



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS  
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**LUCAS RODOLFO INACIO DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO  
EMPREGANDO RESÍDUO DE COCO VERDE (MESOCARPO) SOB AÇÃO DE UM  
FUNGO ISOLADO NA FASE TERMOFÍLICA DE UM PROCESSO DE  
COMPOSTAGEM**

**SUMÉ – PB  
2016**

**LUCAS RODOLFO INACIO DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO  
EMPREGANDO RESÍDUO DE COCO VERDE (MESOCARPO) SOB AÇÃO DE UM  
FUNGO ISOLADO NA FASE TERMOFÍLICA DE UM PROCESSO DE  
COMPOSTAGEM**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glauciane Danusa Coelho

**SUMÉ - PB**

**2016**

S586p Silva, Lucas Rodolfo Inácio da..  
Produção de celulase por fermentação e estado sólido empregando resíduo de coco verde (Mesocarpo) sob a ação de um fungo isolado na fase termofílica de um processo de compostagem . / Lucas Rodolfo Inácio da Silva . Sumé - PB: [s.n], 2016.

61 f.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Bioenologia e Bioprocessos.

1. Atividade enzimática. 2. Resíduos lignocelulóticos. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Compostagem. 5. Ação fungica. I. Título.

CDU: 60(043.1)

LUCAS RODOLFO INACIO DA SILVA

**PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO  
EMPREGANDO RESÍDUO DE COCO VERDE (MESOCARPO) SOB AÇÃO DE UM  
FUNGO ISOLADO NA FASE TERMOFÍLICA DE UM PROCESSO DE  
COMPOSTAGEM**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos

**BANCA EXAMINADORA:**

*Glauciane D. Coelho*

**Prof. Dra. Glauciane Danusa Coelho  
Orientador - UAEB/CDSA/UFCG**

*Lenilde M. Ribeiro Lima*

**Profa. Dra. Lenilde Mérgia Ribeiro Lima  
Examinadora I - UAEB/CDSA/UFCG**

*Bruno Rafael Pereira Nunes*

**Prof. Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes  
Examinador II - UAEB/CDSA/UFCG**

Aprovado em: 17 de novembro de 2016.

*A Maria Alves, minha mais que mãe e avó, pelo incondicional amor, às minhas mães Ana Maria, Ana Paula e Odeci Maria (Moral), tio/pai Ormando (velho) e irmã Gabriella por tamanho amor e crença em mim. DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Glauciane Danusa Coelho, pela orientação, amizade, oportunidades e carinho de mãe pelos seus orientandos, permitindo assim excelência acadêmica e prestígio ao trabalho.

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

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

Aos Srs. Zé Tiano e Ademar, pela presteza no preparo do bagaço do coco.

A Cristiano, pela prontidão e paciência de todos os dias.

A Eliélson Barros, por ser um amigo companheiro e pela ajuda direta na realização deste trabalho.

A Maysa Bernardino e Darlyson Guimarães pela irmandade.

A Jaqueline Siqueira, pelas contribuições.

A Rúbia Tavares, Lúcia Alves e Irece Cabral pela adoção como filho e cuidados.

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

Aos amigos e colegas de curso Jéssica Moreira, Ana Carla Fonseca, Jéssica Renally, Aisla Rayanny, Renato França, Caio de Azevedo, Aparecida Yasmim, Livia Soares, Maiara Alves, Marília, Maíra Gonçalves, Andreia Cabreira, Sendy Alves, Julya Karoline, Anderson Steyner, Patrícia Marinho, Ana Célia, Iracema Paiva, Monalisa Farias, Breno Lino, Bruno Marins, pelas diversas contribuições. Vocês são parte dessa história.

O fim de uma fase.

*“Alguns homens veem as coisas como são e dizem ‘Por quê?’  
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”*

**Bernard Shaw**



## RESUMO

Este trabalho objetiva estimar o efeito da umidade inicial e da temperatura de incubação na produção de celulase (CMCase) por meio da fermentação em estado sólido utilizando um isolado fúngico, denominado F1C3, que foi obtido a partir de um processo de compostagem, tendo mesocarpo de coco verde triturado como substrato. O estudo da produção de CMCase foi realizado utilizando planejamento experimental fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central e a análise estatística foi realizada com o programa computacional Statistica TM. O mesocarpo de coco verde triturado lavado inoculado com o Fungo F1C3 foi avaliado quanto à produção de celulase com teores de umidade iniciais de 45, 55 e 65% e temperaturas de 30, 37 e 45°C. A fermentação foi avaliada a cada 24 horas, durante 168 horas. Para o Fungo F1C3, o pico de produção de CMCase ( $0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) ocorreu em 72 horas de fermentação, a 45% de umidade e 45°C. A análise estatística demonstrou que os fatores avaliados não influenciaram a produção enzimática.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática. Resíduos lignocelulósicos. Resíduos agroindustriais

## ABSTRACT

The aim of this work was to produce cellulases and estimate the effect of humidity and temperature in the production of cellulase (CMCase) through solid state fermentation using two isolate fungi obtained from a composting process, and having grinded green coconut mesocarp as substrate. The study of CMCase production was made through the factorial design  $2^2$  with triplicate at the center point, and the statistical analysis was performed using Statistica TM software. The washed grinded green coconut mesocarp inoculated with Fungi F1C3 was evaluated for cellulase production with initial moisture contents of 45, 55 and 65% and temperatures of 30, 37 and 45°C. Fermentation was developed along 168 hours during which the parameters pH and enzyme activity expressed in CMCase were analyzed. For the Fungus F1C3, the peak production (CMCase) ( $0,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}$ ) occurred in 72 hours of fermentation, 45% humidity and 45 ° C. Statistical analysis showed that the factors did not influence in enzyme production.

**Keywords:** Enzymatic activity. Lignocellulosic residues. Agroindustrial residues

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases da compostagem.....	20
Figura 2 - Estruturas constituintes do fruto do coqueiro em corte longitudinal .....	22
Figura 3 - Estrutura da celulose .....	23
Figura 4 - Estrutura da hemicelulose.....	24
Figura 5 - Estruturas monossacarídicas das hemiceluloses .....	25
Figura 6 - Ácidos precursores da lignina .....	25
Figura 7 - Fluxograma de preparação do mesocarpo de coco verde triturado .....	33
Figura 8 - Placa de petri com meio BDA contendo o Fungo F1C3, após período a 30°C. ....	36
Figura 9 - Etapas do processo de fermentação em estado sólido (FES) .....	38
Figura 10 - Fermentação em estado sólido (FES) em mesocarpo de coco verde triturado .....	38
Figura 11 - Curva padrão para açúcares redutores construída com a solução reagente DNS e glicose diluída em água ultrapura .....	40
Figura 12 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 01 do planejamento .....	43
Figura 13 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 02 do planejamento .....	44
Figura 14 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 03 do planejamento .....	45
Figura 15 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 04 do planejamento. ....	46
Figura 16 Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase dos Ensaio 05, 06 e 07 do planejamento. ....	47
Figura 17 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os Ensaio do planejamento .....	48
Figura 18 - Gráfico de Pareto .....	51
Figura 19 - Gráfico de contornos das variáveis independentes umidade e temperatura em função da atividade enzimática .....	52
Figura 20 - Superfície de resposta da atividade expressa em CMCase em função da temperatura e umidade .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de celulases via fermentação em estado sólido (FES) .....	31
Tabela 2 - Níveis do Planejamento Experimental.....	34
Tabela 3 - Matriz do Planejamento Experimental fatorial ( $2^2$ ) com três repetições no ponto central.....	35
Tabela 4 - Composição do meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA).....	36
Tabela 5 - Análise qualitativa de crescimento do Fungo F1C3 .....	41
Tabela 6 - Dados referentes aos pontos de maior atividade CMCase obtida em cada ensaio.....	49
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática CMCase .....	50

## ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μmol	Micromol
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing Materials
atm	Atmosfera
Ca	Cálcio
CBHI	Celobiohidrolase I
CBHII	Celobiohidrolase II
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FES	Fermentação em estado sólido
h	Hora
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Mg	Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Nitrogênio
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade suficiente para
RPM	Rotações por minuto
U%	Teor de Umidade
UAEB	Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. OBJETIVO GERAL .....	17
1.1.1. Objetivos Específicos .....	17
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
2.1. COMPOSTAGEM.....	18
a. <b>Primeira fase: mesofílica</b> .....	<b>19</b>
b. <b>Segunda fase: termofílica</b> .....	<b>19</b>
c. <b>Terceira fase: resfriamento (composto semicurado)</b> .....	<b>19</b>
d. <b>Quarta fase: maturação (composto curado)</b> .....	<b>20</b>
2.3. COCO.....	20
2.4. COMPOSIÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	23
<b>2.4.1 Celulose</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4.2 Hemicelulose</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.3 Lignina</b> .....	<b>25</b>
2.5. PRODUÇÃO DE ENZIMAS .....	26
<b>2.5.1 Enzimas Celulolíticas</b> .....	<b>26</b>
2.5.1.1 Endoglicanases .....	26
2.5.1.2. Exoglucanases .....	27
2.5.1.3 $\beta$ -glucosidases .....	27
<b>2.5.2 Microrganismos produtores de celulases</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.3 Aplicações das Celulases</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5.4 Fermentação em Estado Sólido</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5.5 Vantagens e Desvantagens da FES</b> .....	<b>30</b>
2.6 PRODUÇÃO DAS CELULASES MEDIDA COMO ATIVIDADE ENZIMÁTICA...30	
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1. LOCAL DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO .....	32
3.2. MATÉRIA-PRIMA.....	32
<b>3.2.1 Preparação do mesocarpo de coco verde triturado</b> .....	<b>32</b>
3.3 CARACTERIZAÇÃO .....	33
<b>3.3.1 Teor de umidade</b> .....	<b>33</b>
3.4 PRODUÇÃO DAS CELULASES .....	34
<b>3.4.1 Planejamento Experimental</b> .....	<b>34</b>

<b>3.4.2 Microrganismos</b> .....	<b>35</b>
3.4.2.1 Repique dos microrganismos .....	35
<b>3.4.3 Processo Fermentativo</b> .....	<b>37</b>
3.4.3.1 Preparação do sistema de cultivo .....	37
3.4.3.2 Inóculo.....	37
3.2.3.3 Incubação.....	37
3.4.3.4 Fermentação .....	38
3.5 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO .....	39
3.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO .....	39
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	39
3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
4.1 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO .....	41
4.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) .....	42
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	42
<b>4.3.1 Celulases</b> .....	<b>42</b>
4.4. ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO.....	49
<b>4.4.1 Metodologia de Superfície de Resposta</b> .....	<b>49</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

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

No Brasil, uma grande quantidade de subprodutos como bagaços, cascas e farelos são produzidos em função das atividades agroindustriais e das indústrias de alimentos, o que torna viável a aplicação desses subprodutos em bioprocessos, considerando a grande disponibilidade e alta concentração de nutrientes. Esses subprodutos são constituídos basicamente de compostos lignocelulósicos, os quais são os recursos renováveis mais abundantes na natureza, constituídos majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina (CASTRO; PEREIRA, 2010).

A crescente industrialização da água de coco verde vem aumentando a geração de resíduos (casca), que corresponde a cerca de 85 % da massa total do fruto. A degradação desse material leva em média 08 (oito) anos para ser completada, tempo relativamente longo. As indústrias que processam água de coco geram volumes significativos e crescentes do material, que atualmente é enterrado em lixões e aterros, causando problemas ambientais, principalmente em grandes centros urbanos (ROSA, 2001). Os constituintes desse subproduto fazem dele um potencial material que pode ser usado na obtenção de produtos de alto valor agregado, como enzimas, por meio da conversão utilizando microrganismos.

As enzimas, também são chamadas de biocatalisadores, possuem alta eficiência, em condições fisiológicas, e especificidade. Dessa forma, apresentam potencial para utilização industrial em processos de biotransformações microbianas (PEREIRA Jr. et al., 2008).

Considerando os nichos de atuação, é cada vez maior, internacionalmente, o uso de enzimas. As celulasas e as amilases estão entre as principais enzimas de uso industrial no mundo, representando juntas 22% da demanda (POLITZER; BOM, 2006).

