose e celodextrinas. E as exoglucanases

enzimas que agem na redução das extremidades da cadeia de celulose (GÉRVÁSIO, 2017).

Possuem várias aplicações industriais, como a utilização na indústria têxtil para lavagem de tecidos, na indústria de processamento de alimentos propiciando facilidade aos processos de clarificação e redução da viscosidade de néctares, sucos, vinhos, ou também facilitando processos de extração na indústria farmacêutica (ANDRADE, 2016).

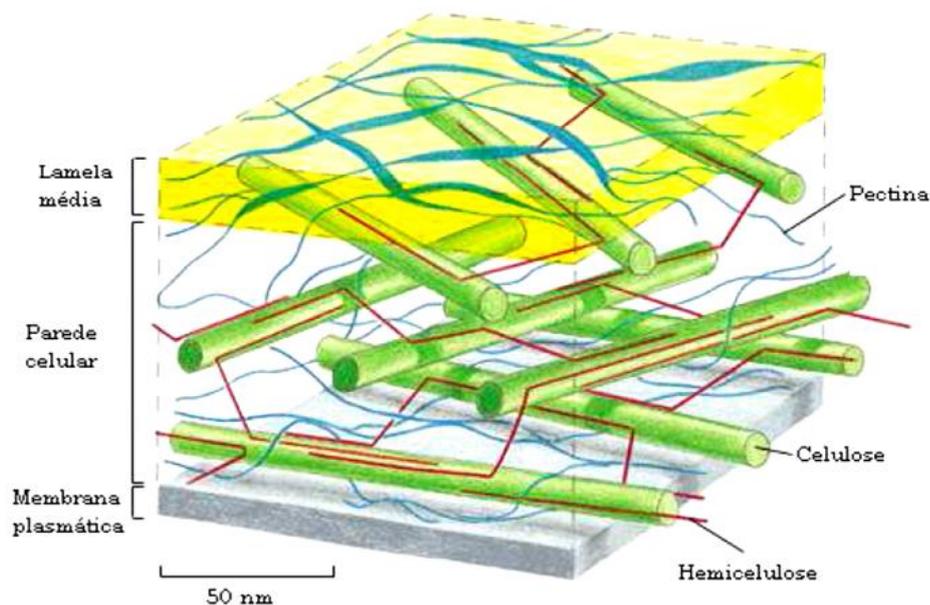
### 2.3.2 Pectinases

As pectinases constituem um grupo de enzimas responsáveis pela catálise da degradação de carboidratos poliméricos componentes da parede celular e da lamela média de vegetais, chamados de substâncias pécticas (Figura 3). Estas enzimas são produzidas pelos mais diversos organismos, desde fungos e bactérias até protozoários e plantas (MUKESH KUMAR et al., 2012).

As enzimas pectinolíticas são classificadas em três grandes grupos, baseados no seu modo atuação na molécula péctica, são eles: as protopectinases, as esterases e as despolimerases. Estas últimas atuam na catálise da hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha(1,4)$  entre os monômeros de ácido d-galacturônico das substâncias pécticas (JAYANI, 2005).

A pectinase foi uma das primeiras enzimas a ser utilizada comercialmente, possuindo variadas aplicações na indústria, dentre elas a diminuição da viscosidade de produtos aplicada nos mais diversos ramos industriais. Estas enzimas têm grande destaque na indústria vinícola, onde são utilizadas no esmagamento das uvas, objetivando a melhora na extração do suco e redução do tempo de clarificação (ANDRADE, 2016).

**Figura 3** – Estrutura da parede celular vegetal representando o arranjo das moléculas de pectina e celulose.



Fonte: MARTINS (2016)

## 2.4 Fermentação em Estado Sólido

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é definida como um processo fermentativo onde os microrganismos crescem se desenvolvem sobre substratos sólidos, com quase nenhuma ou nenhuma água livre, sendo a umidade necessária para o crescimento microbiano encontrada absorvida ou complexada no meio (RAIMBAULT, 1998). A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes fontes de energia e formas de suporte para o desenvolvimento do microrganismo (PINTO, 2005). A FES pode dar origem a vários bioprodutos, sendo as enzimas um dos seus principais representantes.

Existem algumas vantagens e limitações da FES em comparação a outros processos fermentativos, como a fermentação submersa (FS). A FES em vantagem em relação à FS possui um menor risco de contaminação devido à baixa umidade apresentada no sistema, viabilidade de utilização de resíduos agroindustriais, semelhança das condições naturais de crescimento do microrganismo, principalmente para fungos, e maior concentração de produto de interesse num

espaço reduzido, além de que as etapas de purificação deste são facilitadas (GERVÁSIO, 2017).

Porém, frente às vantagens, a FES apresenta algumas limitações como a restrição de microrganismos capazes de se desenvolver em ambientes de baixa umidade, dificuldade de controle dos parâmetros do processo como pH e temperatura, difícil homogeneização do meio de cultivo em geral altamente heterogêneo, dificultando o controle do crescimento microbiano, e a comumente dificuldade de acesso completo do microrganismo aos nutrientes do substrato (SANTOS, 2007; ANDRADE, 2016).

#### 2.4.1 Fatores que influenciam o processo

A escolha do substrato, a seleção do microrganismo e o manejo dos parâmetros do processo são etapas necessárias da FES. Os quais podem afetar no desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, o sucesso do processo (GERVÁSIO, 2017).

A água possui grande relevância nas condições que influenciam a FES, através dos parâmetros da umidade e da atividade de água. Ter o nível de umidade ideal para o crescimento do microrganismo influencia na produtividade do processo uma vez que regula a disponibilidade de água no meio e define a dilatação do substrato, que irá permitir a penetração do fúngico. A atividade de água ( $a_w$ ), responsável pelo fornecimento de água não ligada ao substrato disponível ao microrganismo, deve ser assegurada a um nível mínimo para que o microrganismo realize suas atividades metabólicas (GERVÁSIO, 2017).

Os substratos são compostos naturais ou sintéticos que podem ser usados na FES, e são normalmente insolúveis em água, mas com capacidade de absorver água que poderá ser aproveitada pelo microrganismo (SANTOS, 2007). Tornou-se bastante comum o emprego de subprodutos ou resíduos agroindustriais como substratos para a FES. São recursos naturais renováveis, baratos e produzidos em grande quantidade, se tornando algumas vezes problemas ambientais. A estrutura desses materiais, em geral, tem como seus principais componentes celulose,

hemicelulose, lignina, amido e pectina, caracterizando-os como heterogêneos, servindo tanto como fonte de carbono e energia quanto para suporte do crescimento microbiano (PINTO, 2005).

Diferentes tipos de microrganismos dentre bactérias e fungos podem crescer em substratos sólidos, com baixos níveis de umidade. Porém, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse processo, capazes de crescer com pouco aporte de água ofertada. Se bem adaptado, a parte vegetativa formada pelo crescimento das hifas favorece a colonização em diferentes meios sólidos (PINTO, 2005). Além desta facilidade de cultivo, o uso de fungos filamentosos possibilita também maior facilidade na extração enzimática, uma vez que estes secretam as enzimas diretamente no meio em que se encontram, não sendo necessárias etapas de lise celular (GALINDO, 2016).

## 2.5 *Paecilomyces* sp.

O gênero *Paecilomyces* inclui espécies de fungos filamentosos, pertencentes ao filo dos Deuteromicetos, ou fungos conidiais, que possuem reprodução assexuada. Por reunir diversas espécies entomopatogênicas, o gênero tem papel importante da hidrólise da cutícula de insetos, sendo então muito empregado como agente de biocontrole. São geralmente isolados do solo ou de matéria vegetal em decomposição (SEJAS, 2002; NOGUEIRA, 2012).

O gênero foi descrito pela primeira vez em 1907 por Bainier, com a descoberta da espécie *P. varioti*, sendo relacionado aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os conídios das espécies de *Paecilomyces* podem ser elípticos unicelulares, hialinos ou fracamente pigmentados. As colônias são inicialmente planas e floculadas, adquirindo em seguida uma textura “poeirenta” de coloração pastel, e a depender da espécie e meio de cultivo, assume coloração branca, amarelada, rosa ou avermelhada (NOGUEIRA, 2012).

