



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
EM BAGAÇO DE CAJU (*Anarcadium Orcidentalle* Lineu) UTILIZANDO O
MICROORGANISMO *Trichoderma* sp.**

BEATRIZ CAVALCANTI AMORIM

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2010

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
EM BAGAÇO DE CAJU (*Anacardium Orcidentalle* Lineu) UTILIZANDO O
MICRORGANISMO *Trichoderma* sp.**

BEATRIZ CAVALCANTI AMORIM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Líbia de Sousa Conrado Oliveira (UAEQ/UFCG)

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2010



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

A524e

Amorim, Beatriz Cavalcanti.

Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium Orcidentalle* Lineu) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp./Beatriz Cavalcanti Amorim. – Campina Grande, 2010.

86 f.: il. col.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Líbia de Sousa Conrado Oliveira.

Referências.

1. Enzima Celulolítica - Celulase. 2. Bagaço de caju. 3. Fermentação Semi-Sólida. I. Título.

CDU 604.4:577.15(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DA ALUNA BEATRIZ CAVALCANTI AMORIM**

**Título: Estudo da Produção de Celulases por Fermentação Semi-Sólida
em Bagaço de Caju (*Anarcadium Occidentale*) Utilizando o
Microrganismo *Trichoderma sp***

COMISSÃO EXAMINADORA

CONCEITO

Prof^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira (Doutor)

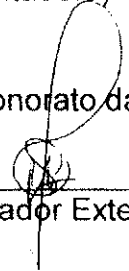
Aprovado



(Orientadora)

Prof. Flávio Luiz Honorato da Silva (Doutor)

Aprovado



(Examinador Externo)

Prof^a Ana Mario Souto Maior (Doutor)

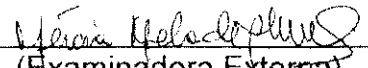
Aprovado



(Examinadora Externa)

Prof^a Mércia Melo de Almeida (Doutor)

Aprovado



(Examinadora Externa)

Campina Grande, 02 de setembro de 2010

DEDICATÓRIA

*À minha família e ao meu noivo João
Neto, pelo amor incondicional que a
mim dedicam.*

*Obrigada! Vocês são a base da minha
vida!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e por dar-me forças para enfrentar os momentos mais difíceis dessa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Valdiney e Soraia, e aos meus irmãos, Breno e Ana Rosa, pelo amor dedicado, por todo apoio ao longo dessa fase que passei e por serem a base da minha vida.

Ao meu noivo, João Neto, pela dedicação ao nosso amor, pela paciência comigo nos momentos mais turbulentos e pelo companheirismo incondicional.

À minha família, avós e avôs, tios e tias, primos e primas, pelo apoio dedicado ao longo dessa fase de minha vida.

À família “Amorim Magalhães”, pelo acolhimento e pelo carinho que deles recebi.

À minha orientadora, Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pelos 7 anos de trabalhos juntas e por, além de ser uma excelente profissional, ter se tornado uma pessoa tão importante em minha vida.

A todos os meus amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG, Carlos Bispo, Israel, Daniel, Mércia, Bruno Rafael, Sckaymenn, Ezenildo, Sandra, Alberto e Jardes, pelos inúmeros momentos em que me ajudaram e pelo carinho demonstrado ao longo desses anos de trabalhos.

Aos meus amigos, Fernanda, Marcella, Shirlene, Etimógenes, Aécio, Amanda e Gardênia, que sempre estiveram do meu lado me apoiando e dando-me força.

À Embrapa do Semi-Árido – Petrolina/PE, pelo apoio técnico oferecido no desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Pesquisador Carlos Alberto Tuão Gava pelo acolhimento que me foi oferecido.

À coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos de Origem Vegetal, em especial aos professores Páulia Maria, Marta Eugênia, Marcos Lima, Luciana Cavalcanti,

Verônica, Robson, e Sandra, por compreender-me e facilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia pelo apoio técnico oferecido durante algumas etapas deste trabalho e em especial à Fabiano Marinho e Antônio Sá.

A Maricé pela dedicação ao trabalho e por está sempre disponível a ajudar-me.

Aos funcionários da Unidade Acadêmica de Engenharia Química pela ajuda prestada, em especial à Eranildo e Selminha.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo Geral.....	3
1.1.1. Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Materiais Lignocelulósicos.....	4
2.1.1. Caju.....	7
2.2. Enzimas Celulolíticas.....	9
2.2.1. Classificação das Celulases.....	9
2.2.2. Aplicações das Celulases.....	10
2.2.3. Produção das Celulases por Ação Microbiana.....	10
2.3. Fermentação Semi-Sólida.....	11
2.3.1. Umidade e Atividade de Água.....	13
2.3.2. pH.....	14
2.3.3. Temperatura.....	15
2.3.4. Aeração.....	15
2.3.5. Tamanho das Partículas.....	15
2.3.6. Pré-Tratamento.....	16
2.3.7. Microrganismo.....	17
2.3.8. Inóculo.....	18
2.3.9. Substrato.....	18
2.4. Trabalhos Desenvolvidos para Produção de Celulases.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Preparo do Substrato.....	22
3.2. Caracterização Físico-Química.....	23
3.2.1. Granulometria.....	24
3.2.2. Densidade Aparente.....	24

3.2.3. Densidade Real.....	24
3.2.4. Porosidade.....	25
3.2.5. Umidade.....	25
3.2.6. pH.....	25
3.2.7. Cinzas.....	26
3.2.8. Sólidos Solúveis (°brix).....	26
3.2.9. Açúcares Redutores e Redutores Totais.....	27
3.2.10. Lignina.....	28
3.2.11. Celulose.....	29
3.2.12. Extrativos.....	29
3.2.13. Isotermas de Adsorção de Umidade.....	29
3.3. Processo Fermentativo.....	30
3.3.1. Planejamento Experimental.....	30
3.3.2. Microrganismo e Inóculo.....	31
3.3.2.1. Microrganismo.....	31
3.3.2.2. Inóculo.....	33
3.3.3. Experimentos de Fermentação.....	34
3.4. Extração das Enzimas.....	35
3.5. Determinação da Atividade Enzimática.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Caracterização Físico-Química do Substrato.....	37
4.1.1. Umidade.....	38
4.1.2. pH.....	39
4.1.3. Sólidos Solúveis (°brix).....	40
4.1.4. Açúcares Redutores.....	40
4.1.5. Celulose.....	41
4.1.6. Lignina.....	41
4.1.7. Cinzas.....	41
4.1.8. Granulometria.....	42
4.2. Processo Fermentativo.....	43
4.2.1. Bagaço de Caju Lavado.....	44
4.2.2. Bagaço de Caju sem Lavar.....	53

4.3. Análise do Processo Fermentativo Utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.....	61
4.3.1. Bagaço de Caju Lavado.....	62
4.3.2. Bagaço de Caju sem Lavar.....	64
5. CONCLUSÕES.....	67
6. PERSPECTIVAS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
APÊNDICE.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da molécula de celulose.....	4
Figura 2 – Diversas unidades de açúcares.....	5
Figura 3 – Estruturas dos precursores majoritários da lignina.....	6
Figura 4 – Caju – (a) pseudofruto (pedúnculo) e (b) fruto (castanha).....	7
Figura 5 – Aspecto do bagaço de caju lavado (a) e sem lavar (b).....	23
Figura 6 – Isotermas de adsorção de umidade no bagaço de caju lavado (♦) e sem lavar (■), a 30°C.....	39
Figura 7 – Perfis granulométricos do bagaço de caju lavado e sem lavar.....	42
Figura 8 – Perfil cinético do processo fermentativo do bagaço de caju lavado para os ensaios do ponto central (♦ - Ensaio 5, ■ – Ensaio 6 e ▲ – Ensaio 7), com 55% de umidade em base úmida e 0,75% de fonte de nitrogênio ((a) pH, (b) Umidade, (c) Açúcares Redutores e (d) Atividade Enzimática (CMCase)).....	44
Figura 9 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma</i> sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 1 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).....	46
Figura 10 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma</i> sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 2 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).....	47
Figura 11 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma</i> sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 3 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).....	47
Figura 12 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma</i> sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 4 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).....	48
Figura 13 – Perfil cinético médio do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma</i> sp. em bagaço de caju lavado – Ensaios 5, 6 e 7 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).....	48
Figura 14 – Perfil cinético do processo fermentativo do bagaço de caju sem lavar para	53

os ensaios do ponto central (♦ - Ensaio 5, ■ - Ensaio 6 e ▲ - Ensaio 7), com 55% de umidade em base úmida e 0,75% de fonte de nitrogênio ((a) pH, (b) Umidade, (c) Açúcares Redutores e (d) Atividade Enzimática (CMCase))

Figura 15 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 1 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲))..... 55

Figura 16 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 2 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲))..... 56

Figura 17 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 3 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲))..... 56

Figura 18 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 4 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲))..... 57

Figura 19 – Perfil cinético médio do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaios 5, 6 e 7 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲))..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do pedúnculo do caju.....	8
Tabela 2 – Níveis do planejamento experimental.....	31
Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com três repetições no ponto central.....	31
Tabela 4 – Composição do meio básico.....	32
Tabela 5 – Caracterização físico-química do bagaço seco do caju.....	37
Tabela 6 – Resultados obtidos ao longo do processo fermentativo com o bagaço lavado para os ensaios do ponto central.....	45
Tabela 7 – Atividade enzimática máxima e produtividade obtidas para cada condição experimental com o bagaço lavado.....	52
Tabela 8 – Resultados obtidos ao longo do processo fermentativo com o bagaço sem lavar para os ensaios do ponto central.....	54
Tabela 9 – Atividade enzimática máxima e produtividade obtidas para cada condição experimental com o bagaço sem lavar.....	61
Tabela 10 – Dados de atividade enzimática e produtividade máxima para cada ensaio com o bagaço lavado.....	62
Tabela 11 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança sem o efeito da curvatura.....	62
Tabela 12 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança com o efeito da curvatura.....	63
Tabela 13 – Dados de atividade enzimática e produtividade máxima para cada ensaio com o bagaço sem lavar.....	64
Tabela 14 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança sem o efeito da curvatura.....	65
Tabela 15 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança com o efeito da curvatura.....	65

AMORIM, Beatriz Cavalcanti - Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium Orcidentalle* Lineu) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp. Dissertação de mestrado, UFCG, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente, Campina Grande/PB, Brasil.

RESUMO – Apesar da ampla utilização das celulases, o seu elevado custo tem tornado alguns processos onerosos. O pedúnculo do caju é um material lignocelulósico que apresenta uma estimativa de produção no Brasil em torno de 1,8 milhão de toneladas/ano concentrando-se basicamente na região Nordeste e com aproveitamento industrial de apenas 15 % do seu total. Dentro desse contexto, este trabalho teve por objetivo estudar a produção de celulase por fermentação semi-sólida do resíduo de caju utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp. Inicialmente, foi realizada uma caracterização físico-química do bagaço de caju e o levantamento da isoterma de adsorção de umidade do bagaço a uma temperatura de 30°C. Em seguida, estudou-se a fermentação semi-sólida do bagaço de caju para produção da enzima, utilizando-se da metodologia de planejamento fatorial do tipo 2² com três repetições no ponto central para avaliar a influência das variáveis dependentes, umidade inicial e concentração da fonte de nitrogênio, na atividade enzimática. O processo fermentativo foi desenvolvido para o bagaço de caju, lavado e sem lavar, utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp. com uma concentração de 10⁷ esporos/g, a uma temperatura de 30°C, com a umidade inicial variando de 45, 55 e 65% em base úmida, concentração da fonte de nitrogênio variando de 0,50, 0,75 e 1,00% e amostras foram coletas ao longo do processo para análises de pH, umidade, açúcares redutores e atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase, até um tempo de 73 horas. A caracterização físico-química mostrou que o bagaço de caju é um substrato viável para processo de produção da enzima celulase por apresentar condições favoráveis ao processo de fermentação com um pH ácido ideal para a produção de enzimas em fermentação semi-sólida com fungos (4,84 para o bagaço lavado e 3,94 para o bagaço sem lavar) e com uma fonte de carbono representada pelos açúcares redutores (0,31% para o bagaço lavado e 25,53% para o bagaço sem lavar) e pela celulose (22,75% para o bagaço lavado e 21,32% para o bagaço sem lavar). O planejamento experimental mostrou que o processo fermentativo foi reprodutivo tanto para o bagaço lavado como para o sem lavar por apresentarem coeficientes de variação menores que 10% nos experimentos realizados no ponto central. A maior atividade enzimática obtida para o bagaço lavado foi de 1,173 U/g em 42 horas de fermentação quando utilizou-se 45% de umidade inicial e 1,00% de adição de fonte de nitrogênio e para o bagaço sem lavar, a maior atividade enzimática foi de 1,896 U/g em 18 horas de fermentação quando utilizou-se 55% de umidade inicial e 0,75% de adição de fonte de nitrogênio. A produtividade atingiu maiores valores quando se utilizou 55% de umidade inicial e 0,75% de adição de fonte de nitrogênio tanto para o bagaço lavado como para o bagaço sem lavar, com valores de 0,064 U/g.h e 0,105 U/g.h, respectivamente.

Palavras-chave: celulase, bagaço do caju, fermentação semi-sólida.

AMORIM, Beatriz Cavalcanti - Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium Occidentalle* Lineu) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp. Dissertação de mestrado, UFCG, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente, Campina Grande/PB, Brasil.

ABSTRACT – Despite the widespread use of cellulases, their high cost has made some processes become expensive. The cashew apple is a lignocellulosic material which has an estimated production in Brazil around 1.8 million tons/year concentrating primarily in the Northeast and with industrial use of only 15% of its total. Within this context, this work aimed to study the production of cellulase by semisolid fermentation of cashew apple waste using microorganism *Trichoderma* sp. The first step was to perform a physical-chemical characterization of cashew bagasse and characterization of the moisture adsorption isotherm of bagasse at a temperature of 30°C. Then it was studied the semisolid fermentation of the cashew bagasse for production of the enzyme, using the design methodology of factorial type 2² with three replications at the central point to evaluate the influence of the dependent variables, initial moisture and concentration of nitrogen source on enzyme activity. The fermentation process was developed for the cashew bagasse, washed and unwashed, using the microorganism *Trichoderma* sp. with a concentration of 10⁷ spores/g at a temperature of 30°C with the initial moisture content ranging from 45, 55 and 65% in wet basis, nitrogen source concentration ranging from 0.50, 0.75 and 1.00% and samples were collected throughout the process in order to analyze the pH, moisture, reducing sugars and enzyme activity, expressed in carboxymethylcellulase until a time of 73 hours. The physical-chemical characterization showed that the cashew bagasse is a suitable substrate for the production process of the enzyme cellulase for presenting favorable conditions for the fermentation process with an acidic pH optimal for enzyme production in semisolid fermentation with fungi (4.84 for the washed bagasse and 3.94 for the unwashed bagasse) and a carbon source represented by reducing sugars (0.31% for the washed bagasse and 25.53% for the unwashed bagasse) and cellulose (22.75% for the washed bagasse and 21.32% for the unwashed bagasse). The experimental design showed that the fermentation process was reproductive for both washed bagasse as for the unwashed because they had coefficients of variation less than 10% for replications at the central point. The major enzyme activity obtained for the washed bagasse was 1.173 U/g in 42 hours of fermentation when it was used 45% of initial moisture and 1.00% of added nitrogen source and the unwashed bagasse, the highest activity enzyme was 1.896 U/g in 18 hours of fermentation when it was used 55% of initial moisture and 0.75% of added nitrogen source. The major productivity obtained for the washed and unwashed bagasse was when used 55% of initial moisture and 0.75% of added nitrogen source with 0.064 U/g.h and 0.105 U/g.h, respectively.

Palavras-chave: cellulase, cashew bagasse, semisolid fermentation.

1. INTRODUÇÃO

As celulasas são enzimas capazes de hidrolisar a ligação β -1,4-glicosídica da cadeia da celulose, que é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal. Os principais obstáculos à exploração em potencial da celulase são rendimento, estabilidade, especificidade e custos de produção (Md. *et al.*, 2008).

Essas enzimas têm uma ampla variedade de aplicações industriais, sendo utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, como componente de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal (Bhat & Bhat, 1997). Atualmente, as celulasas têm sido bastante aplicadas na produção de bioetanol durante a etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica para conversão da celulose em glicose.

Apesar da ampla utilização das celulasas, o seu elevado custo tem tornado alguns processos onerosos. Estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de produzir essa enzima através de um processo de fermentação semi-sólida em resíduos agroindustriais, diminuindo assim o custo de produção da enzima.

No Brasil, devido as suas características climáticas, existe abundância de matéria-prima a ser utilizada nos cultivos microbianos para a produção de enzimas. Além disso, há uma grande variedade e disponibilidade de recursos naturais renováveis, que podem ser transformados, enzimaticamente, em produtos de maior valor agregado, e de interesse industrial (Palma, 2003). Dessa forma, a utilização de matérias-primas de baixo custo na produção de celulasas pode ser uma forma de viabilizar economicamente processos que utilizam essa enzima (Ruggiero, 2002).

Os processos industriais, além do produto de interesse, geram múltiplas saídas de outros materiais em forma de resíduos e emissões não incorporadas no produto final que geralmente são aceitas como efeito normal no processo de fabricação. Porém, nos últimos anos têm se intensificado o aproveitamento de resíduos, especialmente os agroindustriais tais como, polpa e folhas de café, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, etc. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais na produção de álcool, enzimas e ácidos orgânicos, gerando produtos de grande valor econômico e atendendo à proposta ZERI “Zero Emissions Research Initiative”, que

estabelece uma mudança de paradigmas no conjunto das atividades econômicas, particularmente dos processos de produção industrial. Essa estratégia objetiva a transformação da matéria-prima em bens úteis sem danificar o meio ambiente, colocando os resíduos e emissões como insumos para outros produtos (Israel, 2005).

O pedúnculo do caju é um material lignocelulósico que apresenta uma estimativa de produção no Brasil em torno de 1,8 milhão de toneladas/ano, concentrando-se basicamente na região Nordeste, e com aproveitamento industrial de apenas 15% do total (Globo Rural, 2005). Na região Nordeste o aproveitamento industrial do caju é feito praticamente do fruto (a castanha) para produção de castanha comestível e em pequena escala do suco e derivados do pseudofruto (Globo Rural, 2005). Segundo Holanda & Oliveira (2001) a quantidade desperdiçada dessa matéria-prima representa um elevado potencial de uso para conversão por microrganismos em bioprodutos.

Uma das formas de agregar valor aos resíduos agroindustriais, em particular ao resíduo do caju, é obter enzimas, como, por exemplo, as celulases através da fermentação semi-sólida utilizando microrganismos como o agente metabolizador de açúcares e celulose.

A fermentação semi-sólida é o processo em que os microrganismos crescem sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo de líquido ligado a ela está em um nível de atividade de água que assegure o crescimento e o metabolismo das células sem exceder à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (Del Bianchi *et al.*, 2001). Devido aos baixos níveis de água nesse tipo de sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas atuais pesquisas, pois apresentam maior capacidade de crescimento em baixas quantidades de água livre, uma vez que se adaptam ao meio e excretam grandes quantidades de enzimas nestas condições.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande (UAEQ/CCT/UFCG) vem realizando pesquisas com o objetivo de desenvolver novas tecnologias que possam minimizar o desperdício de resíduos agroindustriais que são lançados no meio ambiente. Dentre os projetos em desenvolvimento nesse laboratório, um dos principais é intitulado Desenvolvimento de Bioprocessos para Agregação de Valor a Resíduos Industriais do Nordeste, que é desenvolvido por seis instituições nordestinas (UFC/CE, EMBRAPA/CE, UFCG/PB, UFPE/PE, UFRPE/PE e UFRN/RN), dentro da RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia. Dentre os

objetivos do projeto, estuda-se o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de enzimas celulolíticas a partir de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de caju.

1.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a produção de celulasas através de um processo de fermentação semi-sólida do resíduo agroindustrial do caju (bagaço) utilizando como agente metabolizador o microrganismo *Trichoderma* sp..

1.1.1. Objetivos Específicos

- Caracterização físico-química do bagaço seco do caju, lavado e sem lavar: granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade, umidade, pH, cinzas, sólidos solúveis, açúcares redutores e redutores totais, lignina, celulose e extrativos;

- Levantamento das isotermas de adsorção de umidade do bagaço seco do caju, lavado e sem lavar, na temperatura de 30°C;

- Fermentação do bagaço seco do caju, lavado e sem lavar, para produção de celulasas por meio de uma fermentação semi-sólida com o microrganismo *Trichoderma* sp. avaliando o pH, a umidade, a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase;

- Utilização da metodologia de planejamento fatorial do tipo 2² com três repetições no ponto central com a finalidade de observar a influência das variáveis independentes, umidade inicial e concentração da fonte de nitrogênio, nas variáveis respostas, atividade enzimática (carboximetilcelulase) e produtividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Materiais Lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos, na sua maioria, têm como principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lignina, apresentando baixo teor de nitrogênio. A proporção percentual dos componentes celulose, hemicelulose e lignina, bem como do teor de nitrogênio dependem do tipo de material, idade e estágio vegetativo (Rajarithnam *et al.*, 1992).