A celulase, entre várias enzimas, vem se destacando pela aplicação em diversas atividades, tais como indústria alimentícia, detergentes, indústria



farmacêutica, têxtil, celulose e papel, indústria de biocombustíveis para produção de bioetanol na conversão de biomassa lignocelulósica por hidrólise em glicose e no tratamento de efluentes e resíduos (AMORIM, 2010).

Devido aos elevados custos para produção de celulase, estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de produzi-la por fermentação em estado sólido empregando resíduos agroindustriais, diminuindo assim os custos de produção da enzima (CGEE, 2010).

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a produção de celulase, em fermentação em estado sólido do mesocarpo coco verde pelo fungo F1C3 isolado da fase termofílica de um processo de compostagem.

### 1.1.1 Objetivos Específicos

- Analisar qualitativamente o crescimento microbiano no mesocarpo de coco verde triturado.
- Avaliar o efeito da umidade e da temperatura, bem como da interação entre esses fatores, na produção da enzima celulase, utilizando planejamento fatorial.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 COMPOSTAGEM

A compostagem é um processo controlado de decomposição microbiana, de oxidação e oxigenação de uma massa heterogênea constituída por matéria orgânica no estado sólido e úmido, sendo caracterizada por uma fase inicial e rápida de ação tóxica nas plantas. Posteriormente, há uma fase de bioestabilização, atingindo finalmente a fase em que ocorre a maturação ou humificação (KIEHL, 2004). Segundo Kiehl (1985) a fase de maturação é acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica, como N, P, Ca e Mg, que passam da forma orgânica para a inorgânica, ficando disponíveis às plantas, com produção de calor e o desprendimento, principalmente de gás carbônico e vapor d'água.

Segundo Giusti e Marsili-Libelli (2010), a compostagem caracteriza-se por uma sucessão multifásica na colonização de fungos e bactérias no material orgânico, que devido ao baixo consumo de energia, requisitos tecnológicos e alto valor dos produtos, deve ser um processo considerado vantajoso como investimento.

Por se tratar de um processo microbiológico, a ação e interação de microrganismos são intrínsecos à eficiência, os quais são dependentes da ocorrência de condições favoráveis como umidade, nutrientes, aeração, pH, relação carbono/nitrogênio e temperatura (BIDONE, 2001).

A temperatura é considerada, por muitos autores, o mais importante indicador da eficiência do processo de compostagem e está diretamente relacionada com a atividade metabólica dos microrganismos, sendo também influenciada pela aeração (LI; ZHANG; PANG, 2008), pelo teor de umidade (PETRIC; SESTAN; SESTAN, 2009; KUMAR, 2010; KARADG et al., 2013), pela granulometria (BERNAL; ALBUQUERQUE; MORAL, 2009; BERNHARDT; FASINA, 2009; RUGGIERI *et al.*, 2012) e disponibilidade de nutrientes (PIOTROWSKA-CYPLIK *et al.*, 2013).

Nesse sentido, Trautmann e Olynciw (2005) afirmam que o processo de compostagem pode ser dividido em quatro fases de acordo com a temperatura:

#### **a. Primeira fase: mesofílica**

Na fase mesófila, predominam bactérias, que são responsáveis pela quebra inicial da matéria orgânica, promovendo a liberação de calor na massa em compostagem (CORRÊA *et al.*, 1982). Nesta fase, ocorre também a atuação de fungos que utilizam a matéria orgânica sintetizada pelas bactérias e outros microrganismos como fonte de energia (PEREIRA NETO, 2007). Esses microrganismos são importantes, pois decompõem os açúcares, amidos, proteínas e outros compostos orgânicos de fácil digestão presentes nos resíduos sólidos orgânicos (GOMES, 2007).

#### **b. Segunda fase: termofílica**

A liberação de calor promove o aumento da temperatura devido e como consequência a morte de microrganismos mesófilos (PEIXOTO, 1988). Na fase termofílica há estímulo à germinação dos esporos dos fungos e endosporos das bactérias termófilas. A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve o ajustamento da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA a temperaturas acima da faixa mesofílica (BERNAL *et al.*, 1998).

Ainda nesta fase, as bactérias degradam os lipídeos e frações de hemicelulose, enquanto que os actinomicetos e fungos decompõem a celulose e a lignina (KIEHL, 1985). Esses microrganismos tem a capacidade de utilizar a celulose como fonte de carbono e energia (MELO, 2000), que é o mais abundante polímero encontrado na matéria orgânica vegetal (TAUK, 1990).

#### **c. Terceira fase: resfriamento (composto semicurado)**

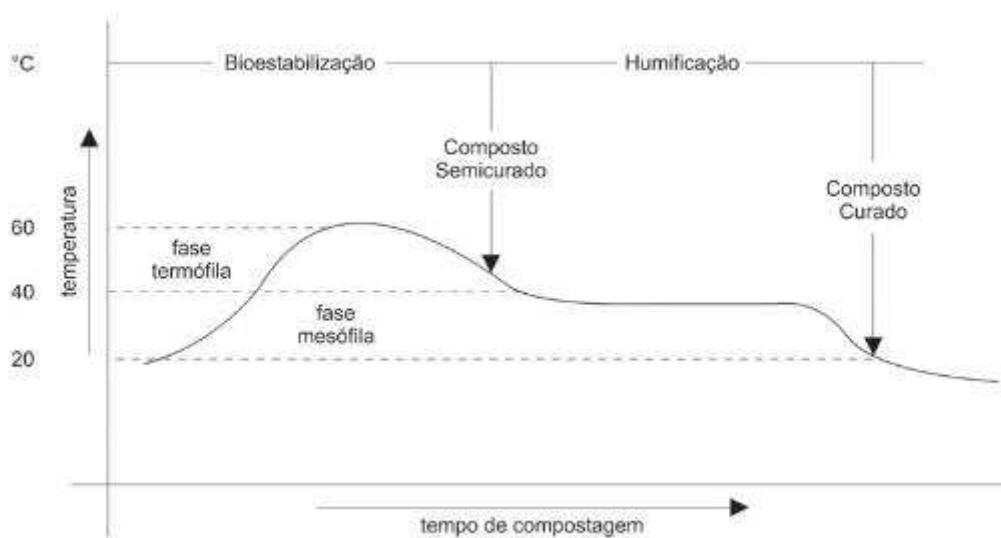
Marcada pela queda da temperatura para valores de temperatura ambiente (BERNAL *et al.*, 1998).

#### d. Quarta fase: maturação (composto curado)

Nesta fase, ocorre a humificação, acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica (KIEHL, 1985).

A Figura 1 ilustra as fases térmicas da compostagem.

Figura 1 - Fases da compostagem.



FONTE: (D'ALMEIDA; VILHENA, 2000)

Enzimas são produzidas por microrganismos termófilos e mesófilos. Apesar das enzimas termoestáveis terem microrganismos termófilos como potenciais fontes, a maioria destas enzimas utilizadas pela indústria são originárias de organismos mesófilos (ENDO et al., 2001; BISCHOFF et al., 2006; VIKARI et al., 2007; NUNES, 2014).

A demanda por enzimas termoestáveis com aplicações industriais, tais como celulasas, é crescente na indústria de biocombustíveis, indústrias de alimentos, de tratamento de resíduos domésticos e agroindustriais (JANG e CHENG, 2003).

### 2.3 COCO

No Brasil, o cultivo do coqueiro representa grande importância econômica e social, visto que das propriedades produtoras, 75% possuem área inferior a 10

hectares (PERSLEY, 1992). O coqueiro é abundante principalmente na região Nordeste (FAO, 2012; IBGE, 2012), sendo ideal para o cultivo em clima tropical úmido, visto que prosperam em solos arenosos e toleram curto período exposto à água salina (ETHERINGTON, 2005).

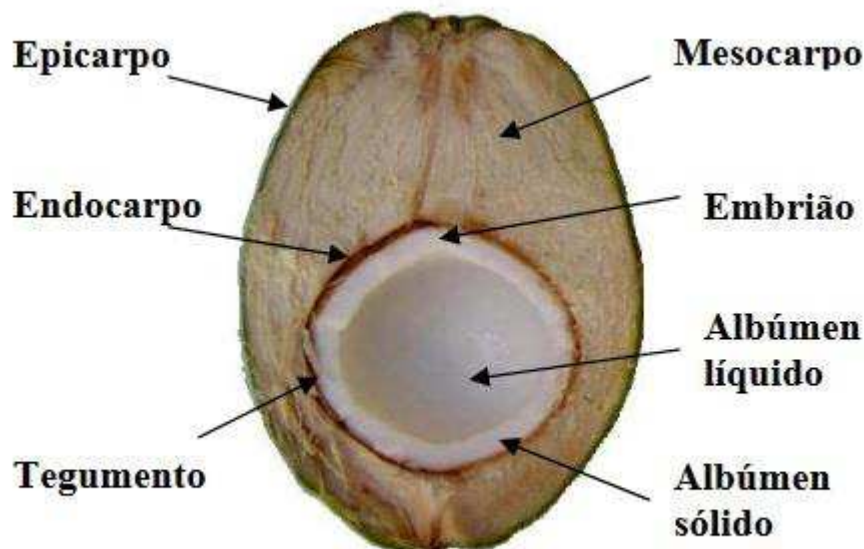
Segundo o IBGE (2012), o Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco, com aproximadamente 3 milhões de toneladas (5% da produção mundial) produzidas. Na América do Sul, é responsável por mais de 80% da produção, sendo 82,28% da área total plantada e 69,25% do valor total do coco produzido da região Nordeste, em 2009.

Por não se conhecer populações espontâneas, teorias sobre a origem do coqueiro são baseadas em evidências indiretas e causam controvérsias. Independentemente da origem, o coqueiro atualmente está disperso por toda a região intertropical, em mais de 90 países, sendo o homem considerado importante agente dispersor (PLOETZ *et al.*, 1998).

De acordo com BONDAR (1955), FREMOND *et al.* (1975), MEDINA (1980), GOMES (1984) e PASSOS (1998b), o fruto do coqueiro, em um corte longitudinal, (Figura 2), compõe-se de:

- a) Epicarpo, película fina, lisa e cerosa, que envolve externamente o fruto.
- b) Mesocarpo, que constitui-se numa camada bastante grossa e fibrosa, situada entre o epicarpo e o endocarpo.
- c) Endocarpo, de constituição lenhosa, de coloração escura quando o fruto se apresenta seco, é formado por três partes ou “costelas”, unidas por suturas longitudinais salientes.
- d) Tegumento, uma fina camada de coloração marrom, nos frutos secos, que encontra-se fortemente aderida ao endocarpo.
- e) Albúmen sólido, polpa branca no interior do fruto, oleosa, de espessura e consistência variada dependendo da idade do fruto.
- f) Albúmen líquido, constituído por um líquido, adocicado, levemente acidulado, chamado de água-de-coco.
- g) Embrião, corpo branco, inserido no albúmen sólido.

**Figura 2** - Estruturas constituintes do fruto do coqueiro em corte longitudinal.



FONTE: (BENASSI, 2006)

A busca por uma alimentação adequada como uma alternativa de melhora para saúde, gera inúmeros produtos alimentícios produzidos à base de coco, a exemplo da água de coco *in natura* e em pó. Com esse avanço, não há uma destinação correta dos seus resíduos agroindustriais e urbanos pela cadeia produtiva.

Nas regiões litorâneas, as cascas de coco verde chegam a representar até 80% do volume total de resíduos sólidos que devido à alta concentração de lignina, hemicelulose e celulose apresenta lenta decomposição, sendo mais de 80% do peso do fruto constituído por material lignocelulósico (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010).

A fibra do coco verde tem lignina (43,14%) e celulose (45,93%) (BRIGIDA *et al.*, 2010). Esses valores sugerem que esse material possui potencial para ser empregado como substrato para a produção de bioprodutos, como enzimas celulolíticas.

## 2.4 COMPOSIÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Material de origem lignocelulósica é importante para os bioprocessos, uma vez que a fermentação em estado sólido (FES) destaca-se, pela utilização dessa matéria prima na obtenção de diversos produtos com potencial comercial (GALEMBECK et al., 2009; ROSSI et al., 2009).