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas de um isolado de *Paecilomyces* sp. TP08 usando como substrato o engaço de uva em cultivo sólido.

#### 3.2 Objetivos específicos

Caracterizar o engaço de uva quanto ao pH, umidade, porosidade, açúcares redutores totais e açúcar redutor;

Avaliar a produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas por *Paecilomyces* sp. TP08 nas condições propostas de pH 4 e temperatura ambiente;

Avaliar o enriquecimento proteico do engaço de uva a partir da colonização do fungo;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta e preparo do substrato

Como substrato para o cultivo sólido, utilizou-se o resíduo do engajo de uva coletado em fevereiro de 2020, cedido pela empresa Sabores de Frutas Santa Maria localizada no distrito Chã do Esquecido do município São Vicente Férrer – PE (Figura 4).

**Figura 4** – Localização do local de coleta.



(A) Distrito Chã do Esquecido; (B) Município de São Vicente Férrer, em Pernambuco.

Fonte: Google Maps.

Após a coleta, promoveu-se a separação de qualquer casca ou polpa de uva residual no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. O engajo, livre dos resíduos de casca e polpa, foi higienizado com solução de hipoclorito de sódio a 1%(v/v) e lavado em água corrente (Figura 5).

Em seguida, após a lavagem e esterilização (121°C, 1 atm, 15 min), o engajo foi seco em estufa a 60°C durante 42h, e triturado em moinho de facas tipo Willey (SOLAB, SL-31) numa granulometria de 10mesh. O triturado obtido foi armazenado a temperatura ambiente, protegido de umidade em sacos plásticos de fechamento hermético, para posterior utilização.

**Figura 5 – Engaço lavado.**



Fonte: AUTOR (2020)

#### 4.2 Caracterização do resíduo do engaço de uva

O resíduo foi caracterizado físico-quimicamente quanto ao percentual de umidade, pH, a densidade aparente, a densidade real, a porosidade do leito e o teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais, segundo a metodologia descrita seguir:

##### 4.2.1 Percentual de umidade

Para análise do percentual de umidade, pesou-se 330g do engaço lavado e esterilizado em uma placa de Petri. Então, este conjunto amostra-recipiente foi colocado em estufa a 60°C por 42h, e posteriormente pesado novamente. Sendo o percentual de umidade representado pelo teor de água livre presente na amostra, determinado conforme a Equação 1 (EMBRAPA, 2010).

$$Umidade (\%) = \frac{(\textit{peso inicial} - \textit{peso final da amostra})}{\textit{peso inicial da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

#### 4.2.2 pH

Para determinação do valor do pH do substrato, preparou-se uma suspensão com 50mL de água e 5g de engaço seco e triturado, posteriormente, homogeneizada e colocada em repouso por 30 minutos para precipitação. Depois, o pH foi determinado em um potenciômetro (TECNOPON – LUCA 210) previamente calibrado com soluções padrão (ADOLF LUTZ, 2008).

#### 4.2.3 Densidade aparente

A densidade aparente foi determinada conforme a Equação 2. Para a análise, pesou-se 1g do engaço que foi posteriormente colocado em uma proveta, sem compactá-lo, onde se verificou o volume ocupado e os espaços vazios (CORREIA, 2004).

$$Densidade\ aparente\ \left(\frac{g}{mL}\right) = \frac{massa\ (g)}{volume\ ocupado\ (mL)} \quad Eq.\ (2)$$

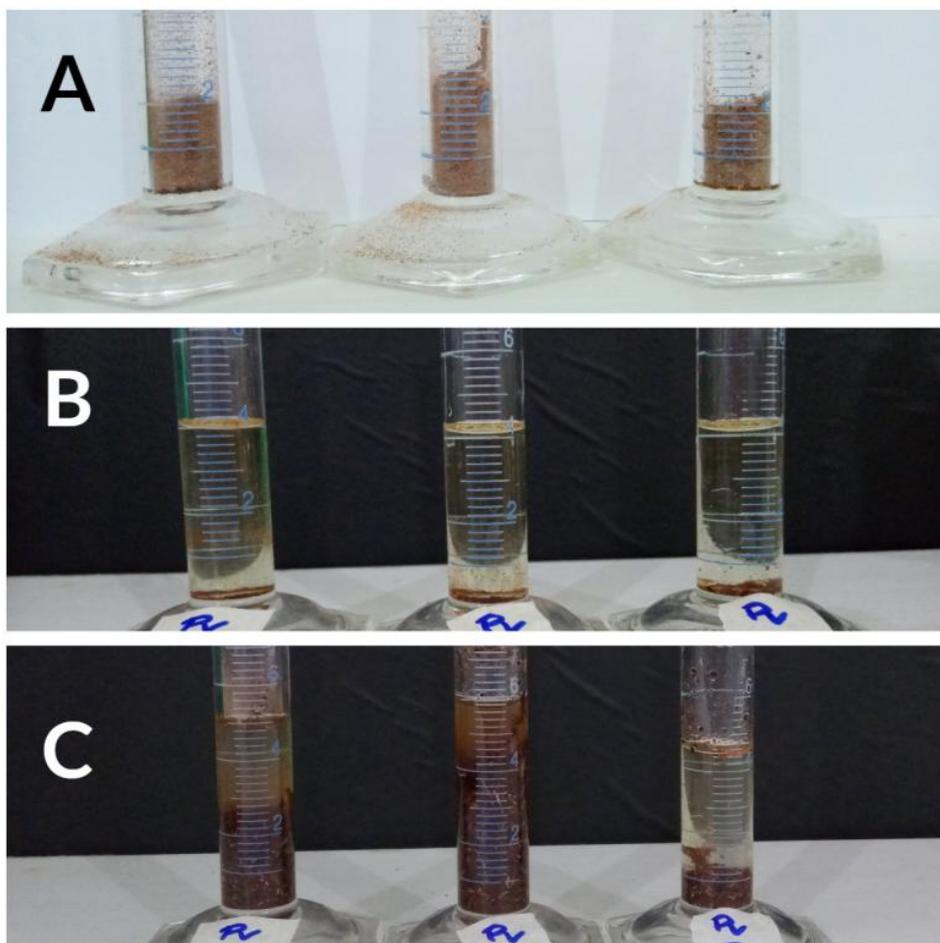
#### 4.2.4 Densidade real

A determinação da densidade real foi dada pela relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra, através do deslocamento de um fluido de volume conhecido, sendo esse fluido o óleo de soja comercial. Para isso, o óleo foi colocado em uma proveta e mediu-se o seu volume. Em seguida, foi adicionado o engaço com uma massa conhecida e esperou-se até que este estivesse depositado totalmente no fundo da proveta. Por fim, foi medido novamente o volume indicado na proveta (Figura 6). Assim, o volume real ocupado pelo engaço foi determinado pela diferença entre o volume final e inicial, sendo a densidade real deste resíduo dada pela Equação 3.

$$Densidade\ real\ \left(\frac{g}{cm^3}\right) = \frac{m_A}{(V_2 - V_1)} \quad Eq.\ (3)$$

Em que:  $m_A$  é massa do substrato;  $V_1$  é volume do fluido;  $V_2$  é volume do fluido deslocado.

**Figura 6 – Determinação da densidade real.**



(A) 1g de engajo numa proveta de 10mL sem compactação; (B) Volume do fluido; (C) Volume final ocupado pelo óleo e engajo.

Fonte: AUTOR (2020)

#### 4.2.5 Porosidade do leito

Um meio poroso pode ser definido como uma matriz sólida que contém vazios ou poros, por onde ocorre o fluxo de um fluido. Sendo então, porosidade, dada como a razão entre o volume de vazios e o volume total do meio (COUTO, 2017). Assim, a porosidade do leito foi calculada através da relação entre a densidade real e a densidade aparente da amostra de engajo, através da Equação 4.

$$Porosidade = 1 - \frac{Densidade\ aparente}{Densidade\ real} \quad Eq. (4)$$

#### 4.2.6 Teor de açúcares redutores totais

Na determinação do teor de açúcares redutores totais (ART), foi utilizado o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) que é descrito por SANTOS (2007) de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa).

