



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA EM BAGAÇO
DE PEDÚNCULO DO CAJU UTILIZANDO *Trichoderma reesei* LCB 48**

SIMONE APARECIDA DA SILVA LINS

CAMPINA GRANDE
2012

SIMONE APARECIDA DA SILVA LINS

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA EM BAGAÇO
DE PEDÚNCULO DO CAJU UTILIZANDO *Trichoderma reesei* LCB 48**

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

Área de Concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

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

**CAMPINA GRANDE
2012**





FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCEG

L651p Lins, Simone Aparecida da Silva.
Produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48/ Simone Aparecida da Silva Lins. – Campina Grande, 2012.
75 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Orientadora: Profª. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira.
Referências.

1. Bagaço. 2. Caju. 3. Semi-Sólida. I. Título.

CDU 621.316 (043)

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA EM BAGAÇO
DE PEDÚNCULO DO CAJU UTILIZANDO *Trichoderma reesei* LCB 48**

Dissertação aprovada em 31 / 03 / 2012

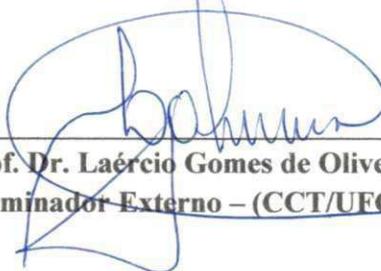
BANCA EXAMINADORA



**Prof. Dr.ª Líbia de Sousa Conrado Oliveira - UFCG
(Orientadora)**



**Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador Externo – (CCT/UFPB)**



**Prof. Dr. Laércio Gomes de Oliveira
Examinador Externo – (CCT/UFCG)**



**Prof. Dr.ª Glauciane Danusa Coelho
Examinadora Externa – (UATEC/CDSA/UFCG)**



**Prof. Dr.ª Josivanda Palmeira Gomes
Examinadora Externa – (CTRN/UFCG)**

CAMPINA GRANDE

2012

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Severino Ramos e Maria do Socorro, pelo
amor incondicional, às minhas irmãs, Suelem
e Soleane e ao meu querido noivo Rodrigo.*

AGRADECIMENTOS

O trabalho que ora se apresenta resulta, naturalmente, do esforço de várias pessoas, com as quais me sinto profundamente agradecida e com quem estarei sempre em débito.

Meus mais sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar a DEUS, que é o motivo maior de toda a minha existência, pela força e proteção nas horas mais difíceis.

Aos meus pais Severino Ramos Lins e a Maria do Socorro da Silva, por terem me proporcionado a educação que não puderam ter, sempre acreditando que meus objetivos seriam alcançados e apoiando-me nos momentos difíceis com paciência, dedicação e muito amor.

Às minhas queridas irmãs, Soleane da Silva Lins e Suelem da Silva Lins, pelo imenso carinho a mim dedicado. Nossos laços são eternos... Independe de distância e tempo.

Ao meu noivo Rodrigo Lins Rodrigues, pelo amor, carinho, companheirismo, amizade e por mesmo na distância ter sido tão presente. Meu companheiro...

À Professora Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela orientação, pela amizade, por todo apoio recebido durante a realização deste trabalho, pelo conhecimento que me passou e principalmente por ter acreditado na minha capacidade de desenvolver juntamente com ela esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química PPGEQ da Universidade Federal de Campina Grande, na pessoa de seus coordenadores Dr. Luis Gonzaga Sales Vasconcelos e Dr. Romildo Brito.

A todos os professores das disciplinas do mestrado e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial a secretária Maricé Pereira.

Ao Centro de Desenvolvimento do Semiárido, em especial amigos Adriano Marques, Ana Paloma Tavares, Norma Lima, Amanda Kelle, Mirela Guerra, Everton Oliveira, Gracielle Farias e Flávio Medeiros pela amizade e incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Glauciane Danusa Coelho, pelo apoio, pela amizade e por ter me entendido nos momentos em que mais precisei.

Aos componentes da banca examinadora Dr. Laércio Gomes de Oliveira, Dra. Josivanda Palmeira e ao Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva pela atenção, disponibilidade e principalmente pela contribuição ao trabalho realizado.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG, Berg Domingos, Flávia Lima, Silmara Alcântara, Paloma Lima, Nathalya, Ângela Maria Santiago, Mônica, Lahyana, Vitória, Mariano Neto, Daniel Portela, Daniel Barachuy, Ezenildo e Carlos Bispo, por terem ajudado nos momentos mais difíceis, por não deixarem me faltar esperança.

Aos meus amigos do curso de mestrado Maria Janaina, Guilherme Costa, Joelma Dias, Daniela Passos, Thássio Nóbrega e Vinícius Mousinho, pela amizade e parceria.

Enfim, a todos que contribuíram e me apoiaram, de forma direta ou indireta, na realização desse trabalho, meus agradecimentos.

Mas é preciso ter força. É preciso ter raça. É preciso ter gana sempre...

Quem traz na pele essa marca possui a estranha mania...

De ter fé na vida....

(Milton Nascimento e Fernando Brant)

RESUMO

LINS, S. A. S. **Produção de celulases por fermentação semi-sólida com bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande. 75f. 2012.

As celulases, dentre muitas enzimas, vem se destacando, em diversos nichos de atuação, tais como alimentício, detergentes, farmacêutico, têxtil, celulose e papel e no tratamento de efluentes e resíduos. Atualmente, a maioria das celulases microbianas comercialmente utilizadas são produzidas pela espécie *Trichoderma*, em especial o *Trichoderma reesei* com capacidade comprovada de produção de enzimas celulolíticas. Estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de produzir essa enzima através de um processo de fermentação semi-sólida a partir de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, diminuindo assim os custos de produção da enzima, e agregando valor ao resíduo. O objetivo desse trabalho foi produzir celulases a partir do bagaço do pedúnculo do caju utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48. Foi realizada a caracterização do resíduo visando conhecer a composição química do bagaço do caju com relação aos nutrientes presentes, uma vez o mesmo foi utilizado como substrato durante o processo fermentativo para a produção das celulases. O estudo da produção dessas celulases foi realizado através do planejamento experimental fatorial 2^2 com quadruplicata no ponto central. O bagaço do pedúnculo do caju lavado inoculado com *T. reesei* foi avaliado quanto à produção de celulases com teores de umidade iniciais de 45, 55 e 65% e em presença de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio) nas concentrações 0,5, 0,75 e 1%. A fermentação se desenvolveu ao longo de 238 horas durante os quais foram analisados os parâmetros pH, umidade, AR e atividade enzimática expressa em CMC_{case}. Através da caracterização do resíduo do bagaço do pedúnculo do caju confirmou-se que este substrato tem potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulolíticas, principalmente por ter apresentado um percentual de celulose satisfatório, por que esse é conhecidamente um excelente indutor dessas enzimas. O pico de produção de enzima celulase expressa em CMC_{case} foi obtida com 238 horas sendo esta com o valor de 0,71 U/g (0,095 U/mL), nas condições de 45% de umidade inicial e 1% de fonte de nitrogênio. A utilização da metodologia de planejamento experimental permitiu observar que a umidade inicial do substrato é uma variável determinante na produção das enzimas CMC_{cases}, e que o nível mínimo de umidade (45%) proporcionou os maiores valores de produção de CMC_{case}.

Palavras-chaves: bagaço, caju, semi-sólida.

ABSTRACT

LINS, S. A. S. **Cellulase production under semi-solid fermentation in cashew peduncle bagasse by *Trichoderma reesei* LCB 48**. Dissertation (Master Science) - Federal University of Campina. 75s. 2012.

Cellulases, among many enzymes, have been highlighted in several activities niche, such as food, detergents, pharmaceuticals, textiles, pulp and paper and wastewater treatment of effluents and residues. Currently, most commercially used microbial cellulases are produced by the species *Trichoderma*, in particular, *Trichoderma reesei* with proven ability for the production of cellulolytic enzymes. Studies have been developed in order to produce this enzyme through a process of solid state fermentation from lignocellulosic agroindustrial wastes, thus reducing the cost of enzyme production, and adding value to the residue. The aim of this work was to produce cellulases from the stalk of the cashew bagasse using *Trichoderma reesei* LCB 48. Characterizations were carried out aiming at the residue of the chemical composition of the pulp relative to the cashew nutrients, since it was used as substrate for the fermentative process for production of cellulase. The study of the production of cellulase was performed using the 2² factorial design with central point in quadruplicate. The stalk of the cashew bagasse washed inoculated with *T. reesei* was evaluated for the production of cellulases with initial moisture contents of 45, 55 and 65% and in the presence of inorganic nitrogen (ammonium sulfate) at concentrations 0.5, 0.75 and 1%. The fermentation was developed over 238 hours during which the parameters analyzed were pH, moisture, AR and enzyme activity expressed in CMCase. Through the characterization of the waste bagasse from the stalk of the cashew confirm that this substrate has the potential to be used in fermentation for production of cellulolytic enzymes, mainly because it presented a satisfactory percentage of cellulose, for that is known to be an excellent inducer of these enzymes. Peak production of cellulase enzyme expressed in CMCase was achieved with 238 hours this being with a value of 0.71 U/g (0,095 U/mL), under the conditions of 45% initial moisture content and 1% of nitrogen source. Using the methodology of experimental design allowed us to observe that the initial substrate moisture is a key variable in the production of enzymes CMCases, and that the minimum level of humidity (45%) showed the highest production values of CMCase.

Keywords: bagasse, cashews, semi-solid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representações gráficas da molécula de β -D-glucose	21
Figura 2 – Modelo estrutural de microfibrila de celulose.	22
Figura 3 – Estrutura parcial da hemicelulose.	23
Figura 4 - Fórmulas dos açúcares presentes nas polioses.	24
Figura 5 - Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de <i>Eucalyptus grandis</i>	25
Figura 6 - Álcoois precursores da lignina.	26
Figura 7 - Representação esquemática do rompimento das ligações da celulose nas regiões amorfas e cristalina.....	27
Figura 8 - Fluxograma de preparação do bagaço de pedúnculo do caju.	34
Figura 9 - Placa de petri com meio básico contendo o microrganismo <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48, após período em estufa a 28°C.	44
Figura 10 - Repique do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em arroz.	45
Figura 11 - Fermentação semi-sólida em bagaço do pedúnculo do caju utilizando o <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48.....	47
Figura 12 - Análise granulométrica do bagaço do pedúnculo do caju, lavado, seco a 55°C. ...	52
Figura 13 - Perfil cinético do processo de produção de CMC _{Case} por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de pedúnculo do caju lavado, na umidade 45% e fonte de nitrogênio 0,5%.	53
Figura 14 - Perfil cinético do processo de produção de CMC _{Case} por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, na umidade 65% e fonte de nitrogênio 0,5%.	54
Figura 15 - Perfil cinético do processo de produção de CMC _{Case} por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, umidade inicial 45% e fonte de nitrogênio de 1%.	55
Figura 16 - Perfil cinético do processo de produção de CMC _{Case} por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, na umidade inicial 65% e fonte de nitrogênio 1%.	56
Figura 17 - Perfil cinético do processo de produção de CMC _{Case} por fermentação semi-sólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, na umidade inicial 55% e fonte de nitrogênio 0,75% (Ponto Central).	57

Figura 18 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os ensaios do planejamento.	58
Figura 19 - Diagrama de pareto para a análise da variável dependente atividade enzimática CMCase.....	61
Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno em função da umidade inicial e da fonte de nitrogênio para o pico de atividade enzimática CMCase.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição físico-química do pedúnculo do caju <i>in natura</i>	20
Tabela 2 - Microrganismos produtores de celulases e respectivos substratos.	32
Tabela 3 - Níveis do planejamento experimental.....	42
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com quatro repetições no ponto central.....	43
Tabela 5 - Composição química do meio de cultura.....	44
Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço do pedúnculo do caju, lavado, seco a 55°C.....	49
Tabela 7 - Dados experimentais de atividade enzimática e produtividade máxima para cada ensaio do planejamento.	60
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática CMCase.	61

ABREVIATURA E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association Official Analytical Chemists
AR	Açúcares Redutores
CBHI	Celobiohidrolase I
CBHII	Celobiohidrolase II
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CMCase	Carboximetilcelulase
CMC	Carboximetilcelulose
CPATSA	Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido
CTAA	Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos
CTRN	Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIEC	Federação das Indústrias do Estado do Ceará
FRUTNAT	Indústria e Comércio de Polpas de Frutas
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
N	Nitrogênio
PPGEQ	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

pH	Potencial Hidrogeniônico
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry
UAEQ	Unidade Acadêmica de Engenharia Química
UATEC	Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento
$U_{B.U.}$	Umidade em Base Úmida
U_i	Umidade Inicial
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.1.1 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 CAJU	19
2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	21
2.2.1 Celulose.....	21
2.2.2 Hemicelulose.....	23
2.2.3 Liginina	24
2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS	27
2.3.1 Enzimas celulolíticas.....	27
2.3.2 Microrganismos produtores de celulases	28
2.3.2.1 O gênero <i>Trichoderma</i>	29
2.3.3 Fermentação	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	33
3.2 MATÉRIA-PRIMA	33
3.2.1 Preparação do bagaço do pedúnculo do caju	33
3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU	34
3.3.1 Teor de umidade	35
3.3.2 Cinzas.....	35
3.3.3 Granulometria	36
3.3.4 Densidade aparente	36

3.3.5 Densidade real.....	37
3.3.6 Porosidade.....	37
3.3.7 pH.....	38
3.3.8 Sólidos solúveis (°brix).....	38
3.3.9 Açúcares redutores.....	38
3.3.10 Celulose.....	39
3.3.11 Extrativos.....	40
3.3.12 Proteína Bruta.....	41
3.4 PRODUÇÃO DAS CELULASES.....	42
3.4.1 Planejamento experimental.....	42
3.4.2 Microrganismo.....	43
3.4.2.1 Repique do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48.....	43
3.4.3 Processo fermentativo.....	46
3.4.3.1 Inóculo do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48.....	46
3.4.3.2 Fermentação.....	46
3.4.4 Extração das enzimas.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	49
4.2 PROCESSO FERMENTATIVO.....	52
4.3.1 Perfil cinético do processo de fermentação semi-sólida do bagaço do pedúnculo do caju, lavado, seco a 55°C.....	53
4.3.2 Análise do processo fermentativo utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	59
5. CONCLUSÕES.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

Atualmente processos biotecnológicos vêm oferecendo inovadoras possibilidades para a produção de substâncias químicas e processos mais limpos, apresentando soluções para atender à humanidade em suas mais diferentes necessidades (alimentos, energia, medicamentos), bem como suplantam tecnologias que poluem a biosfera ou que contribuem para a depleção de fontes finitas.

A produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos. Também denominadas de biocatalisadores, as enzimas são catalisadores proteicos com características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade. Este potencial catalítico é utilizado industrialmente não só nos clássicos processos fermentativos, mas também em processos de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância na indústria (PEREIRA Jr et al., 2008).