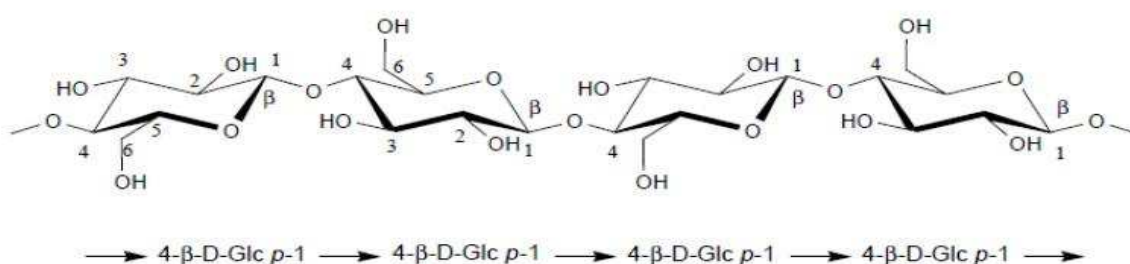
Vale ressaltar que material lignocelulósico inclui os resíduos agrícolas (bagaços, cascas), resíduos industriais, resíduos sólidos urbanos e resíduos domésticos (MTUI, 2009), que são majoritariamente constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, apresentando baixo teor de nitrogênio (GLAZER e NIKAIDO, 2007). O Brasil dispõe de uma grande variedade desses resíduos, cujo bioprocessamento representa interesse econômico e social. Esses resíduos são potenciais fontes de matéria-prima para fermentação originando compostos químicos com alto valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros (MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009).

### 2.4.1 Celulose

A celulose é o polímero mais abundante existente na Terra. A cada ano mais de  $10^{11}$  toneladas de gás carbônico são fixadas por meio da fotossíntese derivada de material vegetal, e metade desse material consiste em celulose (LESCHINE, 1995).

A celulose é composta por cadeias lineares de D-glicose, unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (Figura 3) com alto grau de polimerização e elevada massa molecular, principalmente na forma cristalina que confere alta resistência ao rompimento das ligações por substâncias químicas (BORTOLAZZO, 2011).

**Figura 3** - Estrutura da celulose.



FONTE: (SANTOS, 2013)

Apesar de ser quimicamente simples, existe uma complexa gama de formas físicas da celulose devido principalmente à diversidade de origem e aos processamentos tecnológicos subsequentes a que a biomassa celulósica é sujeita (BEGUIN e AUBERT, 1994).

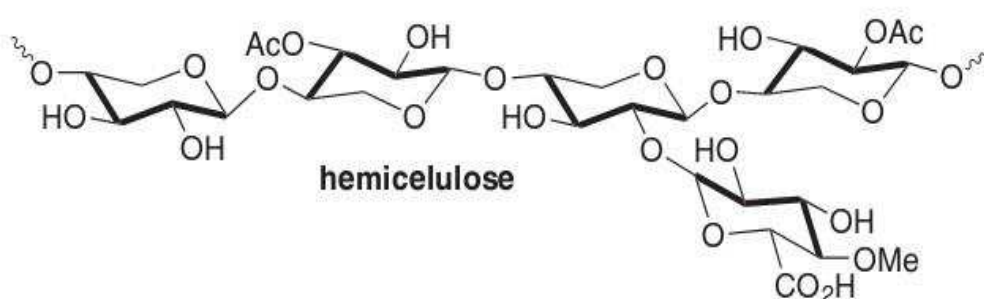
A celulose é o resíduo polimérico predominante da atividade agrícola (ZHANG e MIELENZ, 2006), que vem sendo utilizado para a produção de diversos produtos químicos (tensoativos, adesivos, corantes, solventes, produtos farmacêuticos, etc.), além do etanol de segunda geração (KUMAR, SINGH e SINGH, 2008).

#### 2.4.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são compostas por uma variedade heterogênea de polissacarídeos amorfos com grau de polimerização bem inferior ao da celulose. A estrutura (Figura 4) lhe proporciona flexibilidade e estabilidade ao agregado, por apresentar ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose.

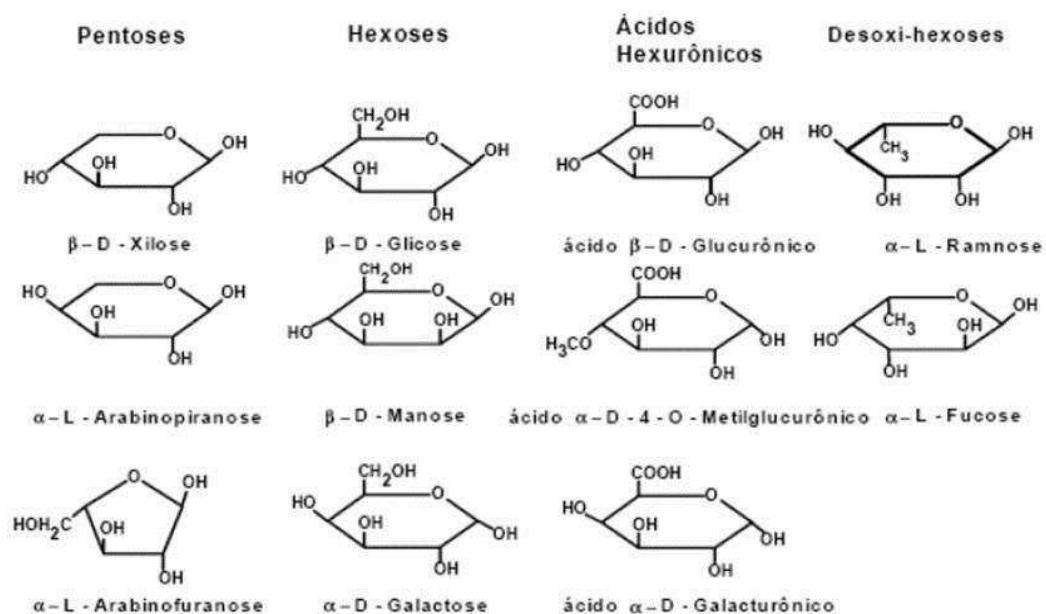
Também chamadas de poliose, as hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, associadas à celulose e lignina principalmente nas camadas primária e secundária. Cerca de 30% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se à hemicelulose, sendo um abundante carboidrato na natureza (DA SILVA *et al.*, 1997; HON e SHIRAISHI, 1991). De maneira geral, as hemiceluloses diferem da celulose principalmente pela constituição em diferentes unidades de açúcares (Figura 5).

**Figura 4** - Estrutura da hemicelulose.



FONTE: Ferreira *et al.*, 2009.

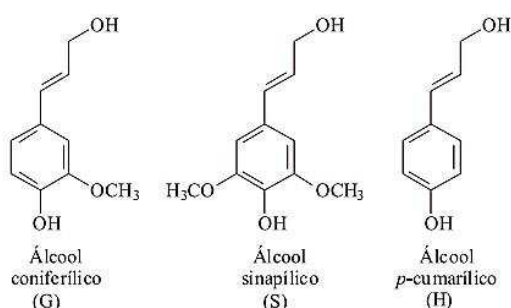


**Figura 5** - Estruturas monossacarídicas das hemiceluloses.

FONTE: FENDEL; WEGENER, 1989.

### 2.4.3 Lignina

A lignina é a segunda macromolécula orgânica mais abundante na natureza. Representa cerca de 20-30% da massa total do material lignocelulósico e durante o crescimento vegetal vai sendo incorporada. Constituída basicamente de unidades de fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa, se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmílicos precursores: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 6), que geram unidades *p*-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas (RABELO, 2007).

**Figura 6** - Álcoois precursores da lignina.

FONTE: BARBOSA *et al.*, 2008.

As cadeias de celulose e hemicelulose são fixadas pela lignina. As cadeias de celulose se mantêm compactadas através de ligações de hidrogênio, enquanto que a lignina une os componentes e age como uma barreira física contra o ataque de microrganismos e água (RABELO, 2007).

## 2.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

### 2.5.1 Enzimas Celulolíticas

Enzimas são catalisadores biológicos, formadas por grupos de substâncias orgânicas, de origem proteica, produzidas por células vivas. Essas enzimas (biocatalisadores) apresentam alta atividade catalítica e seletividade específica sobre o substrato, catalisando reações que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam (BORTOLAZZO, 2011).

A bioconversão de resíduos de celulose até glicose é catalisada por um grupo de enzimas denominadas celulasas. Uma vez que a celulose representa cerca de 40% do material de origem vegetal, esse processo é de importância crucial para a ciclagem de nutrientes (KLYOSOV, 2015).

As celulasas apresentam especificidades diferentes para hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4 na celulose. Assim, segundo Sun e Cheng (2002), as celulasas estão divididas em três grandes grupos, com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose: endoglicanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases.

#### 2.5.1.1 Endoglicanases

As endoglicanases hidrolisam a celulose amorfa e celulosas solúveis (modificadas quimicamente), como a carboximetilcelulose (CMC). As endoglicanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório, havendo a clivagem das ligações glicosídicas internas da celulose liberando oligossacarídeos de vários comprimentos; novas cadeias finais (MARTINS, 2005).

### 2.5.1.2 Exoglucanases

As exoglucanases também conhecidas como celobiohidrolases (CBH),  $\beta$ -1-4 celobiohidrolases ou avicelases, atuam nas extremidades redutoras (CBH I) e nas extremidades não redutoras (CBH II) da cadeia de celulose e unidades de glicose de terminais não redutoras da cadeia, produzindo majoritariamente celbiose (OYEKOLA *et al.*, 2007). Essas enzimas não atuam sobre celulose solúvel por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes como o carboximetílico. Dessa forma, torna-se possível a diferenciação entre as enzimas, pois ensaios de atividade sobre CMC são característicos para endoglicanases (MARTINS, 2005).

### 2.5.1.3 $\beta$ -glucosidases

As  $\beta$ -glicosidades ou celobiasas possuem a função de desdobrar a celbiose gerada pelas endoglicanases e celobiohidrolases em glicose. A completa hidrólise é realizada por sua ação, que converte celbiose em glicose e catalisa a hidrólise de resíduos de  $\beta$ -D-glicose terminais não redutores liberando  $\beta$ -D-glicose (GILKES *et al.*, 1991; BHAT & BHAT, 1997; CAO e TAN, 2002; LYND *et al.*, 2002; HOWARD *et al.*, 2003).

## 2.5.2 Microrganismos produtores de celulases

Microrganismos celulolíticos são aqueles que produzem enzimas capazes de degradar a celulose natural. Na natureza, existe uma variedade desses microrganismos produtores de celulases, e a hidrólise da celulose por estes resulta na produção final de glicose que é utilizada como fonte de carbono para obtenção de bioprodutos (TAVARES, 2009).

A produção de celulases por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos. No processo de produção de enzima, um microrganismo é utilizado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes em um meio, ou substrato, de forma que as enzimas são sintetizadas e excretadas (TAVARES, 2009).

Os microrganismos mais importantes utilizados pela indústria de enzimas são os fungos. Desses, os principais produtores de celulases são: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Aspergillus sp*, *Schizophyllum sp*, *Chaetominum sp* e *Humicola sp*. Tais fungos excretam celulases de alta atividade no meio de cultura (BORTOLAZZO, 2011).

### 2.5.3 Aplicações das Celulases

Materiais celulósicos são particularmente atraentes, quando consideramos a importância da biomassa vegetal como fonte sustentável de materiais disponíveis para humanidade e fonte sustentável de bioprodutos, tais como o etanol de segunda geração. Uma estratégia promissora para isto envolve a produção de enzimas celulolíticas, hidrólise da biomassa e fermentação de açúcares para desenvolver produtos em um único processo por meio da utilização de microrganismos.

Na indústria, as celulases podem ter variadas aplicações (Quadro 1).