Para análise, em um frasco Erlenmeyer foi pesado 1g do engaço e adicionados 9mL de água destilada e 5mL de HCL 1N. Esta mistura foi colocada em uma mesa agitadora (SOLAB – SL 223) durante uma hora a 200rpm. Em seguida, foram adicionados 2mL de NaOH 1N. Esta última mistura foi então filtrada em um funil de Buchner utilizando um papel de filtro qualitativo (Whatman nº1), com o auxílio de uma bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581). Em um tubo de ensaio, adicionou-se a 0,5mL desta solução filtrada, 2,5mL do reagente DNS. A mistura foi aquecida a 100°C durante 5 minutos e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 4mL de água destilada, e realizadas a homogeneização e leitura em espectrofotômetro (EVEN) a 540nm.

#### 4.3 Processo de produção enzimática

##### 4.3.1 Microrganismo e inóculo

No preparo do inóculo para o cultivo sólido, foi realizado o repique da cultura de um isolado de *Paecilomyces* sp. TP08, originado de um solo contaminado com óleo diesel na cidade de João Pessoa - PB, cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia Vegetal (Prof<sup>a</sup>. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, mantido em meio sólido Ágar-Dextrose em placas de Petri e incubado a 30°C durante 15 dias, em seguida armazenado a 4°C (Figura 7).



#### 4.3.2 Cultivo para produção enzimática

O cultivo sólido para produção enzimática foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125mL contendo 5g de substrato (engaço de uva), previamente esterilizados. Em seguida, realizou-se a inoculação em cada frasco com  $1 \times 10^7$  conídios por grama de substrato. Para o controle da produção, em um frasco ao invés de adicionar uma concentração de inóculo, foi adicionado uma quantidade equivalente de água destilada esterilizada. Todos os frascos foram mantidos em temperatura ambiente ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

O cultivo teve duração de 120 horas, sendo retiradas amostras a cada 24 horas para realização das análises de atividade enzimática. Os cultivos foram realizados em duplicata (Figura 8).

**Figura 8** – Cultivos para produção enzimática.



Fonte: AUTOR (2020)

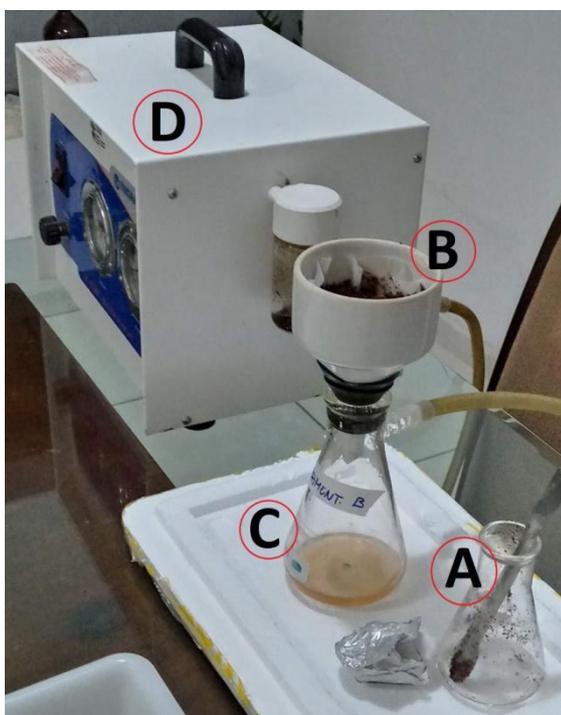
## 4.4 Extração e caracterização do complexo enzimático

### 4.4.1 Obtenção do extrato enzimático bruto

Para extração do complexo enzimático, foi adicionado em cada frasco Erlenmeyer tampão citrato a 0,05M (pH 5,0) na proporção de 10mL de tampão para cada grama de substrato (10mL:1g). A mistura foi homogeneizada em mesa agitadora (SOLAB– SL 223) a 200rpm por 30 minutos.

Em seguida, filtrou-se a suspensão em funil de Buchner e papel de filtro (Whatmann nº1) com auxílio de bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581) para separar o resíduo de engaço processado da fração líquida contendo o complexo enzimático produzido (Figura 9). As amostras filtradas foram adicionadas em tubos Falcon e armazenadas em congelador para posteriores análises.

**Figura 9** – Filtração para obtenção de extrato bruto enzimático.



(A) Frasco Erlenmeyer onde ocorria o cultivo; (B) Aparato composto de frasco Kitassato, funil de Buchner e papel filtro; (C) Fração líquida, extrato bruto enzimático; (D) Bomba a vácuo.

Fonte: AUTOR (2020).

#### 4.4.2 Análises do extrato enzimático bruto

##### 4.4.2.1 Determinação da atividade de celulases totais (FPase)

A quantificação da atividade de celulases totais foi realizada de acordo com adaptação da metodologia proposta por Oliveira Júnior (2014), onde o substrato empregado foi o papel de filtro (Whatmann N°1) cortado em tiras medindo 1x 6cm. As tiras foram colocadas em tubos de ensaio, e foi adicionado 0,5mL de tampão citrato 0,05M (pH 5,0) e 0,5mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 50°C durante 60 minutos, para ocorrência da reação enzimática (Figura 10). Em seguida, foi retirada 0,5mL da mistura reacional e adicionada a tubos de ensaio contendo 0,5mL do reagente DNS. Estes seguiram para o banho termostatizado a 100°C durante 5 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram acrescentados 4mL de água destilada aos tubos e as amostras homogeneizadas.

Foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (EVEN) no comprimento de onda de 540nm para determinação dos açúcares redutores produzidos, de acordo com o método DNS. O branco da reação é feito para realizar a determinação da concentração inicial de açúcares redutores no extrato enzimático, para isso, adicionou-se 0,5mL do tampão citrato 0,05M (pH 5,0) e 0,5mL do extrato enzimático obtido em 0h de processo. Posteriormente, todos os procedimentos foram realizados em semelhança às outras amostras, como descrito anteriormente.

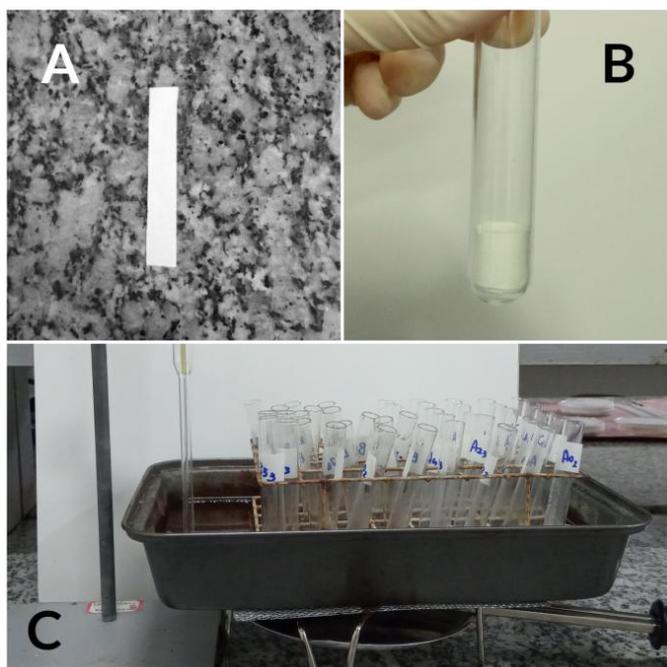
Os ensaios foram feitos em triplicata, e comparou-se os valores obtidos nas leituras com uma curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade de celulase é definida pela produção de 1µmol de glicose por minuto (0,18mg de glicose por minuto), nas condições de processo, e é expressa por U/g como diz a Equação 7.

$$FPase \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times 1 \times R}{(0,18 \times 60 \times 0,5)} \quad \text{Eq. (7)}$$

Em que: *A* é a absorbância da amostra; *B* é absorbância do branco da amostra; *f* é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL); *d* é a diluição da

amostra;  $1$  é o volume total da mistura reacional (mL);  $R$  é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g);  $0,18$  é o fator de conversão de miligramas para  $\mu\text{mol}$  de glicose;  $60$  é o tempo de reação (minutos); E  $0,5$  é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL);

**Figura 10** – Preparo para reação enzimática de determinação de celulases totais.



(A) Tira de papel de filtro medido 1cm x 6cm; (B) Tudo de ensaio com a tira de papel filtro; (C) Incubação dos tubos a 50°C.