As celulasas, dentre muitas enzimas, vem se destacando, em diversos nichos de atuação, tais como alimentício, detergentes, farmacêutico, têxtil, celulose & papel e no tratamento de efluentes e resíduos. Há também o grande desafio da produção de biocombustíveis, onde atualmente, as celulasas têm sido bastante aplicadas na produção de bioetanol, a qual é usada durante a etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica para conversão da celulose em glicose (AMORIM, 2010).

A maioria das celulasas microbianas comercialmente utilizadas são produzidas pela espécie *Trichoderma* (ZHANG e LYND, 2006). Sendo obtidas basicamente endoglicanases e exoglicanases, além de uma série de enzimas complementares, como β -glicosidase, hemicelulasas e pectinases (BERLIN et al., 2005).

Considerando os nichos de atuação, é cada vez maior, internacionalmente, o uso de enzimas. O mercado mundial de enzimas é da ordem de quatro bilhões de dólares, 2,2 bilhões de dólares o mercado de enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e 1,8 bilhão de dólares o de enzimas especiais (terapêuticas, enzimas para diagnóstico e enzimas para química quiral). As celulasas e as amilases estão entre as principais enzimas de uso industrial no mundo, representando 22% desta demanda (POLITZER e BOM, 2006).

Apesar da ampla utilização das celulasas, o seu elevado custo tem tornado alguns processos onerosos. Estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de produzir essa enzima através de um processo de fermentação semi-sólida em resíduos agroindustriais, diminuindo assim os custos de produção da enzima (AMORIM, 2010).

Esse cenário é particularmente importante para o Brasil, país que necessita inserir-se de forma representativa como usuário de tecnologia enzimática, que concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo esses a fonte de carbono mais abundante do planeta (PEREIRA Jr e CASTRO, 2010). Portanto, há a necessidade de agregar valor e de aumentar o leque de possíveis aplicações destes materiais estimulando assim o interesse no desenvolvimento de processos industriais que visem o aproveitamento destes resíduos.

Devido à ampla disponibilidade de resíduos agroindustriais do caju na região Nordeste e a possibilidade real de agregar valor a tais resíduos, com significativa redução do impacto ambiental causado pelo seu acúmulo, propõe-se nesse trabalho o uso do bagaço do pedúnculo do caju como substrato semi-sólido para a obtenção de enzimas celulasas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a produção de celulases através de um processo de fermentação semi-sólida do resíduo agroindustrial do caju (bagaço do pedúnculo) utilizando como agente metabolizador o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48.

1.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o bagaço de caju seco. Os parâmetros físico-químicos analisados foram: granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade, umidade, pH, cinzas, sólidos solúveis, açúcares redutores, celulose, extrativos e proteínas;
- Produzir celulases por meio de fermentação semi-sólida, do bagaço do caju, com o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48 avaliando o pH, a umidade, a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase, por meio de cinética de fermentação;
- Avaliar as condições ótimas de produção da enzima celulase, utilizando planejamento fatorial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAJU

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical, originária do Brasil, dispersa em quase todo o seu território. A área atualmente ocupada com a cultura do cajueiro no Nordeste é de cerca de 700.000 hectares, com uma produção em torno de 1.260.000.000 quilos de pedúnculo. O estado do Ceará é o maior produtor, com uma área cultivada superior a 350.000 hectares, sendo que quase 80% das árvores plantadas estão em terras de pequenos produtores rurais, segundo a Embrapa (OLIVEIRA, 2003).

A industrialização do caju pode ser dividida nos setores de beneficiamento da castanha e do processamento do pedúnculo. O beneficiamento da castanha visa principalmente à produção da amêndoa da castanha de caju; enquanto que o processamento do pedúnculo tem como principal produto industrial o suco de caju (BARRETO et al., 2007).

Ressalta-se que além da diversidade de produtos provenientes do processamento do caju e da potencialidade de aproveitamento econômico destes, a agroindústria do caju tem ainda um grande impacto socioeconômico, em virtude do grande número de empregos gerados nas atividades agrícolas, industriais e comerciais, gerando renda e fixando o homem ao campo. Assim, a exploração do cajueiro apresenta-se como uma alternativa para melhoria da qualidade de vida do homem do campo, notadamente nas regiões mais pobres do Nordeste brasileiro (SOUZA FILHO et al., 2012).

O pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) apresenta uma grande variabilidade com relação às suas características químicas e físico-químicas, tendo como principais fatores que as influenciam o tipo de solo, o clima, o tipo de cajueiro, o estado de maturação e as condições de plantio (sequeiro ou irrigado) (SOUZA FILHO et al., 2012).

A Tabela 1, a seguir, apresenta as características físico-químicas do pedúnculo do caju *in natura*. Verifica-se o valor nutricional do pedúnculo, por seu alto teor de vitamina C, um bom conteúdo de açúcares, sendo ainda uma fonte regular de cálcio e fósforo.

Tabela 1 – Composição físico-química do pedúnculo do caju *in natura*.

Determinações	Valores médios
Umidade (%)	87,20
Cinzas (%)	0,32
Sólidos solúveis (°Brix)	9,74
pH	4,34
Acidez total titulável (%)	0,47
Açúcares redutores (%)	8,24
Açúcares não redutores (%)	0,31
Açúcares totais (%)	8,55
Vitamina C (mg/100g)	153,20
Taninos (%)	0,30
Proteína (%)	0,64
Fibra (%)	0,20
Ferro (mg/100g)	0,24
Cálcio (mg/100g)	16,00
Fósforo (MgP ₂ O ₅ /100g)	26,80

Fonte: Maia et al. (2004).

Apesar da importância socioeconômica para a região, a cajucultura apresenta baixo nível de aproveitamento do pedúnculo, algo em torno de 10 a 20% da produção. A cada ano, toneladas de alimento são jogadas no lixo ou destinadas à alimentação animal, acarretando subutilização de uma fonte de rico valor nutricional, notadamente vitamina C e minerais (FIEC, 2010).

Os resíduos são constituídos basicamente de matéria orgânica e fibra, com alto valor nutritivo, abundante e de baixo custo econômico. 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 (AMORIM, 2010).

2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica, tem origem em resíduos vegetais, florestais, animais, resíduos sólidos urbanos e industriais. Os resíduos lignocelulósicos, geralmente contêm 30-45% de celulose, 25 - 30% de lignina, 25 - 30 de hemicelulose, e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. A proporção percentual desses componentes depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (FUENTES, 2009).

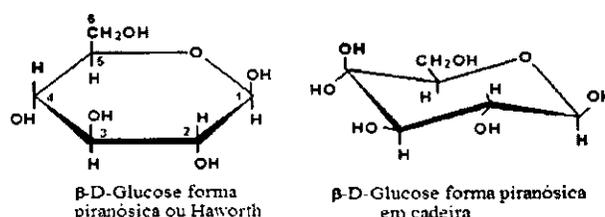
2.2.1 Celulose

A celulose responde isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. Está presente em todas as plantas e seu conteúdo pode variar de 20 a 99% de acordo com as características de cada espécie (FENGEL e WEGENER, 1989).

Dado o caráter renovável e biodegradável da celulose, ela tem sido historicamente utilizada para a manufatura de diversos produtos úteis ao homem (SCHURZ, 1999). Além disso, é o resíduo polimérico predominante da atividade agrícola (ZHANG e MIELENZ, 2006), o que vem gerando interesse crescente, nos últimos anos, visando à sua utilização para a produção de diversos produtos químicos (diferentes açúcares, ácidos orgânicos, tensoativos, adesivos, corantes, solventes, produtos farmacêuticos, etc.), além do chamado “etanol de segunda geração” (KUMAR, SINGH e SINGH, 2008).

Quimicamente, a celulose é formada por microfibrilas que são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da parede celular, estando firmemente empacotadas em cadeias lineares de D-glicoseS (Figura 1) com ligações β -(1 \rightarrow 4).

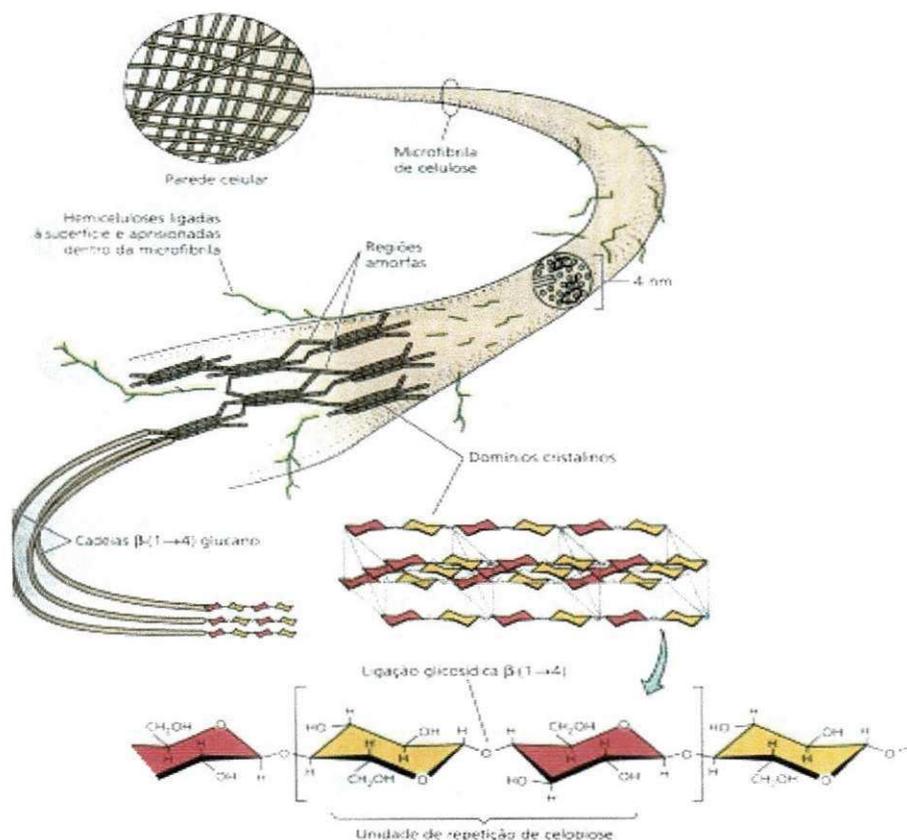
Figura 1 – Representações gráficas da molécula de β -D-glucose



Fonte: Klock (2005).

Os glucanos (polímeros de glicose) (Figura 2) que constituem a microfibrila da celulose estão fortemente alinhados e ligados entre si, formando uma fita altamente ordenada (cristalina), que exclui água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. Como resultado, a celulose é muito forte, muito estável e resistente à degradação. Devido à configuração espacial alternante das ligações glicosídicas que unem resíduos de glicose adjacentes, a unidade de repetição da celulose é considerada a celobiose, um dissacarídeo de D-glicose com ligações β -(1 \rightarrow 4). Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma subestrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por regiões amorfas menos organizadas. Dentro dos domínios cristalinos, os glucanos adjacentes estão altamente ordenados e unidos entre si por ligações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Quando a celulose é degradada, primeiramente são atacadas as regiões amorfas, liberando pequenas cristalitas, consideradas como correspondentes aos domínios cristalinos da microfibrila (KIMURA et al.,1999).

Figura 2 – Modelo estrutural de microfibrila de celulose.

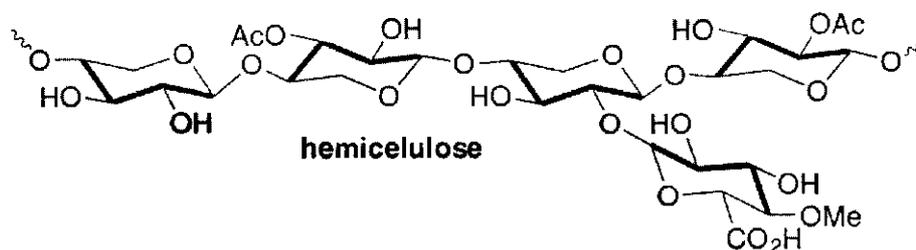


Fonte: Gallão (2012).

2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses (Figura 3) ou polioses são polissacarídeos de cadeia linear e ramificada. Elas são amorfas e possuem massa molecular relativamente baixo. Junto com a celulose, lignina, pectina e proteínas formam a parede celular das plantas (MARTINS, 2005). As hemiceluloses são depositadas de maneira intercalada nas microfibrilas de celulose, em um estágio anterior a lignificação, conferindo elasticidade e flexibilidade ao agregado de microfibrila e impossibilitando que as mesmas se toquem (AGUIAR, 2010).

Figura 3 – Estrutura parcial da hemicelulose.



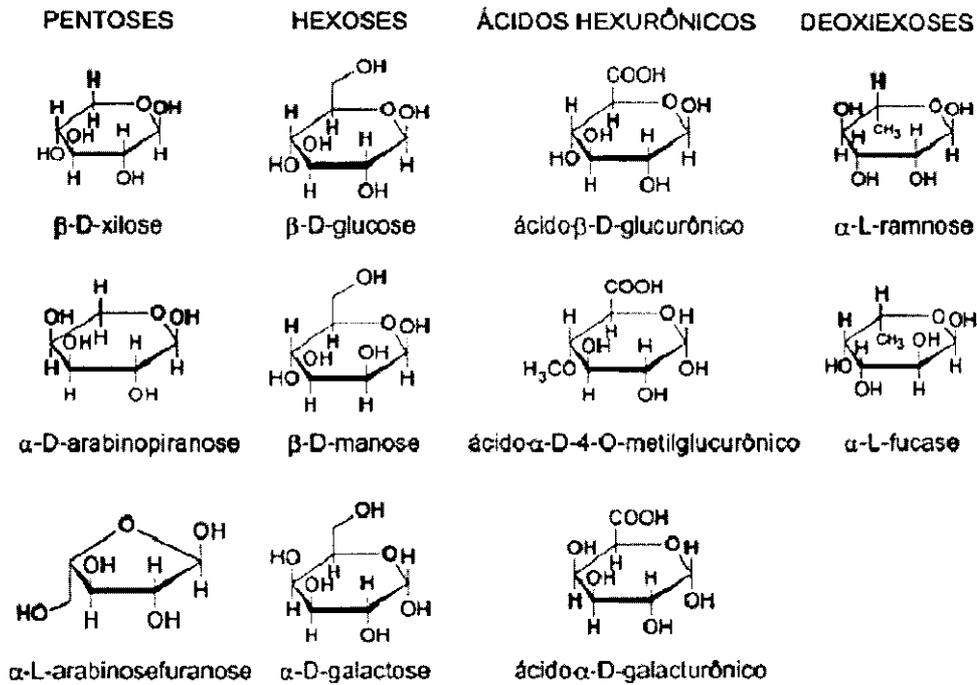
Fonte: Ferreira et al. (2009)

Hemicelulose é uma estrutura complexa de carboidratos, consiste de diferentes polímeros, a saber, polímeros de pentoses (xilose e arabinose), e polímeros de hexoses (manoses, glicose e galactose), além de ácidos hexurônicos e desoxiexoses (TAVARES, 2009). Alguns desses açúcares são mostrados na Figura 4.