**Quadro 1** – Principais aplicações industriais das celulases.

ENZIMA	APLICAÇÃO INDUSTRIAL
Celulases	Aumentar a reidratabilidade dos produtos quando chegam aos consumidores; Melhorar drenagem e execução de máquinas de papel; Produção sustentável de biocombustíveis; Degradação das fibras superficiais tornando os tecidos mais lisos e macios
Hemicelulases	Hidrólise total das fibras da polpa
Celulases, Pectinases e Xilanases	Promover a hidrólise parcial de componentes da parede celular, reduzindo sua viscosidade
Celulases, Hemicelulases e Pectinas	Extração de sucos de frutas e óleos de sementes, filtração e clarificação de sucos, aumento da eficiência da extração da cor de sucos e liquefação do tecido vegetal
Celulases e Hemicelulases	Degradação de plantas forrageiras e hidrólise dos polissacarídeos usados na alimentação de ruminantes, resultando no aumento da produção de leite e ganho de peso

FONTE: BHAT; BHAT (1997); MUHLBACH et al., (2000); CAO; TAN (2002); GRAMINHA et al., (2008).

Além da aplicação da celulase, propriamente dita, há também o emprego de microrganismos com potencial celulolítico em processo de biorremediação, como tratamento de águas residuais, lodo e efluentes. Ainda, quanto mais estável, maior atividade e especificidade a enzima tiver, maior o interesse comercial pela molécula (GLAZER, *et al.*, 2007).

#### 2.5.4 Fermentação em Estado Sólido

As denominações “fermentação em estado sólido”, “fermentação em substrato sólido”, “fermentação em meio sólido” ou simplesmente “fermentação semissólida”, consistem em um único processo que é caracterizado pelo crescimento microbiano a partir de material sólido (substratos insolúveis), com propriedades para absorver água em baixas porcentagens, para formação de produtos (PANDEY *et al.*, 2010).

Enzimas e outros metabólitos não enzimáticos são secretados pelos fungos atuando diretamente sobre a matriz lignocelulósica, e esta deve atuar tanto como suporte fisiológico, quanto como fonte de nutrientes na ausência de água livre (SHRESTHA *et al.*, 2009). Essa restrição de disponibilidade de água é capaz de estimular a produção de algumas enzimas que em meio submerso não seriam produzidas pelos mesmos microrganismos (SIGHANIA *et al.*, 2010).

O método clássico de produção de celulases é a fermentação em meio líquido ou submersa. Em função de resultados altamente promissores que vêm sendo obtidos por pesquisadores da área no que diz respeito a baixo custo operacional e capital de investimento, a fermentação em estado sólido ou fermentação semissólida tem despertado grande interesse. Além disso, é estimado que a FES permite reduzir cerca de 10 vezes os custos da produção quando comparada à fermentação submersa, uma vez que a concentração final da enzima produzida por esta rota é maior, o que também reduz custos com o processo de fase logística (SIGHANIA *et al.*, 2010).

Os substratos para FES são, geralmente, resíduos agroindustriais como farelos, cascas, bagaços e outros materiais considerados viáveis para a biotransformação. Por serem recursos não renováveis naturais, tornam-se, por vezes, problemas ambientais em face à produção em grandes quantidades. Como já mencionado, a estrutura desse tipo de material tem como principais componentes: celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes lignocelulósicos,

caracterizando-os como materiais heterogêneos, que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

### 2.5.5 Vantagens e Desvantagens da FES

A fermentação em estado sólido (FES) é um método eficiente em escala laboratorial apresentando vantagens por tratar-se de um processo favorecido pelo reduzido teor de água, gerando pouco ou nenhum volume de água residual.

Bianchi, Moraes e Capalbo (2011) relatam algumas vantagens e desvantagens da FES (Quadro 2).

**Quadro 2** – Vantagens e Desvantagens da FES.

<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
Menor condução de calor	Se operado em reator, queda do rendimento em função da dificuldade de dissipar calor.
Utilização de agitação raramente é necessária	Dificuldade de acompanhamento dos parâmetros operacionais
Difusão de oxigênio e outros gases são maiores devido aos interstícios existentes entre as partículas de substrato	Heterogeneidade na distribuição de massa celular, nutrientes, temperatura, pH e umidade
Alta produtividade e baixo custo de produção em função do crescimento microbiano ocorrer em condições mais próximas às dos habitats naturais	Dificuldades no aumento de escala
Esporos utilizados para a inoculação permitem repetições mais confiáveis	Alguns substratos requerem pré-tratamento químico e/ou físico
Tratamento dos resíduos é simplificado	Baixa condutividade térmica do substrato sólido

FONTE: Adaptado de Bianchi, Moraes e Capalbo (2011).

## 2.6 PRODUÇÃO DAS CELULASES MEDIDA COMO ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Vários pesquisadores publicaram valores diferentes para produção de celulase medida como atividade enzimática, por meio da fermentação em meio sólido, por fungos cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos.

A Tabela 1 apresenta informações referentes aos dados da produção de celulases.

**Tabela 1** – Produção de celulasas via fermentação em estado sólido (FES).

<b>Autores</b>	<b>Substrato</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>U.mL<sup>-1</sup> (FES)</b>
Farinas (2011)	Bagaço de cana	<i>Aspergillus niger</i>	0,1338
Victor et al. (2003)	Sabugo de milho	<i>Aspergillus flavus</i>	0,0502
Lins (2012)	Bagaço do pedúnculo do caju	<i>Trichoderma reesei</i>	0,095
Abreu (2014)	Palha de milho verde e Cana de açúcar	<i>Psicocybe castanella</i> CCIBt 2781	0,038
Albuquerque (2016)	Bagaço de coco verde	Fungo isolado de um processo de compostagem	0,54

FONTE: Autor, 2016.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos (UAEB) do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande, em Sumé – Paraíba.

#### 3.2 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o mesocarpo de coco verde. O resíduo foi obtido de um produtor rural da cidade de Sumé, Paraíba.

##### 3.2.1 Preparação do mesocarpo de coco verde triturado

Os resíduos foram triturados em uma máquina desintegradora/trituradora de forragem, equipamento disponível na Escola Agrotécnica de Ensino Fundamental Dep. Evaldo Gonçalves de Queiroz, em Sumé, para que o tamanho das fibras fosse diminuído e proporcionasse assim aumento da capacidade de retenção de umidade e nutrientes.

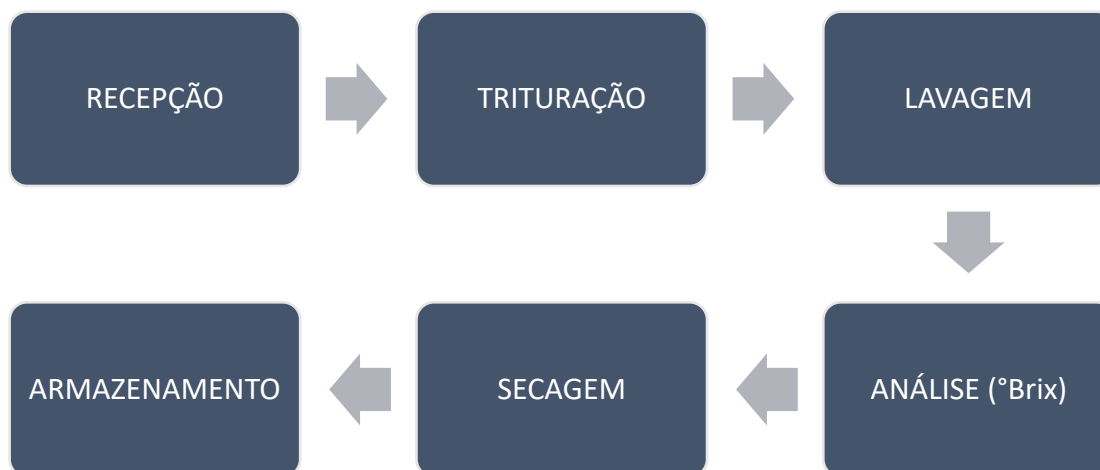
O resíduo utilizado no estudo da produção das celulases passou pelo processo de lavagem até que todos os sólidos solúveis, presentes no bagaço fossem removidos. A determinação de sólidos solúveis (<sup>o</sup>Brix) foi realizada utilizando-se refratômetro, a partir do lixiviado do processo de lavagem do mesocarpo triturado.

O processo de lavagem teve o objetivo de remover os açúcares contidos no substrato, pois a presença de açúcares redutores, segundo Bon *et al.*, (2008), pode reprimir a síntese enzimática 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.

O fluxograma da Figura 7 mostra a sequência de etapas que envolveu a preparação do mesocarpo de coco verde para posterior uso nas fermentações.



**Figura 7** – Fluxograma de preparação do mesocarpo de coco verde.



FONTE: Autor, 2016.

O resíduo foi seco em estufa de secagem a 60°C por 24h. Após atingir massa constante, o resíduo foi colocado em sacos hermeticamente fechados e congelado.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO

#### 3.3.1 Teor de umidade

Para determinação da umidade, 05 (cinco) gramas do material foram colocados em termobalança determinadora de umidade SHIMADZU (MOC63u) por 15 minutos a 105°C. Os testes foram realizados em duplicata. A umidade foi ajustada pela adição de água destilada através de um balanço de massa, levando-se em consideração que a densidade da água é igual a 1 g.cm<sup>-3</sup>, calculada utilizando a equação apresentada a seguir:

$$V_{aa} = M_{aa} = m_i * \frac{v_2 - v_1}{1 - v_2}$$

Sendo:

$V_{aa} = M_{aa}$  = volume de água a ser adicionado

$m_i$  = quantidade de substrato utilizado

$v_2$  = umidade desejada

$v_1$  = umidade encontrada

### 3.4 PRODUÇÃO DAS CELULASES

#### 3.4.1 Planejamento Experimental

O estudo da produção de celulases por fermentação em estado sólido foi realizado utilizando-se um planejamento fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central, totalizando 07 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória, para avaliar o efeito da umidade inicial do meio (U) e a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) de incubação na produção enzimática.

O programa computacional *Statistica* TM (Versão 8.0, da *Statsoft*, Inc.) foi usado para calcular os efeitos das variáveis avaliadas, bem como das interações entre elas, e para realizar a análise de Variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta foi usada para fornecer um modelo matemático adequado para o processo.

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais do planejamento fatorial estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Níveis do Planejamento Experimental.

Variáveis	-1	0	1
U (%)	45,00	55,00	65,00
T ( $^{\circ}\text{C}$ )	30,00	37,00	45,00

FONTE: Autor, 2016.

**Tabela 3** – Matriz do Planejamento Experimental fatorial ( $2^2$ ) com três repetições no ponto central.

Ensaio	U (%)	T (°C)
1	(-1) 45	(-1) 30
2	(+1) 65	(-1) 30
3	(-1) 45	(+1) 45
4	(+1) 65	(+1) 45
5	(0) 55	(0) 37
6	(0) 55	(0) 37
7	(0) 55	(0) 37

FONTE: AUTOR, 2016.

### 3.4.2 Microrganismos

O fungo utilizado foi obtido da fase termofílica de um processo de compostagem denominado F1C3 (Fungo 1 obtido da Coleta 3), durante projeto realizado anteriormente no Laboratório de Microbiologia intitulado “A compostagem como fonte de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial”. No referido trabalho, foram obtidos 37 (trinta e sete) isolados fúngicos, sendo 06 (seis), isolados durante a fase termofílica do processo de compostagem, denominada Coleta 3 (NUNES et al. 2014).

#### 3.4.2.1 Repique dos microrganismos

- a. **Preparo do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA):** para a preparação deste meio, as batatas (tipo inglesa) foram descascadas e cortadas em pequenos pedaços e fervidos em água destilada esterilizada (ADE) durante 10 minutos, a partir do início da ebulição. Posteriormente o material foi filtrado para obtenção do caldo nutritivo de batata e acrescido de dextrose e ágar para suporte do microrganismo e o volume ajustado para 1L. A preparação final foi esterilizada por 20 min a 121°C e 1 atm. A composição do meio de cultura é mostrada na Tabela 4.

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

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

(\*) q.s.p.= quantidade suficiente para. Fonte: Dados da Pesquisa.

- b. **Repique do fungo:** a partir do tubo tipo Eppendorf contendo o fungo em água destilada foi realizado o primeiro repique. Uma alça de platina foi colocada de repique em contato com a suspensão de esporos do Eppendorf e em seguida transferida para o centro das placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas à temperatura de 30°C por um período de 10 dias ou tempo necessário para que as placas fossem totalmente cobertas (Figura 8).

**Figura 8** - Placa de Petri com meio BDA contendo o Fungo F1C3, após período a 30°C.



FONTE: Autor, 2016.