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

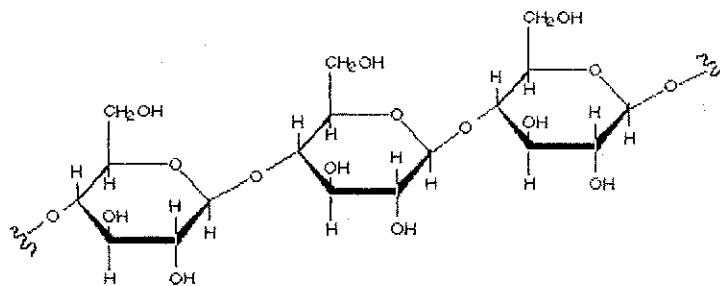


Figura 1 – Estrutura da molécula de celulose (Tavares, 2009).

As moléculas de celulose são completamente lineares e tem forte tendência para formar pontes de hidrogênio inter e intramoleculares. Feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas. Como consequência dessa

estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes.

Outro componente dos materiais lignocelulósicos, a hemicelulose, é um heteropolissacarídeo formado por cadeias ramificadas, compostas de hexoses, pentoses, ácido urônico e açúcares menores, facilmente hidrolisáveis. Essa molécula representa o segundo maior componente dos resíduos lignocelulósicos, chegando até 40% do seu peso seco (Rajarathnam *et al.*, 1992). O termo hemiceluloses se refere a polissacarídeos de massas moleculares relativamente baixas, os quais estão intimamente associados à celulose nos tecidos das plantas. Enquanto a celulose, como substância química, contém como unidade fundamental exclusivamente a β -glucose, as hemiceluloses são polímeros em cuja composição podem aparecer condensadas em proporções variadas de diversas unidades de açúcares como mostrado na Figura 2 (Morais *et al.*, 2005).

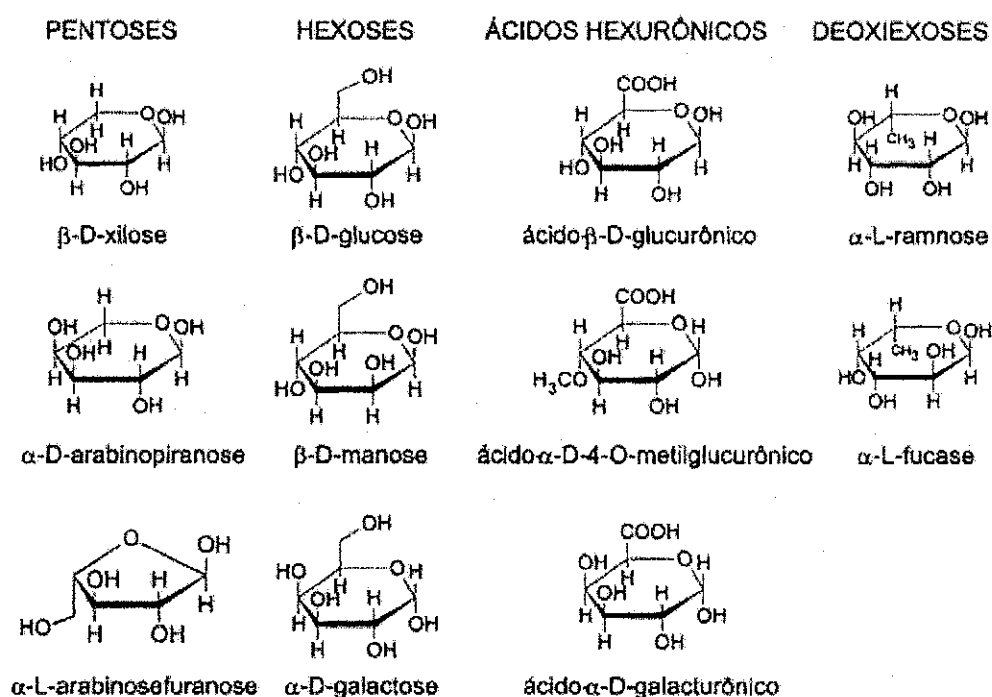


Figura 2 – Diversas unidades de açúcares (Tavares, 2009).

Observa-se, na Figura 2, que algumas unidades monoméricas possuem apenas cinco átomos de carbono, sendo denominadas pentoses, enquanto outras contam com seis deles, sendo, então, denominadas hexoses, gerando, assim, pentosanas (polímeros

formados pela condensação de pentoses) e hexosanas (polímeros formados pela condensação de hexoses), respectivamente.

Isoladas das madeiras, as hemiceluloses apresentam-se como misturas complexas de polissacarídeos, sendo os mais importantes as glucoxilanas, arabinoglucoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas. Portanto, o termo hemiceluloses não designa um composto químico, mas sim uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo, cada componente, propriedades peculiares. O teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses de madeira variam com a espécie e, provavelmente, também de árvore para árvore.

O terceiro componente mais importante dos resíduos agroindustriais, a lignina, é responsável, em parte, pela resistência mecânica das madeiras e funciona também como suporte para dispersão dos metabólitos excretados pelas células. Ela pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% do seu peso seco. Juntamente com a hemicelulose, envolve as fibras celulósicas, desempenhando as funções de cimentante e preservadora (Pauli, 1997). A lignina forma uma barreira física que dificulta a atividade de inúmeros organismos produtores de enzimas celulolíticas, limitando os sítios de ataques enzimáticos e impedindo a entrada de enzimas de maior peso molecular, devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa, restringindo o ataque à superfície externa (Rajarathnam *et al.*, 1992). A Figura 3 mostra as estruturas dos precursores majoritários da lignina que são: (a) álcool cumarílico, (b) álcool coniferílico e (c) álcool sinapílico.

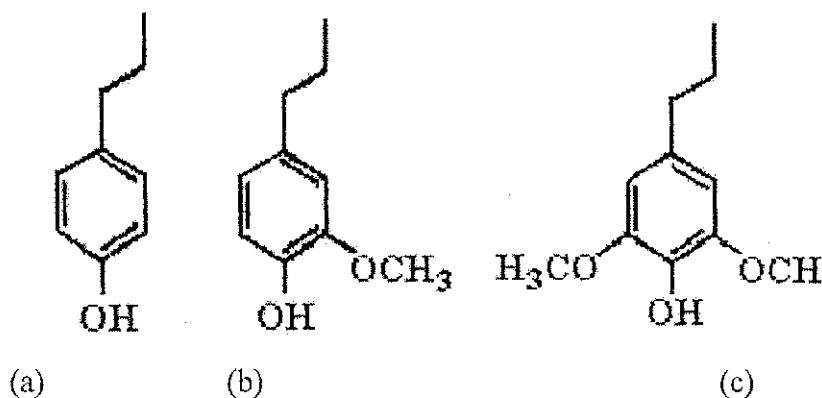


Figura 3 – Estruturas dos precursores majoritários da lignina (Saliba *et al.*, 2001).

2.1.1. Caju

O pedúnculo do caju, que possui alta concentração em material lignocelulósico é um dos diversos resíduos agroindustriais com potencialidade para serem utilizados em bioprocessos, segundo **Tonini (2004)**.

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família *Anacardiaceae*, e é uma planta perene, nativa do Brasil e sua exploração econômica é uma atividade relativamente nova, dos anos 1950 e 1960, a qual foi se espalhando em todo o território nacional (**Assessoria de Comunicação da Fundação do Banco do Brasil, 2007**). O caju é a segunda fruta com maior área plantada no Brasil, ocupando uma área de 704 mil hectares, perdendo para a laranja, que ocupa mais de 803 mil hectares e ganhando da banana, que ocupa aproximadamente 505 mil hectares.

No caju, o que se chama de fruta é na verdade o pedúnculo (Figura 4 (a)), ou seja, o taio que prende a fruta ao galho e que, estranhamente, no caju é carnudo, saboroso e aromático. Esta parte suculenta e refrescante é o pseudofruto do cajueiro chamado cientificamente pedúnculo floral e tem incontáveis usos e, embora alcance pouco valor no mercado externo, é muito apreciada no Brasil (**Vitor Hugo de Oliveira/EMBRAPA, 2008**). O fruto propriamente dito é o que se chama de castanha de caju (Figura 4 (b)), cuja produção é a principal finalidade das lavouras. O fruto do cajueiro (a castanha) é definido como um aquênio reniforme pendente do pedúnculo floral, e é constituído de três partes: a casca, a película e a amêndoa (**Faria, 1994**).

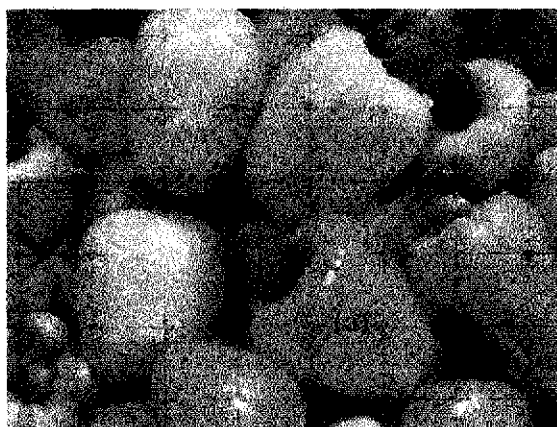


Figura 4 – Caju – (a) pseudofruto (pedúnculo) e (b) fruto (castanha) (**Tavares, 2009**).

O caju é um material que apresenta uma estimativa de produção no Brasil em torno de 1,8 milhões de toneladas/ano concentrando-se basicamente na região Nordeste e com aproveitamento industrial, de apenas 15 % (Globo Rural, 2005).

Na região Nordeste o aproveitamento industrial do caju é feito praticamente do fruto (a castanha) para produção de castanha comestível e em pequena escala do suco e derivados do pseudofruto (Embrapa, 2004; Globo Rural, 2005). Segundo Holanda & Oliveira (2001) a quantidade desperdiçada representa um elevado potencial de uso para conversão por microrganismos em bioprodutos.

Os componentes presentes no pedúnculo variam em função da variedade, do estado de maturação, do tamanho, da duração da colheita e de variações ambientais regionais, entre outros fatores. A Tabela 1 apresenta a composição química do pseudofruto do caju, o pedúnculo suculento, segundo Vitor Hugo de Oliveira/EMBRAPA (2008).

Tabela 1 – Composição química do pedúnculo do caju.

Discriminação	Valores médios
Umidade (%)	86
°brix	11
pH	4,2
Açúcares redutores (%)	7,9
Açúcares totais (%)	8,4
Acidez total (%)	0,36
Ácido ascórbico (mg/100g)	204
Taninos (%)	0,35
Cálcio (mg/100g)	14,5
Fósforo (mg/100g)	33
Ferro (mg/100g)	0,36
Proteínas (%)	0,74
Vitamina A (U.I.)	11,32
Cinzas (%)	0,38

Uma das formas de agregar valor aos resíduos agroindustriais, em particular ao resíduo do caju, é obter enzimas, como por exemplo, as celulases através da fermentação semi-sólida utilizando microrganismos como agente metabolizador de carboidratos.

2.2. Enzimas Celulolíticas

As celulases são enzimas capazes de hidrolisar a ligação β -1,4-glicosídica da cadeia da celulose, que é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal. Os principais obstáculos à exploração em potencial da celulase são rendimento, estabilidade, especificidade e custos de produção (Md. *et al.*, 2008).

2.2.1. Classificação das Celulases

De acordo com Gilkes *et al.* (1991), as celulases são descritas como um grupo complexo de enzimas com ação sinérgica e que reúne-se em:

Endoglicanases (EC 3.2.1.4): são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações β -1,4 em D-glicanas que contenham ligações β -1,3. As endoglicanases são também conhecidas como celulases, endo β -1,4 glicanases e carboximetilcelulases. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel (celulose cristalina), β glicana e xilana.

Celulose beta-1,4-celobiosidase (EC 3.2.1.91): conhecida também como exoglicanase, celobiohidrolase, β -1,4 celobiohidrolase ou Avicelase. Catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias.

β -glicosidase (EC 3.2.1.21): conhecida como gentobiase, celobiase e amígdalase, catalisa a hidrólise de resíduos β -D-glicose terminais não redutores, liberando β -D-glicose. Apresenta ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -D-galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilosídeos e β -D-fucosídeos.

β -1,3(4)-endo-glicanase (EC 3.2.1.6): conhecida também como β -1,4-endoglicanase, β -1,3 endoglicanase ou laminarinase, esta enzima catalisa a hidrólise interna de ligações β -1,3 ou β -1,4 em da glicose D-glicanas. Tem como substrato a laminarina, lichenina e D-glicana. É uma enzima diferente de glicana β -1,3-endo-Dglicosidase (EC 3.2.1.39), embora ambas hidrolisem o substrato laminarina.

2.2.2. Aplicações das Celulases

As celulases têm uma ampla variedade de aplicações industriais, sendo utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, como componente de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal (Bhat & Bhat, 1997).

A partir de 1980, as celulases foram introduzidas na indústria têxtil e de detergentes, passando a ser um importante componente do mercado mundial de enzimas, e vêm sendo usadas também, muito eficientemente, em detergentes enzimáticos biodegradáveis (Mitidieri *et al.*, 2002).

Essas enzimas são usadas em vários processos da indústria alimentícia, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Orberg, 1981).

Atualmente, as celulases tem sido bastante aplicada na produção de bioetanol durante a etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica para conversão da celulose em glicose que se trata de um açúcar diretamente fermentescível pela levedura de produção do etanol.

2.2.3. Produção das Celulases por Ação Microbiana

A produção de celulases por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos com o objetivo de estabelecer as melhores condições para a produção dessas enzimas. Nesse processo de produção da enzima, um microrganismo é utilizado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes em um meio de cultivo, de forma que as

enzimas são sintetizadas e excretadas. Uma vasta gama de microrganismos tem sido estudada extensivamente de forma a tornar o processo de produção da enzima viável (Tavares, 2009).

Alguns estudos sobre parâmetros para obter o máximo rendimento das enzimas celulase por fermentação vêm sendo desenvolvidos e percebe-se que a temperatura e o pH são considerados como os parâmetros que mais afetam o processo, juntamente com a utilização de indutores adequados a este respeito (Muhammad *et al.*, 2009).

Na forma nativa a celulose é composta por longas fibras cristalinas unidas por pontes de hidrogênio, e dessa forma, todos os organismos capazes de degradar o cristal de celulose secretam, em maior ou menor quantidade, complexo multienzimático que possuem sinergismo e mecanismos diferentes de atuação durante a hidrólise da celulose (Beguin, 1990).

Muitos substratos são utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos (Vitti, 1988; Silva & Dillon, 1988). Os resíduos agroindustriais podem ser devidamente moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, em uma fermentação (Da Silva *et al.*, 1994). Na maioria dos casos, o simples enriquecimento destes compostos com fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de elevada atividade enzimática (Bisaria & Ghose, 1981; Elisashvili, 1993).

A resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e do tipo do indutor, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de enzimas celulolíticas têm duas funções, podem servir como fonte de carbono para o crescimento celular, e como indutores da síntese enzimática (Gong & Tsao, 1975).

2.3. Fermentação Semi-Sólida

A fermentação semi sólida (FSS) é o processo em que os microrganismos crescem sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo de líquido ligado a ela está em um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das células sem exceder à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (Del Bianchi *et al.*, 2001).

Tanto o processo de fermentação semi-sólida quanto o de fermentação submersa apresentam características importantes, sendo necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de produto desejado e, principalmente, o grupo de microrganismos a ser utilizado.

O processo de fermentação semi-sólida tem se mostrado muito promissor no desenvolvimento de vários produtos como enzimas (Castilho, 1997; Couri, 1993; Martin, 2006; Santos, 2007); ácidos orgânicos (Rodrigues *et al.*, 2007); aromas (Uenojo, 2003) e bioherbicidas (Moraes *et al.*, 2007). Os estudos sobre esse tipo de fermentação têm-se intensificado por algumas de suas vantagens: suas necessidades são satisfeitas com menor infra-estrutura e recursos humanos qualificados relativamente menores e utilizam-se matérias-primas mais baratas para a produção enzimática. Todas estas vantagens aumentam a economia deste tipo de fermentação para a produção da enzima. Industrialmente, uma das vantagens mais importantes é que na fermentação semi-sólida, obtém-se um produto concentrado, o que no caso de produção de bioetanol, é muito vantajoso (Rajeev *et al.*, 2009).

Algumas características da fermentação semi-sólida são: alta produtividade, alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia. Por outro lado, apresentam dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Nesse tipo de processo, o principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba favorecendo o uso de fungos filamentosos no processo, devido os mesmo se adaptarem bem a essa condição (Pandey *et al.*, 1999).

Os processos de fermentação semi-sólida necessitam de uma seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um microrganismo específico e controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita (Gutierrez-Correa & Tengerdy, 1997).

Os principais fatores que afetam a síntese microbiana de enzimas em um sistema de fermentação semi-sólida incluem: seleção de um substrato satisfatório e microrganismo; pré-tratamento do substrato; tamanho de partícula (espaço inter-partícula e área superficial) do substrato; umidade e atividade de água (a_w) do substrato; temperatura da fermentação; período de cultivo; manutenção de uniformidade no ambiente do sistema em fermentação semi-sólida e taxa de consumo de oxigênio (Pandey *et al.*, 1999).

2.3.1. Umidade e Atividade de Água

O teor de umidade do substrato é um dos fatores que mais afetam o crescimento microbiano e a formação de produto, pelo fato de determinar a quantidade de água inicial disponível para o microrganismo e por fazer com que o substrato se dilate, facilitando assim, a penetração do micélio para a utilização do substrato (Murthy *et al.*, 1993).

No caso em que o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo de porosidade do substrato e irá resultar em uma menor difusão de oxigênio no interior do meio e conseqüentemente decréscimo de trocas gasosas, além de aumentar o risco de contaminação, principalmente a bacteriana. E quando a umidade for baixa, haverá maior dificuldade na difusão de nutrientes, resultando em um crescimento do microrganismo menor do que o possível e esperado e, conseqüentemente, com menor produção do produto desejado (Losane *et al.*, 1985).

O requerimento de água pelo microrganismo deve ser definido em termos de atividade de água do meio em lugar da umidade do substrato sólido (Doelle, 1996). A atividade de água (a_w) do meio é o parâmetro que fornece a quantidade de água não ligada viável à disposição dos microrganismos (Ramana *et al.*, 1993).

Cada microrganismo tem um nível de a_w mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas e em termos gerais, os fungos possuem uma atividade de água mínima de 0,7 (Leitão, 1997).

O estudo da atividade de água pode ser feito através de isotermas de sorção (dessorção e adsorção), que permitem a determinação do valor de água ligada no substrato na monocamada. Essas isotermas de sorção podem ser representadas graficamente uma relação entre a umidade de equilíbrio expressa em massa de água por unidade de massa de matéria seca com sua atividade de água à temperatura constante. As isotermas podem ser de adsorção, onde o material passa pelo processo de umidificação, ou de dessorção, processo pelo qual ocorre a secagem do material (Fennema, 1996).

O controle da umidade na fermentação semi-sólida pode ser utilizado para modificar a produção e excreção de metabólitos (Pandey, 1992). O metabolismo dos microrganismos é fortemente influenciado pelas condições de atividade de água e

através do seu controle, pode-se regular a fermentação e formar condições favoráveis para a biossíntese do produto desejado (Pandey *et al.*, 2001).

2.3.2. pH

Durante um processo de fermentação semi-sólida, o controle do pH é um dos fatores mais críticos, dificilmente sendo conseguido devido à heterogeneidade e à consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (Losane *et al.*, 1985).

O pH é um fator importante em qualquer processo biológico, havendo valores mínimo, ótimo e máximo de pH para o desenvolvimento de cada microrganismo. De acordo com Franco *et al.* (2001), o pH em torno da neutralidade (entre 6,5 e 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos. Ainda comenta que os bolores podem se multiplicar em valores de pH mais baixos que as leveduras, sendo estas mais tolerantes que as bactérias a valores baixos de pH.

O pH de um cultivo varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do microrganismo. Quando ácidos orgânicos são secretados, como ácidos acético ou láctico, causam o decréscimo do pH. Entretanto, o consumo destes ácidos quando presente no meio causa o aumento do pH. A utilização de fonte de nitrogênio causa variação de pH: com sais de amônia o pH geralmente decresce durante o crescimento celular, devido a formação do íon hidrogênio durante o consumo da amônia e quando nitrato serve de fonte de nitrogênio o pH tende a subir (Doelle, 1996).

Xiong *et al.* (2004) estudaram a produção de celulasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 e relataram que houve uma correlação entre o pH inicial do meio e picos de celulase. A maior produção da enzima ocorreu quando o pH do meio contendo lactose foi ajustado para 4,0 - 4,5. Este estudo sugere também que o pH ácido do meio induz a produção de celulasas.