Hemicelulose tem uma massa molecular menor do que a celulose e ramificações com cadeias laterais curtas, que consistem de diferentes açúcares, os quais apresentam maior susceptibilidade à hidrólise (HENDRIKS e ZEEMAN, 2008).

A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, em relação ao tipo de tecido vegetal e espécies a quem pertencem. As madeiras em geral possuem de 20 a 30% de hemicelulose na composição geral, enquanto que nas gramíneas esse valor é de 20 a 40% (SJOSTROM, 1992). Já o caju apresenta em média 15% de hemicelulose em sua composição.

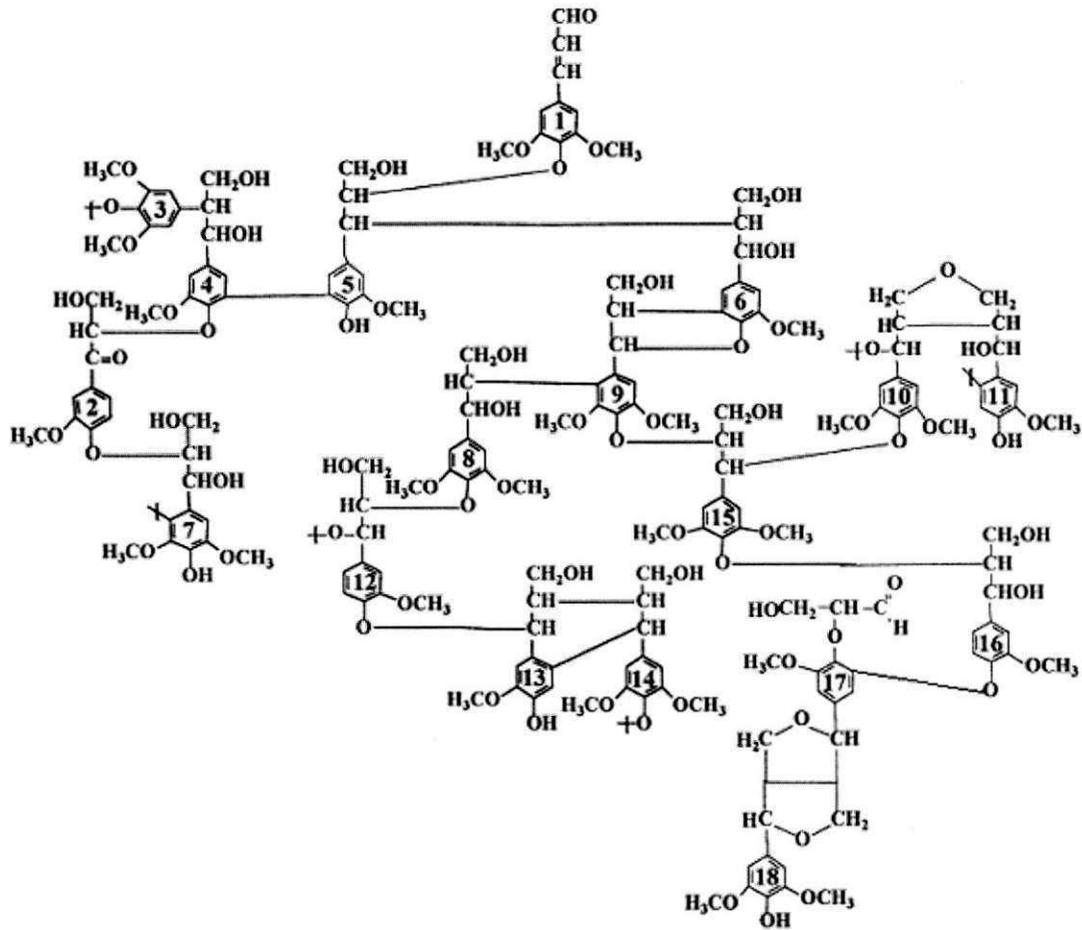
Figura 4 - Fórmulas dos açúcares presentes nas poliose.



Fonte: Tavares (2009).

2.2.3 Liginina

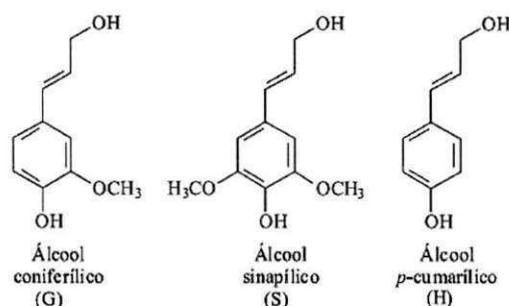
A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades de fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa (Figura 5). A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico (RABELO, 2007).

Figura 5 - Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de *Eucalyptus grandis*.

Fonte: Piló-Veloso, Nascimento e Morais (1993).

Diferentemente da celulose e hemicelulose, a estrutura da lignina não pode ser representada por uma combinação de unidades monoméricas ligadas pelo mesmo tipo de ligação química. Esta segundo Rabelo (2007), se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 6), que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente.

Figura 6 - Álcoois precursores da lignina.



Fonte: Barbosa et al. (2008).

A presença da lignina nos materiais lignocelulósicos representa o principal interferente para o processo de conversão da biomassa, já que é uma substância que atua como uma barreira. Esta estrutura apresenta-se como uma molécula capaz de fornecer rigidez às plantas, bem como, grande resistência ao ataque de microrganismos comuns (VÁSQUEZ et al., 2007).

Cardoso et al. (2012), afirmam em seus estudos que a lignina e sua distribuição constituem o fator responsável pela recalcitrância dos materiais lignocelulósicos à degradação enzimática, limitando a acessibilidade da enzima. Resultados semelhantes foram obtidos por Durrant et al. (1991). Segundo eles a lignina não permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase e a xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono, impossibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para a formação de frutificação. Tais resultados corroboram com Rajarathnam et al. (1992), que ao pesquisar a influência de microrganismos em contato com a lignina, observaram que essa macromolécula forma uma barreira física que dificulta a atividade de inúmeros organismos produtores de enzimas celulolíticas, uma vez que a lignina age 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.

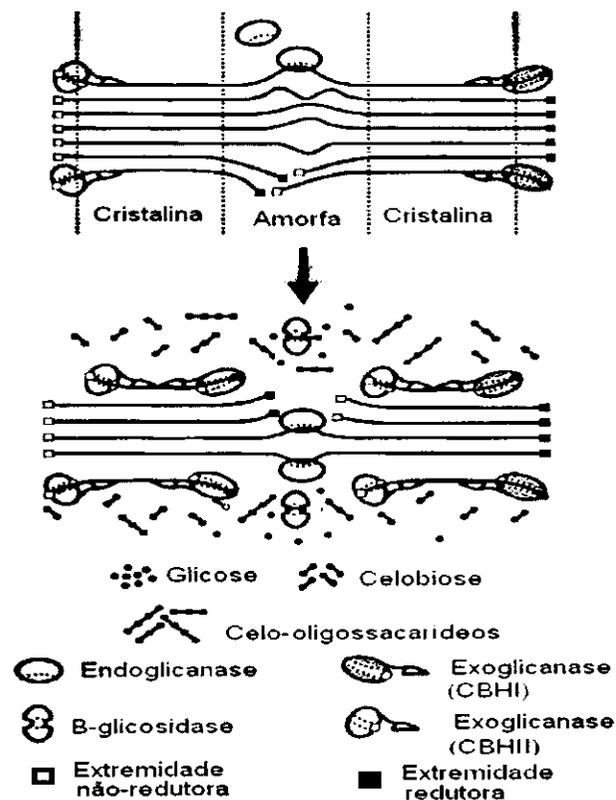
2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

2.3.1 Enzimas celulolíticas

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídas de moléculas de proteínas, produzidas por células vivas. Esses biocatalizadores apresentam alta atividade catalítica e seletividade específica sobre o substrato (SAID e PIETRO, 2004).

As celulasas são enzimas que possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (DILLON, 2004) (Figura 7). Segundo Sun e Cheng (2002) as celulasas estão divididas em três grandes grupos, com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose: a) endoglicanases, b) exoglucanases e c) β -glucosidasases.

Figura 7 - Representação esquemática do rompimento das ligações da celulose nas regiões amorfas e cristalina.



Fonte: Melo (2010).

As endoglicanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório, clivam ligações glicosídicas internas da celulose liberando oligossacarídeos de vários comprimentos e, conseqüentemente, novas cadeias finais. Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose (CMC). A celulose cristalina é menos hidrolisada devido ao maior grau de organização molecular que apresenta. As regiões de menor organização estrutural são facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (MARTINS, 2005).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) atuam nas extremidades redutoras (CBH I) e nas extremidades não redutoras (CBH II) da cadeia de celulose, produzindo majoritariamente celbiose (OYEKOLA et al., 2007). Essas enzimas não atuam sobre celulose solúvel por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes como carboximetílico (CMC). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Assim, ensaios de atividade sobre CMC são característicos para endoglicanases, enquanto que a atividade contra celulose microcristalina (Avicel ®) caracteriza as celobiohidrolases, tornando possível a diferenciação entre as enzimas (MARTINS, 2005).

As β -glicosidades, também denominadas celbiases, possuem a função de desdobrar a celbiose gerada pelas endoglicanases e celobiohidrolases em glicose. Estritamente falando, β -glicosidades não são celulases legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mais sua contribuição é muito importante para eficiência da hidrólise da celulose e remoção da celbiose do meio reacional (MEDVE, 1997). A atividade das β -glicosidades pode ser determinada usando celbiose, a qual não é hidrolisada por endoglicanases nem exoglucanases (GHOSE, 1987).

2.3.2 Microrganismos produtores de celulases

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (ROBSON e CHAMBLISS, 1989).

A produção de celulasas por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos com objetivo de estabelecer as melhores condições para a produção dessas enzimas. Nesse processo de produção de enzima, um microrganismo é utilizado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes em um meio de cultivo, ou substrato, 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 enzima viável (TAVARES, 2009).

Segundo Lynd et al. (2001) e Desvaux (2005), algumas espécies de bactérias são decompositoras da celulose, dentre as aeróbias produtoras de celulasas, estão as dos gêneros *Cellulomonas*, espécies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus*. Entre as anaeróbias estão os gêneros *Acetovibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, capazes de formar celulosomas (complexo multienzimático que possui celulasas que atuam de modo agrupado).

Ainda conforme Lynd et al. (2001) os fungos ocupam papel fundamental na degradação de biopolímeros de celulose e hemiceluloses sendo por isso, essenciais para a produção de complexos enzimáticos.

Para Nordisk (1996) e Menezes (1997) os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas. As espécies de fungos produtores de celulasas mais estudadas são *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Fusarium solani*, *Myrothecium cerrucaria*, *Sporothichum* sp., *Chaetomium*, *Aspergillus niger* e também os gêneros como *Schizophyllum* sp., *Chaetomium* sp. e *Humicola* sp. Tais fungos excretam celulasas de alta atividade no meio de cultura (RABELO, 2007; AGUIAR e MENEZES, 2000).

2.3.2.1 O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* foi descrito por Persson há mais de 200 anos atrás (RIFAI, 1969) e consiste de fungos anamórficos que habitam principalmente o solo, matéria orgânica e árvores em decomposição (GAMS e BISSET, 1998). Espécies de *Trichodermas* estão dentre os fungos mais comumente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em ecossistemas que variam desde a tundra até a tropical (SAMUELS, 1996). Essa capacidade de sobrevivência em regiões tão diferentes pode ser atribuída a sua capacidade metabólica diversificada e sua agressividade natural competitiva (KLEIN e EVELEIGH, 1998).

Isolados de *Trichoderma* podem ser reconhecidos por suas características, tais como rápido crescimento em cultura, produção de numerosos esporos (conídios), os quais comumente são verdes e micélio aéreo (BISSET, 1991). Apesar de suas características macroscópicas serem facilmente reconhecidas, este gênero carece de um conceito de espécie mais definido, em virtude de variações dentro e entre grupos de espécies (RIFAI, 1969).

Trichoderma sp. possuem um grande número de mecanismos para sobrevivência e proliferação incluindo ataque físico a outros fungos e degradação e utilização de carboidratos complexos (HARMAN, 2004). Devido a essas características esses fungos são de grande interesse econômico e são usados em aplicações comerciais. *Trichoderma reesei* é economicamente um importante produtor de celulasas e hemicelulasas e também é usado para produção heteróloga de proteínas (KUBICEK e PENTTLILA, 1998).

Segundo Ahamed e Vermette (2008), a celulase produzida por fungos filamentosos, *Trichoderma reesei*, é o sistema enzimático mais eficiente para a hidrólise completa de substratos celulósicos em componentes monoméricos de glicose, que é um açúcar fermenticível. Sendo a celulase uma enzima muito importante para o comércio, amplamente utilizada em alimentos, ração animal, têxtil, papel e celulose, a fermentação de álcool e cereais, de processamento de amido, farmacêutico e as indústrias de malte e cerveja.

O sistema extracelular celulolítico do *Trichoderma reesei* é composto por 60-80% de celobiohidrolases ou exogluconases, 20-36% de endoglicanases e 1% de β -glucosidasases, os quais actuam em sinergia na conversão de celulose em glicose. A reação sinérgica ocorre como resultado da ação, sequencial cooperativa entre os três componentes do complexo enzimático, onde o produto de uma reação enzimática torna-se substrato para outra (AHAMED e VERMETTE, 2008).

2.3.3 Fermentação

As celulasas, normalmente, são produzidas por duas metodologias de cultivo: em estado sólido ou semi-sólido e em cultivo submerso. Muitas pesquisas são conduzidas utilizando cultivo submerso, o qual permite o controle dos níveis de aeração, pH e temperatura do meio, para o crescimento ótimo do microrganismo. Contudo, a fermentação em estado sólido tem sido preferida na produção de enzimas lignocelulolíticas. Isto se explica

pelo grande número de vantagens econômicas e de processo, nos quais se destaca a natureza dos substratos utilizados como suporte e/ou fonte indutora na produção da enzima (FERREIRA, 2010).

Segundo Hölker et al. (2004) e Singhania et al. (2010) a fermentação em estado sólido é vantajosa, pois, além de simular o hábitat natural de microrganismos fúngicos selvagens, apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH.

As denominações “fermentação em estado sólido”, “fermentação em substrato sólido”, “fermentação em meio-sólido” ou simplesmente “fermentação semi-sólida”, consistem em um único processo, que é definido como o processo no qual o microrganismo cresce sobre partículas da matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) está a um nível de água que assegura o crescimento e o metabolismo das células e não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PANDEY et al., 2000).