### 3.4.3 Processo Fermentativo

#### 3.4.3.1 Preparação do sistema de cultivo

Em frascos uniformes, com capacidade de 500 mL, foram colocados 15 g de mesocarpo do coco triturado na umidade inicial pré-determinada, auto clavados por 1 hora a 121°C e 1 atm.

#### 3.4.3.2 Inóculo

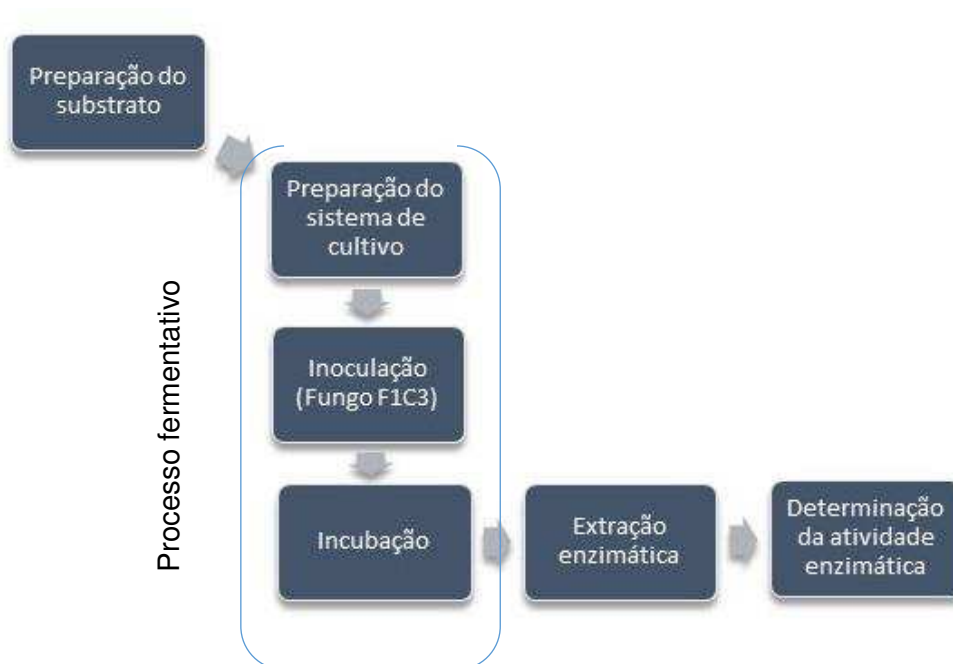
A suspensão de esporos foi obtida pela adição de água destilada esterilizada (ADE) à placa de Petri e os esporos raspados com uma alça de inoculação. A suspensão de esporos foi filtrada com auxílio de gaze e algodão esterilizados e quantificada em câmara de Neubauer espelhada. O volume da suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a se obter um inóculo na concentração de  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

#### 3.2.3.3 Incubação

Aos frascos contendo bagaço de casca de coco verde esterilizado e umidificado foi adicionado um (1mL) de inóculo fúngico preparado nas condições descritas anteriormente. A incubação da FES foi interrompida pela adição ao DNS em 24h, 48h, 72 h, 96 h, 120h, 144h e 168h.

A Figura 9 apresenta as etapas do processo de fermentação em estado sólido (FES), para a produção das enzimas celulolíticas (CMCase).

**Figura 9** - Etapas do processo de fermentação em estado sólido (FES).



FONTE: Autor, 2016.

#### 3.4.3.4 Fermentação

Os frascos foram incubados por um período de 168 horas nas temperaturas de 30°C, 37°C e 45°C (Figura 10). Em intervalos de 24 h foram retiradas as amostras do processo.

**Figura 10** – Fermentação em estado sólido (FES) em mesocarpo de coco verde triturado.



FONTE: Autor, 2016.

### 3.5 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

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

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

### 3.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Para a obtenção do extrato enzimático, a cada frasco foi adicionado 30 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, segundo o procedimento descrito por Moreira-Neto (2012). O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente por 5 min, e em seguida agitado em mesa agitadora a 120 rpm durante 1 hora a 25 °C. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro qualitativo para remoção dos esporos. O extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática de carboximetilcelulase e aferição do pH.

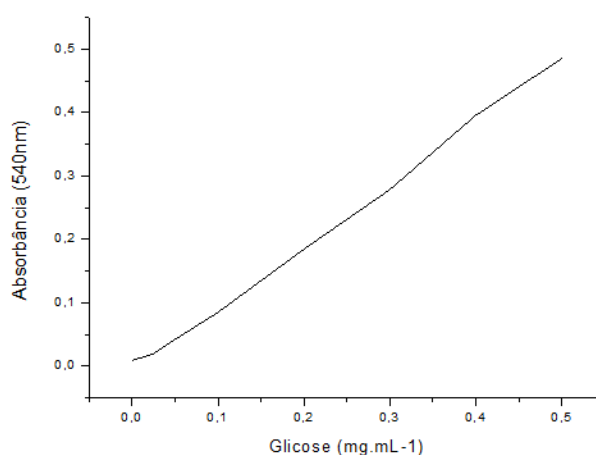
### 3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade celulolítica analisada neste trabalho foi de endoglicanases, também chamadas de carboximetilcelulases (CMCase). O método para determinação da atividade baseia-se na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de carboximetilcelulose devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose. O meio reacional foi composto por 500 µL do extrato enzimático obtido em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0 e 500 µL de uma solução carboximetilcelulose a 1% (m/v) em tubos de ensaio. A mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos. Após esse tempo foi retirado um volume de 500 µL do tubo de ensaio

e colocado em outro tubo de ensaio com 500  $\mu\text{L}$  de DNS (1 % 3,5-dinitrossalicílico; 1,6 % hidróxido de sódio; 30 % tartarato de sódio e potássio), interrompendo a reação para determinar a concentração de açúcares redutores, seguindo a metodologia de Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose, por minuto, a 50°C.

As amostras foram diluídas com água ultrapura de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração. Os testes foram feitos em duplicata. A curva padrão para a determinação dos açúcares redutores (Figura 11) foi construída com o intervalo de diluição da glicose de 0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  com limites inferior e superior de 0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 0,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Figura 11** - Curva padrão para açúcares redutores construída com a solução reagente DNS e glicose diluída em água ultrapura.



O método utilizando a solução reagente DNS mostrou-se confiável entre os limites de 0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 0,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  com  $R^2 = 0,9968$  e  $y = 2,0563x + 0,0065$ , visto que Harland (1989) afirma que valores de  $R^2$  próximos de 1 representam modelos melhores para predições.

### 3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os efeitos das variáveis e as interações entre elas, bem como a análise de variância (ANOVA) foram avaliados utilizando-se o programa computacional *Statistica* TM.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

A análise do crescimento microbiano foi determinada por meio da observação do bagaço de mesocarpo de coco verde submetido à FES.

A Tabela 5 apresenta os resultados das análises qualitativas realizadas no bagaço de mesocarpo de coco verde com relação ao crescimento micelial, já que o mesmo foi utilizado como substrato durante o processo de fermentação em estado sólido (FES) para produção de celulases.

Tabela 5 - Análise qualitativa de crescimento do Fungo F1C3

Ensaio	24horas	48horas	72horas	96horas	120horas	144horas	196horas
01	-	-	+	+	+	++	++
02	-	-	+	+	+	++	++
03	-	-	+	+	+	+	+
04	-	-	-	-	-	-	-
05	+	+	+	+	+	+	+
06	+	+	+	+	+	+	+
07	+	+	+	+	+	+	+

O crescimento microbiano foi determinado de acordo com o padrão adaptado da ASTM (American Society for Testing Materials), STANDARD METHODS G21-90 (1990).

Nos Ensaios 01 e 02 (30°C e umidades de 45% e 65%, respectivamente), o crescimento só foi verificado a partir das 72h de fermentação, tendo pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio. A partir das 144h foi observado crescimento moderado com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio.

No Ensaio 03 (45°C e 45% U) observou-se a colonização do substrato a partir das 72h de fermentação, com pouco crescimento e turvação de pequenos fragmentos

de micélio lançados no meio, indicando que as condições de temperatura e umidade não foram propícias para o crescimento do Fungo F1C3.

No Ensaio 04 não foi verificado crescimento micelial.

Nos Pontos Centrais (Ensaio 05, 06 e 07) a 37°C e 55% U, observou-se pouco crescimento em todos os tempos avaliados, indicando que as variáveis temperatura e umidade pouco influenciaram para o desenvolvimento do fungo.

Visto que o fungo utilizado foi isolado numa temperatura de 43°C  $\pm$  2 (NUNES et al., 2014), era esperado maior crescimento a temperatura de 45°C, o que não foi observado. O Fungo F1C3 teve maior crescimento na temperatura de 30°C.

Independentemente dos teores de umidade e temperaturas empregadas, pela análise visual, é possível afirmar que o microrganismo foi capaz de crescer no mesocarpo de coco verde triturado.

## 4.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Em todos os Ensaio o pH do meio variou entre 4,9 e 5,5 durante a fermentação. Os valores ótimos de pH para produção de celulases estão na faixa ácida (FERREIRA, 2010).

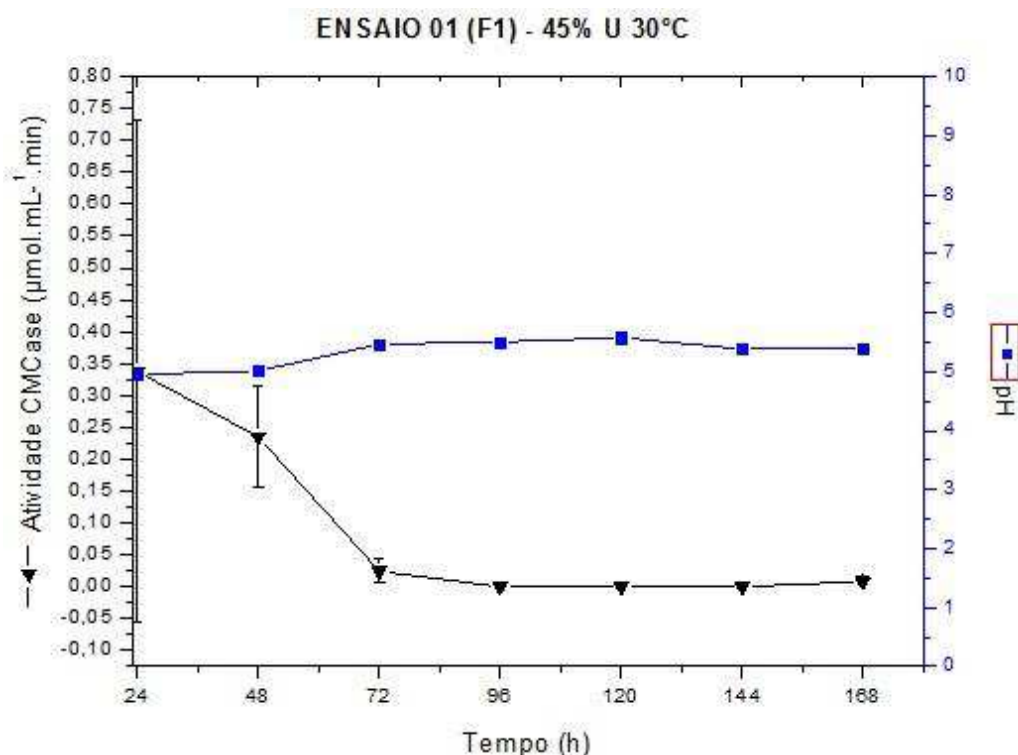
## 4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 4.3.1 Celulases

Os resultados da atividade enzimática e potencial hidrogeniônico estão detalhados nas Figuras 13 a 18, em que visualiza-se o perfil do processo de produção de CMCase em FES, usando o bagaço do mesocarpo de coco verde.

Na Figura 12 tem-se o comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 01 do planejamento do Fungo F1C3.