Fonte: AUTOR (2020).

#### 4.4.2.2 Determinação da atividade de endoglucanases (CMCase)

A determinação da atividade de endoglucanases foi realizada de acordo com adaptação do protocolo proposto por Oliveira Júnior (2014), em que uma solução de carboximetilcelulose sódica a 2% em tampão citrato 0,05M (pH 5,0) foi utilizada como substrato. Em tubos de ensaio contendo 0,25mL de extrato enzimático, foram adicionados 0,25mL do substrato, e incubou-se essa mistura a 50°C por 30 minutos. Após isso, foram adicionados 0,5mL de reagente DNS e os tubos foram levados a um banho termostatizado a 100°C por 5 minutos e por fim foram adicionados aos tubos 4mL de água destilada e promovida a homogeneização.

Para determinar a glicose liberada pela reação com o DNS, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (EVEN) no comprimento de onda de 540nm. Para o branco da reação foram adicionados 0,5mL do reagente DNS a uma mistura de 0,25mL de substrato com 0,25mL do extrato enzimático obtido em 0h do processo. Em seguida, seguiram-se todos os procedimentos realizados às outras amostras, como descrito anteriormente.

Os ensaios foram feitos em triplicata, e comparou-se os valores obtidos nas leituras com uma curva padrão de glicose. Expressa por U/g, e calculada de acordo com a Equação 8, uma unidade de atividade de endoglucanase equivale a 1µmol de glicose liberada por minuto, nas condições do processo (ALVA et al, 2007).

$$CMCase \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times 0,5 \times R}{(0,18 \times 30 \times 0,25)} \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que: *A* é a absorbância da amostra; *B* é absorbância do branco da amostra; *f* é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL); *d* é a diluição da amostra; *0,5* é o volume total da mistura reacional (mL); *R* é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g); *0,18* é o fator de conversão de miligramas para µmol de glicose; *30* é o tempo de reação (minutos); E *0,25* é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL);

#### 4.4.2.3 Determinação da atividade de pectinases

Para estimativa da atividade pectinolítica, utilizou-se farinha de maracujá como substrato, num procedimento adaptado da metodologia descrita por Pinheiro (2007). Para isso, foi preparada uma solução de farinha de maracujá a 1% em tampão acetato 0,1M (pH = 5,7). Então em tubos de ensaio contendo 2mL desta solução, foram adicionados 0,25mL de extrato enzimático e em seguida incubados a 35°C durante 30 minutos para ocorrência da reação enzimática. Após isso, foram transferidos 0,5mL da mistura de reação para tubos de ensaio contendo 0,5mL do reagente DNS que seguiram para um banho termostatizado a 100°C por 10 minutos (Figura 11). Por fim, após o resfriamento, os tubos foram acrescidos de 4mL de água destilada e homogeneizados.

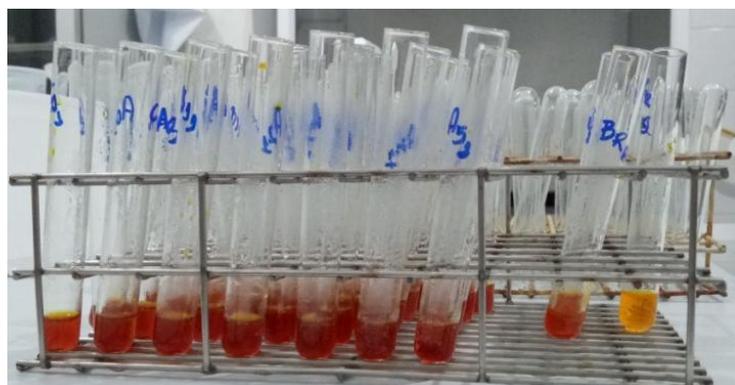
As amostras seguiram então para leitura em espectrofotômetro (EVEN) a 540nm, com ensaios realizados em triplicata. O branco da reação foi preparado adicionando-se 0,5mL do reagente DNS a uma mistura de 2mL da solução substrato com 0,25mL do extrato enzimático obtido em 0h do processo. Em seguida, foram seguidos todos os procedimentos realizados às outras amostras, como descrito anteriormente.

A determinação da atividade de pectinases no extrato enzimático foi baseada no aumento de açúcar redutor formado por ação da enzima na pectina presente na farinha de maracujá. Uma unidade de atividade enzimática de pectinase corresponde à quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose por minuto, nas condições do processo. Os resultados foram expressos por U/g e calculados de acordo com a Equação 9.

$$\textit{Atividade Pectinase} \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times 2,25 \times R}{(0,18 \times 30 \times 0,25)} \quad \text{Eq. (9)}$$

Em que: *A* é a absorbância da amostra; *B* é absorbância do branco da amostra; *f* é o fator de conversão da curva de calibração de glicose (mg/mL); *d* é a diluição da amostra; *2,25* é o volume total da mistura reacional (mL); *R* é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g); *0,18* é o fator de conversão de miligramas para µmol de glicose; *30* é o tempo de reação (minutos); E *0,25* é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL);

**Figura 11** – Tubos contendo a mistura reacional e DNS, na análise de pectinases.



Fonte: AUTOR (2020).

#### 4.4.2.4 Proteínas solúveis totais

Para análise das proteínas totais foram adicionadas em tudo de ensaio 10 $\mu$ L do extrato enzimático, 790 $\mu$ L de água destilada e 200 $\mu$ L do reagente de Bradford. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 15 minutos para a reação (Figura 12). Terminado o tempo de reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595nm.

O branco foi preparando um tubo contendo 800 $\mu$ L de água destilada e 200 $\mu$ L do reagente de Bradford. A análise foi realizada em triplicata, e empregaram-se os valores obtidos na leitura na comparação com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BRADFORD, 1976).

**Figura 12** – Tubos incubados a temperatura ambiente para determinação de proteínas solúveis totais.



Fonte: AUTOR (2020).

#### 4.5 Avaliação do crescimento microbiano

Para a avaliação do crescimento do isolado de *Paecilomyces* sp. TP08 durante o processo de fermentação em estado sólido foi estimada em Câmara de Neubauer a concentração de conídios de cada amostra de extrato bruto retirada. Os resultados foram expressos em c/mL (conídios por mL de extrato), e calculados de acordo com a Equação 5.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do resíduo de engaço de uva

Os resultados da caracterização do engaço de uva estão apresentados na Tabela A.

**Tabela A** - Caracterização físico-química do engaço de uva

Parâmetro analisado	Unidade	Resultado
Umidade	%	73
pH	-	4
Densidade aparente	g/mL	0,39
Densidade real	g/mL	1,18
Porosidade do leito	-	0,66
Açúcares redutores totais	g/L	0,434

Fonte: AUTOR (2020)

O resíduo de engaço apresentou um teor de umidade maior que os valores de 20%, 13,9%, 15,5% obtidos por Prozil (2013), Costa (2010) e Yahya (2015) respectivamente. Esta diferença pode ser atribuída aos processos de preparo do substrato deste trabalho e os encontrados na literatura.

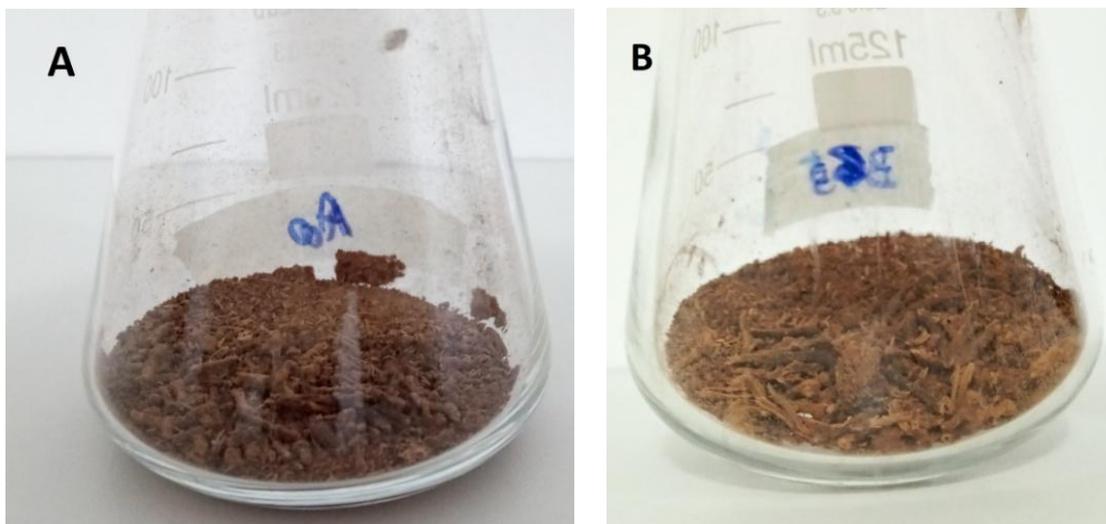
A densidade aparente de 0,39g/mL mostra certa tendência a não compactação do substrato, uma vez que influencia diretamente no aumento da porosidade do leito, conseqüentemente aumentando a áreação do meio de cultivo, proporcionando uma melhor difusividade de gases no processo. O pH 4 observado, está de acordo com o esperado desse substrato pela presença de compostos fenólicos em sua composição, estudada por Prozil (2013).