A produtividade enzimática da fermentação em estado sólido, como todo processo biotecnológico, é definida pelo microrganismo e as condições de cultivo. Parâmetros como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade, atividade de água e temperatura representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação (SINGHANIA et al., 2010). O nível de umidade varia de acordo com o ecossistema formado entre o microrganismo e o substrato. Baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, a ineficiente utilização do substrato. Em contrapartida, o excesso de umidade resulta na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana (HOLKER et al., 2004).

Resíduos lignocelulósicos disponíveis em abundância podem ser excelentes matérias-primas para a produção enzimática por fermentação em estado semi-sólido, eles podem ser devidamente moídos ou triturados para servir de fonte de nutrientes, principalmente de carbono, em uma fermentação.

Vários trabalhos foram desenvolvidos com objetivo de analisar a produção de celulasas por fermentação semi-sólida por fungos cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos. Na Tabela 2 constam alguns microrganismos produtores de celulasas e os respectivos substratos utilizados nos processos de produção enzimática.

Tabela 2 - Microrganismos produtores de celulases e respectivos substratos.

Autores	Substrato	Microrganismo
(RODRÍGUEZ-ZÚÑIG et al., 2011)	Bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i>
(AMORIM, 2010)	Bagaço do pedúnculo do caju	<i>Trichoderma</i> sp.
(SUKUMARAN et al., 2009)	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30
(MEKALA et al., 2008)	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30
(GAO et al., 2008)	Sabugo de milho	<i>Aspergillus terreus</i> M1
(JA'AFARU e FAGADE, 2007)	Espiga de milho e serragem	<i>Aspergillus niger</i>
(SILVA et al., 2005)	Farelo de trigo	<i>Thermoascus aurantiacus</i> Miehe
(BAIG et al., 2004)	Resíduo de banana	<i>Trichoderma lignorum</i>
(LI et al., 2004)	Farelo de trigo	<i>Thichoderma koningi</i> F244
(DOGARIS et al., 2009)	Bagaço de sorgo	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Neurospora crassa</i>

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, em Campina Grande – Paraíba.

3.2 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o bagaço do pedúnculo do caju, o resíduo agroindustrial foi cedido pela indústria de produção de polpas de frutas, FRUTNAT, localizada na cidade de Campina Grande, Paraíba.

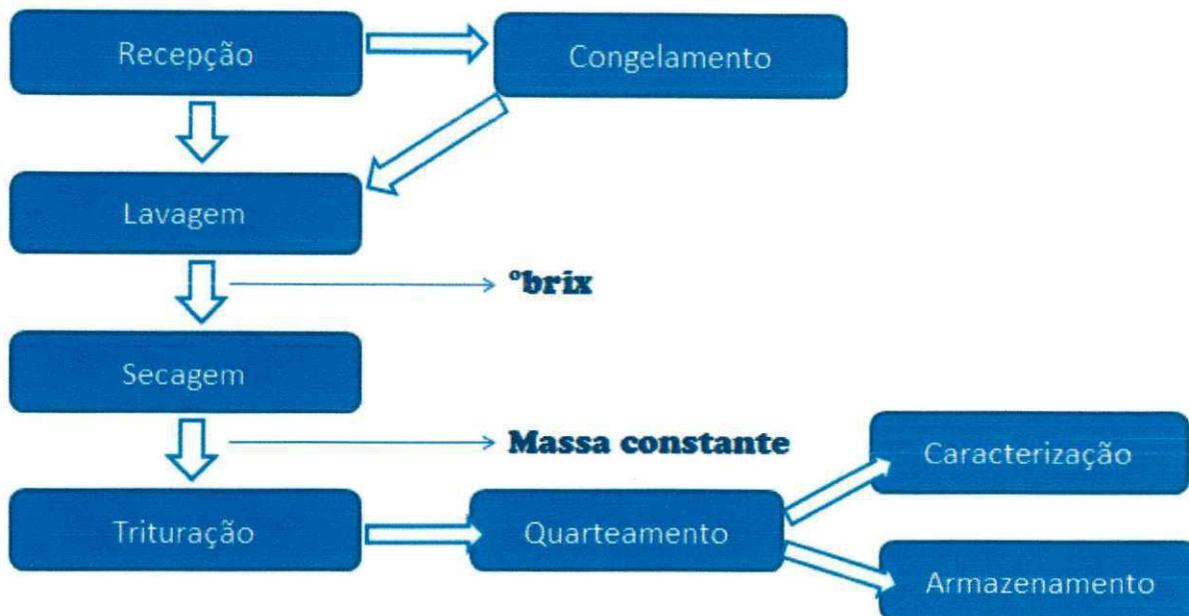
3.2.1 Preparação do bagaço do pedúnculo do caju

O resíduo utilizado no estudo da produção das celulases deste trabalho passou pelo 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 avaliado por meio da análise de sólidos solúveis (°Brix) do lixiviado do processo de lavagem.

O processo de lavagem do resíduo do caju teve como objetivo remover os açúcares contidos no substrato já que a glicose em alta concentração é um forte repressor na produção de celulases.

O fluxograma (Figura 8) a seguir, mostra todo o processo de preparação do bagaço de pedúnculo caju para armazenamento e posterior uso nas fermentações.

Figura 8 - Fluxograma de preparação do bagaço de pedúnculo do caju.



Como observado na Figura 8 o resíduo, após lavagem, foi seco em secador de leito fixo 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 4 horas. Após atingir massa constante, o resíduo foi colocado em embalagem de vidro hermeticamente fechado e triturado em moinho de facas da marca MARCONI, para obtenção da granulometria necessária.

O bagaço do pedúnculo do caju lavado, triturado e seco à 55°C foi homogeneizado, e submetido ao quarteamento para obtenção da amostra representativa para caracterização físico-química do resíduo. Todo resíduo foi armazenado em embalagem hermeticamente fechada a temperatura ambiente, até o momento de ser utilizado.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU

A caracterização físico-química do bagaço do caju foi realizada avaliando-se 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 a seguir. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.1 Teor de umidade

Para determinação da umidade do material foram colocados recipientes metálicos (latinhas de alumínio) na estufa a 105 °C por 24 h e transferidos para um dessecador, onde permaneceram por 20 a 30 min para serem esfriados. Após esse período, pesou-se $\pm 0,1$ mg do material, levando o conjunto, amostra e recipiente, para a estufa sob às mesmas condições de temperatura e tempo. Em seguida, retirou-se da estufa o conjunto e foram levados imediatamente para o dessecador, por 20 a 30 minutos, pesando depois de esfriados e obtendo-se a massa seca da amostra (AOAC, 1975). Para o cálculo do teor de umidade, em base úmida, foi usada a fórmula a seguir:

$$U_{B.U.}(\%) = \frac{m_u - m_s}{m_u} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

$U_{B.U.}$ – Umidade base úmida

m_u - Massa úmida

m_s - Massa seca

3.3.2 Cinzas

Para determinação do teor de cinzas no bagaço do pedúnculo do caju, colocaram-se cadinhos em mufla a 600°C por 30 minutos e, após esse tempo, transferiu-se os cadinhos para um dessecador, por 30 minutos, para esfriar e, posteriormente pesar, obtendo-se a tara. Pesou-se $2 \text{ g} \pm 0,1$ mg do material em cadinhos, e em seguida, foram levados para a chapa elétrica para fazer pré-queima, retirando-se apenas quando cessou a fumaça, para facilitar a combustão na mufla. Dando prosseguimento, levaram-se os cadinhos para a mufla, até atingir 600°C, prolongando-se por mais 2 horas, após as quais, foram retirados e transferidos para um dessecador, por 30 minutos, para esfriar e proceder à pesagem. (AOAC, 1975). O cálculo foi feito, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Cz (\%) = \frac{m_{cz} - m_{cad}}{m_A} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

Cz - Cinzas

m_{cz} - Massa do cadinho + cinza

m_{cad} - Mass do cadinho

m_A - Massa da amostra, em grama

3.3.3 Granulometria

O perfil granulométrico do bagaço de caju, lavado, foi determinado pesando 50 g do bagaço em uma balança analítica, e transferindo para um agitador de peneiras PRODUTEST na velocidade de agitação de 50 rpm por treze minutos, em jogo constituído por sete peneiras, seguindo as recomendações da NBR 7181 da ABNT (ABNT, 1984): 14 mesh (1,180 mm), 20 mesh (0,850 mm), 24 mesh (0,710 mm), 35 mesh (0,425 mm), 42mesh (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.

3.3.4 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 3.

$$DA \left(\frac{g}{cm^3} \right) = \frac{m_A(g)}{V (cm^3)} \quad (3)$$

Em que:

DA – Densidade Aparente

3.3.5 Densidade real

A densidade real do bagaço de caju, lavado, 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 ($V_2 - V_1$) (BRASIL, 2005). O cálculo da densidade real foi determinada pela Equação 4.

$$DR \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{m_A \text{ (g)}}{(V_2 - V_1) \text{ (cm}^3\text{)}} \quad (4)$$

Em que:

DR – Densidade Real

3.3.6 Porosidade

A porosidade do material foi determinada seguindo a metodologia descrita por Keey (1991), como mostrado na Equação 5.

$$P = 1 - \frac{DA}{DR} \quad (5)$$

Em que:

P – Porosidade

DA – Densidade Aparente

DR – Densidade Real

3.3.7 pH

O pH do bagaço de caju, lavado, 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 a completa homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e em seguida o pH foi medido diretamente em um potenciômetro digital.

3.3.8 Sólidos solúveis (°brix)

O teor de sólidos solúveis contidos no bagaço de caju, lavado, foi determinado seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005), na qual 1 g da amostra 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 de sólidos solúveis (°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.

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

3.3.9 Açúcares redutores

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

Para o desenvolvimento da metodologia foi pesada uma massa da amostra (m_A) em balança analítica e adicionado um volume de água destilada (V_A) de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração para que a concentração de açúcares redutores 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.

Os resultados de açúcares redutores foram expressos em gramas de açúcares redutores por grama de amostra analisada, seguindo a Equação 7.

$$AR \left(\frac{g_{AR}}{g_A} \right) = \frac{Abs \times F_C \times 10 \times V_A}{m_A \times 1000} \quad (7)$$

Onde:

Abs – Absorbância

F_C – Fator de conversão

V_A – Volume de água destilada

m_A – massa da amostra

3.3.10 Celulose

O teor de celulose contido no bagaço de caju, lavado, 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 incubada a 110 a 120°C em manta aquecedora em agitação. Após 20 minutos foi adicionada água destilada e o sistema continuou em agitação por um curto período de tempo para assim ocorrer uma melhor filtração. Em seguida o sistema foi deixado em repouso para resfriamento e sedimentação do resíduo insolúvel, que foi filtrado em um cadinho de Gush com kitassato acoplado a uma bomba à vácuo, sempre lavando o precipitado com água destilada. Por fim, o resíduo foi seco em estufa a 60 °C por um período de 24 horas. O teor de celulose foi calculado com base na Equação 8.

$$\% C = \frac{m_s}{m_i} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

C - Celulose

m_s - massa seca, g

m_i - massa inicial da amostra, g

3.3.11 Extrativos

O teor de extrativos foi determinado seguindo o método TAPPI T 204 cm-07 (TAPPI, 2010). Para determinação dos extrativos, foi pesada uma amostra de 10 g do bagaço do pedúnculo do caju seco, em seguida a amostra foi submetida à extração com sistema solvente (ciclo-hexano:etanol 2:1) em aparelho tipo Soxhlet, acondicionadas as amostras em cartucho confeccionado por papel de filtro quantitativo previamente tarado, por 8 horas. Após este tempo os solventes foram removidos, e os resíduos obtidos no cartucho foram secos em estufa a 105°C até massa constante, para a determinação do teor de extrativos totais. A porcentagem de extrativos foi determinada com base na diferença de massa conforme a Equação 9.

$$\%EX = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

EX - Extrativos

m_i - massa inicial, g

m_f - massa final, g

3.3.12 Proteína Bruta

Para determinação da proteína bruta utilizou-se o método semi-micro Kjeldahl adaptado para nitrogênio por espectrofotometria para determinação da concentração de proteína bruta do bagaço do pedúnculo do caju (LE POIDEVIN e ROBINSON, 1964). Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,1 g da amostra, 50 mg de sulfato de sódio, 7 a 10 gotas de sulfato de cobre a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico. A seguir foi feita uma pré-digestão a frio por aproximadamente 12 horas. Em bloco digestor aqueceu-se a amostra aumentando a temperatura e 50 °C por hora até alcançar 350 °C. Retirou-se a amostra do bloco digestor quando esta apresentou coloração verde clara, indicando que toda a matéria orgânica havia sido digerida. A amostra fria, foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Fez-se a aferição. Com isso, obteve-se o Extrato 1. Colocou-se 1 mL do Extrato 1 em um balão volumétrico de 50 mL. Acrescentou-se 1 mL de hidróxido de sódio 10%, 1 mL de silicato de sódio 20%, 2 mL do reativo de Nessler e aferiu-se com água destilada. Deixou-se em repouso por 30 min. As leituras foram feitas em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 410 nm. Em paralelo foi feita a curva padrão do nitrogênio a partir de uma solução de sulfato de amônia 10 ppm. A porcentagem de proteína bruta foi obtida através da Equação 10.

$$\% \text{ PB} = \text{Abs} \times \text{F} \times 6,25 \quad (10)$$

Em que:

Abs - Absorbância

F - fator da curva de calibração

6,25 - fator de conversão

3.4 PRODUÇÃO DAS CELULASES

3.4.1 Planejamento experimental

Fez-se estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida através de um planejamento experimental. Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com quadruplicata no ponto central, totalizando 8 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória, para avaliar a umidade inicial do meio (U_i) e a fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), para verificação das variáveis mais significativas para o processo.

Os valores adotados para as variáveis foram baseados nos valores estudados por Amorim (2010), que avaliou a influência da concentração da fonte de nitrogênio e da umidade inicial sobre a produção de celulases em bagaço do pedúnculo do caju, lavado, por fermentação semi-sólida utilizando o *Trichoderma* sp.

O programa computacional Statistica TM (Versão 5.0, da Statsoft, Inc.) foi usado para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como dados relativos à Análise de variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta foi usada para fornecer um modelo matemático adequado para o processo.

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - 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 4 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com quatro 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)
8	0 (55,00)	0 (0,75)

3.4.2 Microrganismo

Foi utilizado o fungo lignocelulolítico *Trichoderma reesei* LCB 48, presente no estoque de culturas da Embrapa Semiárido, localizada em Petrolina, Pernambuco. O *Trichoderma reesei* LCB 48 foi mantido em tubos tipo eppendorf em blocos de ágar de 4-6 mm³, na presença água destilada, e estocados a temperatura de 8 °C (CASTELLANI, 1939). A conservação de fungos em frascos com água destilada estéril é de fácil manejo, armazenamento e transporte, além de mais econômica do que o método tradicional de repiques sucessivos. Esse método mantém a atividade enzimática natural dos fungos, já que a constante repicagem dos fungos em diferentes meios pode resultar em uma alteração genética e/ou enzimática. Diogo et al. (2005), ao estudar a preservação de fungos em água destilada, observou que a preservação das cepas pelo método possibilitou, em 12 meses, a manutenção da viabilidade e capacidade de esporulação de diversos fungos.