**Figura 12** – Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 01 do planejamento.

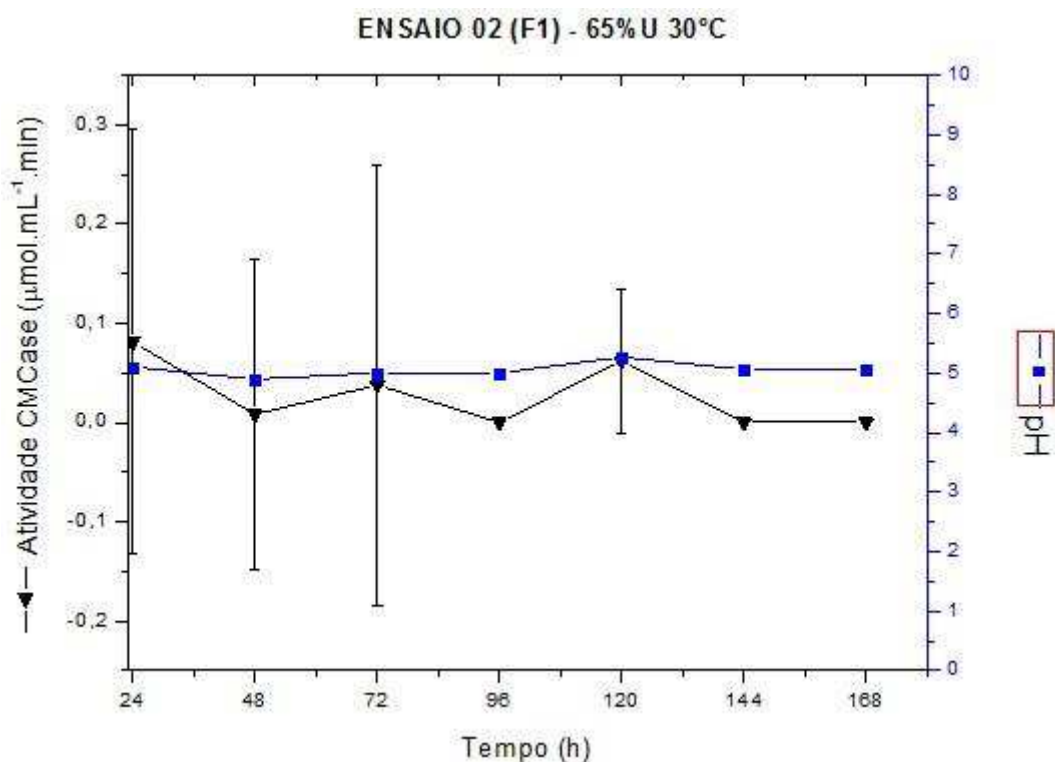


Analisando a Figura 12 foi possível verificar que a maior atividade observada no ensaio realizado, a partir do planejamento experimental, foi ao tempo de 24 horas de fermentação, à temperatura de 30°C e 45% de umidade, em que foi observado o pico de atividade enzimática expressa em CMCase de 0,34 U.mL<sup>-1</sup>. O valor encontrado neste trabalho foi de melhor desempenho que o reportado por Barros et al. (2014) ao estudar a produção de celulases pelo fungo *fsde3* em cultivo semissólido utilizando resíduos da cana-de-açúcar obtendo atividade de CMCase igual a 0,06 U.mL<sup>-1</sup> também a 24 horas de fermentação.

Após o pico de produção, observou-se a queda da atividade semelhante ao comportamento encontrado por Amorim (2010), que verificou pico de produção seguido de processo de queda da produção da enzima. Ao analisar o crescimento do Fungo 1 e a atividade enzimática, observou-se que este não precisou crescer no meio para produzir enzimas.

Na Figura 13 tem-se o comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 02 do planejamento do Fungo F1C3.

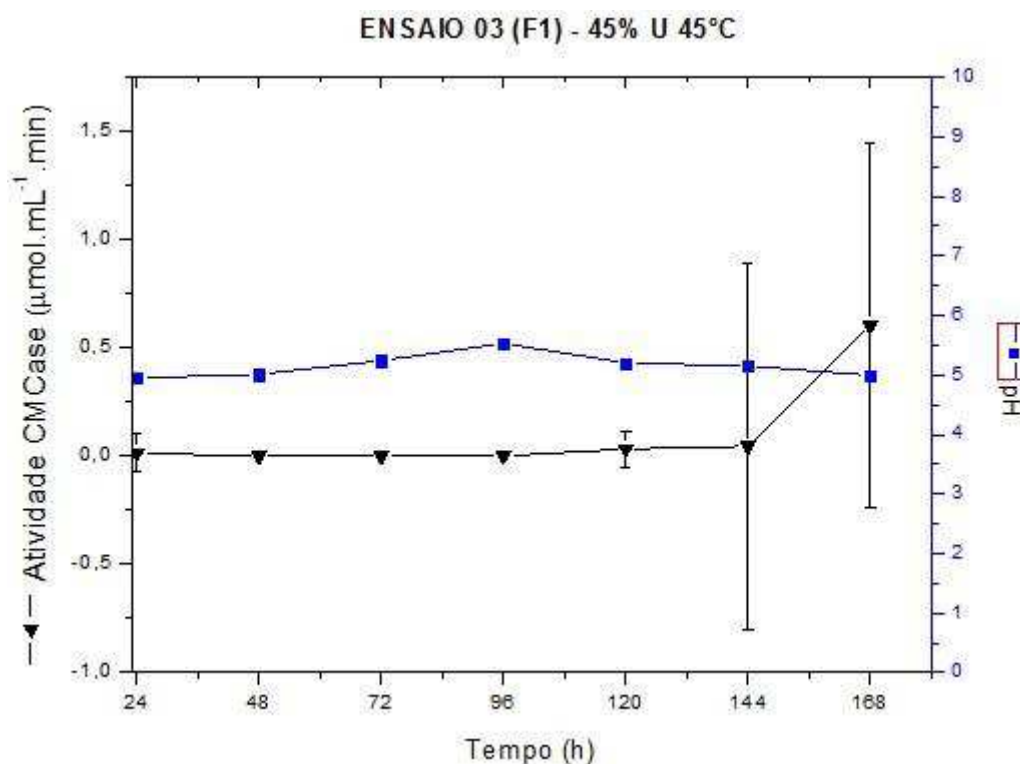
**Figura 13** – Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 02 do planejamento.



No Ensaio 02, a 30°C de temperatura e 65% de umidade inicial, percebeu-se que para essa condição obteve-se oscilação na atividade enzimática ao decorrer do tempo de cultivo, com pico de atividade enzimática de 0,08 U.mL<sup>-1</sup>, obtido em 24h, sendo máxima atividade verificada para esse Ensaio. Percebeu-se a tendência a aumentar a produção em 120h (0,06 U.mL<sup>-1</sup>). Neste Ensaio, o aumento da umidade resultou em diminuição da atividade de CMCase. O crescimento do fungo foi semelhante ao observado no Ensaio 01.

Na Figura 14 tem-se o comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do ensaio 03 do planejamento do Fungo F1C3.

**Figura 14** – Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do Ensaio 03 do planejamento.

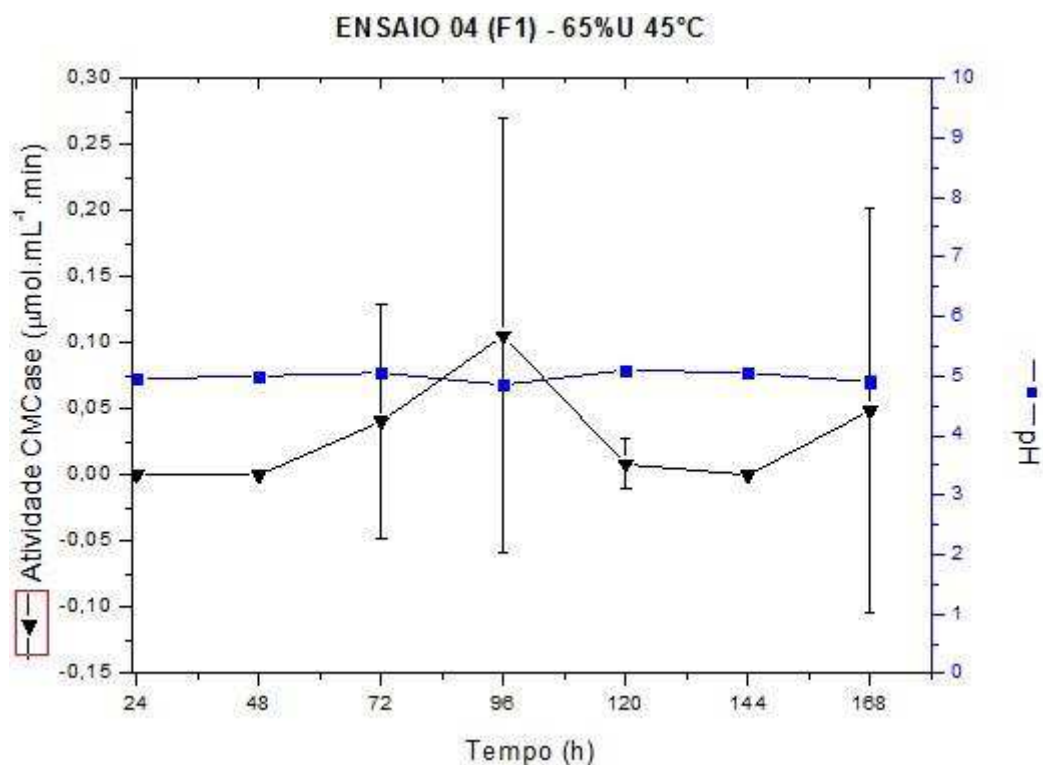


No Ensaio 03, observou-se que para uma temperatura de 45°C e umidade de 45%, a maior atividade enzimática ocorreu em 168h, com atividade de 0,6 U.mL<sup>-1</sup>. O aumento da temperatura neste ensaio pode ter contribuído para o aumento da atividade de CMCase. Foi possível inferir também que a umidade inicial não contribuiu significativamente na produção de enzima, visto que sua máxima produção foi no limite superior de tempo de fermentação, no qual parte da umidade havia sido perdida.

Ao analisar o crescimento do fungo, observou-se que o microrganismo teve pouco crescimento, predizendo que a inibição de seu crescimento se deu devido à faixa de temperatura, embora sua adaptação à termofilia o tenha feito produzir grandes quantidades de enzima para sobreviver.

Na Figura 15 tem-se o comportamento cinético das atividades expressas em CMCase do ensaio 04 do planejamento do Fungo F1C3.

Figura 15 – Comportamento cinético das atividades expressas em CMCCase do Ensaio 04 do planejamento.



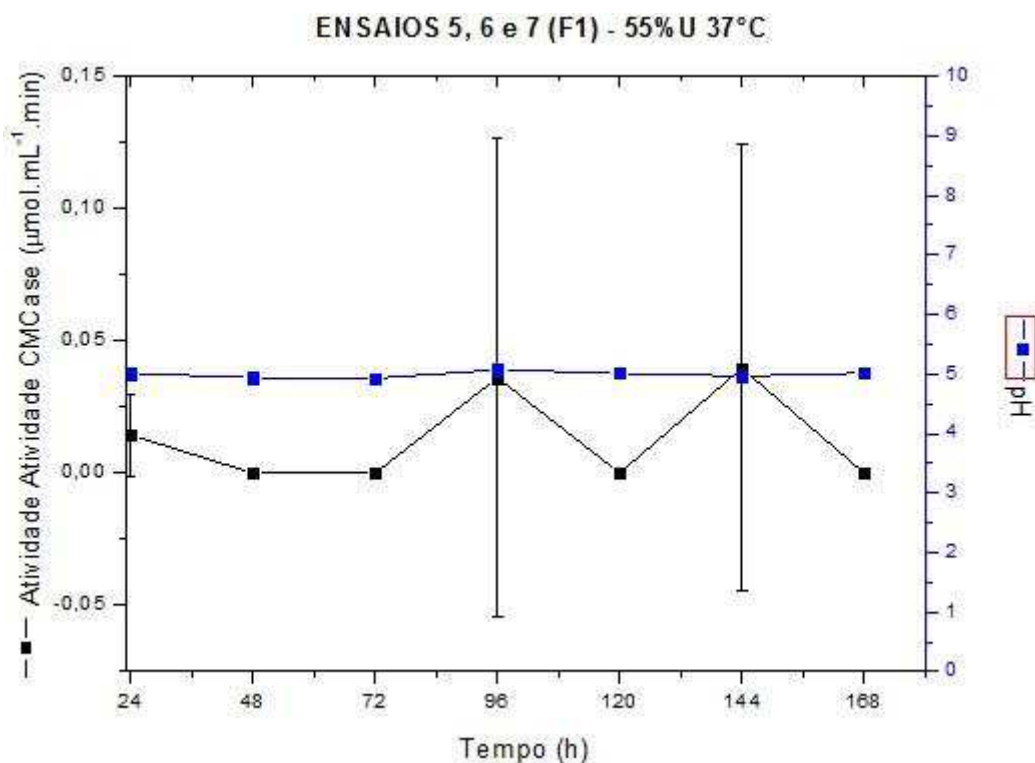
No ensaio 04, para uma temperatura de 45°C e umidade inicial de 65% observou-se que houve um aumento da concentração da enzima CMCCase em 72h com atividade de 0,04 U.mL<sup>-1</sup>. A maior concentração da enzima CMCCase ocorreu em 96h com atividade de 0,106 U.mL<sup>-1</sup>. Após esse período, observou-se a diminuição da concentração da enzima e uma nova tendência de aumento de atividade em 168h com atividade enzimática de 0,048 U.mL<sup>-1</sup>. Assim como no Ensaio 02, esse comportamento pode ser atribuído ao efeito cumulativo de oligossacarídeos presentes no meio.