2.3.3. Temperatura

Em processos de fermentação semi-sólida, a temperatura é um fator crítico devido ao acúmulo do calor gerado pelas atividades metabólicas. Nesse tipo de processo, além da dificuldade de mistura no meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura (Pinto *et al.*, 2006). Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos microrganismos bem como a formação do produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada (Del Bianchi *et al.*, 2001).

Existe uma temperatura mínima, abaixo da qual o microrganismo não se desenvolve, uma temperatura ótima na qual o crescimento microbiano é máximo e uma temperatura máxima, acima da qual não há crescimento microbiano. A grande maioria dos microrganismos é mesófila, ou seja, a temperatura ótima de multiplicação ocorre entre 25 e 40°C.

2.3.4. Aeração

O fator aeração é de grande importância em processos de fermentação semi-sólida, pois o desenvolvimento microbiano requer um grande consumo de oxigênio, logo a passagem de ar através do meio permite elevadas taxas de crescimento e produtividade (Pinto *et al.*, 2006).

De acordo com Correia (2004), a aeração cumpre funções básicas nesse tipo de processo como: manter condições aeróbicas, eliminar o dióxido de carbono formado, regular a temperatura do substrato e ajustar o nível de umidade.

2.3.5. Tamanho das Partículas

Segundo Mitchell *et al.*, 2000, o tamanho e a forma da partícula afetam a relação área superficial e o seu volume, bem como o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas. De acordo com esse autor, o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. No geral, partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Porém,

uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato que pode interferir na respiração microbiana e podendo resultar em pouco crescimento. Ao contrário, partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, mas limitam a superfície para ataque microbiano (Pandey *et al.*, 1999).

2.3.6. Pré-Tratamento

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

Na produção de celulasas, o tratamento que tem sido bastante avaliado é a hidrólise ácida ou alcalina do material celulósico buscando remover a lignina presente no substrato para facilitar a síntese da enzima. Aguiar e Menezes (2000) avaliaram o processo de produção de celulasas e xilanases em bagaço de cana sob três formas: a primeira foi o bagaço de cana sem pré-tratamento, a segunda foi o bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio a 4% e a terceira foi o bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio 4%, ácido fosfórico PA e vapor. Os autores perceberam que a produção de endoglicosidade não sofreu influencia dos pré-tratamentos e que o pré-tratamento com hidróxido de sódio a 4% promoveu maior indução de síntese de celulase total.

2.3.7. Microrganismo

Devido aos baixos níveis de água em sistemas de fermentação semi-sólida, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas atuais pesquisas, pois apresentam maior capacidade de crescimento em baixas concentrações de água livre, uma vez que se adaptam-se ao meio e excretam grandes quantidades de enzimas nestas condições. Nesse tipo de fermentação, o crescimento acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento determinadas pela disponibilidade dos nutrientes, bem como pelas características do substrato (Losane *et al.*, 1985). As hifas crescem ao longo da superfície da partícula sólida úmida utilizando o filme líquido como fonte de umidade e nutrientes e os poros do substrato como espaço para o crescimento em busca de novos nutrientes.

Para fungos filamentosos, as condições de crescimento em fermentação semi-sólida se aproximam mais do habitat natural que as observadas em meios de cultura submersos. Desta forma, estes tipos de microrganismos são capazes de produzir e excretar grandes quantidades de enzimas (Castilho *et al.*, 2000).

De acordo com Pinto (2003), o próprio modo de crescimento dos fungos gera uma vantagem sobre os microrganismos unicelulares. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas hifas permitem aos fungos uma rápida colonização em substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. De forma coordenada ao crescimento, os metabólitos excretados pelo microrganismo permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes.

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas (Novo Nordisk, 1996; Menezes, 1997) e os principais celulolíticos produtores de celulasas e xilanasas incluem: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporium lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Aspergillus* sp., *Schizophyllum* sp., *Chaetomium* sp. (Bisaria & Ghose, 1984) e *Humicola* sp. (Da Silva *et al.*, 1994). Algumas leveduras como as do gênero *Trichosporium* sp. também são produtoras de

xilanases e celulasas, assim como diversas espécies de *Aspergillus* produzem altos níveis de β -glicosidase (Stevens & Payne, 1977).

Segundo Bigelis (1993), celulasas produzidas por *Aspergillus niger* podem ser utilizadas em usos alimentícios e produzidas por *Trichoderma viride* devem ser utilizadas para aplicações não alimentícias, embora ambas possam cumprir muitas tarefas.

2.3.8. Inóculo

É necessário otimizar a concentração de inóculo nas fermentações semi-sólida, uma vez que uma baixa concentração de inóculo pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e formar pouca biomassa. Por outro lado, um inóculo com elevada concentração de esporos pode exaurir o meio para a formação de biomassa, reduzindo a quantidade de produto desejado. Caso se deseje a produção de biomassa é recomendado o emprego de inóculo elevado para evitar contaminantes, no entanto, deve-se ter cuidado para não elevar muito o custo de produção com a preparação de inóculo (Mudgett citado por Perazzo Neto, 1999).

2.3.9. Substrato

O meio de cultura em um processo de fermentação semi-sólida é um fator tão importante quanto os citados anteriormente. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas e para os diferentes substratos (Bravo *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, estudos vêm mostrando que os resíduos agroindustriais são adequados para processos de fermentação semi-sólida, como por exemplo, a produção de enzimas. A escolha de um substrato para esta finalidade depende de vários fatores, principalmente relativo ao custo e disponibilidade, envolvendo assim diversos destes resíduos (Pandey *et al.*, 1999).

Em processos de fermentação semi-sólida, o material sólido atua como fonte de nutrientes para a cultura de microrganismos e também como suporte para as células

(Pandey, 2003). Segundo Pinto *et al.* (2006) farelos, cascas, bagaços de frutas da agroindústria (maça, maracujá, pedúnculo de caju) e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação, entretanto, em alguns casos, muitos substratos sólidos são complementados com fontes solúveis de nitrogênio durante a sua preparação, já que o nitrogênio é um nutriente importante no desenvolvimento microbiano (Mitchell *et al.*, 2000). Além do nitrogênio, outras fontes de nutrientes precisam estar presentes no substrato como a glicose, a sacarose, a maltose, e ainda outros compostos orgânicos mais complexos, por exemplo, amido e celulose (Pelczar *et al.*, 1980).

Gong & Tsao (1975) observaram que indutores da síntese de celulasas incluem celulose, derivados de celulose, celobiose, soforose e lactose. A resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo do indutor, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de enzima celulolítica têm duas funções, ou seja, podem servir como fonte de carbono para o crescimento celular, ou mesmo como indutores da síntese enzimática.

2.4. Trabalhos Desenvolvidos para Produção de Celulasas

Gupta & Madamwar (1997) estudaram uma cultura mista de *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* desenvolvida em bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de cálcio a 2% e perceberam que esse processo foi favorável à produção de celulase e β -glicosidase, após 8 dias de fermentação.

Abdelnasser *et al.* (1997) testaram três fungos: *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6361 e *Coriolus versicolor* NRRL 6102, quanto às suas capacidades de produzir xilanase e celulase, em resíduos agrícolas (bagaço de cana tratado e não tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó) e perceberam que espigas de milho, palha de trigo e bagaço de cana tratado promoveram maior indução enzimática.

Estudos de atividade celulolítica utilizando o fruto da palma em fermentação em estado sólido apresentaram a maior atividade de celulase com 8,2 FPA/g após quatro dias de fermentação. Segundo os autores, os resultados indicaram que a atividade celulolítica começou a diminuir após 4 dias e continuou um declínio gradual até o

último dia de fermentação (15 dias). Essa diminuição na atividade de celulase pode ser atribuída ao efeito cumulativo de oligossacarídeos especialmente celobiose, um dímero de glicose, que é conhecido por inibir tanto endoglucanase como β -glicosidase (Md. *et al.*, 2008).

Joglekar & Karanth, citados por Vitti (1988), verificaram que o desenvolvimento de *Penicillium funiculosum* UV49 em algodão, papel de filtro, bagaço de cana e carboximetil celulose foi pequeno e a atividade celulolítica baixa. Porém Dekker, citado por Vitti (1988), observou que as celuloses que não são facilmente hidrolisadas pelas celulases, como Avicel, algodão, celulose em pó e carboximetil celulose parecem ser os melhores substratos para induzir a formação de celulase.

Uma linhagem de *Chaetomium globosum* apresentou bom crescimento e substancial quantidade de celulase em fibras deslignificadas de palma, produzindo extrato celulolítico cujas atividades de celulase total, endoglicanase e β -glicosidase foram 1,4, 30,8 e 9,8 UI/mL, respectivamente (Umikalsen *et al.*, 1997).

Segundo Gutierrez-Correa & Tengerdy (1997) o bagaço de cana, em cultura mista de *Trichoderma reesei* LMUC4 e *Aspergillus phoenicis*, induziu a produção de celulase total atingindo 13,4 UI/g, após 120 horas de incubação a 30°C.

Aguar & Menezes (2000) avaliaram a produção de celulases e xilanases de *Aspergillus niger* IZ9, crescido sobre bagaço de cana, quimicamente tratado, como substrato. O bagaço de cana foi utilizado de três formas: na primeira, o bagaço foi utilizado sem tratamento, na segunda, o bagaço foi tratado com uma solução de hidróxido de sódio a 4%, e na terceira, o bagaço foi tratado com uma solução de hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico PA e vapor. A produção das enzimas celulolíticas (celulase total, endoglicanase e β -glicosidase) e xilanases foi observada nas três formas em que o bagaço foi utilizado. O tratamento com solução de hidróxido de sódio a 4% promoveu maior indução de síntese da maioria das enzimas, com exceção de β -glicosidase, a qual apresentou produção semelhante para os bagaços tratados quimicamente. Para a endoglicosidase percebeu-se que as atividades enzimáticas obtidas para o bagaço sem tratamento e com os dois tratamentos químicos, não apresentaram diferenças significativas apesar de o teor de lignina serem diferentes.

O estudo da produção da enzima celulase empregando *T. reesei* Rut C-30 em farelo de trigo, quimicamente tratado, como substrato, demonstrou níveis apreciáveis de

atividade de endoglucanase (0,45 U/mL) através do método CMCase (Rajeev *et al.*, 2009).

Victor *et al.* (2003) obtiveram 0,0743, 0,0573 e 0,0502 UI/mL de celulase dentro de 120h de fermentação quando serragem, bagaço de cana e sabugo de milho, respectivamente, foram utilizadas como substratos a partir de uma cepa de *Aspergillus flavus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, no Laboratório de Controle Biológico (LCB) da Embrapa Semi-Árido e no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sertão Pernambucano.

As metodologias empregadas ao longo dos experimentos foram baseadas em estudos anteriormente realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande. Neste laboratório tem sido desenvolvidas diversas pesquisas utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima em fermentações semi-sólidas tais como: produção de enriquecidos nutricionais para ração animal com cactáceas como a palma forrageira e o mandacaru sem espinho e a produção de enzimas pectinolíticas a partir de bagaços como o de caju e de maracujá.

3.1. Preparo do Substrato

O resíduo agroindustrial utilizado foi o resíduo do pedúnculo do caju que foi cedido pela indústria de produção de polpas de frutas, FRUTNAT, localizada na cidade de Campina Grande, Paraíba.

O substrato utilizado no estudo da produção das celulases deste trabalho foi tratado de duas formas diferentes: lavado e sem lavar. Para o bagaço sem lavar (Figura 5 (b)), o resíduo agroindustrial cedido pela indústria de polpas de frutas foi submetido a um processo de secagem em um secador de leito fluidizado a uma temperatura de 55°C e com uma velocidade de secagem de aproximadamente 1 m/s até atingir massa constante, processo este que durou aproximadamente 5 horas. Após atingir massa constante, o resíduo foi colocado em um dessecador, até atingir a temperatura ambiente e foi então moído em um moinho de facas. Por fim, todo o bagaço sem lavar foi homogeneizado, dividido em sacos plásticos do tipo ZIP-PLOT e armazenado em estojo térmico contendo sílica gel até o momento de ser utilizado.

Para o bagaço lavado (Figura 5 (a)) o processo foi semelhante ao bagaço sem lavar, mas nesse caso, o resíduo cedido pela indústria de polpas de frutas foi submetido a um processo de lavagem com água destilada até que todos os sólidos solúveis, presentes no bagaço, remanescentes do processo de beneficiamento industrial do caju fossem removidos, o que foi constatado através da análise do °brix do lixiviado do processo de lavagem. Em seguida, o resíduo foi submetido ao mesmo processo de secagem, moagem e armazenamento que o bagaço sem lavar. O processo de lavagem do resíduo do caju teve como objetivo remover todos os açúcares contidos no substrato para avaliar a sua influência no processo de produção das celulases.

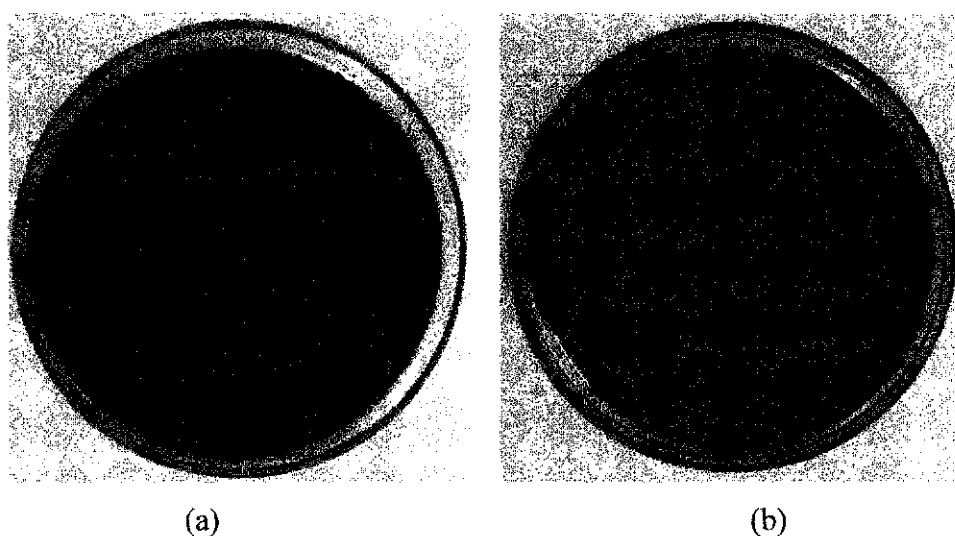


Figura 5 – Aspecto do bagaço de caju lavado (a) e sem lavar (b).

O material utilizado nesse estudo foi amostrado segundo o método do quartejamento, de acordo com a NP-1379 (NP, 1976). O material foi vagorosamente misturado para evitar compactação das partículas menores, e então amontoado em forma de cone. O monte em cone foi achatado e dividido em quatro partes iguais, sendo recolhidas duas partes diagonalmente opostas que constituíram a amostra reduzida. Este processo foi repetido até obter a quantidade de material necessária para as análises.

3.2. Caracterização Físico-Química

A caracterização físico-química do bagaço do caju foi realizada tanto para o bagaço lavado quanto para o bagaço sem lavar, em triplicata, e foi feita quanto a

granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade, umidade, pH, cinzas, sólidos solúveis, açúcares redutores e redutores totais, lignina, celulose e extrativos, de acordo com as metodologias descritas ao longo deste capítulo.

3.2.1. Granulometria

O perfil granulométrico do bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinado pesando 50 g do bagaço em uma balança analítica, e transferindo para um agitador de peneiras PRODUTEST na frequência 50 rpm por treze minutos, em jogo constituído por sete peneiras, seguindo as recomendações da NBR – 7181 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1984): 14 mesh (1,180 mm), 20 mesh (0,850 mm), 24 mesh (0,710 mm), 35 mesh (0,425 mm), 42 mesh (0,355 mm), 65 mesh (0,212 mm) e 115 mesh (0,125 mm). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos percentualmente em relação ao peso da amostra analisada.

3.2.2. Densidade Aparente

A densidade aparente do material foi determinada seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005), na qual foram pesados 100 g (m_A) do material e em seguida colocados em uma proveta, sem que houvesse compactação, para determinar o volume ocupado (V). O valor da densidade aparente foi obtido seguindo a Equação 1.

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

3.2.3. Densidade Real

A densidade real do bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinada a partir da relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra, através do deslocamento de um fluido de volume conhecido, que nesse caso foi o óleo de cozinha. Inicialmente colocou-se o óleo em uma proveta e mediu-se o volume ocupado (V_1), em seguida adicionou-se uma massa conhecida do bagaço (m_A) e esperou-se que a mesma se depositasse totalmente no fundo da proveta. Por fim, mediu-se novamente o volume

indicado na proveta (V_2), e o volume real do material em análise foi determinado pela diferença dos volumes ($V_2 - V_1$). O cálculo da densidade real foi determinada pela Equação 2.

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

3.2.4. Porosidade

A porosidade do material foi determinada seguindo a metodologia descrita por **Keyy (1991)**, como mostrado na Equação 3.

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

3.2.5. Umidade

A determinação da umidade do material foi realizada seguindo-se a metodologia descrita em **Brasil (2005)**. Para o desenvolvimento da metodologia foram pesados 3 g do material (m_A) em um cadinho de porcelana previamente seco e tarado. Em seguida, levou-se as amostras para uma estufa sem circulação forçada de ar a uma temperatura de 105°C até atingir massa constante. Após a secagem, o material foi colocado em um dessecador no qual permaneceu até resfriamento total da amostra e por fim, pesou-se a amostra seca (m_s). A umidade, em base úmida, foi determinada seguindo a Equação 4.

$$U_{BU} (\%) = \frac{m_A - m_s}{m_A} \times 100 \quad (4)$$

3.2.6. pH

O pH do bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinado seguindo a metodologia descrita em **Brasil (2005)**, na qual foi preparada uma suspensão de 2 g de

amostra com 20 mL de água destilada. Após completa homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e em seguida o pH foi medido diretamente em um potenciômetro digital.

3.2.7. Cinzas

O teor de cinzas contidos no bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinado seguindo a metodologia descrita em **Brasil (2005)**. Para o desenvolvimento da metodologia, um cadinho de porcelana foi colocado em uma mufla a uma temperatura de 550°C por aproximadamente 5 horas. Após esse tempo, o cadinho foi colocado em um dessecador até total resfriamento e pesado. Em seguida, colocou-se no cadinho aproximadamente 3 g do material a ser analisado (m_A) e levou-o para uma estufa a 105°C até atingir massa constante. Após as 24 horas, o cadinho foi levado para a mufla por 5 horas, colocado para esfriar em um dessecador e pesado. O cadinho foi levado novamente para a mufla por 30 minutos e repetiu-se o procedimento de pesagem até que a amostra atingisse massa de cinzas constante (m_C). O teor de cinzas foi calculado seguindo a Equação 5.

$$\text{Cinzas(\%)} = \frac{m_C}{m_A} \times 100 \quad (5)$$

3.2.8. Sólidos Solúveis (°brix)

O teor de sólidos solúveis contidos no bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinado seguindo a metodologia descrita em **Brasil (2005)**, na qual uma amostra de 1 g foi misturada a um volume de água destilada (F_D) que fornecesse uma leitura que estivesse dentro de uma faixa linear. Após completa homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e filtrada em gaze e algodão. Por fim, foi realizada a leitura do °brix em um refratômetro de Abbe e o teor de sólidos solúveis do material em análise foi determinado multiplicando a leitura do equipamento pelo fator de diluição, seguindo a Equação 6.

$$^{\circ}\text{brix} = \text{Leitura}(\%) \times F_D \quad (6)$$

3.2.9. Açúcares Redutores e Redutores Totais

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

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

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

A concentração de açúcares redutores totais foi determinada seguindo a metodologia descrita em Somogy-Nelson (**Demiate et al., 2002**) adaptado por **Correia (2004)**. Para o desenvolvimento da metodologia, realizou-se uma hidrólise ácida no extrato de açúcares, colocando em um tubo de ensaio 1 mL do extrato de açúcares com 1 mL de ácido clorídrico a 2 N e levando à fervura por exatos 5 minutos. Em seguida, o hidrolisado foi resfriado em água fria e neutralizado com um volume de hidróxido de sódio a 1 N, o que gerou um fator de diluição do extrato de açúcares devido à hidrólise e à neutralização (F_H). Por fim, seguiu-se o mesmo procedimento que foi utilizado para a análise de açúcares redutores (**Miller, 1959**), colocando 1 mL do hidrolisado no lugar de 1 mL do extrato de açúcares.

Os resultados de açúcares redutores e redutores totais foram expressos em gramas de açúcares redutores e redutores totais por grama de amostra analisada, seguindo as Equações 7 e 8.

$$AR(g_{AR} / g_A) = \frac{\text{Absorbância} \times F_C \times 10 \times V_A}{m_A \times 1000} \quad (7)$$

$$ART(g_{ART} / g_A) = \frac{\text{Absorbância} \times F_C \times 10 \times V_A}{m_A \times 1000} \times F_H \quad (8)$$

3.2.10. Lignina

O teor de lignina presente no bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinado seguindo a metodologia descrita por **Milagres et al. (1994)**. Para o desenvolvimento da metodologia, pesou-se 10 g da amostra, sendo envolto em papel de filtro e deixado num sistema de banho, utilizando ciclo-propano e álcool etílico, por aproximadamente 6 horas. Em seguida, o bagaço foi seco em estufa durante 24 horas. Da amostra lavada e seca, foi pesado 2 g e posto em um erlenmeyer de 250 mL adicionando 15 mL de H₂SO₄ (72%), mantendo-o sob agitação durante 2 horas. Após esse tempo a pasta negra foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 1 litro de um sistema de refluxo, utilizando 560 mL de água destilada e deixando refluxar por 4 horas.