Este substrato apresentou também, um teor de açúcares redutores totais de 0,434g/L, pouco menor do que o teor de 0,9g/L encontrado por Rocha (2018) em resíduos agroindustriais de acerola e cajá. Prozil (2013) realizou uma análise da composição média de monossacarídeos no engaço da uva, observando em seus resultados um teor de 62,7% de glicose na massa total de monossacarídeos presentes no resíduo. Este mesmo autor atribuiu a origem desse teor de glicose à composição dos 30,3% de celulose e 21% de hemicelulose que encontrou em suas análises químicas do engaço de uva. Esse teor de glicose presente no substrato corrobora então a composição lignocelulósica e pode favorecer o processo da FES.

## 5.2 Processo de produção enzimática

Durante o tempo de 120 horas de cultivo, o substrato não sofreu alterações visuais, não sendo possível observar características macroscópicas do crescimento do fungo (Figura 13). Porém, é possível atestar que houve seu desenvolvimento através das análises que comprovam a produção enzimática pelo fungo.

**Figura 13** – Aspecto visual do substrato ao longo do processo fermentativo.



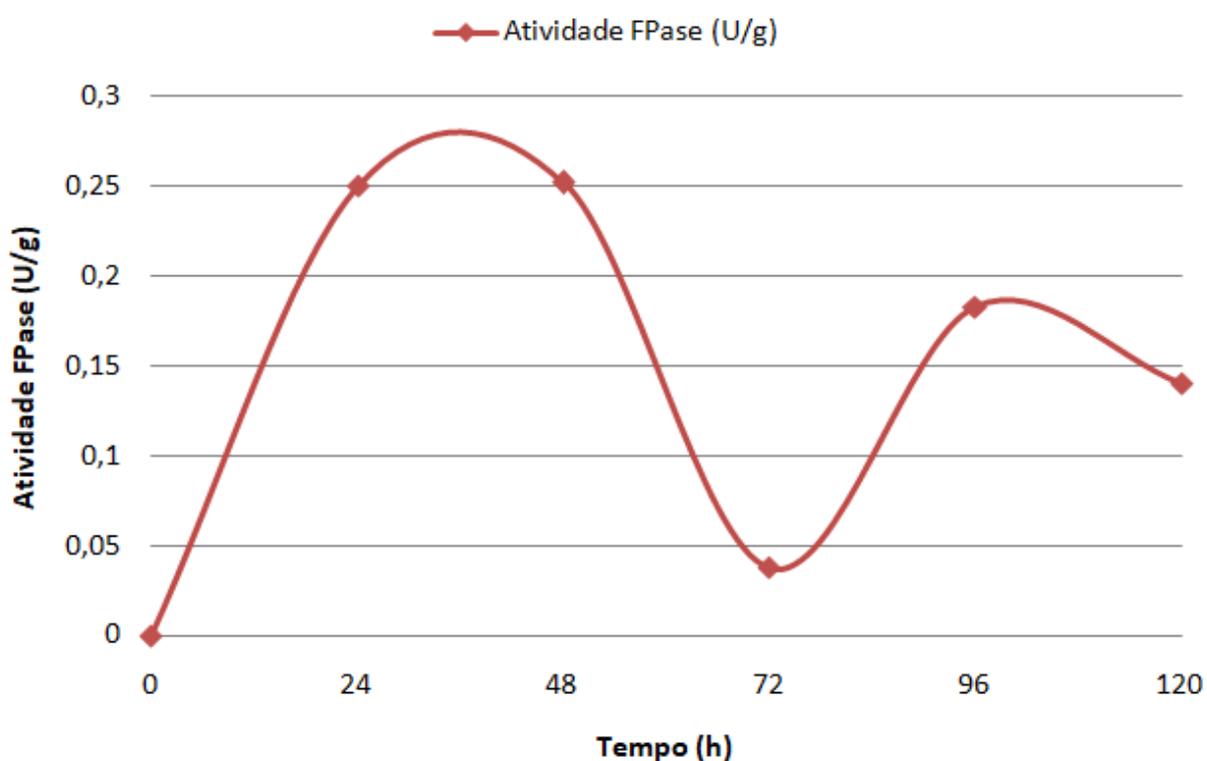
(A) Meio de fermentação em 0h de processo; (B) Meio de fermentação em 120h de processo;

Fonte: AUTOR (2020)

### 5.3 Atividade de celulases totais (FPase)

Uma unidade da atividade da celulase total é definida pela quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto - equivalente a 0,18mg de glicose por minuto - (ALVA et al., 2007). A Figura 14 apresenta os valores da análise de FPase em cada ponto de tomada de amostra no processo.

**Figura 14** – Atividade de celulases totais durante o processo de produção enzimática por *Paecilomyces* sp. TP08



Fonte: AUTOR (2020)

A atividade celulolítica total deste processo teve seu melhor desempenho no início da fermentação, entre 24h e 48h, onde se obtiveram atividades semelhantes de 0,25U/g. A oscilação dos valores de atividade entre 48h e 96h explica-se pela disponibilidade de glicose livre no meio, diminuindo a demanda de produção enzimática momentaneamente. Santos (2018), utilizando a fibra do coco verde como substrato no cultivo em estado sólido de *Paecilomyces* sp., ao contrário do observado no presente trabalho, obteve a melhor atuação da atividade celulolítica ao final da fermentação, observando o valor de 33,1U/g em 196h. Gervásio (2017),

utilizando o mesmo substrato que Santos (2018), mas utilizando um isolado de *Aspergillus* sp. também observou uma melhor atividade no final da fermentação, porém com um valor inferior, de 15,7U/g. Já Zuñiga (2009), utilizando o bagaço de cana de açúcar e nutrientes diversos no cultivo sólido de *A. niger*, obteve atividade de 0,59U/g em 72h de processo.