O crescimento do fungo diferiu do observado nos anteriores ensaios, visto que neste o microrganismo teve ausência de crescimento.

Foram realizados ensaios, em triplicata, do ponto central para maior confiabilidade e reprodutibilidade dos dados.

Na Figura 16 tem-se o comportamento cinético das atividades expressas em CMCCase dos ensaios 05, 06 e 07 do planejamento do Fungo F1C3.

Figura 16 – Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase dos Ensaio 05, 06 e 07 do planejamento.



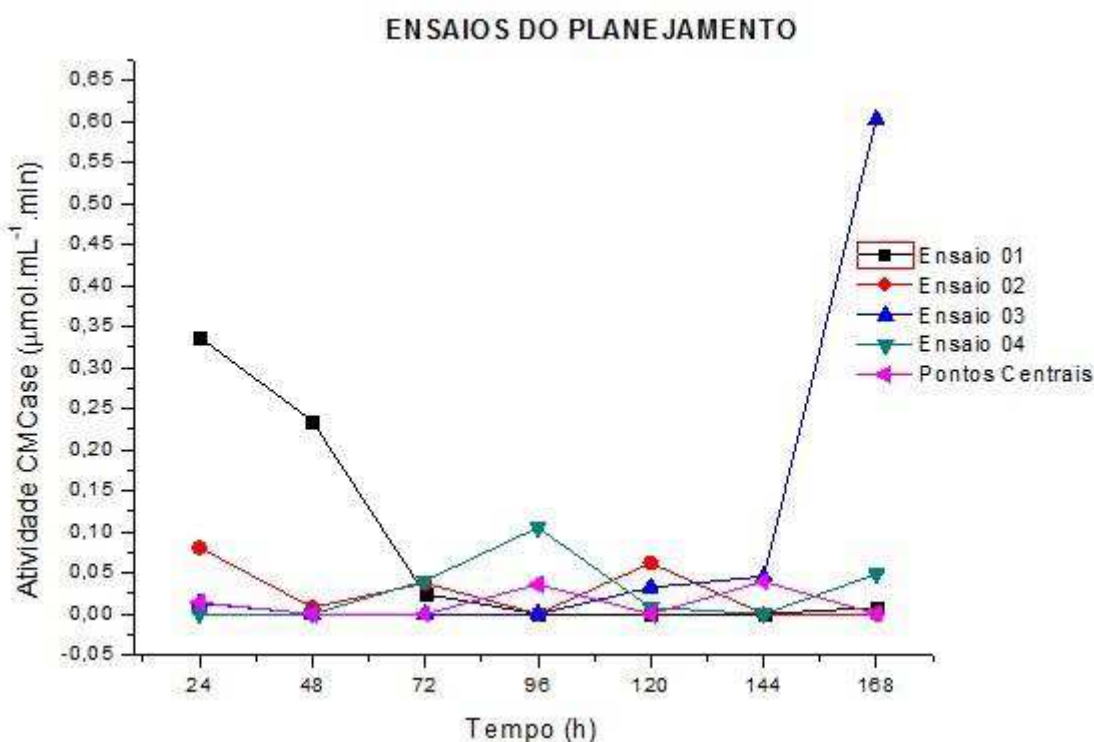
Ao analisar os resultados da média dos Pontos Centrais inferiu-se que ao longo do processo fermentativo, houve atividade enzimática de CMCase. Um aumento da atividade enzimática neste ensaio foi observado com 96h, com 0,036 U.mL<sup>-1</sup> e, após esse período, houve uma queda na concentração enzimática, seguida por novo aumento com 144h de fermentação com atividade enzimática de 0,039 U.mL<sup>-1</sup> (a maior concentração obtida nesses Ensaio).

Ao analisar o crescimento microbiano, percebeu-se que nessa faixa de temperatura (37°C) e umidade (55%) foi pouco o crescimento observado do Fungo F1C3, sugerindo que esses índices de temperatura e umidade não são os ideais para o crescimento do microrganismo.

Observou-se também que em todos os ensaios do planejamento o pH do meio não sofreu grandes variações, ficando entre 4,9 e 5,5.

Na Figura 17 tem-se o comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os ensaios do planejamento do Fungo F1C3.

**Figura 17** – Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os Ensaio do planejamento.



Em todos os tempos avaliados de todos os Ensaio realizados, houve produção de atividade enzimática, sendo que as fermentações ocorreram a diferentes níveis de temperatura e umidade. Ao analisar a Figura 15 foi possível verificar que as maiores atividades ocorreram nos ensaios 01 e 03. Os Ensaio 01 (30°C e 45% U) e 03 (45°C e 45% U) apresentaram os melhores resultados para a produção de CMCase com atividade máxima de 0,34 U.mL<sup>-1</sup> (24 horas) e 0,6 U.mL<sup>-1</sup> (168 horas), respectivamente. Oliveira Júnior (2014) usando coco como substrato observou ao longo do processo fermentativo a máxima concentração de CMCase de 0,233 U.mL<sup>-1</sup>.

Nos Ensaio 02 (30°C e 65% U) e 04 (45°C e 65% U), observou-se produção enzimática de 0,08 U.mL<sup>-1</sup> (24 horas) e 0,106 U.mL<sup>-1</sup> (96 horas), respectivamente. Os baixos níveis de produção de CMCase podem ter sido ocasionados possivelmente pelo aumento da umidade, indicando que o aumento da umidade, neste caso, foi desfavorável para a produção da enzima.

Nos Ponto Centrais (37°C e 55%), observou-se que estes seguem os parâmetros dos demais ensaios, a máxima atividade de CMCase foi de 0,039 U.mL<sup>-1</sup> em 164 horas de fermentação. Dessa forma, foi possível inferir que a combinação



entre temperatura e umidade moderadas não promoveram boa produção de CMCase. (Porque a 30°C obteve-se um dos melhores resultados)

Ao analisar o crescimento do fungo com a produção da enzima percebeu-se que o fungo conseguiu crescer mesmo quando submetido a mudanças de temperatura e umidade e que durante seu desenvolvimento não precisou produzir elevados índices enzimáticos.

#### 4.4 ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO

##### 4.4.1 Metodologia de Superfície de Resposta

Na Tabela 6 têm-se os dados referentes aos pontos de maior atividade CMCase obtida em cada ensaio do planejamento do Fungo F1C3.

**Tabela 6** – Dados referentes aos pontos de maior atividade CMCase obtida em cada ensaio.

Ensaio	U (%)	T (°C)	CMCase (U/mL)	Tempo (horas)
1	-1 (45)	-1 (30)	0,34	24
2	+1 (65)	-1 (30)	0,08	24
3	-1 (45)	+1 (45)	0,6	168
4	+1 (65)	+1 (45)	0,106	96
5	0 (55)	0 (37)	0,03	144
6	0 (55)	0 (37)	0,039	144
7	0 (55)	0 (37)	0,034	144

Fonte: Dados da Pesquisa.

Ao analisar a Tabela 6, observou-se que os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos nos experimentos em que foram utilizados níveis menor e maior de temperatura, 30°C Ensaio 01 e 45°C Ensaio 03 e menor teor de umidade inicial (45%).

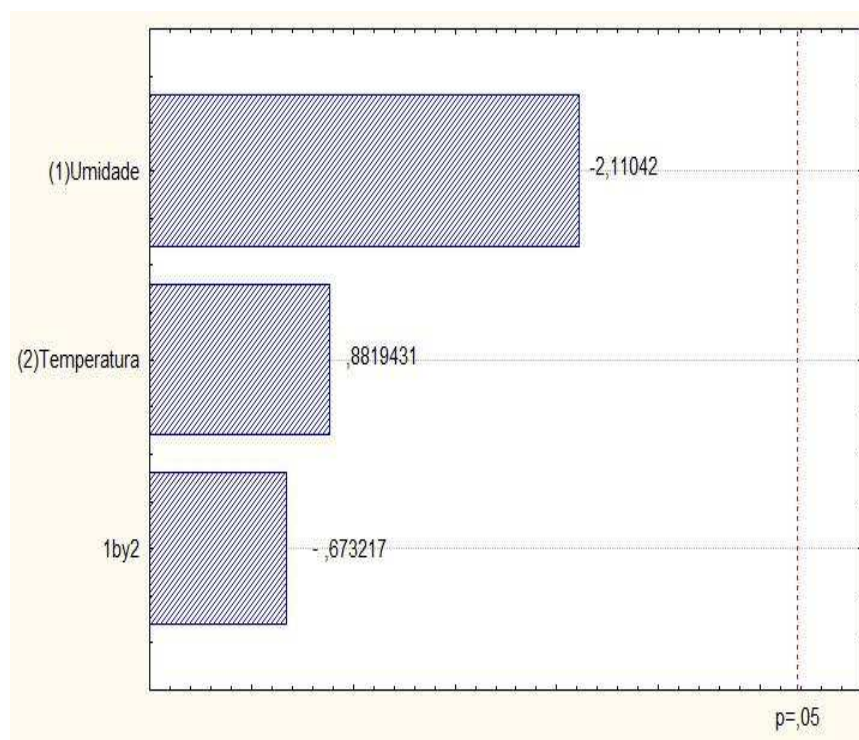
$R^2$  é a porcentagem da variação da variável de resposta explicada pela relação com uma ou mais variáveis preditoras. Normalmente, quanto maior  $R^2$ , melhor o modelo ajusta os dados. O valor de  $R^2$  está sempre entre 0 e 100%. A análise de variância (Tabela 7), gráfico de Pareto (Figura 18) e gráficos de superfície de resposta (Figuras 19 e 20) apresentaram coeficiente de determinação  $R^2 = 0,65457$ , o que não representa um dos melhores modelos para predições, visto que este coeficiente mede o quanto a variável resposta é explicada pelo modelo e é significativa a partir de 70%.

**Tabela 7** – Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática CMCCase.

<b>Fator</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Umidade	0,142046	1	0,142046	4,453884	0,125317
Temperatura	0,024807	1	0,024807	0,777824	0,442751
1by 2	0,014454	1	0,014454	0,453221	0,549031
Erro Puro	0,095678	3	0,031893		
Total	0,276986	6			

Fonte: Dados da Pesquisa.