A lignina insolúvel (L_I) foi filtrada empregando um cadinho de Gush, com kitassato, acoplado a uma bomba de vácuo, sendo posteriormente seca e pesada.

A lignina solúvel (L_S) foi determinada medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 280 e 215 nm do filtrado e o cálculo é feito com base na Equação 9.

$$L_I (g/L) = \frac{4,53(\text{Absorbância}_{215nm} - \text{Absorbância}_{245nm})}{300} \quad (9)$$

O teor de lignina total na amostra analisada é determinada pela soma da lignina insolúvel, após transformação de unidade de concentração para unidade de massa, e lignina solúvel, como mostrado na Equação 10.

$$L_T(g) = L_I + L_S \quad (10)$$

3.2.11. Celulose

O teor de celulose contido no bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinado conforme a metodologia descrita por **Xu et al. (2006)**. Para o desenvolvimento da metodologia, isolou-se a celulose do bagaço utilizando-se uma mistura de ácido acético a 80% com ácido nítrico a 70% na proporção de 10:1 (v/v). A amostra foi então digerida por 20 minutos em uma manta aquecedora à temperatura de 110 a 120°C sendo adicionado hidróxido de sódio para precipitação da celulose. O precipitado foi separado e determinado gravimetricamente como celulose total (**ABNT NBR-14032,1998; Fengel and Wegener, 1989**).

3.2.12. Extrativos

O teor de extrativos contidos no bagaço de caju, lavado e sem lavar, foi determinado empregando um aparelho de Soxhlet, sendo utilizados 5 g de amostra e 200 mL de etanol-ciclohexano à uma proporção 1:2 (v/v). As partículas foram acondicionadas em um cartucho confeccionado com papel de filtro e colocadas dentro do Soxhlet. O solvente foi colocado em um balão de 250 mL, de massa seca conhecida, e o material foi extraído por 6 horas. Após o banho, o material foi levado a estufa até atingir massa constante. Por diferença de massa obteve-se o valor de extrativos em gramas e dividindo-se pela massa da amostra analisada, obtem-se o teor de extrativos em percentual.

3.2.13. Isoterma de Adsorção de Umidade

Para o levantamento da isoterma de adsorção de umidade do bagaço de caju lavado e sem lavar, inicialmente foram preparadas amostras de 5 g de bagaço com

diferentes volumes de água destilada, variando de 0 a 5 mL/5 g de bagaço, de modo a simular as condições de incubação de uma fermentação semi-sólida. Após umidecido, cada amostra preparada foi colocada na geladeira em recipientes herméticos e deixados por 24 horas em repouso para uniformizar o meio.

Após as 24 horas, foram feitas as análises de atividade de água e de umidade de equilíbrio do material. A atividade de água das amostras foi analisada diretamente em equipamento Thermoconstanter Novasina RTD 200 TH2, na temperatura de 30°C que é a temperatura que foi utilizada na produção da celulase. E as análises de umidade de equilíbrio foram feitas seguindo a metodologia descrita em **Brasil (2005)** semelhantemente com a utilizada na caracterização físico-química.

A partir dos dados de atividade de água e da umidade de equilíbrio, foram construídas as isotermas de adsorção de umidade do material.

3.3. Processo Fermentativo

3.3.1. Planejamento Experimental

Para o estudo da produção de celulases, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 com três repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória.

No planejamento experimental, as variáveis independentes foram a umidade inicial (U_i) do material a ser fermentado e a concentração de fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), por ser este um nutriente importante no desenvolvimento microbiano. Os valores adotados para as variáveis foram baseados nos valores estudados por **Tavares (2009)** na produção de celulases com bagaço de caju, lavado e sem lavar, e no trabalho desenvolvido por **Santos (2007)** que estudou a influência da concentração da fonte de nitrogênio e da umidade inicial sobre a produção de pectinases utilizando bagaço de caju, lavado e sem lavar, ambos com *Aspergillus niger*.

O planejamento experimental seguiu os níveis estipulados na Tabela 2 e a matriz do planejamento está apresentada na Tabela 3 que apresenta as variáveis utilizadas no planejamento, bem como suas codificações e os níveis. A análise do planejamento experimental foi realizada utilizando-se o software Statistica 5.0.

Tabela 2 – Níveis do planejamento experimental.

Variável	(-1)	(0)	(+1)
U _{B.U.} (%)	45,00	55,00	65,00
N (%)	0,50	0,75	1,00

Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2² com três repetições no ponto central.

Ensaio	U _{B.U.} (%)	N (%)
1	-1 (45,00)	-1 (0,50)
2	+1 (65,00)	-1 (0,50)
3	-1 (45,00)	+1 (1,00)
4	+1 (65,00)	+1 (1,00)
5	0 (55,00)	0 (0,75)
6	0 (55,00)	0 (0,75)
7	0 (55,00)	0 (0,75)

3.3.2. Microrganismo e Inóculo

3.3.2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentososo da linhagem *Trichoderma* sp. pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza/CE que foi armazenado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/UAEQ/UFCG) em tubos de ensaio com tampas rosqueadas estocados a -18°C.

De acordo com procedimento adotado por **Couri (1993)**, os conídios foram ativados em duas etapas de transferência, usando um meio básico formulado no laboratório do CTAA. Neste meio a pectina é a única fonte de carbono, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição do meio básico.

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

Fonte: Couri (1993).

O meio foi preparado dissolvendo a pectina em água destilada sob agitação vigorosa. Posteriormente, os outros componentes foram adicionados, e o meio transferido para um balão volumétrico de 1,00 L. Em seguida, aferiu-se o balão volumétrico e o meio foi levado à fervura para cozimento do Agar. Distribuiu-se o meio em tubos de ensaio (18x180 mm), nos quais foram adicionados 20 mL do meio e tampados com rolhas de algodão envolvidos em gaze. O meio foi então esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 0,5 atm e, ainda quente, inclinado.

Após resfriamento do meio de cultura contido nos tubos de ensaio, os conídios foram retirados do solo, com o auxílio da alça de platina, e transferidos para o meio de cultura sendo incubados por cinco dias em estufa a 30°C, obtendo-se assim o primeiro repique.

Partindo do primeiro repique, foi obtido o segundo repique. Para tanto, com auxílio da alça de platina, os esporos foram transferidos para o meio básico, descrito anteriormente, e incubados, novamente, a temperatura de 30°C durante cinco dias. Cada repique pôde ser mantido sob refrigeração por um período de quatro meses e seguindo este procedimento cada suspensão de conídios no solo somente pôde ser usada 4 ou 5 vezes, e depois descartada.

Para produção de grande quantidade de conídios foi utilizado o meio de sabugo de milho. O sabugo é apropriado para este fim, uma vez que o fungo cresce em uma superfície maior e conseqüentemente aumenta a esporulação. Este meio de cultura foi

preparado de acordo com protocolo da Embrapa/CNPAT, no qual primeiro prepara-se as seguintes soluções:

- Solução A: pesou-se 20 g de fosfato de potássio monobásico, dissolveu em água destilada e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e aferiu-se.
- Solução B: pesou-se 3,96 g de sulfato de zinco e dissolveu em um pouco de água destilada. Adicionou-se 4,60 g de sulfato de ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5 mL de ácido sulfúrico (95 – 97%). Após completa dissolução, avolumou-se a 100 mL com água destilada.
- Solução umidificante: pesou-se 2,8 g de peptona em um pouco de água destilada, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 0,19 mL da solução A e 0,025 mL da solução B, avolumou-se e homogeneizou.

Após o preparo das soluções, pesou-se 4,6 g de sabugo de milho seco e moído (com granulometria de aproximadamente 1 cm) em erlenmeyers de 125 mL e adicionou-se 6 mL da solução umidificante, para cada erlenmeyer. O frasco foi tampado com tampão de algodão envolvido com gaze, homogeneizado e esterilizado em autoclave por 1 hora a 1 atm.

Para inoculação no meio de sabugo de milho foram adicionados 10 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3% (v/v) nos tubos com microrganismo do segundo repique e com auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram desprendidos, homogeneizados e transferido 1 mL dessa suspensão para cada frasco contendo o sabugo. Os frascos foram agitados e incubados em estufa a 30°C por um período de 5 dias. Após este período os frascos foram armazenados sob refrigeração por um período máximo de três meses e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

3.3.2.2. 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 frascos de sabugo com esporos. Após agitação, os esporos foram transferidos para erlenmeyer estéril com auxílio de gaze e algodão estéril para a contagem e posteriormente ser incubado.

A quantificação da suspensão de esporos obtida foi feita através de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer espelhada e o volume de suspensão de esporos a ser adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se um inóculo de 10^7

esporos por grama de substrato sólido fixada nos 7 experimentos listados na matriz do planejamento.

A concentração de esporos do inóculo foi calculada seguinte a Equação 11 e o volume de suspensão a ser inoculada foi calculado através da Equação 12.

$$C_{Esporos} (\text{esporos} / \text{mL}) = \bar{E} \times 25 \times 10^4 \times F_D \quad (11)$$

$$V_{Suspensão} (\text{mL}) = \frac{C_{Inóculo} (\text{esporos} / \text{g}) \times m (\text{g})}{C_{Esporos} (\text{esporos} / \text{mL})} \quad (12)$$

Onde:

$C_{Esporos}$ – Concentração de esporos na suspensão;

\bar{E} - Média de Esporos contados na Câmara de Neubauer;

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

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

m – Massa de substrato utilizada.

3.3.3. Experimentos de Fermentação

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 15,00 g do substrato previamente umidificado.

A umidade inicial do meio foi ajustada para 45, 55 e 65% (base úmida) pela adição de um volume definido de água destilada, que foi determinado através de um balanço de massa, seguindo a Equação 13, o qual leva em consideração que a densidade da água é igual a 1,00 g/cm³:

$$V_{AA} = m_{AA} = \frac{m_i (U_2 - U_1)}{(1 - U_2)} \quad (13)$$

Onde:

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

m_i – massa de meio a ser umidificado;

U_1 – umidade do meio;

U_2 – umidade do meio desejada;

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

A suplementação do substrato com a fonte de nitrogênio foi realizada adicionando-se sulfato de amônio a 0,50, 0,75 e 1,00% que são as concentrações a serem estudadas no planejamento. Para isso, a massa de nitrogênio foi pesada e diluída no volume de água calculado pelo balanço de massa. Por fim, adicionou-se ao substrato a água já com o suplemento de nitrogênio e homogeneizou-se completamente. O meio foi deixado em repouso em geladeira por 24 horas em recipientes herméticos.

Após as 24 horas, 15 g do substrato foram colocados em erlenmeyers de 250 mL, vedados com algodão e papel alumínio e em seguida autoclavados por 5 minutos a 0,5 atm.

Para realização das fermentações, o microrganismo foi inoculado no meio contido nos erlenmeyers com uma concentração de 10^7 esporos/g de substrato úmido e incubados em estufa úmida a 30°C, sendo esta temperatura favorável ao desenvolvimento do microrganismo. As amostras foram retiradas periodicamente durante o processo (0, 4, 18, 27, 42, 51, 66, 73 horas de fermentação), determinando-se a umidade (base úmida), pH, açúcares redutores e atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase. As análises realizadas ao longo das fermentações de umidade, pH e açúcares redutores seguiram as mesmas metodologias utilizadas na caracterização físico-química do bagaço de caju, lavado e sem lavar, e a metodologia utilizada para determinar a atividade enzimática será descrita posteriormente, ainda neste capítulo.

3.4. Extração das Enzimas

A extração das enzimas foi realizada seguindo o procedimento descrito por Israel (2005). A extração foi feita pela incubação de 1 g do meio fermentado com 20 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, na temperatura de 30°C, velocidade de agitação de 150 rpm, por 30 minutos. Por fim, a amostra foi filtrada com papel de filtro

qualitativo para remoção dos esporos. O extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase.

3.5. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade celulolítica analisada neste trabalho foi de endoglicanases, também chamadas de carboximetilcelulases (CMCase), seguindo o procedimento descrito em **Menezes (2009)**, que baseia-se na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de carboximetilcelulose devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose.

Para a análise, foi colocado em um tubo de ensaio 1 mL do extrato enzimático com 1 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 1% (m/v), preparada em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0, a uma temperatura de 50°C por exatos 60 minutos. Após esse tempo, foi retirado 1 mL do tubo de ensaio e colocado em outro tubo de ensaio com 1 mL DNS para determinar a concentração de açúcares redutores que seguiu semelhantemente à metodologia de **Miller (1959)** como descrita na caracterização físico-química do bagaço do caju lavado e sem lavar. Uma amostra em branco foi realizada para cada análise, e ao invés de colocar 1 mL do extrato enzimático com 1 mL da solução de carboximetilcelulose, colocou-se 1 mL do extrato enzimático com 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Dessa forma, determinou-se a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático sem a presença da carboximetilcelulose ($AR_{Sem\ CMC}$) e a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático após incubação com a fonte de celulose ($AR_{Com\ CMC}$).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose, por minuto, a 50°C e, neste trabalho, a atividade enzimática foi expressa U/g, a qual foi calculada seguindo a Equação 14.

$$CMCase(U/g) = \frac{AR_{Liberado} \times 10^6}{180 \times 60} = \frac{(AR_{Com\ CMC} - AR_{Sem\ CMC}) \times 10^6}{180 \times 60} \quad (14)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Físico-Química do Substrato

A caracterização físico-química do bagaço de caju visou conhecer a sua composição com relação ao conteúdo de nutrientes, que são importantes na síntese das celulases como, percentual de celulose e açúcares redutores, bem como, parâmetros que afetam o processo de fermentação semi-sólida: pH, umidade, granulometria e atividade de água.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores das propriedades analisadas para o bagaço de caju lavado e sem lavar, após secagem e moagem, bem como os seus respectivos desvios padrão.

Tabela 5 – Caracterização físico-química do bagaço de caju.

PARÂMETRO	BAGAÇO	
	LAVADO	SEM LAVAR
Densidade Aparente (g/mL)	0,51 ± 0,03	0,39 ± 0,01
Densidade Real (g/mL)	1,43 ± 0,00	1,25 ± 0,00
Porosidade	0,64 ± 0,01	0,69 ± 0,04
Umidade (b.u.) (%)	7,37 ± 0,04	7,75 ± 1,19
pH	4,84 ± 0,18	3,94 ± 0,30
Cinzas (%)	1,24 ± 0,18	1,79 ± 0,01
°brix (%)	0,00 ± 0,00	38,51 ± 6,07
AR (%)	0,31 ± 0,01	25,53 ± 0,15
ART (%)	0,97 ± 0,05	29,72 ± 1,22
Lignina (%)	29,49 ± 2,53	26,67 ± 1,94
Celulose (%)	22,75 ± 0,39	21,32 ± 0,50
Extrativos (%)	14,66 ± 0,80	38,17 ± 0,44

4.1.1. Umidade

A umidade encontrada para o bagaço de caju lavado e sem lavar foi de 7,37% e 7,75%, respectivamente. Considerando os desvios padrões para determinação dessa propriedade pode-se afirmar que não ocorreu diferença significativa entre seus valores. Essas umidades quando expressas em base seca correspondem a 5,27% para o bagaço lavado e 8,67% para o bagaço sem lavar.

Em processos que ocorrem por fermentação semi-sólida, umidades elevadas resultam numa diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Entretanto, umidades muito baixas levam a um crescimento minimizado da população microbiana em relação ao ponto ótimo e conseqüentemente, baixo grau de utilização do substrato pelos mesmos.

Dentro desse contexto, foram construídas as isotermas de adsorção de umidade do bagaço de caju lavado e sem lavar a 30°C objetivando correlacionar a atividade de água do material e a umidade de equilíbrio, podendo, dessa forma, determinar em que umidade inicial o microrganismo deve ser inoculado de forma que a quantidade de água livre seja suficiente para adaptação, crescimento e metabolização por parte do *Trichoderma* sp. em produzir celulasas no processo de fermentação.

A Figura 6 apresenta as isotermas de adsorção de umidade para o bagaço de caju lavado e sem lavar a 30°C. Na faixa de umidade de 5,27%, para o bagaço lavado, e de 8,67%, para o bagaço sem lavar, a atividade de água se situa abaixo de 0,7, como pode ser percebido na Figura 6, valor esse crítico para o desenvolvido de bolores (Scott, 1957) e ideal para o seu armazenamento, no que diz respeito à proliferação de microrganismos, manutenção das propriedades físico-químicas e a estabilidade química e bioquímica originais do bagaço de caju.

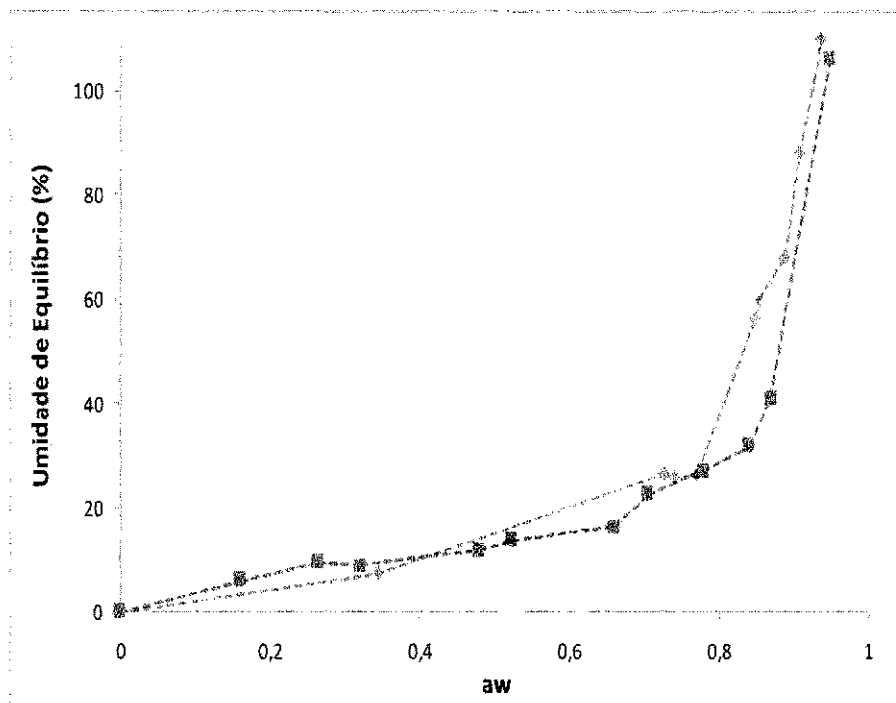


Figura 6 – Isotermas de adsorção de umidade no bagaço de caju lavado (♦) e sem lavar (■), a 30°C.

Avaliando as isotermas de adsorção de umidade do bagaço de caju lavado e sem lavar, pode-se perceber que, como nos materiais higroscópicos, a umidade de equilíbrio aumenta com o aumento da atividade de água (a_w), a uma temperatura de 30°C. Além disso, observa-se que a partir de 20% de umidade em base seca a atividade de água já é suficiente para o crescimento de microrganismos nessa temperatura. Nesse trabalho estudou-se o efeito da umidade inicial do bagaço de caju na produção de celulases a temperatura de 30°C com valores de 45%, 55% e 65% de umidade expressa em base úmida. Esses valores quando expressos em base seca correspondem a 47,37%, 57,89% e 68,43% para o bagaço lavado e, 48,90%, 59,77% e 70,64% para o bagaço sem lavar, o que corresponde a uma faixa de atividade de água acima de 0,7, sendo essa faixa adequada para o crescimento do microrganismo. O processo de restabelecimento da umidade do material seco foi realizado como descrito na Equação 13 no Capítulo 3.

4.1.2. pH

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada

microrganismo. Os valores de pH encontrados neste trabalho para o bagaço de caju lavado (4,84) e para o sem lavar (3,94) foram próximos ao encontrado por **Campos (2003)** quando encontrou que o pH do pedúnculo do caju é 4,5. Segundo **Zheng & Shetty (2000)** enzimas produzidas por microrganismos em processos de fermentação semi-sólida com resíduos cítricos apresentam maior estabilidade frente a variações de pH. Esse fato pode ser uma vantagem de produzir enzimas celulolíticas tendo como substrato o bagaço do caju. **Souza (2008)** estudando a produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizou como substrato o resíduo do maracujá (casca + albedo) o qual apresentou um pH ácido com um valor de 3,57.

4.1.3. Sólidos Solúveis (°brix)

O °brix, que representa o teor de sólidos solúveis, apresentou valores de 0,00% para o bagaço lavado e 38,51% para o sem lavar. Esta diferença está associada ao fato de que as lavagens feitas no bagaço de caju retiraram praticamente todos os sólidos solúveis contidos no substrato. Essa foi uma estratégia adotada no presente trabalho para que fosse avaliado o grau de estresse do microrganismo em produzir celulasas sem a presença de açúcares redutores disponíveis, que não aqueles oriundos da hidrólise da fonte de carbono indutora, ou seja, a celulose.