3.4.2.1 Repique do *Trichoderma reesei* LCB 48

A partir do tubo tipo eppendorf contendo o fungo em água destilada, foi realizado o primeiro repique. Para tal, foram retiradas algumas gotas da suspensão de esporos do eppendorf e em seguida transferidas para placas de petri contendo meio básico formulado pelo

laboratório do CTAA (Embrapa Agroindústria de Alimentos). Neste meio a pectina é a única fonte de carbono, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição química do meio de cultura

Componentes (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
Ágar-agar	20,00
Água destilada	q. s. p.*

(*) q.s.p.= quantidade suficiente para. Fonte: Couri, (1993).

Após inocular o *Trichoderma reesei* LCB 48 em placas de petri, as mesmas foram incubadas a 28°C por um período de 10 a 12 dias ou tempo necessário para que as placas fossem totalmente cobertas por esporos (Figura 9).

Figura 9 - Placa de petri com meio básico contendo o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48, após período em estufa a 28°C.



A partir do repique em placas de petri, foi realizado o repique em arroz. Este meio de cultura foi preparado segundo protocolo da EMBRAPA/CPATSA. Para o preparo do arroz foi utilizado um becker de 1000 mL, no qual foi adicionado aproximadamente 300 g de arroz comercial e água destilada numa quantidade suficiente para cobrir o arroz. Deixou-se o arroz imerso na água por aproximadamente 30 minutos, e com auxílio de peneira foi retirado o

excesso de água. Erlenmeyers de 250 mL, contendo 15 g de arroz previamente umedecidos foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Após resfriamento o arroz umedecido e estéril foi inoculado.

O arroz foi usado como substrato devido o fungo poder crescer em uma superfície maior e que conseqüentemente aumentar sua esporulação. Chávez (2006), estudando a otimização da produção de esporos do fungo *Trichoderma*, empregando diferentes substratos como arroz, aveia, soja, trigo, cevada entre outros, obteve como melhor substrato o arroz (umedecido em água destilada), tal substrato proporcionou melhor recuperação dos conídios (45×10^{18} conídios/mL) e pureza estimada de 92,1%.

Para preparo do inóculo, foi adicionado a cada placa de Petri com microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48, entre 5 e 8 mL de espessante (Tween 80 à 0,3%) e, com o auxílio da alça de platina, foi feito o desprendimento dos esporos contidos no meio de cultivo deixando a suspensão homogênea. Com o auxílio de um pipetador, inoculou-se 1 mL de suspensão de esporos em cada erlenmeyer contendo arroz previamente autoclavado e homogeneizado. Em seguida, os erlenmeyers de 250 mL foram incubados a 28 °C por período de 10 à 15 dias, até que todo o arroz estivesse coberto de esporos (Figura 10). Após o período de cultivo do microrganismo, os erlenmeyers foram mantidos sob refrigeração por período máximo de até 3 meses e utilizados como inóculos nos ensaios de fermentação.

Figura 10 - Repique do *Trichoderma reesei* LCB 48 em arroz.



3.4.3 Processo fermentativo

3.4.3.1 Inóculo do *Trichoderma reesei* LCB 48

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 erlenmeyers contendo o arroz com esporos. Após, agitação, os esporos foram transferidos para béquer estéril com auxílio de gaze e algodão estéril para a contagem. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume da suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a se ter um inóculo de 10^7 esporos por grama de meio.

3.4.3.2 Fermentação

Em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço do pedúnculo de caju, lavado, água destilada para obtenção da umidade inicial, fonte de nitrogênio necessária para os níveis descritos na Tabela 3 e 4, foram autoclavados. Após resfriamento o substrato foi inoculado com suspensão de esporos de *T. reesei*. As suspensões foram ajustadas para conter 10^7 esporos por grama de substrato. Os erlenmeyers foram incubados por um período de 238 horas em estufa a 28°C (Figura 11), sendo esta a temperatura favorável ao desenvolvimento do microrganismo. Em intervalos regulares foram retiradas as amostras do processo, sendo os tempos de 0, 18, 27, 48, 70, 94, 118, 142, 166, 190, 214 e 238 horas, determinou-se a umidade (base úmida), pH, açúcares redutores e atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase.

Figura 11 - Fermentação semi-sólida em bagaço do pedúnculo do caju utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48.



3.4.4 Extração das enzimas

A extração do complexo enzimático foi realizada segundo o procedimento descrito por Portela (2011): 10 g do meio fermentado foi incubado com 75 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, na temperatura de 28°C, velocidade de agitação de 150 rpm, por 30 minutos, em incubadora shake da marca MARCONI. A amostra foi filtrada em gaze e algodão, ambos estéreis, para remoção dos esporos. O extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase.

3.4.5 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 se baseia 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 11.

$$CMC (U/g) = \frac{AR_{Liberado} \times 10^6}{180 \times 60} = \frac{(AR_{Com\ CMC} - AR_{Sem\ CMC}) \times 10^6}{180 \times 60} \quad (11)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização foi realizada visando conhecer a composição química do bagaço do caju com relação aos nutrientes presentes no resíduo, já que o mesmo foi utilizado como substrato durante o processo de fermentação semi-sólida para a produção das celulases.

A Tabela 6 apresenta os resultados das análises físico-químicas realizadas no bagaço do pedúnculo do caju, lavado e seco em secador de leito fixo à temperatura de 55°C.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço do pedúnculo do caju, lavado, seco a 55°C

Parâmetros	Valores
Densidade aparente (g/cm ³)	0,42±0,00
Densidade real (g/cm ³)	1,36±0,00
Porosidade	0,69±0,00
pH	5,45±0,01
Sólidos solúveis (°Brix)	0,00±0,00
AR (%)	0,21±0,00
Umidade (b.u.) (%)	7,02±0,03
Cinzas (%)	1,31±0,01
Extrativos (%)	7,60±0,33
Celulose (%)	32,37±0,50
Proteína bruta (%)	12,50±0,83

A umidade obtida a partir do resíduo do bagaço do pedúnculo do caju foi de 7,02%. Valor esse que corrobora com Amorim (2010), que em estudos de produção de celulase em fermentação semi-sólida, encontrou umidade de 7,37% para bagaço de caju lavado *in natura*. Resultado semelhante também foi encontrado por Campos (2011), em bagaço de pedúnculo do caju *in natura*, o qual foi de 7,28%.

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influenciam a fermentação em estado semi-sólido, uma vez que tem a função da atividade de água. Sendo assim existe uma necessidade de umidificar esse substrato para que o microrganismo se desenvolva nesse substrato. Em tratando-se de fungo filamentosos a atividade de água mínima necessária é de aproximadamente 0,7. Amorim (2010) observou que a partir de 20% de umidade em base seca, o que corresponde a 8% de umidade em base úmida, a mesma é suficiente para o crescimento do microrganismo.

Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão dos gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio fermentado (PARIS, 2008).

Foi observado um pH de 5,45 para o bagaço do pedúnculo do caju lavado, valor superior aos encontrados por Brandão et al. (2003) e por Alves et al. (2011) em bagaço de pedúnculo do caju sem lavar e seco o qual foi 4,23. O fato do pH ser mais elevado neste trabalho, deve-se ao processo de lavagem do bagaço do pedúnculo do caju, o qual resultou na retirada dos ácidos presentes no bagaço in natura. Fato esse que também foi observado por Amorim (2010) que obteve para o bagaço do caju lavado e sem lavar valores de pH de 4,84 e 3,94, respectivamente. Segundo Papavizas (1985), em geral o fungo *Trichoderma* é favorecido por valores mais baixos de pH, ou seja, pH ácido.

O sólido solúvel encontrado por Amorim (2010), em bagaço de caju lavado, foi de 0,0 °Brix, valor igual ao do bagaço de caju lavado utilizado nesta pesquisa. Segundo Moraes (2011), os sólidos solúveis contidos compreendem o total de sólidos dissolvidos na água, como por exemplo, açúcares, sais, proteínas solúveis e ácidos. Logo o teor de sólidos solúveis apresentou esse valor em função das lavagens feitas no bagaço retirando praticamente todos os sólidos solúveis contido no substrato.

A porcentagem de extrativos presentes no bagaço de caju lavado (7,60%) é semelhante aos encontrados nas amostras de casca de arroz (6,1%) e palha de trigo (9,8%) (SILVA, 1997). No entanto, Amorim (2010) encontrou valores bem superiores trabalhando também com bagaço de caju lavado, 14,66% em média. O baixo teor de extrativos encontrados nesse trabalho possivelmente está associado à eficiência do processo de lavagem do caju, que proporcionou uma boa extração de taninos, óleos essenciais, pectinas, compostos fenólicos e

açúcares simples presentes no substrato, fato que é bom para o processo de fermentação, já que os extrativos tem efeito inibitório no processo de conversão da biomassa (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lavagem do pedúnculo do caju foi uma estratégia adotada no presente trabalho, para retirar do referido substrato substâncias que poderiam reprimir a síntese enzimática, como por exemplo, a glicose que apesar de em geral ser excelente fonte para o crescimento celular é reportada como repressora, quando em grande quantidade, para a produção de diversas enzimas, sendo uma delas a celulase (BON et al., 2008).

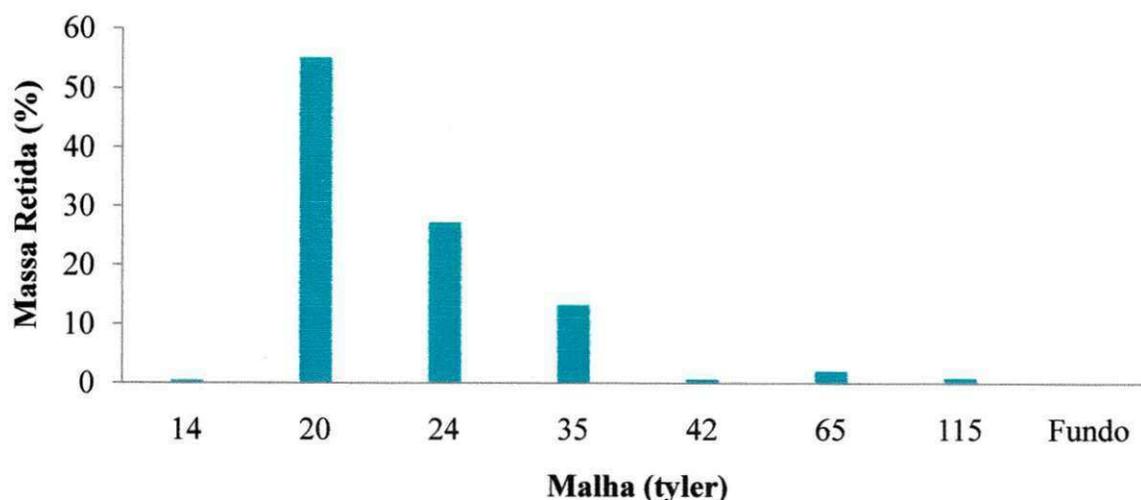
A concentração de açúcares redutores (glicose e frutose) obtida para o bagaço do pedúnculo do caju foi de aproximadamente 0,21%. Considerando-se que o substrato foi lavado, o resultado está de acordo com o obtido por Amorim (2010), que foi de 0,31%.

O percentual médio de celulose verificado neste estudo foi de 32,37%, valor esse que se mostra superior ao encontrado por Campos (2011) 22,95%, o qual trabalhou com bagaço de caju *in natura*. Porém o teor de extrativos do autor citado foi superior ao encontrado neste trabalho, sendo assim pode-se dizer que houve uma concentração de celulose após o processo de lavagem do material. O teor de celulose encontrado na biomassa estudada nesse trabalho se aproxima dos demais resíduos agroindustriais, como o sabugo de milho com 31,7% (CRUZ et al., 2000), a palha de sorgo 34% (HERRERA et al., 2004) e a casca de aveia com 30,51% (FELIPE et al., 2003), os quais apresentaram teores de extrativos semelhantes ao reportados nesse trabalho. O percentual de celulose observado é importante já que é o polissacarídeo indutor para produção das celulases.

Para proteína bruta do bagaço do pedúnculo do caju foi obtido valor médio de 12,50% em média o qual foi semelhante ao encontrado por Alcântara (2008), em bagaço do pedúnculo do caju seco (11,54%). Campos et al. (2005), ao caracterizar bagaço de caju também observou resultados bem próximos ao encontrados nesse trabalho, obtendo 10,74% de proteína bruta.

Na Figura 11 encontra-se a distribuição granulométrica do resíduo do pedúnculo do caju lavado. Observa-se que 95,75% do bagaço ficaram retidos nas peneiras de 20, 24 e 35 mesh, o que corresponde aos tamanhos 0,850; 0,710 e 0,425 mm.

Figura 12 - Análise granulométrica do bagaço do pedúnculo do caju, lavado, seco a 55°C.



A caracterização física com relação à morfologia do substrato é essencial, sobretudo, quanto ao tamanho e a porosidade, porque estas propriedades governam a área superficial acessível ao microrganismo (SANTOS et al., 2005).

Souza et al. (2010) em sua caracterização para produção de poligalacturonase por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato, encontraram valores semelhantes aos reportados nesse trabalho para a análise granulométrica, sendo estes próximos a 20, 24 e 35 mesh.

A densidade aparente ($0,42\text{g/cm}^3$) revela que os resíduos tendem a não se compactarem completamente, segundo Santos (2007), fator propício ao desenvolvimento de microrganismo, visto que os espaços vazios criados pelo resíduo são suficientes para a circulação de ar.

A estrutura do substrato, sobretudo, tamanho e porosidade, determinam a área superficial acessível ao microrganismo e à enzima. Partículas de tamanho reduzido oferecem maior área superficial ao ataque microbiana, mas ao mesmo tempo, tende a compactar-se facilmente. Neste caso, a respiração e aeração do sistema são dificultadas (SANTOS, 2007).