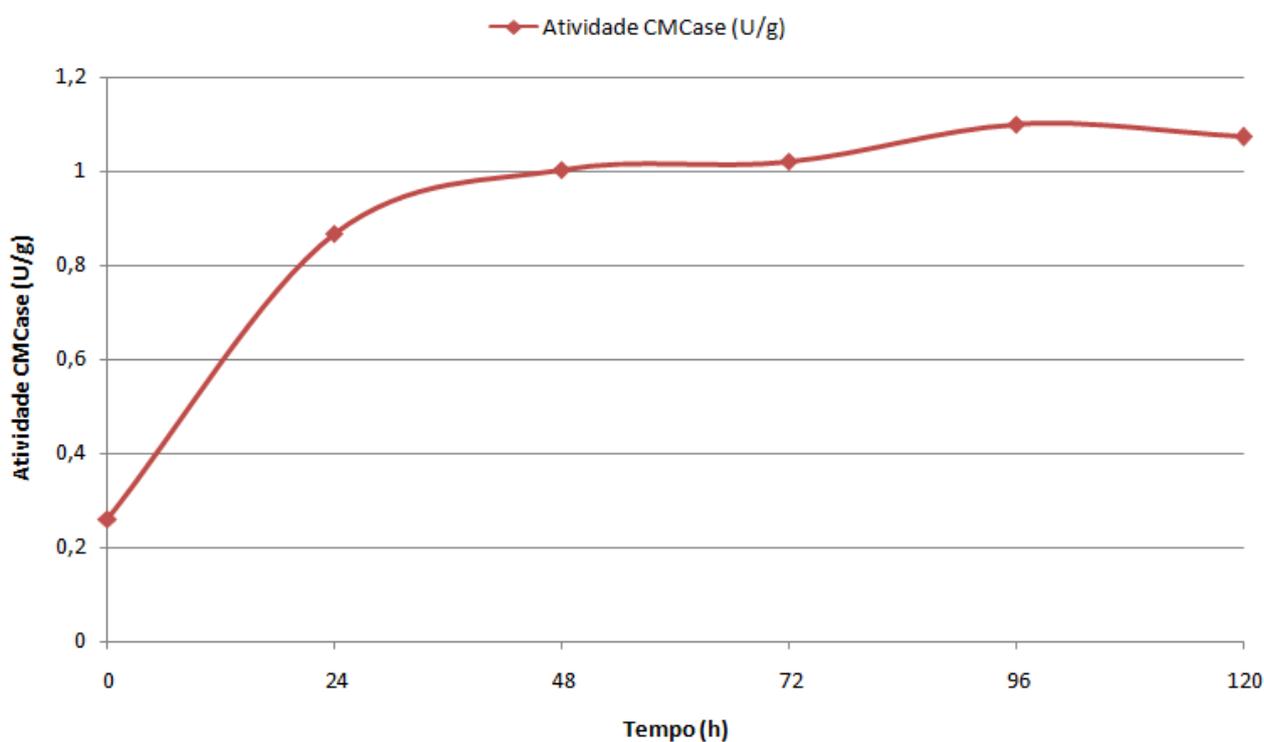
Carvalho (2018), em seu estudo comparativo da produção de celulasas com fungos do gênero *Trichoderma* utilizando uma mistura de casca de café e bagaço de cana como substrato, observou atividade máxima de celulasas totais em 120h de cultivo para ambas as espécies avaliadas, com valores de 4,05U/g para *T. reseei* e de 2,92U/g para *T. koningii*. Já Daronch (2015), utilizando o *Penicillium* sp. com o resíduo de casca de soja como substrato, num percentual de umidade semelhante ao do presente trabalho, observou uma maior atividade celulolítica total de 1,19U/g em 168h de cultivo.

Ao comparar com os resultados obtidos na literatura, percebe-se uma produção de celulasas totais aquém daquelas obtidas por Santos (2018) que utilizou o mesmo fungo, porém empregando como substrato a fibra do coco verde, e que Gervásio (2017), Zuñiga (2009) e Carvalho (2018) que obtiveram seus resultados de processos onde foram empregados fungos e substratos diferentes dos estudados nesse trabalho, sendo eles respectivamente, o fungo *Aspergillus* sp e como substrato o bagaço de cana.

#### 5.4 Atividade endoglucanases (CMCase)

Uma unidade da atividade da endoglucanase equivale a  $1\mu\text{mol}$  de glicose liberada por minuto (ALVA et al., 2007). A Figura 15 apresenta os valores da análise de CMCase em cada ponto de tomada de amostra no processo.

**Figura 15** – Atividade endoglucanase durante o processo de produção enzimática por *Paecilomyces* sp. TP08



Fonte: AUTOR (2020)

A atividade de endoglucanase mostrou um acréscimo gradual no início do processo, obtendo um valor de  $0,86\text{U/g}$  em 24h de cultivo e mantendo-se constante numa atividade de  $1,0\text{ U/g}$  desde 48h ao final do processo em 120h. A atividade CMCase de *Paecilomyces* sp TP08 observada por Santos (2018), empregando a fibra de coco verde como substrato, não obteve valores menores que  $23\text{U/g}$  a partir das 96h e teve seus maiores valores obtidos ao final da fermentação, com picos nos tempos de 168 e 192 horas e atividades de  $34,6\text{U/g}$  e  $32,2\text{U/g}$ . A atividade de CMCase de *Aspergillus* sp. observada pela mesma autora, também obteve seus picos de atividade às 168 e 192 horas, ainda que em valores um pouco menores.

Carvalho (2018) obteve maiores atividades de endoglucanases às 120h de cultivo, de valores de 28,7U/g e 4,05U/g para as espécies *T. koningii* e *T. reseei* respectivamente, tendo este último apresentado um aumento linear da atividade enzimática.

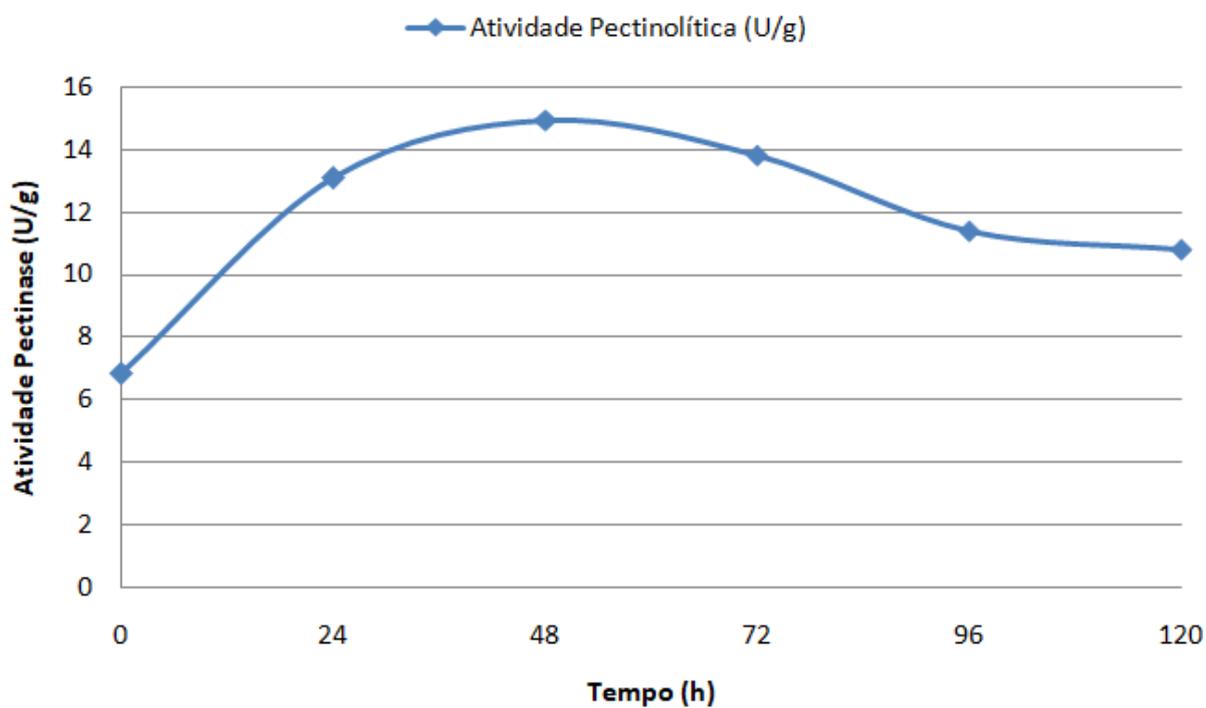
A produção de endoglucanases observada por Santos (2018) e Gervásio (2017) se comportou de forma variável, com picos, indicando nos decréscimos de atividade um consumo dos açúcares redutores provenientes da hidrólise enzimática. A constância observada neste trabalho, a partir das 48h indica que o microrganismo pouco utilizou as enzimas produzidas, significando que não estava havendo hidrólise por endoglucanases durante o processo.

### 5.5 Atividade Pectinolítica

Uma unidade da atividade da pectinase foi definida pela quantidade de enzima que liberou 1 $\mu$ mol de glicose por minuto (OLIVEIRA JÚNIOR, 2014). A Figura 16 apresenta os valores da análise de pectinas em cada ponto de tomada de amostra no processo.