4.1.4. Açúcares Redutores

A principal fonte de carbono para fermentação microbiana é a glicose, bem como outros açúcares (sacarose e maltose), além de outros compostos orgânicos mais complexos, como por exemplo, amido e celulose (**Pelczar et al., 1980**). Para isso, é interessante que a glicose deva estar disponível para o microrganismo no substrato em quantidade suficiente a proporcionar um crescimento inicial da população microbiana, mas não o bastante para impedir que o microrganismo seja capaz de metabolizar a fonte indutora, a celulose. Por outro lado, é importante que a fonte indutora não apresente um valor percentual acentuado de forma a inibir a excreção da enzima pelo microrganismo. Segundo **Fontana et al. (2005)**, substratos que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina, indutor da pectinase, tem mostrado altos rendimentos em enzimas pectinolíticas. Dessa forma, pode-se pressupor que para produção de celulase deva

existir também um valor ótimo da relação entre açúcares redutores e a celulose, que é a fonte indutora na produção das celulasas.

A quantidade de açúcares redutores presente no bagaço de caju lavado foi de 0,31% e no sem lavar foi de 25,53%. No bagaço lavado, espera-se que a concentração de açúcares (0,31%) não iniba a produção da enzima, mas se faz necessário avaliar se essa quantidade de açúcares redutores é suficiente para que ocorra adaptação e, conseqüentemente, crescimento inicial da população microbiana no meio. Já no bagaço sem lavar, espera-se que a quantidade de açúcares (25,53%) seja suficiente para o crescimento inicial dos microrganismos, mas é necessário avaliar se essa quantidade de açúcares não inibirá a produção da enzima. Dessa forma, o processo de produção das celulasas será realizado utilizando o bagaço de caju lavado e sem lavar para avaliar se a concentração de açúcares irá afetar a produção da enzima.

4.1.5. Celulose

Avaliando o teor de celulose encontrado para o bagaço lavado (22,75%) e sem lavar (21,32%), observa-se a presença da fonte indutora para produção de celulase. Os valores encontrados neste trabalho são bem próximos do encontrado por **Ferreira et al. (2007)** no subproduto da agroindústria do caju que foi de 21%.

4.1.6. Lignina

O percentual de lignina encontrado para o bagaço lavado (29,49%) e para o sem lavar (26,67%) são menores que o encontrado por **Ferreira et al. (2007)** que foi de 35,5%. No presente trabalho, optou-se por realizar a produção das enzimas sem um pré-tratamento do material para deslignificar o substrato com o objetivo de analisar a produção da enzima no substrato com sua estrutura não modificada.

4.1.7. Cinzas

O teor de cinzas para o bagaço lavado (1,24%) e para o sem lavar (1,79%) são bem próximos aos encontrados por **Tavares (2009)** que caracterizou o bagaço de caju e verificou ser 1,25% e 1,69% o teor de cinzas para o material lavado e sem lavar,

respectivamente. Pode-se perceber que o processo de lavagem do resíduo agroindustrial de caju removeu parte dos minerais e de outras substâncias presentes no substrato.

4.1.8. Granulometria

É necessário, também, avaliar a estrutura física do substrato, sobretudo, quanto ao tamanho das partículas e a porosidade, que determinam a área superficial acessível ao microrganismo e uma posterior etapa de extração da enzima em processo sólido-líquido. Partículas de tamanho reduzido oferecem maior área superficial ao ataque microbiano, mas, ao mesmo tempo, tendem a compactar-se facilmente, comprometendo a respiração e aeração do sistema. Partículas maiores, por sua vez, promovem mais espaços entre as partículas, mas diminuem o rendimento da absorção dos nutrientes pelo microrganismo. De acordo com **Pinto *et al.* (2006)**, o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais, para que o ar necessário ao desenvolvimento microbiano atravesse os espaços vazios do meio.

A Figura 7 apresenta os perfis granulométricos do bagaço de caju lavado e sem lavar.

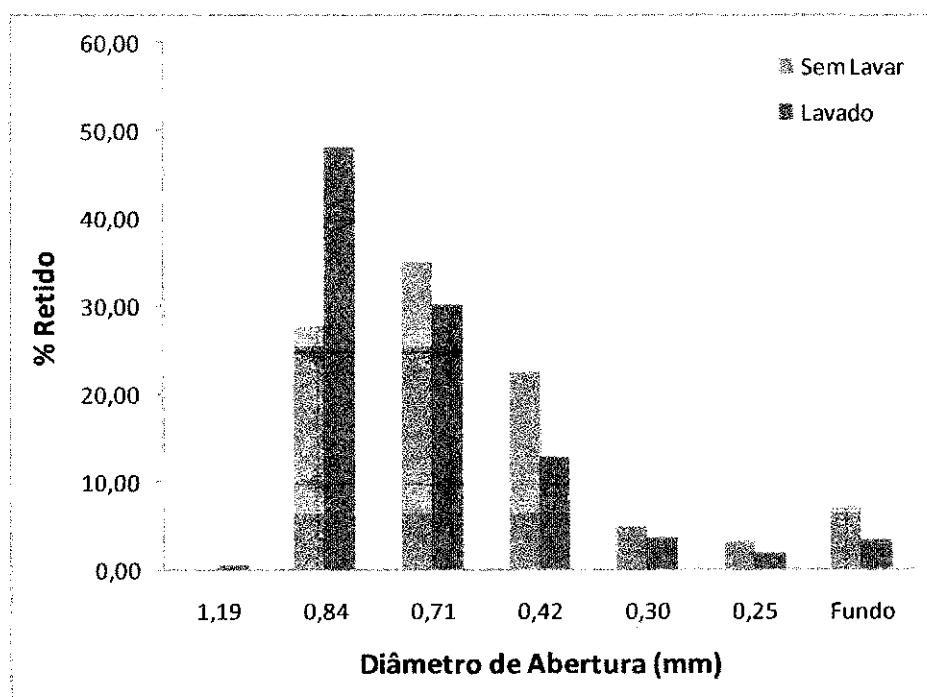


Figura 7 – Perfis granulométricos do bagaço de caju lavado e sem lavar.

Como pode ser observado pela distribuição granulométrica, o bagaço lavado apresenta a maioria das suas partículas com um diâmetro entre 0,71 e 0,84mm e o bagaço sem lavar apresenta a maioria das suas partículas entre 0,42 e 0,84mm. Em ambos os casos, as partículas apresentam tamanhos de partículas satisfatórios para a fermentação semi-sólida com fungos filamentosos. **Correia (2004)**, estudando o enriquecimento protéico do bagaço de abacaxi, trabalhou com partículas de tamanho maior que 0,42 mm. **Souza et al. (2008)**, estudando a produção de enzimas pectinolíticas por fermentação semi-sólida com *Aspergillus niger*, trabalhou com partículas que apresentavam tamanhos entre 0,42 e 0,85 mm. Além desses estudos, **Tavares (2009)**, estudando a produção de celulasas por fermentação semi-sólida em bagaço de caju, lavado e sem lavar, utilizou o substrato com partículas de, em média, 0,42 mm.

Pode-se perceber que cerca de 15% das partículas do bagaço sem lavar e cerca de 9% das partículas do bagaço lavado apresentaram tamanhos menores que 0,30 mm. A porosidade do leito foi de 0,69 para o bagaço sem lavar e 0,64 para o bagaço lavado, favorecendo a aeração do sistema, e disponibilizando o oxigênio necessário ao desenvolvimento do microrganismo. Além do tamanho das partículas, a porosidade está relacionada com a densidade aparente (0,51 e 0,39 g/cm³ para o bagaço lavado e sem lavado) que revela o quanto o substrato tende a não se compactar completamente, gerando os espaços vazios entre as partículas do substrato, suficientes para respiração e metabolismo por parte do microrganismo.

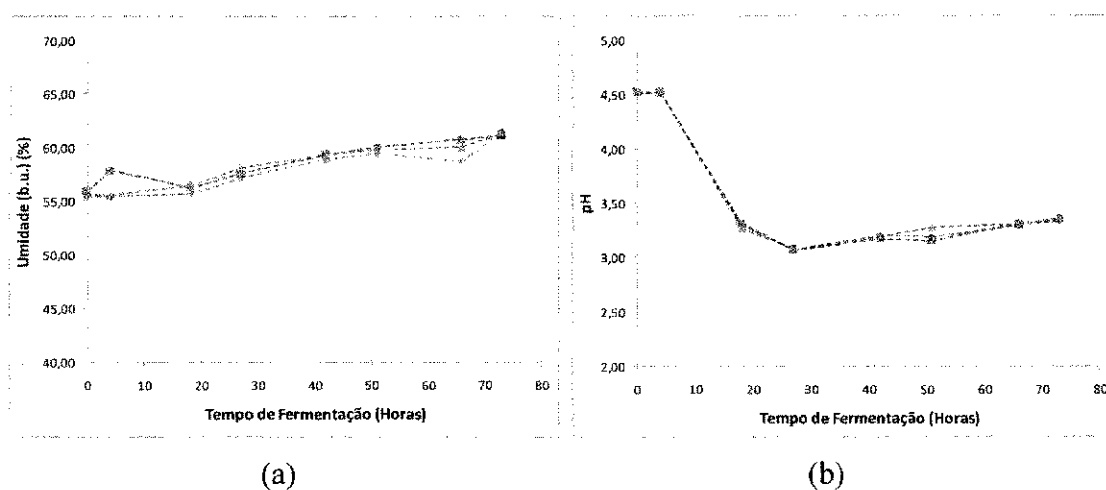
4.2. Processo fermentativo

O processo fermentativo para produção de celulasas foi realizado conforme as metodologias descritas no Capítulo 3, de forma que amostras foram coletadas periodicamente, incluindo o tempo inicial do processo obtido no instante seguinte à inoculação do microrganismo para a realização das análises de pH, umidade, açúcares redutores e atividade enzimática. A seguir serão apresentados os resultados obtidos para o substrato lavado e sem lavar.

4.2.1. Bagaço de Caju Lavado

Os resultados obtidos para o processo fermentativo com o bagaço de caju lavado são apresentados a seguir, mas, primeiramente, foram analisados os resultados obtidos para os ensaios conduzidos nas condições do ponto central estudados com o intuito de avaliar a reprodutibilidade dos dados do processo fermentativo.

A Figura 8 ((a), (b), (c) e (d)) apresenta os resultados dos ensaios 5, 6 e 7 do planejamento experimental (pontos centrais) que foram desenvolvidos com 55% de umidade em base úmida e 0,75% de fonte de nitrogênio.



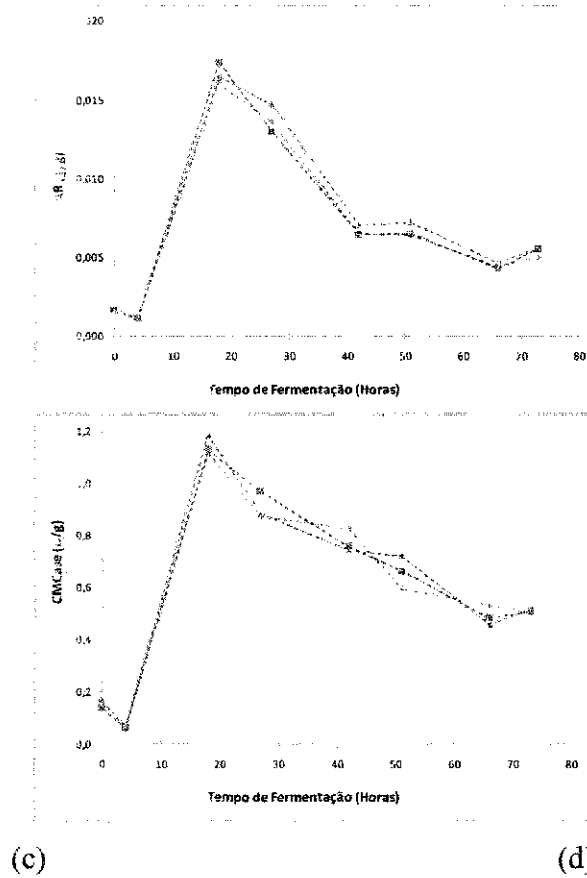


Figura 8 – Perfil cinético do processo fermentativo do bagaço de caju lavado para os ensaios do ponto central (♦ - Ensaio 5, ■ – Ensaio 6 e ▲ – Ensaio 7), com 55% de umidade em base úmida e 0,75% de fonte de nitrogênio ((a) pH, (b) Umidade, (c) Açúcares Redutores e (d) Atividade Enzimática (CMCase)).

Observa-se através dos perfis apresentados na Figura 8 ((a), (b), (c) e (d)) que para todas as variáveis estudadas, os resultados obtidos para os ensaios do ponto central foram bem próximos uns dos outros, mostrando que houve uma boa reprodutibilidade dos dados do processo fermentativo. Para uma melhor análise da reprodutibilidade dos dados, serão analisados os coeficientes de variação para os três ensaios.

A Tabela 6 apresenta as médias do pH, da umidade, dos açúcares redutores e da atividade enzimática para os ensaios do ponto central com os seus respectivos desvios padrão e coeficientes de variação.

Tabela 6 – Resultados obtidos ao longo do processo fermentativo com o bagaço lavado para os ensaios do ponto central.

Tempo (Horas)	pH		Umidade (%)		AR (g/g)		CMCase (U/g)	
	Média **	CV*	Média	CV	Média	CV	Média	CV
0	4,53±0,01	0,13	55,71±0,25	0,46	0,0017±0,0001	3,81	0,153±0,014	8,99
4	4,5 ±0,00	0,00	56,35±1,39	2,46	0,0011±0,0000	2,25	0,065±0,006	9,94
18	3,30±0,03	0,76	56,17±0,38	0,68	0,0167±0,0007	4,01	1,141±0,036	3,18
27	3,08±0,01	0,19	57,69±0,49	0,84	0,0138±0,0009	6,28	0,908±0,053	5,84
42	3,19±0,01	0,31	59,22±0,28	0,48	0,0067±0,0003	4,92	0,774±0,045	5,79
51	3,21±0,06	1,95	59,79±0,31	0,52	0,0067±0,0005	6,69	0,659±0,063	9,57
66	3,31±0,01	0,30	59,87±1,04	1,74	0,0045±0,0002	3,44	0,491±0,037	7,47
73	3,35±0,02	0,46	61,36±0,20	0,33	0,0054±0,0003	5,81	0,508±0,005	0,90

* CV: Coeficiente de Variação (%).

** Média dos valores das variáveis pH, Umidade, AR e CMCase obtidos sob as condições dos ensaios 5, 6 e 7 com os respectivos desvios padrão.

Ao longo do processo fermentativo o pH, a umidade, a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática apresentaram coeficientes de variação máximos de 1,95%, 2,46%, 6,69% e 9,94%, respectivamente, para a triplicata de ensaios. Estes valores sugerem que foi possível obter uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos para o processo fermentativo, tendo em vista que o maior coeficiente de variação para a triplicata dos ensaios do ponto central foi menor que 10%. Segundo **Pimentel-Gomes (1987b)**, coeficientes de variação menores que 10% são considerados baixos, entre 10% e 20%, médios, entre 20% e 30%, altos, e maiores que 30%, muito altos. Apesar de o coeficiente de variação máximo para as variáveis açúcares redutores e atividade enzimática apresentar-se próximos de 10%, que é o valor limite para ser considerado baixo e representar uma boa reprodutibilidade dos dados, os valores obtidos podem ser considerados aceitáveis quando se trabalha com processos biológicos e fungos filamentosos, por se tratar de processos complexos e que mínimos erros geram uma diferença considerável nos resultados. Um fato importante de ser comentado é que os coeficientes de variação apresentaram-se menores que 10% tanto para as triplicatas de ensaios quanto para as triplicatas de análises que foi de, no máximo, 1,23% para o pH, 1,01% para a umidade, 3,68% para os açúcares redutores e 4,96% para a atividade enzimática.

Sabendo que os dados obtidos para os ensaios dos pontos centrais apresentaram coeficientes de variação menores que 10%, mostrando que os dados do processo fermentativo são bem reprodutivos, é possível analisar cada ensaio isoladamente, avaliando o comportamento das variáveis estudadas (pH, umidade, açúcares redutores e atividade enzimática (CMCase) ao longo do processo fermentativo.

As Figuras de 9 a 13 apresentam os resultados obtidos para pH e umidade (a) e açúcares redutores e atividade enzimática (b) de cada condição estudada.

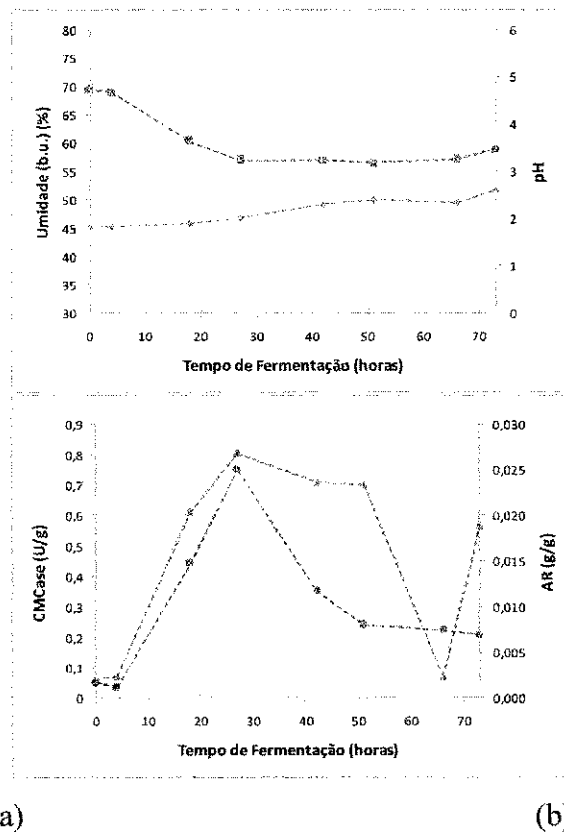


Figura 9 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 1 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

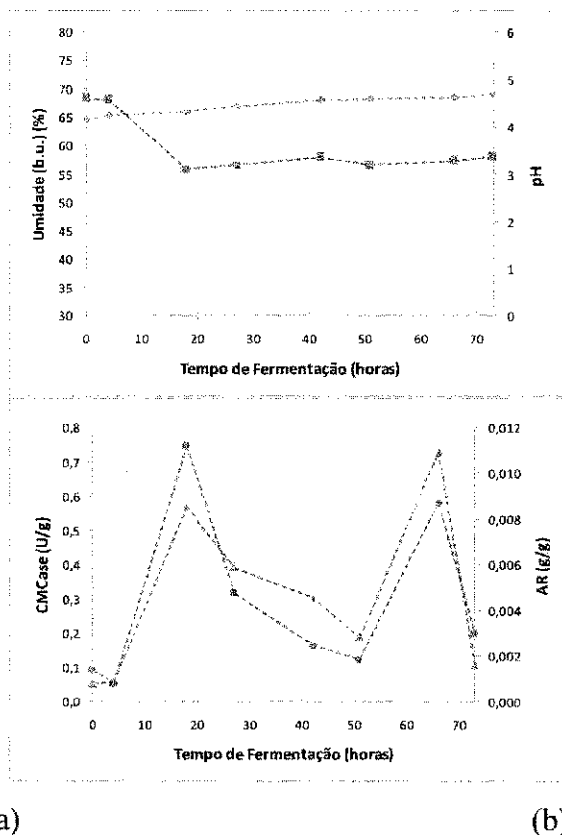


Figura 10 – Perfil cinético do processo de produção de CMCCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 2 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

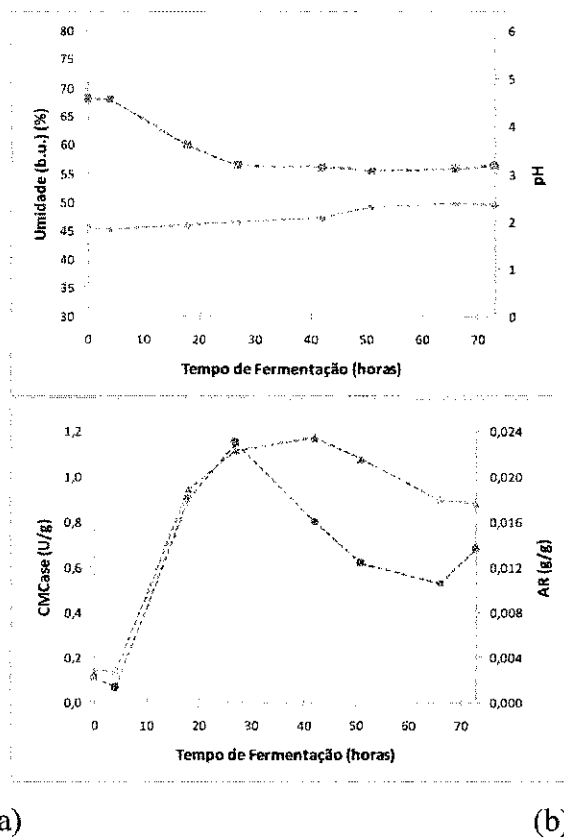
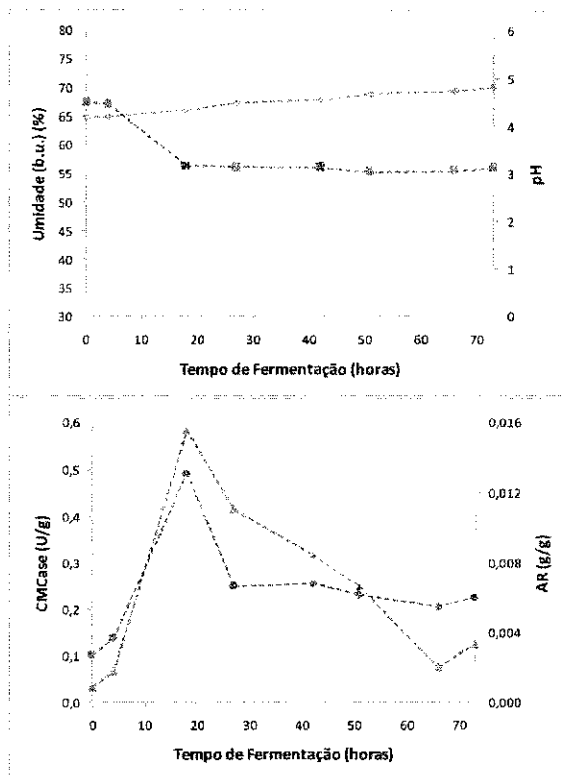


Figura 11 – Perfil cinético do processo de produção de CMCCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 3 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (▲) e Atividade Enzimática (▲)).