4.2 PROCESSO FERMENTATIVO

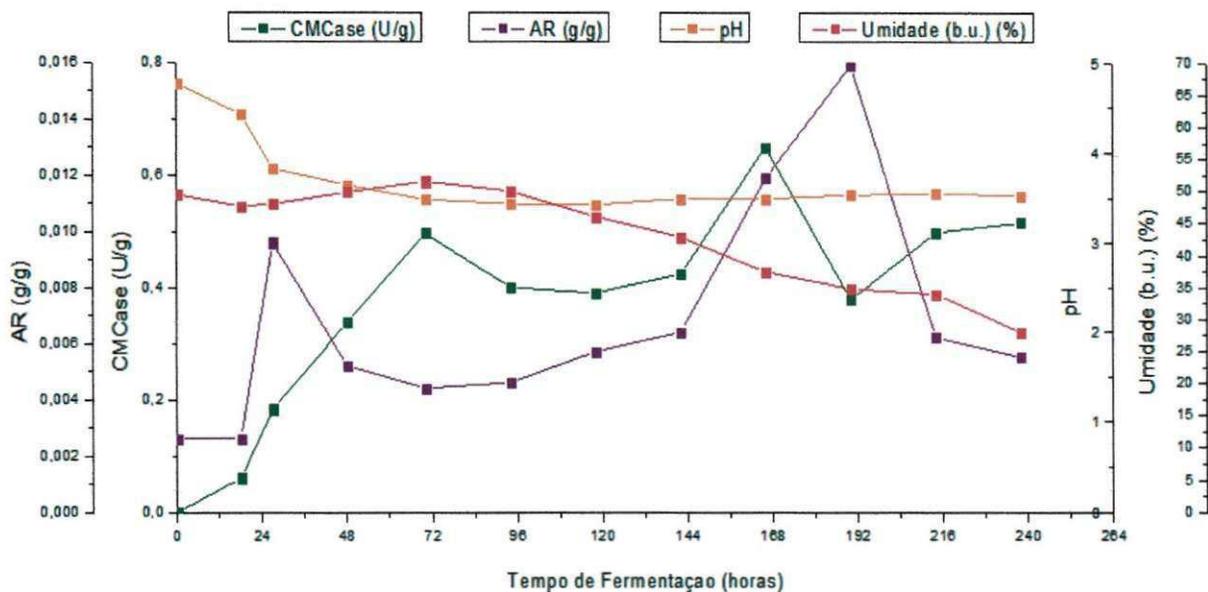
Neste item são apresentados e discutidos os resultados provenientes das cinéticas do processo fermentativo semi-sólido do bagaço do pedúnculo do caju, bem como a avaliação

dos efeitos da umidade inicial e da fonte de nitrogênio inorgânico na fermentação para a produção de CMCase utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48. Os níveis utilizados e os ensaios experimentais estão apresentados na seção 3.4.1.

4.3.1 Perfil cinético do processo de fermentação semi-sólida do bagaço do pedúnculo do caju, lavado, seco a 55°C.

Na Figura 13, observa-se o perfil do processo de produção de CMCase usando o bagaço do pedúnculo do caju lavado como fonte de carbono incrementado com uma fonte de nitrogênio (0,50%) e uma umidade inicial (45% b.u.).

Figura 13 - Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de pedúnculo do caju lavado, na umidade 45% e fonte de nitrogênio 0,5%.



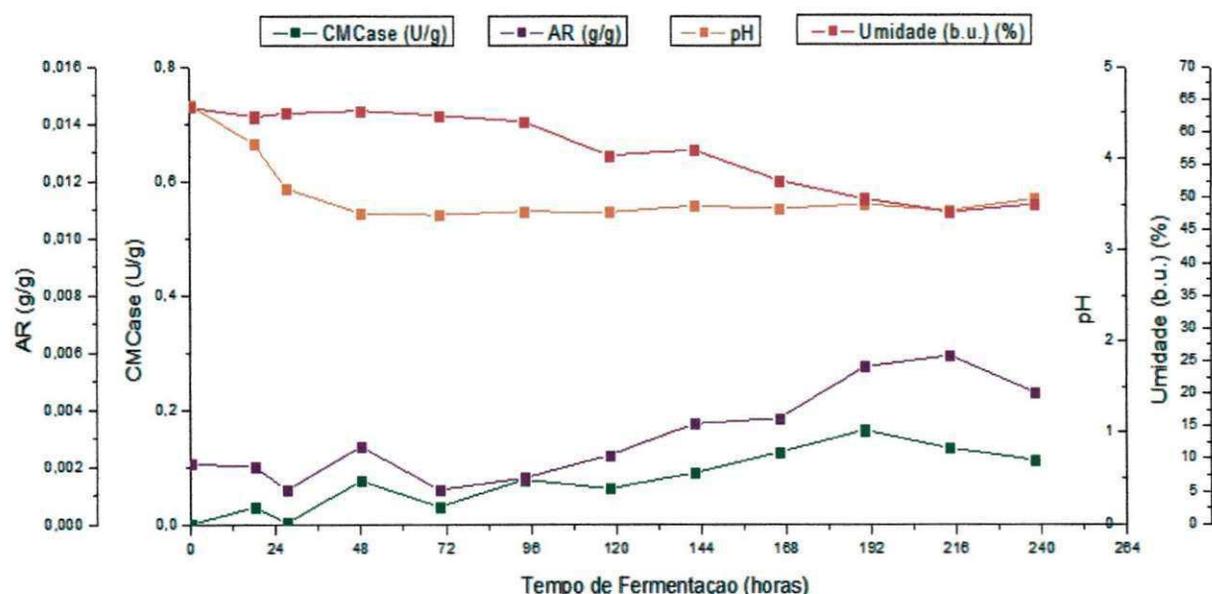
A partir da figura 13, observa-se a ocorrência de atividade enzimática já com 24h de cultivo, porém, o maior pico de atividade enzimática CMCase ocorre as 166 horas de fermentação, atingindo 0,65 U/g (0,087 U/mL). Nota-se também que após esse período houve um acúmulo de AR no meio, sugerindo que os microrganismos, foram induzidos a produzir a enzima para que a celulose fosse hidrolisada a componentes fermentescíveis.

No início do ensaio o pH do meio era de 4,77 havendo uma queda em 24 horas e após esse período o mesmo apresenta-se constante. Essa queda do pH possivelmente está relacionada a produção de ácidos pelo *Trichoderma reesei*. O comportamento constante do pH no valor de 3,6 é característico da produção de celulases produzidas por fungos filamentosos. Segundo Ferreira (2010), os valores ótimos de pH para produção de celulases é na faixa ácida (3,6 - 5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos (SINGH, BATRA e SOBTI, 2001).

Após 142 horas de fermentação a umidade do meio que se apresentava constante começa a cair, tendo-se ao final uma umidade de 28%. O teor de umidade do substrato exerce uma grande influência sobre o desempenho de fermentações, entretanto, seu controle durante o processo é muito difícil. Viccini(2004), trabalhando com fermentação sólida usando fungos filamentosos em cinéticas de 30 dias, observou em seus estudos a variação na disponibilidade da água, sendo que em todos os tratamentos o teor de umidade do substrato diminuiu ao longo da fermentação.

Os resultados dos parâmetros estudados no Ensaio 02 estão detalhados na Figura 14, onde pode-se ver o perfil do processo de produção de CMCCase usando o bagaço do pedúnculo do caju como fonte de carbono incrementado com uma fonte de nitrogênio (0,50%) e uma umidade inicial (65%).

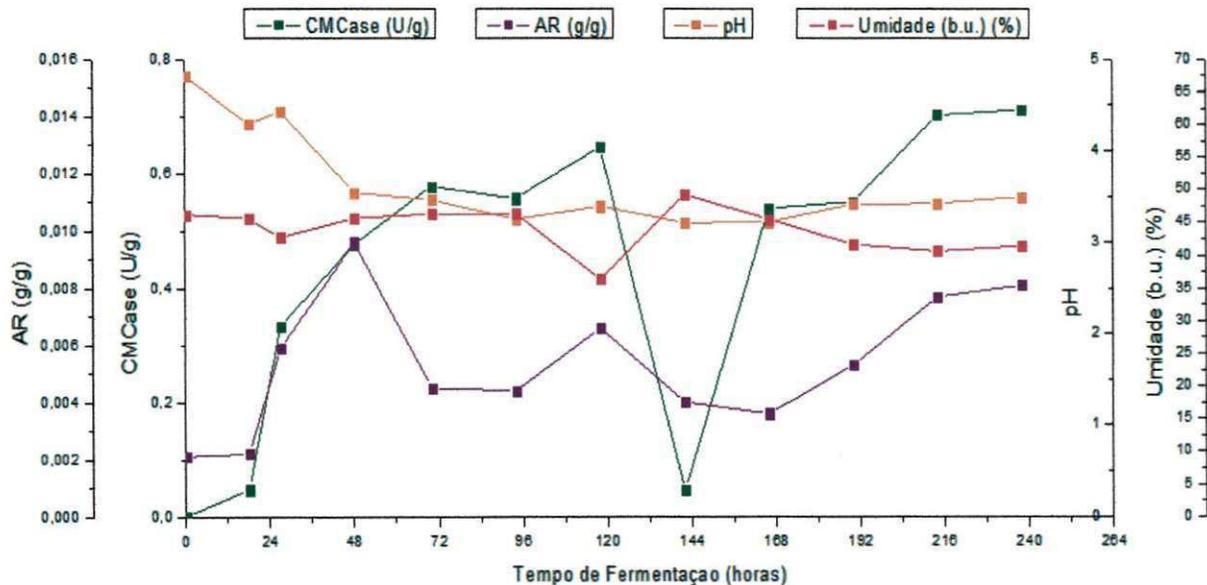
Figura 14 - Perfil cinético do processo de produção de CMCCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, na umidade 65% e fonte de nitrogênio 0,5%.



Observou-se que para uma umidade inicial do meio de 65% o microrganismo encontrou condições desfavoráveis para a produção de CMCase, visto que o pico de atividade enzimática de CMCase obtido com 190 h foi de apenas 0,16 U/g (0,021U/mL). Atividade bem inferior ao encontrado no Ensaio 01. Este teor de umidade mostrou ser um fator negativo na produção das celulases. Segundo Holker et al., (2004), o excesso de umidade resulta na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana, afetando a produção do complexo enzimático. Segundo Santos (2007), sugere que nesse caso o microrganismo encontra condições favoráveis ao seu crescimento se desenvolvendo sem a necessidade de produção de grandes quantidades de enzimas. Em condições desfavoráveis, como o Ensaio 01 no qual a umidade era bem inferior, ele foi obrigado a produzir enzimas para o seu desenvolvimento, uma caso típico de produção de enzimas por indução do substrato.

Na Figura 15 representa-se o processo de produção de CMCase e o perfil dos parâmetros estudados para o Ensaio 03, substrato bagaço do pedúnculo do caju lavado foi incrementado com fonte de nitrogênio de 1% e umidade inicial de 45%.

Figura 15 - Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, umidade inicial 45% e fonte de nitrogênio de 1%.



Neste ensaio, verifica-se que o pico de produção da enzima ocorreu em 118 horas com atividade de 0,65 U/g. Após atingir o pico de atividade enzimática, percebe-se um processo de

inibição da enzima, e um novo pico de atividade (ainda maior) em 238 horas com atividade enzimática de 0,71 U/g (0,095 U/mL).

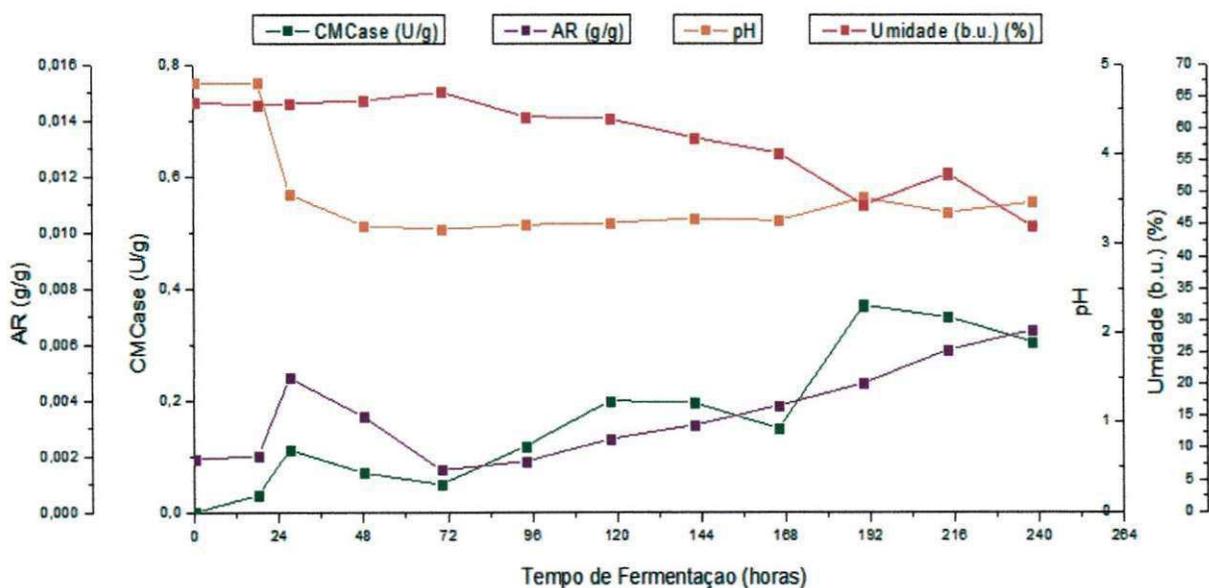
Comportamento semelhante foi encontrado por Amorim (2010), ao trabalhar com produção de celulase em bagaço de caju lavado usando o *Trichoderma sp.*, a qual verificou pico de produção seguido de processo de inibição da enzima. A autora sugere que essa diminuição da atividade pode ser atribuída ao efeito cumulativo de oligossacarídeos especialmente celobiose, um dímero de glicose, que é conhecido por inibir tanto endoglicanases como β -glicosidases.

Ao compararmos com o Ensaio 02 com o Ensaio 01 verifica-se que o aumento da fonte de nitrogênio promoveu uma maior atividade de CMCase (0,65 – 0,71 U/g). Amorim (2010) também observou que uma maior atividade enzimática foi atingida quando a adição de fonte de nitrogênio foi de 1% obtendo um valor de atividade de 1,17 U/g, valor superior ao encontrado nesse trabalho.

Em termos de produtividade houve uma sensível queda de 0,004 U/g.h no Ensaio 01 para 0,003 U/g.h no Ensaio 03.

A Figura 16 apresenta o perfil cinético dos parâmetros estudados no Ensaio 04, que foram desenvolvidos com 65% de umidade inicial e 1% de fonte de nitrogênio.