A atividade de pectinase, observada pela variação da quantidade de açúcar redutor, proveniente da hidrólise de pectinas presentes no substrato empregado no ensaio analítico, obteve seu pico máximo em 48h de processo com 14,9U/g de atividade, decrescendo aos poucos logo em seguida. Rocha (2018) observando a atividade pectinolítica de fungo *A. niger* usando resíduo de cajá como substrato, também observou o ápice da atividade em 48h de cultivo, obtendo um valor de 8,5U/g. Utilizando o resíduo de acerola, este mesmo autor mensurou o valor máximo de atividade de pectinase em 72h, com valor de 3,8U/g. Já Stock (2013), utilizando como substrato para *A. niger*, uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo, às 18h observou uma atividade de 7U/g.

**Figura 16** – Atividade pectinolítica durante o processo de produção enzimática por *Paecilomyces* sp. TP08

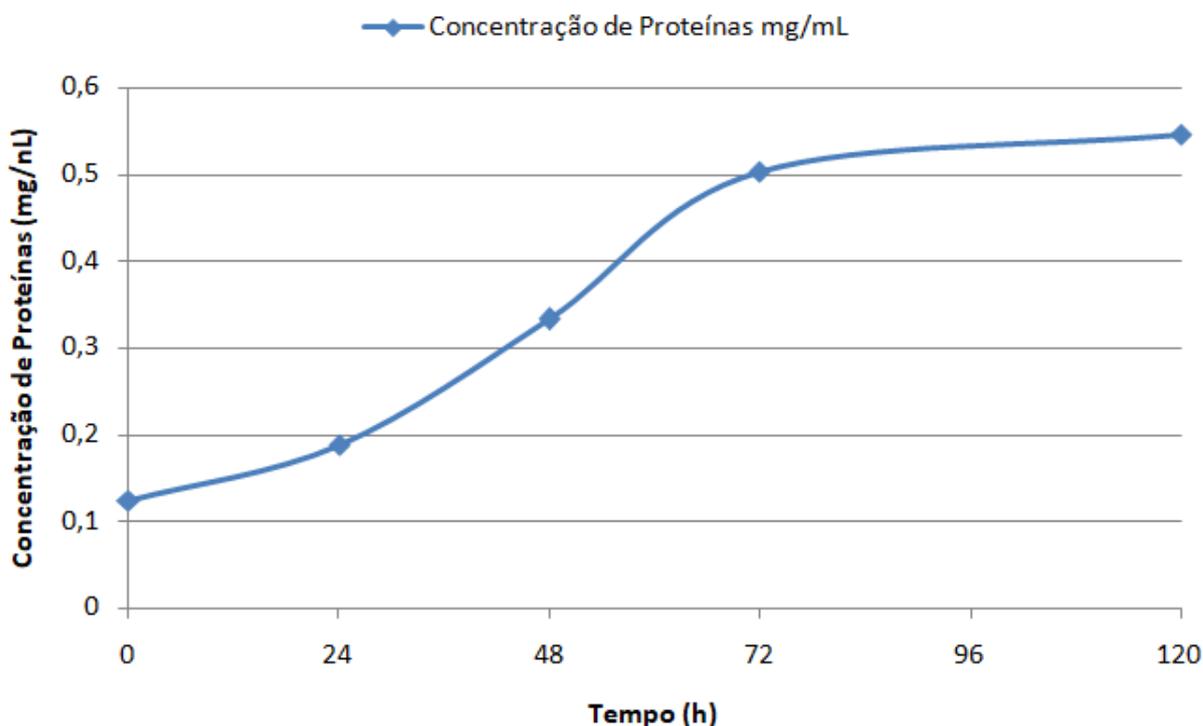


Fonte: AUTOR (2020)

### 5.6 Proteínas solúveis totais do extrato enzimático

A variação da concentração de proteínas solúveis totais durante o processo apresentou um perfil de acréscimo do conteúdo proteico. Este resultado pode ser observado na Figura 17.

**Figura 17** – Proteínas solúveis totais durante o processo de produção enzimática por *Paecilomyces* sp TP08.



Fonte: AUTOR (2020)

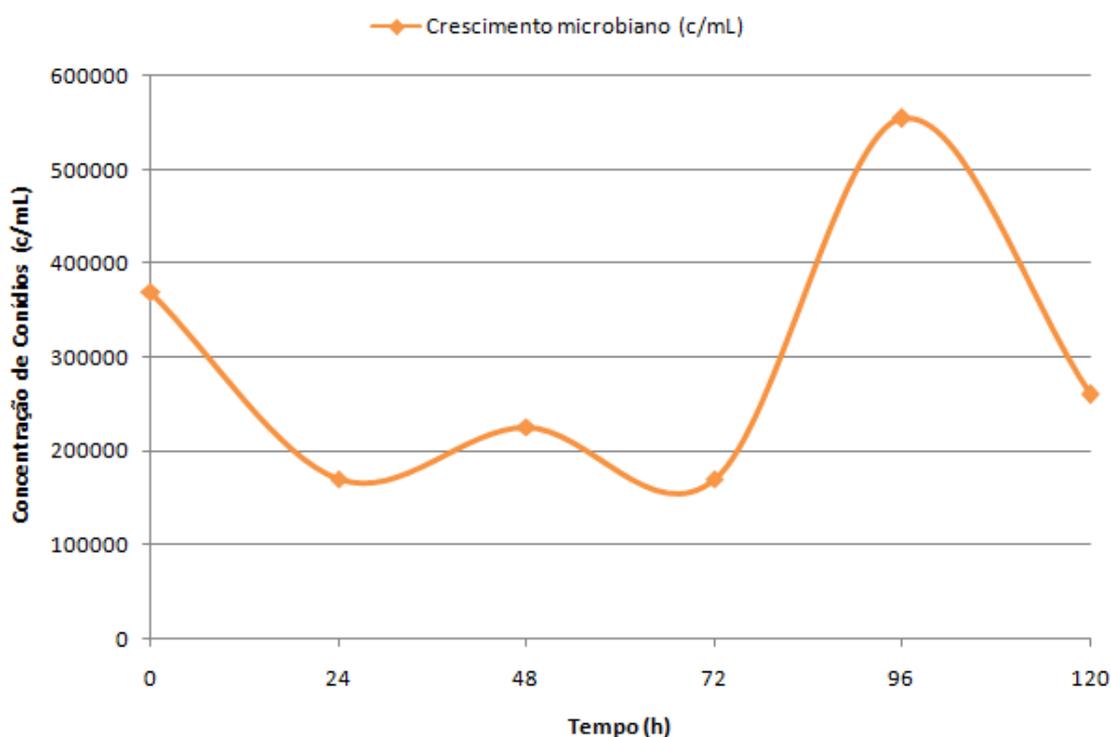
No início, observou-se uma concentração de proteínas solúveis totais de 0,1 mg/mL e um aumento gradativo durante o processo. Constatando que o aumento proteico solúvel foi significativo, pois atingiu cerca de 5 vezes mais do que o inicial. Portanto, pode-se afirmar que houve um enriquecimento proteico no engaço de uva após a biotransformação promovida pelo *Paecilomyces* sp. Portinho (2016) relatou que o engaço de uva possui baixo valor nutritivo para alimentação de ruminantes. Assim, após o cultivo realizado no presente estudo, verificou-se um potencial de utilização para alimentação animal devido ao aumento do conteúdo proteico.

O enriquecimento proteico do substrato ocorrido durante o cultivo em estado sólido também foi observado por Amorim (2011) na fermentação do farelo de cacau por *A. niger*, com um aumento de 13% do teor de proteína bruta às 48h de cultivo. Utilizando o mesmo microrganismo e o bagaço de caju como substrato, Pontes (2009) também observou um aumento de 13% do teor de proteínas do seu substrato.

## 5.7 Avaliação do crescimento microbiano

A variação da concentração de conídios ao longo do processo representando a cinética do crescimento microbiano do isolado de *Paecilomyces* sp. TP08 pode ser observada na Figura 18.

**Figura 18** – Curva de crescimento microbiano ao longo do processo de fermentação em estado sólido.



Fonte: AUTOR (2020)

A variação apresentada ao início do processo seguida do pico de concentração encontrado ao fim do processo, com valor de  $55,5 \times 10^4$  c/mL, pode ser atribuída à adaptação do isolado ao meio de cultivo, relacionada ao acesso de nutrientes do substrato ou ainda ao estresse hídrico pelo emprego do substrato seco. Porém, os valores de concentração de conídios obtidos quando comparados aos encontrados na literatura são satisfatórios, de acordo com o método de cultivo e tipo de meio empregado.