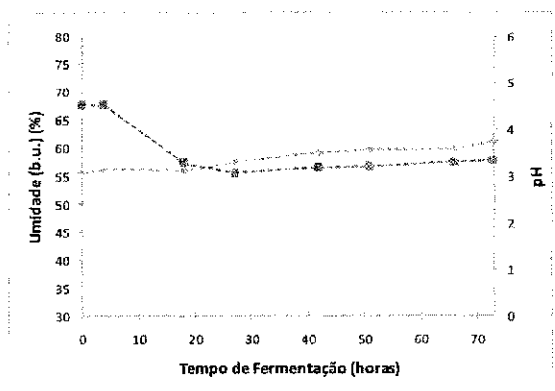


(a)

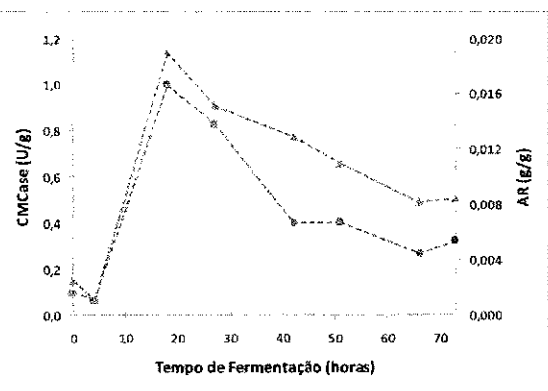


(b)

Figura 12 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju lavado – Ensaio 4 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).



(a)



(b)

Figura 13 – Perfil cinético médio do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju lavado – Ensaios 5, 6 e 7 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

Uma análise de todos os ensaios do planejamento experimental para o bagaço lavado, mostra que o comportamento da umidade e do pH em ambos os casos são semelhantes. A umidade manteve-se praticamente constante até certo momento do processo fermentativo apresentando um aumento até o final do processo devido, provavelmente, às atividades metabólicas ocorridas ao longo do processo fermentativo, já que os erlenmeyers utilizados no estudo foram tampados com algodão e papel alumínio. Nos ensaios em que se utilizou 45% de umidade inicial (ensaios 1 e 3), a umidade manteve-se constante no início do processo apresentando um aumento a partir de 27 horas de fermentação quando utilizou-se 0,50% de adição de fonte de nitrogênio e a partir de 42 horas de fermentação quando utilizou-se 1,00% de adição de fonte de nitrogênio. Nos casos em que a umidade inicial foi de 65% (ensaios 2 e 4), a umidade aumentou ao longo de todo processo fermentativo tanto para o caso em que a adição de nitrogênio foi de 0,50% quanto no caso em que a adição foi de 1,00%. Nos ensaios em que a umidade inicial foi 55% com 0,75% de adição de fonte de nitrogênio, o comportamento da umidade foi semelhante ao encontrado para os ensaios com 45% de umidade inicial com um aumento no seu valor a partir de 27 horas de fermentação.

O pH observado ao longo do estudo apresentou comportamento semelhante para todas as condições estudadas. Em todos os ensaios o valor de apresentou-se constante entre 0 e 4 horas de fermentação e após 18 horas diminuiu, mantendo-se novamente constante até o final do processo. **Botella et al. (2007)** estudaram o processo de produção de enzimas com a polpa de uva utilizando o microrganismo *Aspergillus awamori* e afirmam que o fato do pH sofrer uma diminuição durante a fermentação pode ser associado à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos e no caso de o pH sofrer um aumento ao longo do processo pode ser justificado pela assimilação desses ácidos por ação microbiana. Além disso, **Doelle (1996)** afirma que, quando se utiliza sais de amônio como fonte de nitrogênio, o pH normalmente sofre um decréscimo devido à formação do íon hidrogênio durante o consumo da amônia. Apesar das variações ocorridas ao longo do processo, o pH manteve-se sempre dentro de uma faixa ligeiramente ácida (entre 3,00 e 5,00) que, segundo **Zheng & Shetty (2000)**, é o pH ideal para o processo de produção de enzimas com fungos filamentosos. **Muhammad et al. (2009)**, estudando o efeito da temperatura e do pH na produção de celulasas com *Aspergillus niger* MS82, observaram que ocorreu uma diminuição no pH de 4,00 nas primeiras 20 horas de fermentação, principalmente quando o pH da

fermentação foi ajustado para 6,00 ou 7,00, mantendo-se constante até o término do processo e, quando o pH foi ajustado para 4,00 ou 5,00, ele diminuiu lentamente e tornou-se estável quando atingiu um pH de 3,50.

O perfil cinético de açúcares redutores apresentou comportamento semelhante em todos os ensaios. A concentração apresentou-se constante no início do processo (entre 0 e 4 horas de fermentação) demonstrando uma possível fase de adaptação do microrganismo ao meio. Em seguida, no geral, houve um acúmulo de açúcares redutores até 18 horas de fermentação, exceto para os casos que se utilizou 45% de umidade inicial (ensaios 1 e 3) em que o acúmulo desses açúcares ocorreu até 27 horas de fermentação, dando indícios de que em menores atividades de água, a hidrólise de outros carboidratos é mais lenta. O acúmulo de açúcares redutores ocorre quando a velocidade de hidrólise de outros carboidratos, como por exemplo, a celulose, é maior que a velocidade de absorção de açúcares redutores por parte dos microrganismos. Deve-se salientar que a lavagem do bagaço foi realizada para proporcionar esse fenômeno, induzindo o microrganismo ao estresse, de forma a ocorrer a hidrólise do carboidrato da fonte indutora (celulose) gerando glicose, proporcionando uma provável excreção de enzimas celulolíticas em um menor tempo e conseqüentemente maior produtividade. Ao que parece, a estratégia, se analisada isoladamente, ou seja, sob a ótica de lavagem do resíduo, foi bem sucedida. No entanto, como, nesse trabalho, analisou-se apenas a carboximetilcelulase, uma hipótese alternativa/complementar ao aumento de açúcares redutores pode está ligada à produção de açúcares fermentescíveis provenientes da hidrólise de outras enzimas celulolíticas que não a analisada no presente trabalho. Após o acúmulo desses açúcares, os mesmos foram hidrolisados até o término do processo, exceto para o ensaio 2 que apresentou outra vez um acúmulo de açúcares redutores em 51 horas de fermentação, o que deve ter ocorrido pelo fato de o ambiente ter se apresentado desfavorável após a primeira significativa hidrólise em açúcares redutores, já mencionada, porém provavelmente deveria ainda existir população microbiana suficiente e fonte indutora presente no meio de cultivo, capaz de provocar o mesmo fenômeno acima mencionado.

O perfil cinético da atividade enzimática expressa em CMCase apresentou-se semelhantes para ambos os ensaios, exceto os ensaios 1 e 2. Foi detectada atividade enzimática já no tempo inicial do estudo com valores entre 0,033 e 0,153 U/g, a qual se manteve praticamente constante até 4 horas de fermentação a partir de onde se iniciou a

produção da enzima. O pico de produção da enzima para os ensaios 1 e 3 ocorreram em 27 e 42 horas de fermentação com atividades enzimáticas de 0,807 U/g (0,04 U/mL) e 1,173 U/g (0,059 U/mL), respectivamente. Já para o ensaio 4 e para o ponto central, o pico de produção ocorreu em 18 horas de fermentação com valores de 0,585 U/g (0,029 U/mL) e 1,141 U/g (0,057 U/mL), respectivamente. No ensaio que se utilizou 65% de umidade inicial e 0,50% de adição de nitrogênio (ensaio 2) percebeu-se um pico de atividade já em 18 horas com um valor de 0,570 U/g (0,0285 U/mL). Após atingir o pico de produção da enzima, percebe-se um processo de inibição da enzima, e um novo pico de atividade enzimática é atingido em 66 horas de fermentação com um valor de 0,733 U/g (0,0367 U/mL). Segundo **Ma et al. (2008)**, essa diminuição na atividade de celulase pode ser atribuída ao efeito cumulativo de oligossacarídeos especialmente celobiose, um dímero de glicose, que é conhecido por inibir tanto endoglucanases como β -glucosidase.

Um fator interessante é percebido se for feita uma comparação do comportamento do pH com a atividade enzimática. A produção de CMCCase, em todas as condições, só ocorre a partir do momento em que há a diminuição no pH. Segundo **Muhammad et al. (2009)**, produções de CMCCase e β -glicosidase não foram iniciadas até que o pH do meio baixou para 4,00, fenômeno que também foi observado em todos os ensaios deste estudo com relação à CMCCase.

Uma comparação entre os ensaios 1 e 2 mostra que para a condição de 0,50% de fonte de nitrogênio obteve-se uma maior atividade enzimática quando trabalha-se com uma menor atividade de água (45% de umidade inicial) que foi o caso do ensaio 1 apresentando uma atividade de 0,807 U/g (0,04 U/mL). É possível perceber que, tanto para o ensaio 1 como para o ensaio 2, as atividades máximas alcançadas são inferiores às encontradas por **Victor et al. (2003)**, que estudaram a produção de celulasas em serragem, bagaço de cana e sabugo de milho com uma cepa de *Aspergillus flavus* e obtiveram atividades enzimáticas de 0,0743, 0,0573 e 0,0502 U/mL, respectivamente. **Aguiar e Menezes (2000)** estudaram a produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus niger* usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram atividade de CMCCase de 0,20 U/mL.

Os ensaios 1 e 3 foram conduzidos com uma umidade inicial de 45% e percebe-se que, para essa condição, uma maior atividade enzimática foi atingida quando a adição de fonte de nitrogênio foi de 1,00% (ensaio 3) com um valor de 1,173 U/g

(0,059 U/mL). **Ruegger e Tauk-Tornisielo (2003)** estudando a atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil detectou uma atividade enzimática em CMCase em *Trichoderma koningii* III de 0,06 U/mL, valor este semelhante ao encontrado neste ensaio.

Nos ensaios 2 e 4 foram utilizados 65% de umidade inicial e percebeu-se que para essa condição obteve-se uma maior atividade enzimática quando a adição de fonte de nitrogênio foi de 0,50% (ensaio 2) com um valor de 0,733 U/g (0,0367 U/mL). No estudo da atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins realizado por **Ruegger e Tauk-Tornisielo (2003)**, o microrganismo *Gliocephalotrichum simplex* apresentou uma atividade enzimática em CMCase de 0,02 U/mL.

O valor da atividade enzimática encontrado para as condições de ponto central 1,141 U/g (0,057 U/mL) foi um pouco maior que o encontrado por **Lopes e Buzato (2008)** que, estudando a produção de celulase por *Trichoderma* sp. T676 por fermentação semi-sólida com bagaço de cana-de-açúcar, encontraram uma atividade enzimática de 0,042 U/mL em 72 horas de fermentação.

A Tabela 7 apresenta a atividade enzimática máxima obtida para cada ensaio bem como sua respectiva produtividade.

Tabela 7 – Atividade enzimática máxima e produtividade obtida para cada condição experimental com o bagaço lavado.

Ensaio	U (b.u.) (%)	N (%)	Tempo (horas)	CMCase (U/g)	Produtividade (U/g.h)
1	45	0,50	27	0,807	0,030
2	65	0,50	66	0,733	0,011
3	45	1,00	42	1,173	0,028
4	65	1,00	18	0,585	0,033
Ponto Central	55	0,75	18	1,141	0,064

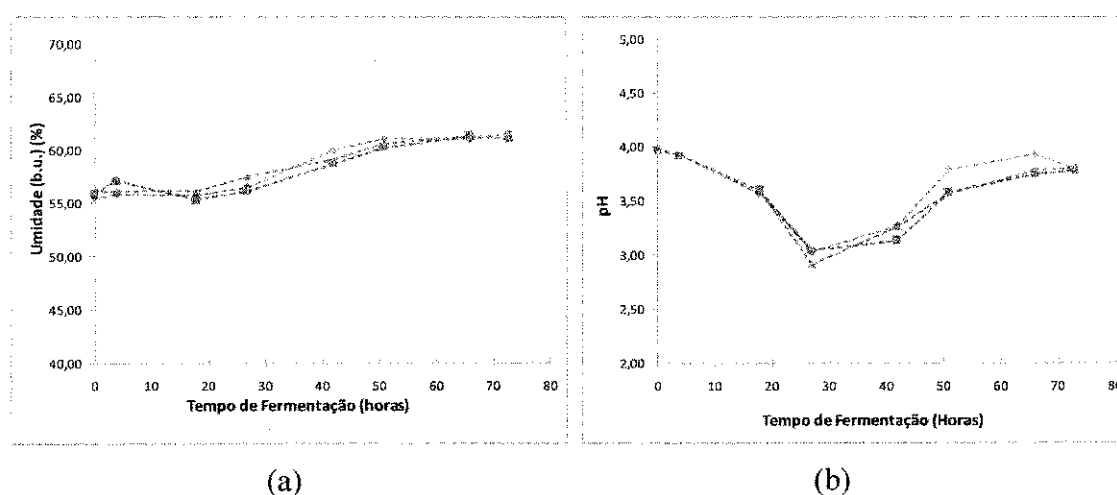
Para os ensaios em que se utilizou 0,50% de fonte de nitrogênio, obteve-se uma maior produtividade quando a atividade de água foi menor (ensaio 1), com um valor de 0,030 U/g.h. Nas condições de menor atividade de água (ensaios 1 e 3), obteve-se maior produtividade quando utilizou-se a menor concentração da fonte de nitrogênio (ensaio

1). No caso em que a umidade foi de 65%, apesar de a atividade enzimática ter alcançado maiores valores quando se utilizou 0,50% de fonte de nitrogênio, obteve-se uma maior produtividade (0,033 U/g.h) quando se utilizou 1,00% de fonte de nitrogênio. Dentre todas as condições estudadas, a produtividade foi maior quando a umidade inicial foi de 55% e a fonte de nitrogênio de 0,75% com 0,064 U/g.h.

4.2.2. Bagaço de Caju sem Lavar

Os resultados obtidos para o processo de produção de enzimas com o bagaço de caju sem lavar são apresentados a seguir, mas, primeiramente, foram analisados os resultados obtidos para os ensaios conduzidos nas condições do ponto central estudados com o intuito de avaliar a reprodutibilidade dos dados do processo fermentativo.

A Figura 14 ((a), (b), (c) e (d)) mostra os resultados dos ensaios 5, 6 e 7 do planejamento experimental nas condições do ponto central que foram desenvolvidos com 55% de umidade em base úmida e 0,75% de fonte de nitrogênio.



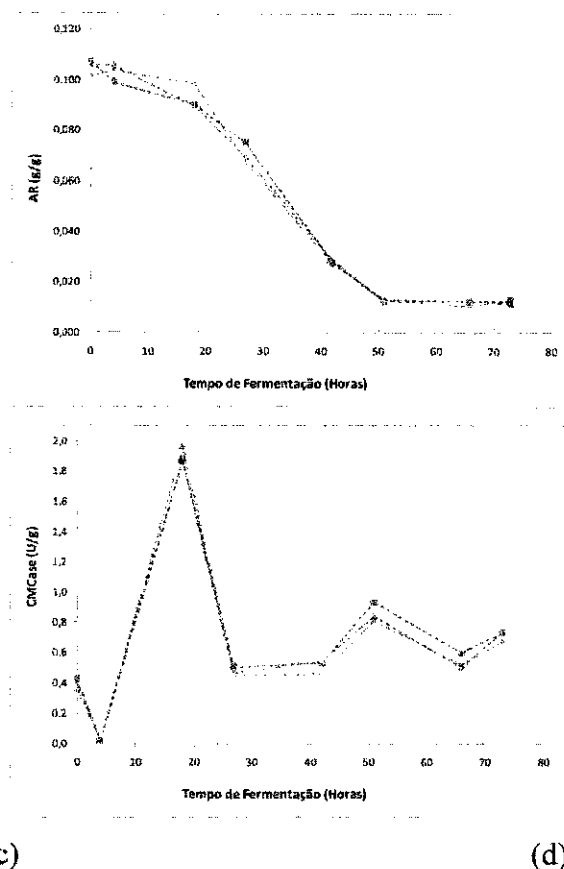


Figura 14 – Perfil cinético do processo fermentativo do bagaço de caju lavado para os ensaios do ponto central (♦ - Ensaio 5, ■ – Ensaio 6 e ▲ – Ensaio 7), com 55% de umidade em base úmida e 0,75% de fonte de nitrogênio ((a) pH, (b) Umidade, (c) Açúcares Redutores e (d) Atividade Enzimática (CMCase)).

Percebe-se na Figura 14 ((a), (b), (c) e (d)) que, para todas as variáveis estudadas, os resultados obtidos para os ensaios do ponto central foram bem próximos uns dos outros, mostrando que houve uma boa reprodutibilidade dos dados do processo fermentativo. Para uma melhor análise da reprodutibilidade dos dados, serão analisados os dados dos coeficientes de variação para os três ensaios.

A Tabela 8 apresenta as médias do pH, da umidade, dos açúcares redutores e da atividade enzimática para os ensaios do ponto central com os seus respectivos desvios padrão e coeficientes de variação.

Tabela 8 – Resultados obtidos ao longo do processo fermentativo com o bagaço sem lavar para os ensaios do ponto central.

Tempo (Horas)	pH		Umidade (%)		AR (g/g)		CMCase (U/g)	
	Média **	CV*	Média	CV	Média	CV	Média	CV
0	3,98±0,01	0,15	55,77±0,30	0,53	0,1074±0,0030	2,85	0,400±0,035	8,79
4	3,92±0,00	0,00	56,36±0,64	1,13	0,1028±0,0034	3,33	0,018±0,000	0,00
18	3,58±0,02	0,48	55,72±0,40	0,72	0,0929±0,0048	5,12	1,896±0,058	3,05
27	2,99±0,07	2,42	56,75±0,69	1,21	0,0705±0,0039	5,47	0,474±0,028	5,80
42	3,22±0,08	2,43	59,27±0,66	1,11	0,0280±0,0008	2,69	0,510±0,044	8,66
51	3,64±0,13	3,49	60,66±0,46	0,76	0,0126±0,0004	3,14	0,860±0,062	7,23
66	3,82±0,10	2,52	61,22±0,16	0,27	0,0117±0,0011	9,31	0,540±0,052	9,69
73	3,80±0,02	0,40	61,26±0,32	0,53	0,0122±0,0008	6,74	0,712±0,035	4,88

* CV: Coeficiente de Variação (%).

** Média dos valores das variáveis pH, Umidade, AR e CMCase obtidos sob as condições dos ensaios 5, 6 e 7 com os respectivos desvios padrão.

Ao longo do processo fermentativo o pH, a umidade, a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática apresentaram coeficientes de variação máximos de 3,49%, 1,21%, 9,31% e 9,69%, respectivamente, para a triplicata de ensaios. Estes valores sugerem que foi possível obter uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos para o processo fermentativo, pelos motivos já mencionados no item referente à reprodutibilidade dos dados para a fermentação do bagaço lavado. Um fato importante de ser comentado é que os coeficientes de variação apresentaram-se menores que 10% tanto para as triplicatas de ensaios quanto para as triplicatas de análises que foi de, no máximo, 0,98% para o pH, 1,21% para a umidade, 2,51% para os açúcares redutores e 4,99% para a atividade enzimática..