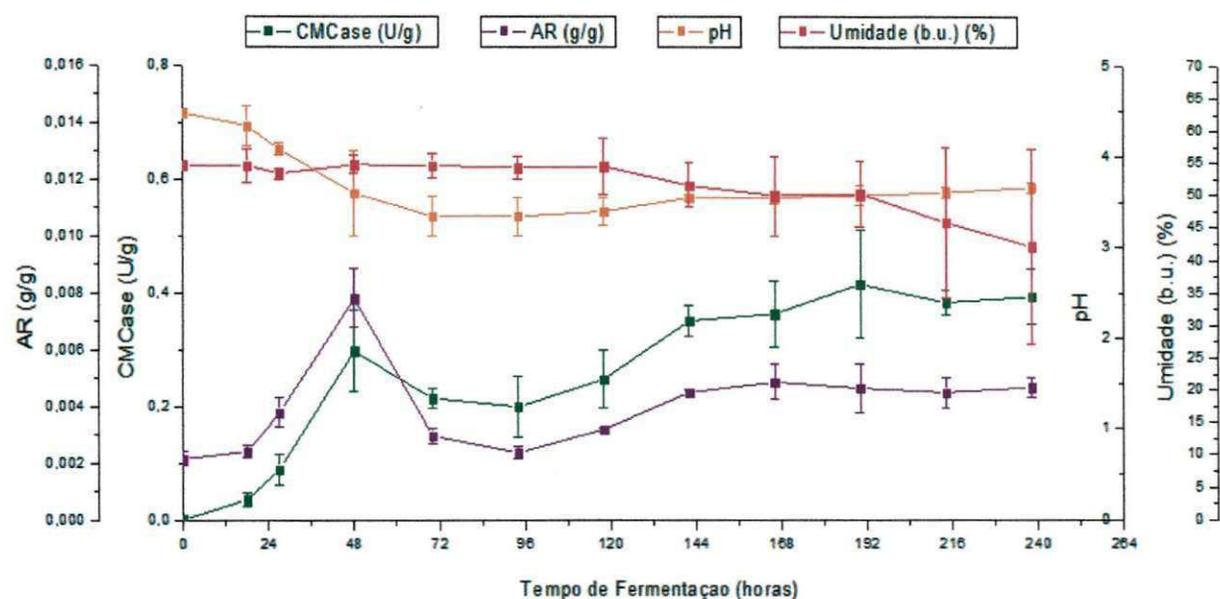
Figura 16 - Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, na umidade inicial 65% e fonte de nitrogênio 1%.



Nos Ensaios 02 e 04 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 1% (Ensaio 04) com um valor de 0,37 U/g (0,05 U/mL). Este valor de atividade é superior ao citado por Rodriguez-Zúñiga et al. (2011) para CMCase obtida em 72 h a partir de resíduo de cana-de-açúcar, 0,3 U/g, utilizando *Aspergillus Niger*.

Visto que uma das finalidades era a reprodutibilidade dos dados, foram realizados ensaios em quadruplicata do ponto central, cujas condições eram: umidade de 55% e incremento de fonte de nitrogênio de 0,75%. A Figura 17 apresenta as cinéticas dos processos para esses ensaios.

Figura 17 - Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semi-sólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de pedúnculo de caju lavado, na umidade inicial 55% e fonte de nitrogênio 0,75% (Ponto Central).



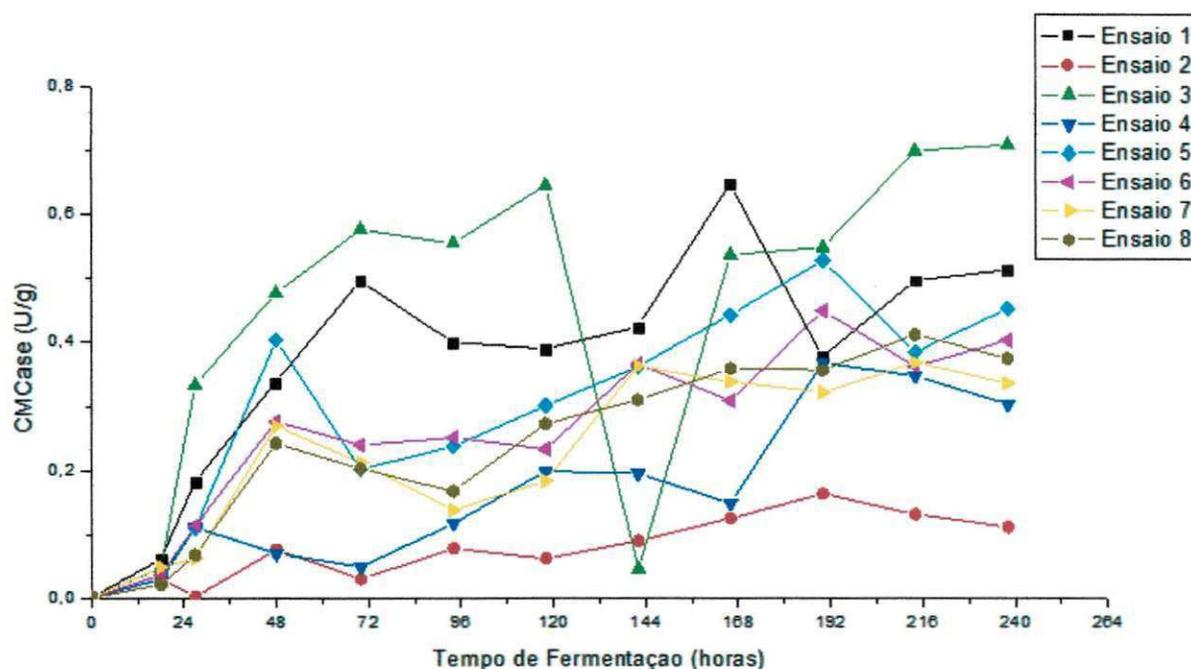
Ao analisar os resultados do ponto central pode-se inferir que ao longo do processo fermentativo o pH, a umidade, a atividade expressa em CMCase e a concentração de açúcares redutores apresentaram em geral desvios-padrões aceitáveis. Ao trabalhar com processos biológicos e fungos filamentosos, por se tratarem de processos complexos, os erros mínimos geram uma diferença considerável nos resultados.

Após 166 horas houve uma queda do teor de umidade, bem como uma maior variabilidade dos resultados. Doelle et al. (1992), afirmaram que variação da disponibilidade de água pode ser afetada pela ação dos microrganismos sobre o substrato, como pela oxidação

dos carboidratos que libera água, e um aumento do calor liberado pelo processo metabólico capaz de elevar a temperatura do substrato, provocando um decréscimo no teor de umidade devido à evaporação. Assim, tanto a evaporação quanto a formação de água ocorrem em processos de fermentação semi-sólida, sendo que o aumento ou o decréscimo na disponibilidade refletirá a diferença na contribuição relativa de cada processo.

Na Figura 18 tem-se o comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os ensaios do planejamento.

Figura 18 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os ensaios do planejamento.



Analisando a Figura 18 é possível verificar que a maior atividade observada entre os ensaios realizados a partir do planejamento experimental foi o Ensaio 03, com 45% de umidade e 1% de nitrogênio, o qual apresentou pico atividade enzimática expressa em CMCase de 0,71 U/g (0,095 U/mL) em 238 horas de fermentação. O valor encontrado neste trabalho foi semelhante aos reportados na literatura para CMCase obtida a partir de diversas fontes lignocelulolíticas. Guimarães e Conrado (2011) ao estudar a produção de enzimas celulolíticas por fermentação semi-sólida em bagaço de caju deslignificado, obtiveram atividade de CMCase igual a 0,73 U/g usando o *Trichoderma* sp. Campos (2011) ao realizar fermentação semi-sólida com bagaço de caju para produção de celulases utilizando condições otimizadas com fungo filamentosso *Trichoderma* sp, obteve valores próximos de atividade

enzimática expressa em CMCase, que foi 0,77 U/g. Lopes et al. (2008), 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.

Mendoza (2009) obteve atividade da endoglicanase de 0,032 U/mL após 9 dias de cultivo. Já em seu trabalho Basso et al. (2010) apresentaram valor 0,5 U/mL ao trabalhar com bagaço de cana-de-açúcar usando *Trichoderma reesei* QM9414, após 15 dias de fermentação. Amorim (2010), trabalhando com produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju lavado utilizando o *Trichoderma* sp., obteve sua maior atividade expressa em CMCase de 1,17 U/g (0,059 U/mL).

Os Ensaios 01 e 03, com umidade de 45%, apresentaram maiores valores de atividade enzimática expresso em CMCase, 0,65 e 0,71 U/g, respectivamente, mostrando que o menor teores de umidade proporcionaram aumento na produção de celulases.

Segundo Murthy et al. (1993), 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, a penetração de micélio para a utilização do substrato.

4.3.2 Análise do processo fermentativo utilizando a metodologia de superfície de resposta.

O processo fermentativo foi realizado avaliando a influência de dois fatores da produção de enzimas CMCases, para tal foi adotada a metodologia de planejamento fatorial 2^2 com quatro repetições no ponto central. Foram avaliadas: umidade inicial e fonte de nitrogênio. Os valores definidos para os níveis mínimos e máximos, bem como os pontos centrais referentes a cada variável estão descritos na seção 3.4.1. Através do programa computacional Statistica TM (Versão 5.0, da Statsoft, Inc.) calculou-se os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como dados relativos à Análise de Variância (ANOVA), usando o pico de atividade de cada ensaio. A metodologia de superfície de resposta foi usada para fornecer um modelo estatístico adequado para o processo.

A Tabela 7 apresenta a atividade enzimática máximas expressa em CMCase para cada ensaio do planejamento experimental.

Tabela 7 - Dados experimentais de atividade enzimática e produtividade máxima para cada ensaio do planejamento.

Ensaio	U _{B.U.} (%)	N (%)	CMCase (U/mL)	CMCase (U/g)
1	-1 (45,00)	-1 (0,50)	0,087	0,65
2	+1 (65,00)	-1 (0,50)	0,021	0,16
3	-1 (45,00)	+1 (1,00)	0,095	0,71
4	+1 (65,00)	+1 (1,00)	0,049	0,37
5	0 (55,00)	0 (0,75)	0,071	0,53
6	0 (55,00)	0 (0,75)	0,060	0,45
7	0 (55,00)	0 (0,75)	0,049	0,37
8	0 (55,00)	0 (0,75)	0,055	0,41

Ao analisar a Tabela 7, observa-se que os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos nos experimentos em que foi utilizado o nível mínimo para teor de umidade inicial (Ensaio 01 e 03).

Com os dados da Tabela 7, obteve-se por regressão um modelo linear que apresenta estimativas com 95% de confiança. Este modelo de regressão dos dados experimentais, juntamente com valores codificados das variáveis independentes. Foi proposto para representar a atividade enzimática CMCase em função da adição de fonte de nitrogênio e de umidade inicial, é apresentado na Equação 12.

$$CMCase (U/g) = 0,4523 - 0,208U + 0,068N + 0,038UN \quad (12)$$

Como se pode observar na Tabela 8, o modelo apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança, com R^2 igual a 0,924, evidenciando que o modelo explicou 92,4% da variação dos dados experimentais. O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida da qualidade do ajustamento de regressão à nuvem de pontos, o qual pode ser expresso em percentual, multiplicando o resultado por 100. Quanto mais próximo de 100 estiver o R^2 , melhor é o ajuste dos dados ao modelo.

A Tabela 8 apresenta os dados da Análise de Variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas máximas expressas em CMCase.

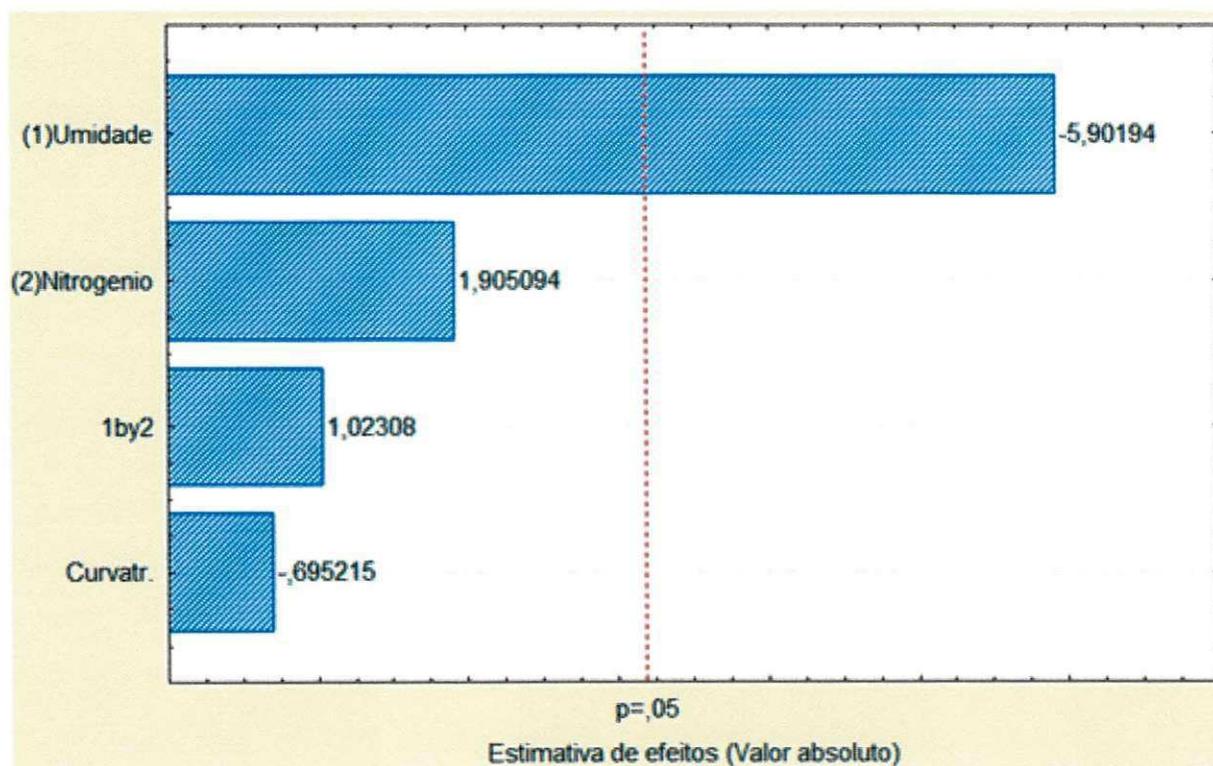
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática CMCase.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste F F_{calc}	$F_{tab(3,4)}$	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	0,1946	3	0,0649	15,122	6,59	2,29
Resíduo	0,0172	4	0,0043			
Total	0,2118	7				
R^2	0,924					

O valor do Fcalculado da regressão foi aproximadamente duas vezes maior que o Ftabelado. Segundo Box et al., (1978) sempre que essa relação for maior que 1,00 a regressão é estatisticamente significativa. Assim, pode-se dizer que os dados experimentais ajustaram-se ao modelo obtido e a análise de regressão foi estatisticamente significativa.

A Figura 19 mostra o diagrama de pareto para análise da variável dependente atividade enzimática CMCase.