Ibrahim e Low (1993), em seu estudo para produção em massa de fungos entomopatogênicos, ao fim de 14 dias de cultivo a 28°C obteve valores de

concentração de conídios de *Paecilomyces fumoroseous* de  $22 \times 10^6$  c/mL utilizando a polpa de coco ralada como substrato. Guimarães (2016), empregando a fibra de algaroba como substrato para o cultivo de outro fungo entomopatogênico, *Beauveria bassiana*, em 10 dias de cultivo a 29°C obteve valores da concentração de conídios de  $2,36 \times 10^6$  c/g. E Silva (2017), utilizando o mesmo substrato para o cultivo de *Metarhizium anisopliae*, após 72h de cultivo obteve uma concentração de mais de 1000 conídios por grama de substrato. Assim, os dados de crescimento microbiano obtidos nesse trabalho estão de acordo com os dados da literatura para o crescimento de *Paecilomyces* sp. em substratos sólidos, assim como de outros fungos de aplicações semelhantes.

## 6 CONCLUSÕES

O engaço da uva apresentou características físico-químicas (pH, porosidade, umidade e quantidade de açúcares redutores totais) compatíveis com substratos normalmente empregados no cultivo sólido. Portanto, nas condições analisadas, o engaço de uva apresentou potencial de utilização para produção enzimática por *Paecilomyces* sp. TP08. As atividades enzimáticas determinadas indicam que o fungo foi induzido a produzir enzimas celulolíticas e pectinolíticas, e esta produção promoveu um aumento do conteúdo proteico do engaço melhorando sua qualidade quanto ao valor nutricional, podendo ser utilizado como auxiliar na alimentação animal.

Embora tenha apresentado resultados satisfatórios na produção de enzimas, fica evidente a necessidade de estudos acerca de melhores condições de cultivo e de novas combinações de microrganismos para aumentar a atividade enzimática observada. Assim como mais estudos para caracterizações enzimáticas, como testes de termoestabilidade e avaliação de viabilidade para emprego em processos industriais.

## REFERÊNCIAS

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SALVA, J.; CHIU, Y.Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B.S.; BHAVYA, D.; PURVI, J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B.S.; VARALAKSHMI, K.N. Production and characterization of fung alamyase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. African Journal of Biotechnology, 2007.

AMORIM, G.M. Ferrmentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapeinga, BA. 2011.

ANDRADE, A.S.A. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB. 2016.

BARCIA, M.T.; PERTUZATTI, P.B.; GÓMES-ALONSO, S.; GODOY, H.T.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. Food Chemistry 159: 95–105. 2014.

BONATO, I.T. Análise histórico-comparada do desenvolvimento do mercado de vinho em três regiões produtoras no Brasil. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em agronegócios, Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2020.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. New York, v. 72, 1976.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. Seminário: Ciências Agrárias, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CARVALHO, I.Z.; BARRETO, L.S.; COELHO, J.M.; PINHEIRO, I.R. Avaliação da casca de café como substrato produção de celulases por fermentação em estado sólido. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia. Maceió, AL. 2018.

CCEF, COMITÉ NATIONAL DES CONSEILLERS DU COMMERCE EXTÉRIEUR DE LA FRANCE. Wine in the world as we approach 2050 – The 21 century market challenges, Foresight. Paris, 2009.

CORREIA, R.T.P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2004.

COSTA, V.L.F. Propriedades papelarias das fibras engaço da uva. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal. 2008.

COUTO, H.J.B.; BARBOSA, F.L.L.; LIMA, O.A. Permeabilidade de meios porosos minerais: efeito da esfericidade, granulometria e tipo de mineral. XXVII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa. Belém, PA. 23 a 27 de Outubro 2017.

CUNHA, N. Projeto de uma planta de tratamento anaeróbio de resíduos vínicos com aproveitamento energético do biogás gerado. Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia ambiental, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS. 2018.

DARONCH, N. A. et al. Produção de celulase por *Penicillium* sp. utilizando resíduo agroindustrial em fermentação em estado sólido. Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 3, p. 1215-1220. 2015.

GALINDO, H.M.; Produção e caracterização de exoglucanases e endoglucanases de mucorales utilizando fermentação sólida. Dissertação (Mestrado) – Programa de

Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal e Pernambuco. Recife, PE. 2016.

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

GUIMARÃES, A.G. L. P. Produção de conídios e enzimas hidrolíticas por *Beauveria Bassiana* (Bals) *vuillemin* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos. 2016. Dissertação de mestrado, 198p.

GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.M.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J.C. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52: 234-238. 2004.

IBRAHIM, Y.B; LOW, W;. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella* , *International Journal of Pest Management*, 39:3, 288-292. 1993.

IBRAVIN, INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. Panorama da Vitivinicultura Brasileira: Reunião da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Viticultura, Vinhos e Derivados. Brasília, 01 de março de 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/viticultura-vinhos-e-derivados/2018/47aro/2-5-comercializacao.pdf>. Acesso em: 8 de jul. 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital). 2008.

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

LEHNINGER, A L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principios de bioquímica. 2. ed. Sarvier, São Paulo. 1995.

LI, H.; WANG, H.; LI, H.; STEVE, G.; PAUL, V.D.L.; XU, Z.; ALESSIO, F.; YANG, P. The Worlds of Wine: Old, New and Ancient. Wine Economics and Policy. 2018.

NOGUEIRA, F.M.; MORAIS, A.N.R; OLIVEIRA, G.P; MARTINS, L.M.S.; GIRÃO, R.J.S; CARVALHO, T.C.B. Micetoma causado por *Paecilomyces* sp.: Relato de caso. Brasília Med, 49(3): 221-224. 2012.

MATEO, J.J.; MAICAS, S. Valorization of winery and oil mill wates by microbial technologies. Food Research International. 2015.

MELLO, L.M.R. Uvas: Desempenho do Setor em 2018. Revista Campo & Negócios. 2019.

MUKESH KUMAR, D.J.; SARANYA, G.M.; SURESH, K.; ANDAL PRIYADHARSHINI, D.; RAJAKUMAR, R.; KALAICHELVAN, P.T. Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. Asian Journal of Plant Science and Research, v. 2, p. 369-375, 2012.

OIV, INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE. OIV Databases and statistics. [s.n.] Disponível em: <http://www.oiv.int/en/databases-and-statistics/statistics>. Acesso em: 8 de jul. 2020.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(4): 853-860, out.-dez. 2006

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

PING, L.; BROSSE, N.; SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A. Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products*, 2011.

PINHEIRO, E.R. Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*): Otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2007.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. Comunicado Técnico Online, EMPRAPA. Fortaleza, CE. 2005.

PONTES, C. R., Enriquecimento Protéico do Bagaço de Caju através de Fermentação Semi-Sólida Utilizando *Aspergillus niger*. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE. 2009.

PORTINHO, R. Aproveitamento do engaço de uva para remoção de cafeína por adsorção. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2016.

PROZIL, S.O. Caracterização química do engaço da uva e possíveis aplicações. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal. 2008.

SANTOS, B.F. Utilização da fibra do coco verde (*cocus nucifera L*) como substrato alternativo para produção de celulases fúngicas. Trabalho de conclusão de curso - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB. 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 Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2007.

SEJAS, F. Análise e quantificação de enzimas produzidas pelo fungo Endofítico entomopatogênico *Paecilomyces* sp. isolado da soja (*Glytinemax* (l.) Merrill). Monografia (Graduação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2002.

SILVA, G. M. H. Fibra da algaroba: um substrato alternativo para a produção de conídios e enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB. 2017.

STOCK, D. Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2013.

YAHYA, M. A.; AL-QODAH, Z.; NGAH, C. W. Zanariah. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 46, p. 218-235, 2015

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1998

ROCHA, J.C. Produção, avaliação da estabilidade e aplicação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando resíduos de frutas tropicais como substrato. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande no Norte. Natal, RN. 2018.

TONIETTO, J.; PEREIRA, G.E. The Development of the Viticulture for a High Quality Tropical Wine Production in the World. *International Symposium Of The Group Of International Experts Of Vitivinicultural Systems For Cooperation*, 17. Anais...Asti-Alba, Italy: 2011

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