Sabendo que os dados obtidos para os ensaios dos pontos centrais apresentaram coeficientes de variação menores que 10%, mostrando que os dados do processo fermentativo são bem reprodutivos, é possível analisar cada ensaio isoladamente avaliando o comportamento das variáveis estudadas (pH, umidade, açúcares redutores e atividade enzimática (CMCase)) ao longo do processo fermentativo.

As Figuras de 15 a 19 apresentam os resultados obtidos para pH e umidade (a) e açúcares redutores e atividade enzimática (b) de cada ensaio.

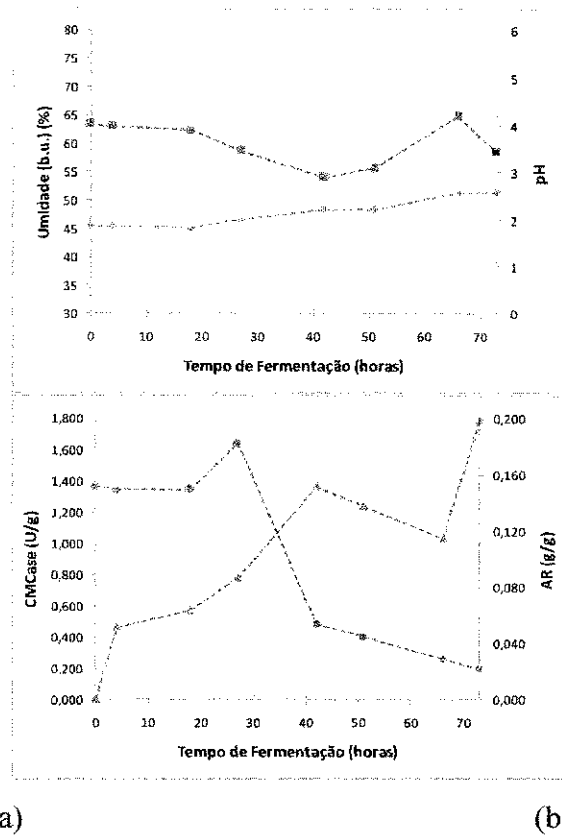


Figura 15 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 1 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

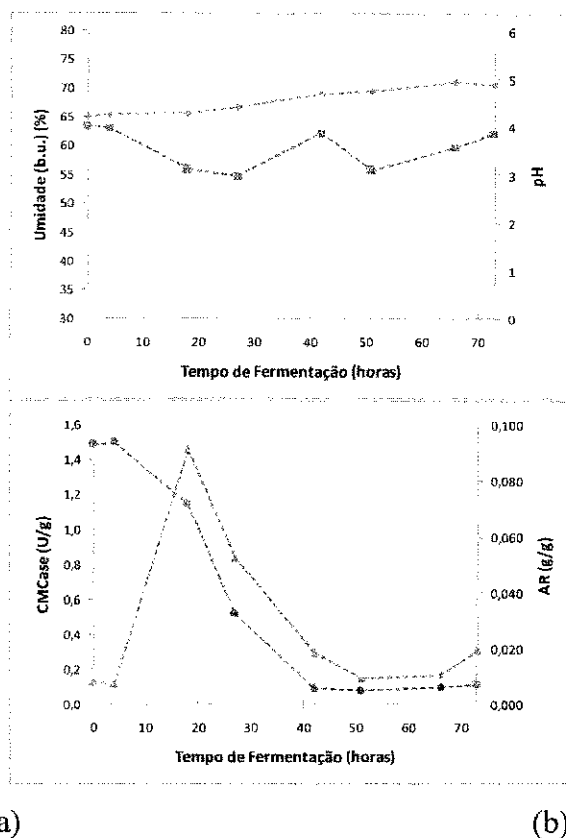


Figura 16 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 2 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

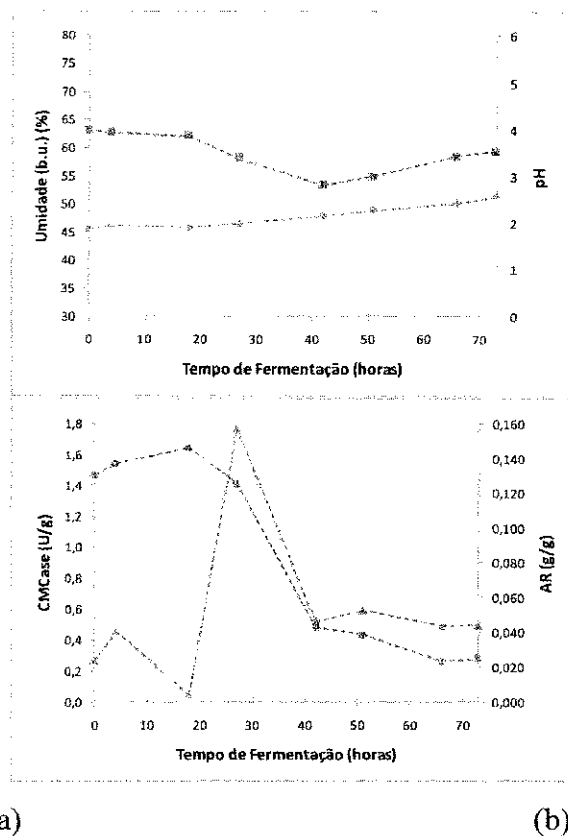


Figura 17 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 3 ((a) – Umidade (♦) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

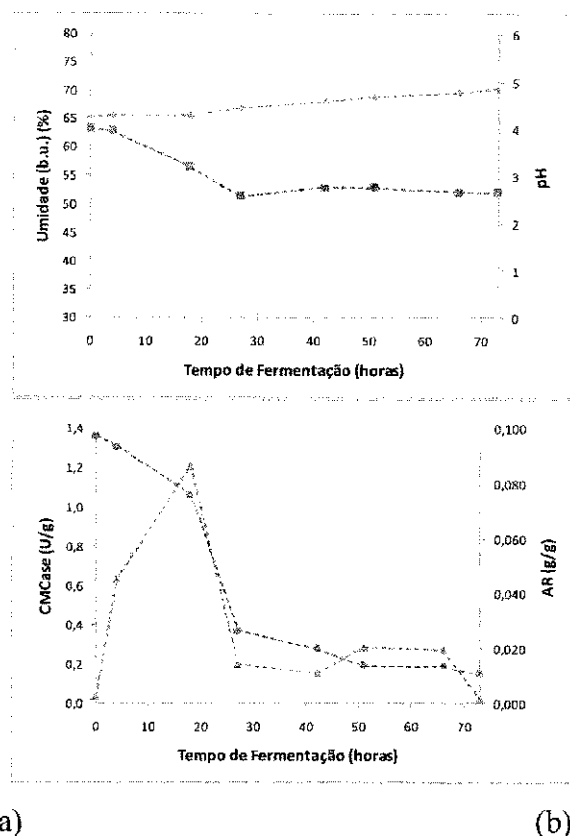


Figura 18 – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaio 4 ((a) – Umidade (◆) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

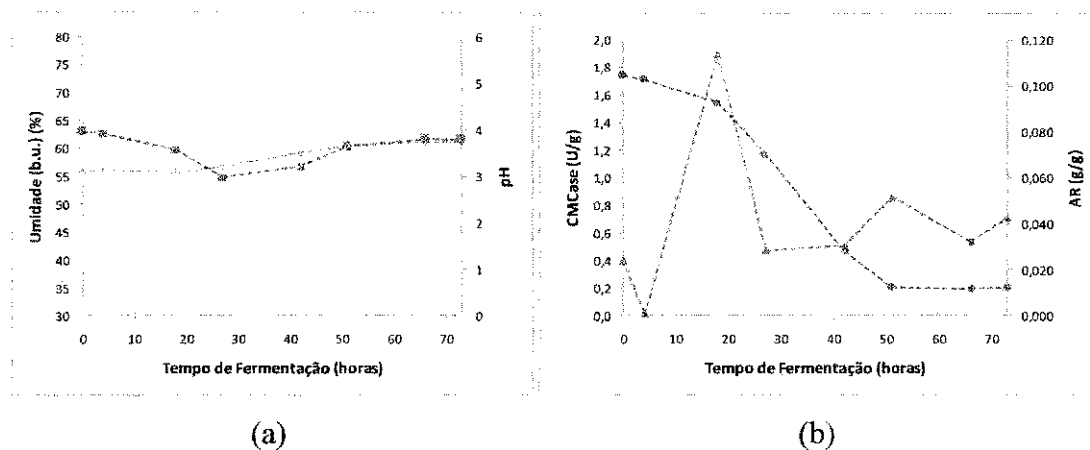


Figura 19 – Perfil cinético médio do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma* sp. em bagaço de caju sem lavar – Ensaios 5, 6 e 7 ((a) – Umidade (◆) e pH (■); (b) – Açúcares Redutores (●) e Atividade Enzimática (▲)).

Uma análise de todos os ensaios do planejamento experimental para o bagaço sem lavar, mostrou que o comportamento da umidade e do pH em ambos os casos foram semelhantes. Para todas as condições estudadas, a umidade manteve-se praticamente constante no início do processo fermentativo apresentando um aumento no seu valor a partir das 27 horas de fermentação até o final do processo devido, provavelmente, às atividades metabólicas ocorridas ao longo do processo fermentativo, já que os erlenmeyers utilizados no estudo foram tampados com algodão e papel alumínio.

O pH encontrado ao longo do estudo apresentou comportamento semelhante para todas as condições estudadas. O pH foi praticamente constante entre 0 e 4 horas de fermentação para os ensaios com 65% de umidade inicial e entre 0 e 18 horas de fermentação para os casos em que utilizou-se 45 e 55% de umidade inicial (ensaios 2, 4 e pontos centrais). Em seguida, o pH sofreu variações ao longo do processo fermentativo, provavelmente, devido à produção e assimilação de ácidos orgânicos ocorridos ao longo do estudo (Botella *et al.*, 2007). A diminuição no pH pode ser atribuída, além da produção de ácidos orgânicos, à formação do íon hidrogênio durante o consumo da amônia que foi utilizada na suplementação de nutrientes com o sulfato de amônio. Nos ensaios 1 e 3 (45% de umidade inicial), o pH sofreu uma diminuição no seu valor entre 18 e 42 horas de fermentação a partir de onde aumentou até o final do estudo. No ensaio 2 (65% de umidade inicial e 0,50% de fonte de nitrogênio), pode-se perceber que o pH diminuiu entre 4 e 27 horas de fermentação, sofreu um aumento em 42 horas, diminuindo até 51 horas e em seguida aumentando até o final do processo. No caso do ensaio 4 (65% de umidade inicial e 1,00% de fonte de nitrogênio), o pH diminuiu entre 4 e 27 horas de fermentação permanecendo constante até o término do processo, mostrando que em maiores concentrações de fonte de nitrogênio, não ocorreu muitas oscilações no valor do pH após 27 horas de fermentação como ocorreu no caso em que se utilizou uma menor concentração da fonte de nitrogênio. Na condição de 55% de umidade inicial e 0,75% de fonte de nitrogênio, o pH diminuiu entre 18 e 27 horas de fermentação, aumentou até 51 horas mantendo-se constante até o final do processo fermentativo. Em ambos os ensaios, o pH manteve-se numa faixa ideal para produção de enzimas com fungos filamentosos (Zheng & Shetty, 2000).

O perfil cinético de açúcares redutores apresentou comportamentos diferentes para os ensaios com o bagaço sem lavar se comparado com a fermentação com o bagaço

lavado. Nos ensaios em que a umidade inicial foi de 45% houve um pequeno acúmulo de açúcares redutores até 27 horas de fermentação quando se utilizou 0,50% de fonte de nitrogênio e até 18 horas de fermentação quando se utilizou 1,00% de fonte de nitrogênio. Esse comportamento mostrou que em atividades de água menores, a quantidade de açúcares redutores ainda não foi suficiente para o desenvolvimento do microrganismo. Nesses ensaios, após o acúmulo dos açúcares redutores, os mesmos foram hidrolisados até o término do estudo atuando como indutores no processo de produção da enzima. Nos ensaios em que a umidade inicial foi de 65% (ensaios 2 e 4) percebeu-se que os açúcares redutores foram hidrolisados ao longo de todo processo fermentativo, diferindo apenas entre 0 e 4 horas de fermentação que, para o ensaio com 0,5% de fonte de nitrogênio percebe-se uma pequena fase de adaptação do microrganismo ao meio. O comportamento percebido quando se utilizou 55% de umidade inicial e 0,75% de fonte de nitrogênio foi semelhante ao encontrado para o ensaio com 65% de umidade inicial e 1,00% de fonte de nitrogênio, os açúcares redutores foram hidrolisados desde o início do processo até 51 horas de fermentação, a partir de onde se manteve constante até o final do processo fermentativo.

De forma semelhante ao processo fermentativo utilizando o bagaço lavado, já no início do processo foi detectada atividade enzimática com valores entre 0,008 e 0,400 U/g, a partir de onde se iniciou o processo de produção da enzima em todos os ensaios, exceto para o ensaio 2 em que a atividade enzimática manteve-se constante até 4 horas de fermentação para em seguida ser iniciado o processo de produção. O pico de produção da enzima foi atingido em torno de 18 horas de fermentação para a maioria dos ensaios, exceto para os ensaios 1 e 3 que ocorreu em 73 e 27 horas de fermentação, respectivamente. O ensaio 1 obteve sua maior atividade enzimática com um valor de 1,792 U/g (0,0896 U/mL). Pode-se perceber que a produção da enzima é acentuada a partir das 42 horas de fermentação, que é também o momento em que o pH atinge seu menor valor (maior acidez) e o momento em que os açúcares redutores começam a ser hidrolisados. Já no ensaio 2, o pico de atividade enzimática foi atingido com um valor de 1,460 U/g (0,073 U/mL) e no ensaio 3 com 1,770 U/g (0,0885 U/mL). No ensaio 4, o valor máximo obtido de atividade enzimática foi de 1,212 U/g (0,0606 U/mL) e nas condições do ponto central alcançou seu valor máximo em 1,896 U/g (0,0948 U/mL). Depois de atingido o pico de atividade enzimática, exceto para o ensaio 1, percebe-se uma queda na atividade enzimática até o final do processo fermentativo, dando indícios

de que tenha ocorrido um processo de inibição da enzima produzida, provavelmente pela presença da celobiose, um dímero de glicose **Md et al. (2008)**. Além disso, percebe-se que, semelhantemente ao processo de produção da enzima com o bagaço lavado, a produção de CMCCase, em todas as condições, só ocorre a partir do momento em que há a diminuição no pH.

Uma comparação entre os ensaios 1 e 2 mostra que com uma adição de fonte de nitrogênio de 0,50%, obteve-se uma maior atividade enzimática quando trabalha-se com uma menor atividade de água (45% de umidade inicial) que foi o caso do ensaio 1 apresentando uma atividade de 1,792 U/g (0,0896 U/mL). **Chandra et al. (2008)** encontrou valores máximos de 3,24 U/g de CMCCase utilizando farelo de trigo como substrato, enquanto que **Farinas (2008)** estudando vários substratos para produção de celulases com *Aspergillus niger* encontrou uma atividade de CMCCase em torno de 17,00 U/g quando utilizou farelo de trigo como substrato.

Os ensaios 1 e 3 foram conduzidos com uma umidade inicial de 45% e percebe-se que, para essa condição, a atividade enzimática não apresentou variações significativas quando utilizou-se 0,50% e 1,00% de fonte de nitrogênio (1,792 U/g e 1,770 U/g, respectivamente). **Farinas (2008)** estudou vários substratos (farelo de soja, bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de trigo) para produção de celulases com *Aspergillus niger* e encontrou maiores atividades de CMCCase quando utilizou bagaço de laranja, farelo de trigo e farelo de soja como substrato, com atividades em torno de 13 U/g, 10 U/g e 17 U/g, respectivamente. Ainda nesse trabalho, a autora encontrou atividades de CMCCase em torno de 1 U/g quando utilizou bagaço de cana como substrato e em torno de 3 U/g quando utilizou casca de arroz como substrato.

Nos ensaios 2 e 4, foram utilizados 65% de umidade inicial e percebeu-se que para essa condição obteve-se uma maior atividade enzimática quando a adição de fonte de nitrogênio foi de 0,50% (ensaio 2) com um valor de 1,460 U/g (0,073 U/mL). **Israel (2005)**, estudando a utilização do resíduo do processamento do palmitero para a produção de enzimas hidrolíticas com *Polyporus tricholoma*, obteve uma atividade de CMCCase de 6,1 U/g em tratamentos adicionando de farelo de soja ao meio de cultivo.

O valor da atividade enzimática encontrada para a condição do ponto central, 1,896 U/g (0,0948 U/mL), foi semelhante ao encontrado por **Ruegger e Taul-Tornisielo (2003)** que, estudando a atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, encontrou alguns microrganismos com atividades

de CMCase próximas à encontrada nos ensaios do ponto central desse estudo, dentre eles estão *Colletotrichum* sp. (0,11 U/mL), *Gliocladium roseum* II (0,10 U/mL) e *Penicillium variabile* II (0,12 U/mL). **Menezes et al. (1991)** obtiveram valores próximos a 0,25 U/mL de celulase total de *Aspergillus niger*, quando utilizaram bagaço de cana, pré-tratado com solução de hidróxido de sódio 4%, como fonte de carbono.

A Tabela 9 apresenta a atividade enzimática máxima obtida para cada ensaio bem como sua respectiva produtividade.

Tabela 9 – Atividade enzimática máxima e produtividade obtidas para cada condição experimental com o bagaço sem lavar.

Ensaio	U (b.u.) (%)	N (%)	Tempo (horas)	CMCase (U/g)	Produtividade (U/g.h)
1	45	0,50	73	1,792	0,025
2	65	0,50	18	1,460	0,081
3	45	1,00	27	1,770	0,066
4	65	1,00	18	1,212	0,067
Ponto Central	55	0,75	18	1,896	0,105

Para os ensaios em que se utilizou 0,50% de fonte de nitrogênio, apesar de a atividade enzimática apresentar-se maior quando se utilizou a condição de menor atividade de água (ensaio 1), o ensaio 2, que foi conduzido em condições de maior atividade de água, apresentou uma maior produtividade com um valor de 0,081 U/g.h. Nos casos em que os ensaios foram conduzidos com 45% de umidade inicial, foi alcançada uma maior produtividade com 1,00% de fonte de nitrogênio (ensaio 3) com um valor de 0,066 U/g.h. Para os ensaios conduzidos com 65% de umidade inicial, foi obtida uma maior produtividade quando utilizou-se 0,50% de fonte de nitrogênio. Dentre todas as condições estudadas, a produtividade foi maior quando a umidade inicial foi de 55% e a fonte de nitrogênio de 0,75% com 0,105 U/g.h.

4.3. Análise do Processo Fermentativo Utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta

Por meio do planejamento fatorial e da análise de superfície de resposta, verificou-se a influência das duas variáveis de entrada (umidade inicial, U, e concentração da fonte de nitrogênio, N) sobre as respostas (atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase, CMCase, e produtividade, PROD), observando os valores máximos obtidos dessas variáveis.

4.3.1. Bagaço de Caju Lavado

A Tabela 10 apresenta os valores máximos de atividade enzimática e produtividade para cada ensaio com o bagaço lavado.

Tabela 10 – Dados de atividade enzimática e produtividade máxima para cada ensaio com o bagaço lavado.

Ensaio	U (b.u.) (%)	N (%)	Tempo (horas)	CMCase (U/g)	Produtividade (U/g.h)
1	45	0,50	27	0,807	0,030
2	65	0,50	66	0,733	0,011
3	45	1,00	42	1,173	0,028
4	65	1,00	18	0,585	0,033
5	55	0,75	18	1,113	0,062
6	55	0,75	18	1,128	0,063
7	55	0,75	18	1,182	0,066

Inicialmente foi analisado o modelo empírico sem a verificação da curvatura para a máxima atividade enzimática e produtividade. Na Tabela 11 são apresentados os modelos de regressão e os respectivos coeficientes de determinação (R^2). Os parâmetros em negrito são aqueles estatisticamente significativos a 95% de confiança e os coeficientes das equações dos modelos que possuem sinal negativo, indicando que nos

níveis mais baixos destas variáveis é onde se obtêm os maiores valores da resposta analisada.

Tabela 11 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança sem o efeito da curvatura.

Modelo Empírico	R ² (%)
CMCase (U/g) = 0,960143 - 0,1655U + 0,0545N - 0,1285UN	51,28
Prod (U/g.h) = 0,041857 - 0,0035U + 0,005N + 0,006UN	10,47

O coeficiente de determinação (R²) é uma medida da qualidade do ajustamento de regressão à nuvem de pontos, o qual pode ser expresso em percentual, multiplicando o resultado obtido por 100. Quanto mais próximo de 100 estiver o valor de R², melhor é o ajuste do modelo aos dados. Com os dados da Tabela 11, percebe-se que tanto para a atividade enzimática máxima quanto para a produtividade máxima, o ajuste dos dados ao modelo sem a verificação da curvatura não foi bom, tendo em vista que o coeficiente de determinação foi de 51,28% para a atividade enzimática máxima e de 10,47% para a produtividade máxima, dando indícios da existência dos termos quadráticos no modelo, pelo menos na região estudada e por isso decidiu-se verificar o efeito de curvatura.