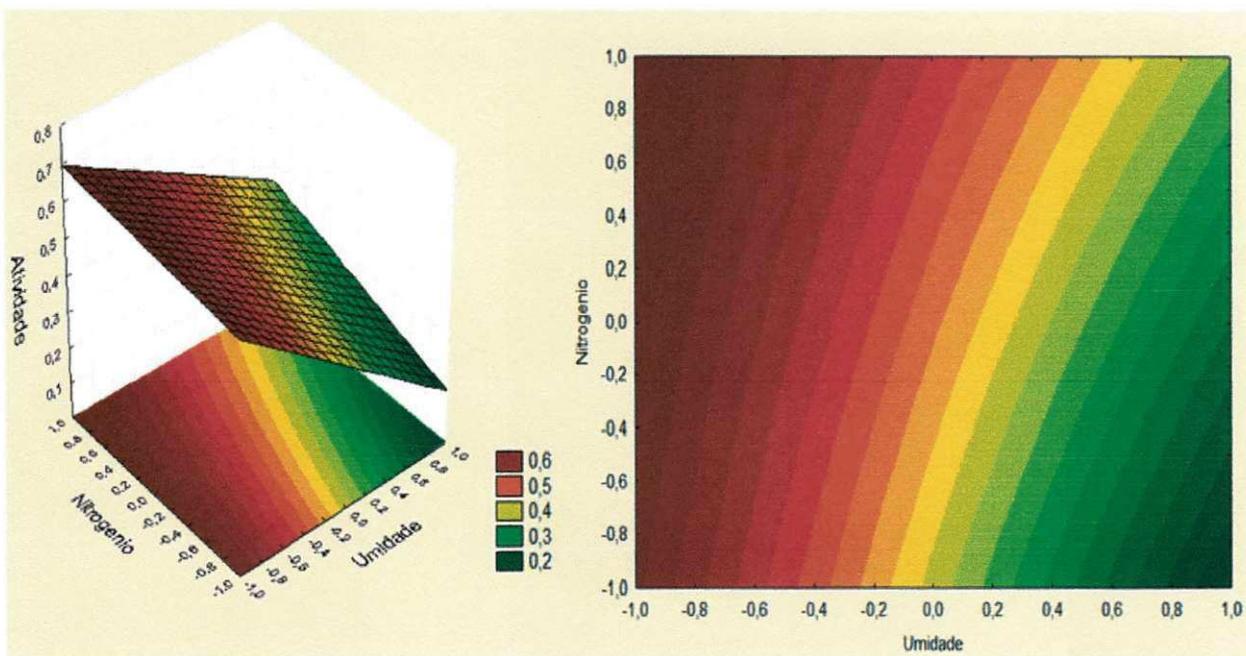
Figura 19 - Diagrama de pareto para a análise da variável dependente atividade enzimática CMCase.



Ao analisar a Figura 19, confirmou-se que a variável que apresentou influência significativa no aumento da produção de enzimas foi o teor de umidade inicial do substrato. É importante evidenciar que o erro experimental (erro puro) obedeceu a uma ordem de grandeza menor aos resultados experimentais, indicando a reprodutibilidade dos experimentos. Adicionalmente, a significância estatística apresentada pela curvatura indica que na faixa de valores avaliados o comportamento da resposta (atividade enzimática CMC_{Case}) não haveria necessidade de usar modelo quadrático.

A Figura 20 representa a superfície de resposta e as curvas de contorno para o pico da atividade CMC_{Case} em função da umidade inicial e do teor da fonte de nitrogênio, geradas através do modelo proposto (Equação 12).

Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno em função da umidade inicial e da fonte de nitrogênio para o pico de atividade enzimática CMC_{Case}.



A superfície obtida e as curvas de contorno confirmam a análise dos efeitos e permitem visualizar a variação da resposta em função das variáveis umidade inicial e teor da fonte de nitrogênio, dentro das faixas utilizadas. É possível verificar através da superfície e curvas de contorno que quando se fixa a umidade abaixo de -0,8 para qualquer valor de fonte de nitrogênio tem-se o máximo de atividade enzimática.

Por meio das análises feitas é possível inferir que a umidade foi o único fator que realmente influenciou no aumento da produção enzimática expressa CMC_{Case} utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48 na fermentação, e que a baixa umidade proporcionou as melhores

atividades enzimáticas do planejamento. Segundo Pandey et al. (2003) os fungos filamentosos pela sua peculiar capacidade de crescer em ambientes com baixa umidade relativa e na ausência de água livre são os que melhor se adaptam a ambientes com reduzida umidade e por isso são tão usados em fermentações semi-sólidas.

Alcântara (2008), avaliando a influência da umidade inicial e do teor da fonte nitrogênio, na fermentação de bagaço de caju para produção de pectinases utilizando fungo filamentoso, concluiu que a concentração de sulfato de amônio influencia de forma negativa as atividades enzimáticas, enquanto a umidade inicial influencia de forma positiva essas respostas.

Kempka et al. (2008) estudando a otimização da produção e caracterização da lipase produzida por fermentação sólida pelo fungo filamentoso *Penicillium verrucosum*, observaram que a umidade inicial do substrato foi um os principais fatores que afetaram a produção enzimática.

5. CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos pode-se concluir:

1 – A caracterização do resíduo do bagaço do pedúnculo do caju demonstrou que este é um substrato com potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulolíticas, principalmente por apresentar um percentual de celulose (35%) satisfatório, já que esse componente é conhecidamente um excelente indutor dessas enzimas.

2 - A maior produção de enzima celulase expressa em CMCase foi 0,71 U/g (0,095 U/mL) obtida em 238 horas, nas condições de 45% de umidade inicial e 1% de fonte de nitrogênio.

3 - A utilização da metodologia de planejamento experimental fatorial 2^2 permite observar que a umidade inicial do substrato é uma variável determinante na produção das enzimas CMCases, e que o nível mínimo de umidade (45%) proporcionou os maiores valores de produção de CMCase.

4 - Os dados experimentais ajustaram-se ao modelo linear, explicando 92,4% da variação dos dados. Com 95% de confiança, o modelo obtido que descreve o comportamento da atividade de CMCase em relação às variáveis é estatisticamente significativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181: Solo - Análise Granulométrica.** [S.l.]. 1984.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre o bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 18, n. 1, 2000. 57-70.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulolíticos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus Níger*.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 106 p. 2010.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

ALCÂNTARA, S. R. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida com bagaço de pedúnculo do caju: influência da atividade de água e fonte de nitroênio.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 127 p. 2008.

ALVES, F. M. S.; MACHADO, A. V.; QUEIROGA, K. H. Alimentos produzidos a partir de farinha de caju, obtida por secagem. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 131, 2011.

AMORIM, B. C. **Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium occidentale* L.) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 86 p. 2010.

AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists.** 12. ed. Washington: AOAC, 1975. 1094 p.

- BAIG, M. M. V.; BAIG, M. L. B.; BAIG, M. I. A.; YASMEEN, M. Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 447-450, 2004.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHAE, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.
- BARRETO, G. P. M.; SOUZA, A. C. R.; AZEREDO, H. M. C.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 207-213. 2007.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1282-1289. 2010.
- BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBUR, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV.; MAXIMENKO, V.; GRECC, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 175-184, 2005.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. **III. Section Pachibasium. Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2374-2417, 1991.
- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley e Sons Inc., 1978. 653 p.
- BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P. H. M. Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de pedúnculos de caju submetidos a desidratação osmótico-solar. **Revista Ciência Agrônômica.**, v. 34, n. 2, p. 139-145, 2003.

- BRASIL, M. D. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, p. 1017. 2005.
- CAMPOS, A. R. N.; SANTANA, R. A. C.; DANTAS, J. P.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L.H. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo do caju por cultivo semi-sólido. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v. 5, n. 2, 2005.
- CAMPOS, D. B. C. **Hidrólise enzimática do bagaço deslignificado do pedúnculo do caju para produção de bioetanol**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 78 p. 2011.
- CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, F. D.; RESENDE, S. T.. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. **Revista Analytica**, n. 56, p. 64-76, 2012.
- CASTELLANI, A. Viability of some pahogenic fungi in sterile distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.**, p. 225-226, 1939.
- CHÁVEZ, M. P. **Producción de *Trichoderma sp* y Evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)**.. Trabajo de grado - Pontoficia Universidad Javeriana. Bogotá. 2006.
- COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 198 p. 1993.
- CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, J. M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C.. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food biotechnology**, New York, v. 14, p. 79-97, 2000.
- DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 373-385, 2005.
- DILLON, A. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-270.
- DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 6, p. 591-594. 2005.

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. [S.l.]: Elsevier Applied Science, 1992.

DOGARIS, I.; KARAPATI, S.; MAMMA, S.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.. Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6543-6549, 2009.

DURRANT, A. J.; WOOD, D. A.; CAIN, R. B. Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid substrate fermentation. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 751-755, 1991.

FELIPE, M. G. A.; HAULY, M. C. O.; CANETTIERI, E. V.; CÂNDIDO, E. J.; TAMANINI, C.. **Avaliação da casa de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo**. Anais Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis. 2003.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, V. **Produção de B-glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 123 p. 2010.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FIEC. Evitando o desperdício. **Revista da Fiec**, Janeiro 2010. Disponível em: <http://www.sfipec.org.br/portaltv2/sites/revista/home.php?st=maisnoticias&conteudo_id=34324&start_date=2010-01-28>. Acesso em: 25 fev. 2012.

FUENTES, L. L. G. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 169 p. 2009.

GALLÃO, M. I. Parede celular vegetal, 2012. Disponível em: <www.biologia.ufc.br/backup/docentes>. Acesso em: 25 fev. 2012.

- GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. **Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. p. 3-34.
- GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GUIMARÃES, P. G.; CONRADO, L. S. **Estudo da Produção de Celulolíticas por Fermentação Semi-sólida do Bagaço do Caju Deslignificado**. VII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande. 2011.
- HARMAN, G. E. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HENDRIKS, A. T. W.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 10-18, 2008.
- HERRERA, A.; SIMÓN, J. T. L.; CABRIALES, J. J. G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M.. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 63, n. 1, p. 103-109, 2004.
- HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.
- JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. Cellulase production and enzymatic hydrolysis of some selected local lignocellulosic substrates by a strain of *Aspergillus niger*. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 13-17, 2007.
- KEEY, R. B. **Drying of loose and particulate materials**. New York: Hemisphere, 1991. 57 p.

KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. D.; OLIVIERA, D.. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosystem Engineering**, n. 31, p. 119-125, 2008.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X. J.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Jr. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **The Plant Cell**, v. 11, p. 2075-2085, 1999.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. ***Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications***. London: Taylor & Francis LTd., 1998. p. 57-74.

KLOCK, U. **Química da Madeira - Manual didático**. 3. ed. Curitiba: [s.n.], 2005. 86 p.

KUBICEK, C. P.; PENTTLILA, M. E. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. ***Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications***. London : Taylor and Francis Ltd., 1998. p. 49-72.

KUMAR, R.; SINGH , S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B.. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 1081-1100, 2005.

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. **Métodos de diagnóstico foliar utilizados nas plantações do grupo booker na Guiana Inglesa: Amostragem e técnica de análise**. 21. ed. Paris: Fertilité, 1964. 3-11 p.

LI, PEI-JUN; JING, DE-BING; ZHOU, QI-XING; ZHANG, CHUN-GUI.. Optimization of solid fermentation of cellulase from *Trichoderma koningii*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 16, n. 5, p. 816-820, 2004.

LOPES, D. O. et al. **Produção de celulase por *Trichoderma* da Amazônia T676 em fermentação em estado sólido de bagaço de cana.** Anais - Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro. 2008. p. 168-169.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2001.

MAIA, G. A. et al. Caracterização química de pedúnculos de diferentes clones de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale*, L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. Número Especial, p. 272-278. 2004.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 121 p. 2005.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 121 p. 2005.

MEDVE, J. **Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II.** Thesis (Doctor In Biochemistry) - Lund University. Lund, 49 p. 1997.

MEKALA, N. K.; SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Thichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 122-131, 2008.

MELO, G. R. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 67. 2010.

MENDOZA, D. P. G. **Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília. Brasília, p. 66. 2009.

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

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.

MORAES, R. R. Refratometria, 2011. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/REFRAT%D4METRO.PDF>>. Acesso em: 12 março 2011.

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

NORDISK, N. **Celluclast 1,5 L: Ficha Técnica**. Curitiba, p. 3. 1996.

OLIVEIRA, V. H. Cultivo do Cajueiro. **Embrapa**, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Caju/CultivodoCajueiro/index.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2012.

OYEKOLA, O. O.; NGESI, N.; WHITELEY, C. G. Isolation, purification and characterization of an endoglucanase and b-glucosidade from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 873-878, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1135-1169, 2000.

PAPAVIZAS, G. C. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 115 p. 2008.

PEREIRA Jr, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Séries em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Escola de Química, v. 1, 2008.

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

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais - Visão geral e área de enzimas, conclusões e recomendações**. CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. Rio de Janeiro, p. 580. 2006.

PORTELA, D. G. **Estudo da produção de enzimas celulolíticas por fermentação semi-sólida do bagaço do caju deslignificado**. Iniciação Científica CNPq/UFCG/PIBIC. Campina Grande. 2011.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 180 p. 2007.

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

RIFAI, R. W. A revision of the genus *Trichoderma*. **C. M. I. - Mycological Papers**, v. 116, p. 1-56, 1969.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin.. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 626-644, 1989.

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

SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas como agentes biotecnológicos. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 1, p. 1-7.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological research**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal , 132 p. 2007.

- SANTOS, S. F. M.; NOBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H.. **Caracterização do resíduo seco do pedúnculo do caju visando sua utilização como substrato para fermentação semi-sólida.** Anais - XV Simpósio Brasileiro de Bioprocessos. Recife. 2005.
- SCHURZ, J. Trends in polymer science: a bright future for cellulose. **Progress in Polymer Science**, v. 24, p. 481-483, 1999.
- SILVA, P. J. **Estudo cinético da deslignificação etanol-água da casca de arroz derivação da casca e polpa celulósica.** Tese (Doutorado) - Instituto de Física e Química de São Carlos - USP. São Carlos. 1997.
- SILVA, R. da; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.. Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus aurantiacus* Mies. **Brazilian Journal of Microbiology**., v. 36, p. 235-241, 2005.
- SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. A highly alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**., v. 17, p. 761-765, 2001.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SJOSTROM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications.** 2. ed. Boca Raton: Academic Press, 1992.
- SOUZA FILHO, M. S. M.; ARAGÃO, A. O.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Aspectos da colheita, pós-colheita e transformação industrial do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Embrapa - CEINFO**, 2012.
- SOUZA, R. S. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 9, p. 987-992, sept. 2010.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Elsevier: Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Official Test Methods (OM), Provisional Test Methods (PM) and Useful Test Methods (UM)**. Atlanta: One Dunwoody Parky, 2010.

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

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA, M. B.; PEREIRA, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 141-153, 2007.

VICCINI, G. **Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rosea* - Um biopesticida para a cultura do morangueiro**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 117 p. 2004.

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

ZHANG , Y. H. P.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.