Na Tabela 12 são apresentados os modelos de regressão e os respectivos coeficientes de determinação (R²) para o modelo testado com efeito da curvatura. Os parâmetros em negrito são aqueles estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Tabela 12 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança com o efeito da curvatura.

Modelo Empírico	R ² (%)
CMCase (U/g) = 0,8245 + 0,3165Curv. - 0,1655U + 0,0545N - 0,1285UN	99,27
Prod (U/g.h) = 0,0255 + 0,038167Curv. - 0,0035U + 0,005N + 0,006UN	99,69

Pode-se perceber que tanto para a atividade enzimática máxima quanto para a produtividade máxima o coeficiente de determinação foi próximo de 100%, dando

indícios que os dados se ajustaram bem ao modelo empírico com efeito da curvatura. Entretanto, para obter o modelo que produz bem o comportamento das influências das variáveis independentes sobre as variáveis respostas, seria necessário ampliar os níveis do planejamento, realizando um planejamento composto central (planejamento fatorial 2^k com configuração estrela - composto central), etapa essa que não foi realizada, ficando como uma perspectiva à este trabalho.

Em função de os modelos codificados da regressão dos dados experimentais para o bagaço lavado (Tabela 10) não apresentarem significância estatística, não se pôde construir as superfícies de resposta. Assim, observando-se os dados da Tabela 10, verifica-se que operando com uma umidade inicial de 55% em base úmida e com 0,75% de adição de fonte de nitrogênio foi alcançada maior atividade enzimática e maior produtividade.

4.3.2. Bagaço de Caju sem Lavar

A Tabela 13 apresenta os valores máximos obtidos para a atividade enzimática e produtividade para cada ensaio com o bagaço sem lavar.

Tabela 13 – Dados de atividade enzimática e produtividade máxima para cada ensaio com o bagaço sem lavar.

Ensaio	U (b.u.) (%)	N (%)	Tempo (horas)	CMCase (U/g)	Produtividade (U/g.h)
1	45	0,50	73	1,792	0,025
2	65	0,50	18	1,460	0,081
3	45	1,00	27	1,770	0,066
4	65	1,00	18	1,212	0,067
5	55	0,75	18	1,854	0,103
6	55	0,75	18	1,872	0,104
7	55	0,75	18	1,962	0,109

Inicialmente foi analisado o modelo empírico sem a verificação da curvatura para a atividade enzimática e produtividade máxima. Na Tabela 14, são apresentados os

modelos de regressão e os respectivos coeficientes de determinação (R^2). Os parâmetros em negrito são aqueles estatisticamente significativos a 95% de confiança e os coeficientes das equações dos modelos que possuem sinal negativo, indicando que nos níveis mais baixos destas variáveis é onde se obtêm os maiores valores da resposta analisada.

Tabela 14 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança sem o efeito da curvatura.

Modelo Empírico	R^2 (%)
CMCase (U/g) = 1,703143 - 0,2225U - 0,0675N - 0,0565UN	53,14
Prod (U/g.h) = 0,079286 + 0,01425U + 0,00675N - 0,01375UN	32,83

Com os dados da Tabela 14, percebe-se que, tanto para a atividade enzimática máxima quanto para a produtividade máxima, o ajuste dos dados ao modelo sem a verificação da curvatura não foi bom tendo em vista que o coeficiente de determinação foi de 53,14% para a atividade enzimática máxima e de 32,83% para a produtividade máxima, dando indícios de que haja a existência dos termos quadráticos no modelo, pelo menos na região estudada e por isso decidiu-se verificar o efeito de curvatura.

Na Tabela 15 são apresentados os modelos de regressão e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) para o modelo testado com efeito da curvatura. Os parâmetros em negrito são aqueles estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Tabela 15 – Modelos empíricos codificados para atividade enzimática (CMCase) e produtividade (Prod) máxima quando analisados ao nível de 95% de confiança com o efeito da curvatura.

Modelo Empírico	R^2 (%)
CMCase (U/g) = 1,5585 + 0,3375 Curv. - 0,2225U - 0,0675N - 0,0565UN	98,45
Prod (U/g.h) = 0,05975 + 0,045583 Curv. + 0,01425U + 0,00675N - 0,01375 UN	99,61

Pode-se perceber que tanto para a atividade enzimática máxima quanto para a produtividade máxima o coeficiente de determinação foi próximo de 100%, dando indícios que os dados se ajustaram bem ao modelo empírico com efeito da curvatura. Entretanto, para obter o modelo que produz bem o comportamento das influências das variáveis independentes sobre as variáveis respostas, seria necessário ampliar os níveis do planejamento, realizando um planejamento composto central (planejamento fatorial 2^k com configuração estrela - composto central), como indicado para o estudo com o bagaço lavado, etapa essa que não foi realizada, ficando como uma perspectiva à este trabalho.

A existência de uma curvatura no comportamento das variáveis respostas pode ser percebida analisando-se os resultados mostrados na Tabela 13, que apresenta maiores valores de atividade enzimática e produtividade no ponto central do planejamento, como já observado no estudo com o bagaço de caju lavado.

Semelhantemente ao comportamento observado para o bagaço lavado, os modelos codificados da regressão dos dados experimentais para o bagaço sem lavar (Tabela 13) não apresentaram significância estatística, e assim, não se pôde construir as superfícies de resposta. Observando-se a Tabela 13, verifica-se que operando com uma umidade inicial de 55% em base úmida e com 0,75% de adição de fonte de nitrogênio foi alcançada maior atividade enzimática e maior produtividade.

5. CONCLUSÕES

- A caracterização físico-química do bagaço de caju, lavado e sem lavar, mostrou que estes possuem viabilidade para serem utilizados como substratos na síntese de celulases em processos de fermentação semi-sólida.
- A atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase, para o bagaço lavado apresentou maior valor quando se utilizou 45% de umidade inicial e 1,00% de adição de fonte de nitrogênio com um pico de atividade de 1,173U/g em 42 horas de fermentação. Já a produtividade alcançou um maior valor quando se utilizou 55% de umidade inicial e 0,75% de fonte de nitrogênio, com um valor de 0,064U/g.h.
- A atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase, para o bagaço sem lavar apresentou maior valor quando se utilizou 55% de umidade inicial e 0,75% de adição de fonte de nitrogênio com um pico de atividade de 1,896U/g em 18 horas de fermentação. A produtividade alcançou seu maior valor (0,105U/g.h) para o bagaço sem lavar na mesma condição que a atividade enzimática alcançou seu pico.
- Uma comparação entre os resultados obtidos para o processo com o bagaço lavado e com o sem lavar mostra que no bagaço lavado, a velocidade de síntese da enzima foi menor do que a do sem lavar, fornecendo menores produtividades para todos os ensaios estudados. Utilizando-se o bagaço sem lavar foram atingidos picos de atividades de carboximetilcelulase e produtividades maiores que quando se utilizou o bagaço lavado.
- A utilização da metodologia de planejamento experimental permitiu observar que operando o processo fermentativo com as variáveis estudadas no ponto central, ou seja, com 55% de umidade inicial e 0,75% de adição de fonte de nitrogênio, obtêm-se maiores atividades enzimáticas e maiores produtividades.

6. PERSPECTIVAS

- Ampliar o planejamento experimental para o Delineamento Composto Central Rotacional (fatorial completo com configuração estrela);
- Estudar a produção da enzima carboximetilcelulase utilizando o substrato após ser submetido a um pré-tratamento para remoção da lignina;
- Avaliar a utilização de outros fungos filamentosos como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma polysporum* e *Aspergillus niger* na produção de enzimas celulolíticas;
- Avaliar a influência da agitação e da proporção de fermentado-solvente na extração da enzima;
- Analisar a atividade enzimática para outras formas de celulases como a celulase total e a β -glicosidase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABDELNASSER, N. H.; HELMY, S. M.; EL GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, n. 7, p. 249-255, 1997.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do CEPPA**, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.

ALEXANDRE, H. V.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n.1, p. 11-20, 2007.

ALMEIDA, K. V. **Caracterização físico-química da farinha de casca de frutos tropicais**. 2009. Monografia (Conclusão de Curso), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB.

ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO DA FUNDAÇÃO DO BANCO DO BRASIL. **Projeto Caju é apresentado ao presidente Lula**. Imprensa - Pautas de agosto 2007. Disponível em (acesso em 14/05/2010 as 21:19): http://www.planalto.gov.br/consea/exec/pauta_meses.cfm?cod=16229&mes=8&ano=2007

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 480 p.

BASTOS, V. D. Etanol, Alcooquímica e Biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n. 25, p. 5-38, 2007.

BEGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 219-248, 1990.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degradating enzymes and their potencial industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 586-620, 1997.

BIGELIS, R. Carbohydrases. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzyme in Food Processing**. San Diego: Academic Press, cap. 6, p. 121-158, 1993.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 3, p. 90-104, 1984.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 98-101, 2007.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, p. 254, 2001.

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

BRAVO, C. E. C; CARVALHO, E. P; SCHWAN, R. F.; GOMEZ, R. J. H. C., PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciências Agrotécnicas**, v. 24 (Edição Especial), p. 137-152, 2000.

BRUNAUER, S.; EMMETT, T. H.; TELLER, F. W. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemistry Society**, v. 60, n. 1, p. 309-319, 1933.

CAMASSOLA M.; DILLON A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 642-647, 2009.

CAMPOS, A. R. N. **Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anarcadium occidentale* L.) por fermentação semi-sólida**. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida**. 1997. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

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

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 323-328, 2007.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi**. 2004. 163f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 1993. 198f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

DA SILVA, R.; YIM, D. K.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 109-111, 1994.

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

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

DOELLE, H. W. Joint venture capital investment for clean technologies and their problems in developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 12, p. 445-450, 1996.

ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied Biotechnology and Microbiology**, v. 29, p. 257-266, 1993.

EMBRAPA. **Tecnologias**. 2004. Disponível em (acessado em 23 de Janeiro de 2004): www.cnpqc.embrapa.br/tecnologias/quersabermals/500p/P256.html

FARIA, F. S. E. D. V. **Influência de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de fermentados de caju (*Anacardium occidentale* L.) em diferentes condições de fermentação**. 1994. 99f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

FARINAS, C. S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. **São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária**, 2008.

FENNEMA, O. **Food chemistry**. New York: Marcel Decker, 1996.

FERREIRA, A. C. H.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M.; CAMPOS, W. E.; BORGES, I. Características químicas e fermentativas do capim-elefante ensilado com

níveis crescentes de subproduto da agroindústria do caju. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 723-731, 2007.

FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., Recife, 2005. **Anais...Recife: 2005.**

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; DEREDEA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades gerais do amido. **São Paulo: Fundação Cargil**, p. 221, 2001.

GILKES, N. R.; LANGSFORD, M. L.; KILBURN, D. G.; MILLER, R. C. Jr.; WARREM, R. A. J. Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 10455-10459, 1991.

GLOBO RURAL. Reforma na casa. **Globo Rural, Agropecuária, Negócios e Vida no Campo**, n. 233, p. 58-63, 2005.

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

GUPTA, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and betaglucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Process**, v. 13, n. 4, p. 166-169, 1997.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENGGERDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

HOLANDA, J. S.; OLIVEIRA, A. C. Enriquecimento protéico de pedúnculo de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 787-792, 2001.

ISRAEL M. C., **Utilização do Resíduo do Processamento do Palmito para a Produção de Enzimas Hidrolíticas por Fungos do Gênero *Polyporus***. 2005. 135f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

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

LEITÃO, M. F. F. Atividade de água e alterações microbiológicas dos alimentos. In: **Atividade de água em alimentos**. JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. Campinas: ITA, p. 13.1-13.8, 1997.

LOMAURO, C. J.; BAKSHI, A. S. LABUZA, T. P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. **Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie**, v. 18, p. 111-117, 1985.

LOPES, D. O.; BUZATO, J. B. **Produção de celulase por *Trichoderma SP. T676* por fermentação em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar**. 3^o Encontro de Bolsistas do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social, Londrina, 2008.

LOSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of pectolytic solid state fermentation. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

Md. Z. ALAM, A. A. MAMUN, I. Y. QUDSIEH, S. A. MUYIBI, H. M. SALLEH, N. M. OMAR Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 2008.

MENEZES, T. J. B., HENNIES, P. T. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *Aspergillus niger*. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 2, p. 213-219, 1991.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MILAGRES, A. M. F.; BORGES, L.; AGUIAR, C. L. Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. **Anais do SHEB**, n. 4, p. 261-269, 1994.

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

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

MITTIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de enzimas hidrolíticas para formulação de detergentes biodegradáveis. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., Brasília, 2002. **Anais...Brasília**, 2002.

MORAIS S. A. L.; NASCIMENTO E. A.; MELO D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* PARTE I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

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

MUHAMMAD S.; ROQUYA S.; AQEEL A.; SHAKEEL A. K. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, 2009.

MURTHY, M.; KARANTH, N.; RAO, K. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 38, p. 99-147, 1993.

NOVO NORDISK. **Celluclast 1,5 L: ficha técnica**. p. 3, 1996.

NP: Normas Portuguesas. **NP 1379: Inertes para argamassas e betões: Análise granulométrica**, 1976. Disponível na internet (Acessado em 12 de Junho de 2010): <http://portal.doc.ua.pt/Bibonline/normas/NP.pdf>

ORBERG, P. K. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. 1981. Dissertação (Mestrado), Oregon State University, Oregon.

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. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. **New Delhi: Asiatech**, 2001.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 8, p. 81-84, 2003.

PAULI, G. **Upzing, How to create more income, create more jobs and eliminate pollution**. Special advanced edition for the Third World Congress on Zero Emissions, 1997.

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

PERAZZO NETO, A. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus indica* Mill) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. 1999. 130f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. Piracicaba: Livraria Nobel, e. 12, p. 467, 1987b.

PINTO, G. A. S., **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 180f. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

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

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 37, p. 223-361, 1992.

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

RAMANA MURTHY, M. V.; KARANTH, N. G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Biochemical Engineering Aspects of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 38, p. 99-146, 1993.

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

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

RUGGIERO C., 2002. Disponível em (acessado em 10 de Março de 2010 às 18:31): www.todafruta.com.br

SALIBA, E. de O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SANTOS, S. F. M.; **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

SCOTT, W. J. Water Relations of Food Spoilage Microorganisms. **Advances in Food Research**, v. 7, p. 83-127, 1957.

SILVA, J. D. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. São Paulo: Editora UFV, p. 166, 1998.

SILVA, D. M.; DILLON, A. J. P. Produção de celulasas em fermentação semi sólida por uma linhagem de *Trichoderma* sp. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15., 1988. Anais... Piracicaba : FEALQ, p. 54, 1988.

SOUZA R. L. A. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato.** 2008. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

SOUZA R. L. A.; AMORIM B. C.; SILVA F. L. H.; CONRADO L. S. Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 17., 2008. Anais...Recife, 2008.

STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus *Trichosporon*. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 100, p. 381-393, 1977.

TAVARES, M. B. R. **Estudo da produção da enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica bagaço do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*.** 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

TONINI, R. C. G.; **Utilização da bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis* Mart. – Arecaceae) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler,** 2004, 125f. Dissertação (Mestrado), Faculdade Regional de Blumenau, Blumenau.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais.** 2003. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

UMIKALSON, M. S.; ARIFF, A. B.; SHAMSUDDIN, Z. H.; TONG, C. C.; HASSAN, M. A.; KARIN, M. I. A. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium*

globosum using delignified oil palm emptyfruitbunch fibre as substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 590-595, 1997.

VICTOR, O.T. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in saw dust, bagasse and corn cob. **Afr. J. Biotechnol**, p. 150-152, 2003.

VITOR HUGO DE OLIVEIRA/EMBRAPA, Disponível em (acessado em 09 de Fevereiro de 2008): www.cajucultura.com.br

VITTI, L. S. S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus sp* e seus mutantes isolados de bagaço de cana**. 1988. 108f. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

XIONG, H. Influence of pH on the production of xylanase by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochemistry**, n. 39, p. 729-733, 2004.

XU, F.; SUN, J. X.; LIU, C. F.; SUN, R. C. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 253-261, 2006.

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

APÊNDICE

DADOS DAS ANÁLISES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**→ BAGAÇO LAVADO**

Tabela A.1 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 1
(Umidade Inicial de 45% e adição de 0,50% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	4,74	45,12	0,00169	0,063
4	4,69	45,39	0,00122	0,074
18	3,65	45,90	0,01484	0,612
27	3,24	46,86	0,02504	0,807
42	3,23	49,32	0,01182	0,711
51	3,19	50,03	0,00815	0,702
66	3,27	49,61	0,00757	0,072
73	3,48	51,78	0,00705	0,567

Tabela A.2 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 2
(Umidade Inicial de 65% e adição de 0,50% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	4,61	64,62	0,00142	0,054
4	4,59	65,46	0,00083	0,060
18	3,12	66,06	0,01123	0,570
27	3,21	66,97	0,00479	0,393
42	3,37	68,22	0,00249	0,305
51	3,20	68,43	0,00189	0,189
66	3,31	68,80	0,00875	0,733
73	3,38	69,25	0,00297	0,108

Tabela A.3 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 3
(Umidade Inicial de 45% e adição de 1,00% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	4,56	45,57	0,00224	0,138
4	4,58	45,36	0,00136	0,141
18	3,59	46,09	0,01809	0,946
27	3,18	46,62	0,02303	1,119
42	3,15	47,39	0,01606	1,173
51	3,09	49,33	0,01235	1,080
66	3,12	49,96	0,01066	0,899
73	3,20	49,57	0,01369	0,883

Tabela A.4 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 4
(Umidade Inicial de 65% e adição de 1,00% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	4,50	64,84	0,00273	0,033
4	4,46	65,02	0,00372	0,066
18	3,17	66,09	0,01317	0,585
27	3,14	67,39	0,00667	0,416
42	3,13	67,93	0,00682	0,318
51	3,04	69,05	0,00614	0,249
66	3,07	69,51	0,00548	0,075
73	3,13	70,26	0,00604	0,126

Tabela A.5 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio de reprodutibilidade (Umidade Inicial de 55% e adição de 0,75% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	4,53	55,71	0,0017	0,153
4	4,52	56,35	0,0011	0,065
18	3,30	56,17	0,0167	1,141
27	3,08	57,69	0,0138	0,908
42	3,19	59,22	0,0067	0,774
51	3,21	59,79	0,0067	0,659
66	3,31	59,87	0,0045	0,491
73	3,35	61,36	0,0054	0,508

→ **BAGAÇO SEM LAVAR**

Tabela A.6 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 1 (Umidade Inicial de 45% e adição de 0,50% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	4,02	45,79	0,1525	0,008
4	3,98	45,54	0,1496	0,468
18	3,90	45,30	0,1497	0,576
27	3,46	46,80	0,1825	0,780
42	2,90	48,56	0,0539	1,368
51	3,09	48,54	0,0450	1,242
66	4,20	51,50	0,0293	1,038
73	3,44	51,62	0,0219	1,792

Tabela A.7 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 2
(Umidade Inicial de 65% e adição de 0,50% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	4,02	65,06	0,0932	0,132
4	3,98	65,53	0,0938	0,120
18	3,11	65,71	0,0715	1,460
27	2,98	66,91	0,0325	0,840
42	3,87	69,14	0,0059	0,300
51	3,10	69,58	0,0051	0,150
66	3,58	71,24	0,0063	0,171
73	3,87	70,79	0,0073	0,309

Tabela A.8 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 3
(Umidade Inicial de 45% e adição de 1,00% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	3,99	45,56	0,1305	0,270
4	3,93	46,20	0,1373	0,456
18	3,86	45,91	0,1464	0,048
27	3,38	46,56	0,1257	1,770
42	2,82	48,03	0,0430	0,521
51	3,01	48,90	0,0387	0,594
66	3,44	50,25	0,0236	0,492
73	3,56	51,45	0,0251	0,496

Tabela A.9 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio 4
(Umidade Inicial de 65% e adição de 1,00% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	3,99	65,29	0,0974	0,036
4	3,94	65,59	0,0936	0,636
18	3,18	65,59	0,0764	1,212
27	2,58	66,97	0,0268	0,204
42	2,77	68,23	0,0201	0,156
51	2,75	69,09	0,0140	0,289
66	2,68	69,91	0,0136	0,275
73	2,67	70,59	0,0108	0,021

Tabela A.10 – Dados das análises do planejamento experimental - Ensaio de reprodutibilidade (Umidade Inicial de 55% e adição de 0,75% de fonte de nitrogênio).

Tempo de Fermentação (horas)	pH	Umidade (b.u.) (%)	AR (g/g)	CMCase (U/g)
0	3,98	55,77	0,1047	0,400
4	3,92	56,36	0,1028	0,018
18	3,58	55,72	0,0929	1,896
27	2,99	56,75	0,0705	0,474
42	3,22	59,27	0,0280	0,510
51	3,64	60,66	0,0126	0,860
66	3,82	61,22	0,0117	0,540
73	3,80	61,26	0,0122	0,712