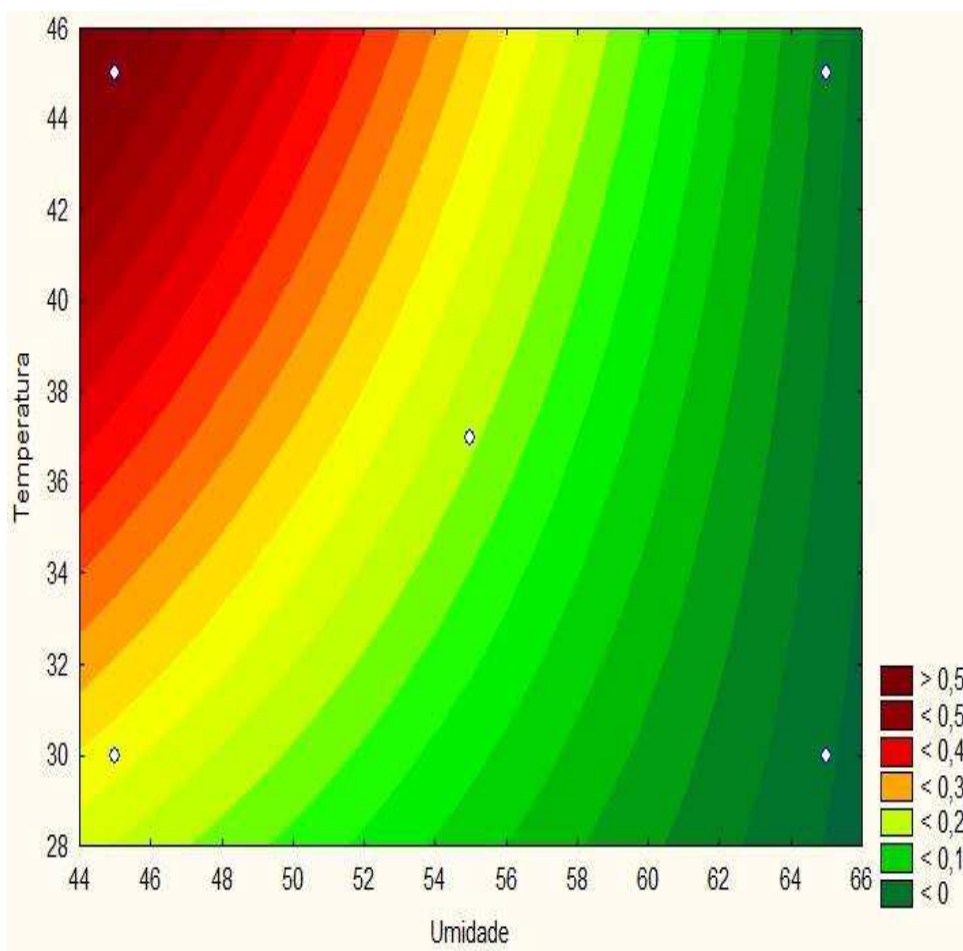
A análise de variância mostrou que nenhuma variável teve influência sobre a atividade enzimática. A análise ainda mostrou que a variável umidade não teve influência sobre a atividade enzimática, ou seja, não foi significativa, ainda que dentre as variáveis estudadas e suas interações, foi a que mais se aproximou do intervalo de confiança.

**Figura 18** – Gráfico de Pareto

O diagrama de Pareto fornece o efeito quantitativo que cada variável possui sobre a atividade enzimática, estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do intervalo de confiança estabelecido para a análise estatística (95%).

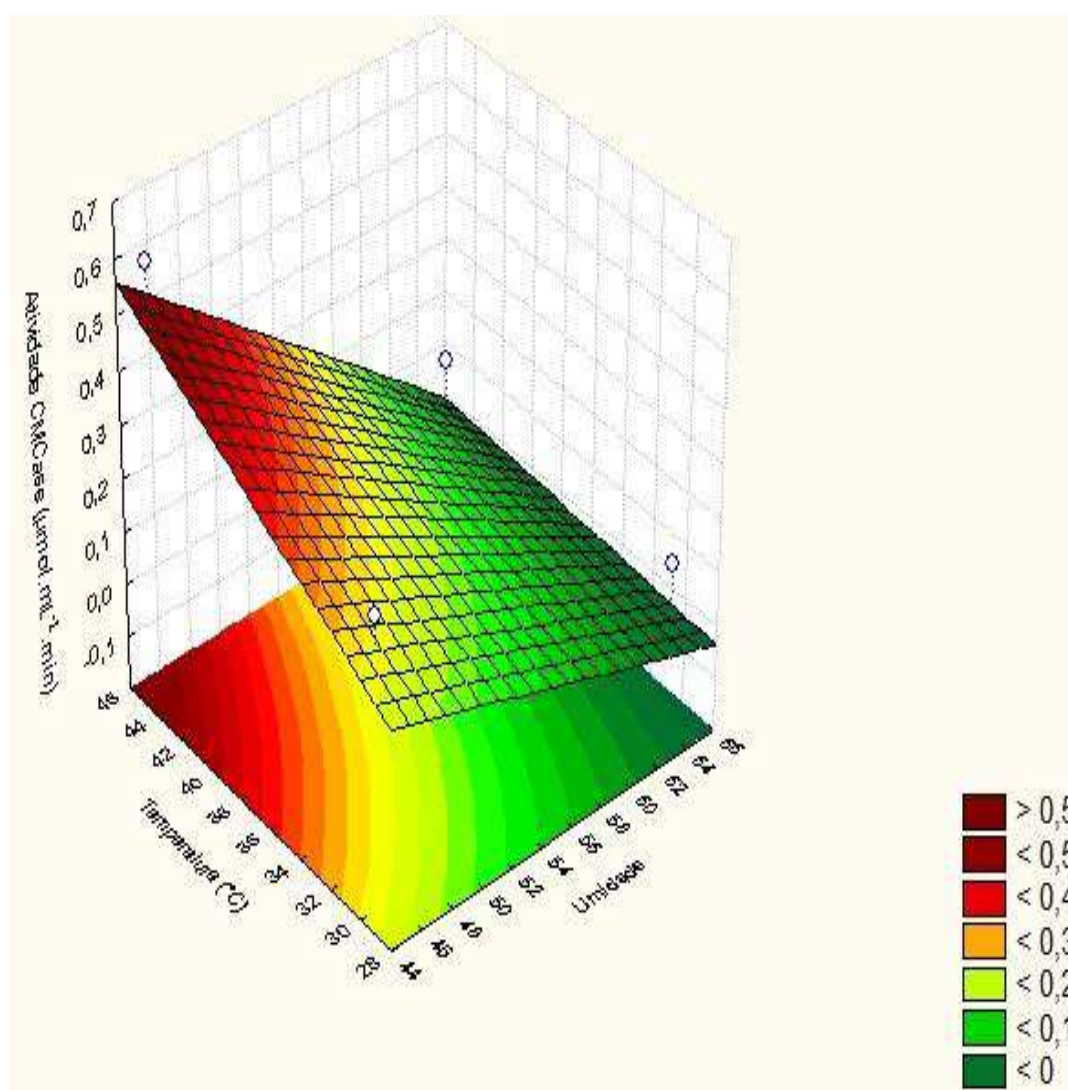
De acordo com o diagrama de Pareto, para a atividade de CMCase, nenhuma variável influenciou no processo fermentativo, indicando que o fungo utilizado neste trabalho conseguiu produzir enzima independentemente das variações de temperatura e umidade. A umidade, temperatura e a interação entre os parâmetros não foram significativas para um nível de significância de 95%, ou seja, a umidade, a temperatura e a interação (1by2) não influenciaram na atividade enzimática nas condições utilizadas nesse experimento.

**Figura 19** - Gráfico de contornos das variáveis independentes umidade e temperatura em função da atividade enzimática.



Por meio do gráfico de contornos (Figura 19), é evidente que, tomando um nível baixo de umidade (45%) e um nível alto de temperatura (45°C), foram obtidos rendimentos otimizados. Além disso, o ponto ótimo de rendimento (máximo) está na parte superior esquerda, encontrado no Ensaio 03.

Figura 20 – Superfície de resposta da atividade expressa em CMCase em função da temperatura e umidade.



Os modelos de superfície de resposta podem ser explorados para determinar condições ótimas para se trabalhar ou a sensibilidade da variável resposta a mudanças dos níveis dos fatores de interesse. O gráfico de superfície de resposta mostra o efeito e permitiu visualizar a variação da resposta em função das variáveis independentes dentro dos níveis de umidade e temperatura sobre a atividade de CMCase, no período de fermentação de 168 horas, no qual a atividade de CMCase máxima foi de 0,6 U.mL<sup>-1</sup>, valor correspondente ao Ensaio 03, a 45°C e 45% de umidade inicial.

## 5 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos pode-se concluir:

1 - O mesocarpo de coco verde é um substrato com potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulolíticas, principalmente por apresentar um percentual de celulose (45,93%) satisfatório, componente que é conhecidamente um excelente indutor dessas enzimas.

2 - A maior produção de enzima celulase expressa em CMCase foi, pelo Fungo F1C3,  $0,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}$  em 168 horas de fermentação, a 45% de umidade e temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ .

3 - O fungo estudado foi capaz de crescer, timidamente, no mesocarpo de coco verde, apesar dos baixos níveis de produção de CMCase.

4 - A utilização da metodologia de planejamento experimental fatorial  $2^2$  permitiu observar que não foi verificada influência das variáveis estudadas (Temperatura e Umidade e sua interação) na produção enzimática.

## REFERÊNCIAS

ABREU, P. M. S. **Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação do fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781**. Dissertação de Mestrado, UFCG, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente, Campina Grande - PB, Brasil. 2014.

ALBUQUERQUE, A. C. A. G. **Avaliação da produção de celulase em mesocarpo de coco verde (*Cocos nucifera*) por meio da fermentação semissólida por um fungo isolado de um processo de compostagem**. Monografia (Bacharelado) – Universidade Federal de Campina Grande. Sumé, 56 p. 2016.

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

BARROS, T.V.F, BONFIM, K.S., MELO, A.L.M., SANTOS, F.A., SANTOS, S.F.M.. Produção de celulases pelo fungo *fsde3* em cultivo semissólido utilizando resíduos da cana-de-açúcar. **Revista Saúde e Ciência**, v. 03, n. 03, 2014.

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, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.

BEGUIN, P., AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.**, 13:25-58, 1994.

BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology**, v.100, p.5444-5453, 2009.

BERNAL, M. P.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; PAREDES, C.; ROIG, A. Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. **Agriculture ecosystems & environment**, v. 69, 1998.

BERNHART, M.; FASINA, O. O. Moisture effect on the storage, handling and flow properties of poultry litter. **Waste Management**, v.29, p.1392-1398, 2009.

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

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**. New York, v.15, p. 583-620, 1997.

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

BIDONE, Francisco Ricardo Andrade. Resíduos Sólidos Provenientes de Coletas Especiais: Eliminação e Valorização. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES/RJ**, 2001.

BISCHOFF, K. M., ROONEY, A. P.; LI, X. L.; LIU, S.; HUGHES, S. R. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol Lett**. V.28, p. 181-188, 2006.

BONDAR, G. A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera*) no Brasil. Salvador: Tipografia Naval, 1955. 91 p.

BORTOLAZZO, N.G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

CAO, Y; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**. Oxford, v.337, p. 1291-6, 2002.

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.

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

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS – CGEE. **Química Verde no Brasil: 2010 – 2030**. Brasília – DF, 2010.



CORRÊA, D.; PRESSI, F. P.; JACOMETTI, M. L. G.; SPITZNER JR., P. I.; PAREDES, E. A. Tecnologia de fabricação de fertilizantes orgânicos. In: CERRI, C. C.; ATHIÉ, D. The regional colloquium on soil organic matter studies. **Proceedings...** São Paulo, 1982, p.217-222.

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

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.

ENDO, K.; HAKAMADA, Y.; TAKIZAWA, S.; KUBOTA, H.; SUMITOMO, N.; KOBAYASHI, T. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. **Appl Microbiol Biotechnol**, V. 57, p. 109-116, 2001.

FAO. 2012. **World Production. Available in**. Acessado em 29 de Julho de 2016.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66, 506.

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

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

FREMOND, Y.; ZILLER, R.; NUCE de LAMOTHE, M. de. El cocotero: técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona: Editorial Blume, 1975. 236 p.

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.

GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. São Paulo: Química Nova, 2009.

GILKES, N. R. *et al.* Domains in microbial – 1,4 glycanases: sequence conservation, function and enzyme families. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 2, p. 303-315, 1991.

GIUSTI, E.; MARSILI-LIBELLI, S. **Fuzzy modeling of the composting process.** Environmental Modeling & Software, v. 25, p. 641-647, 2010.

GLAZER, A. N., NIKAIDO, H. Biomass, In: Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, Glazer, A. N., Nikaido, H., p. 430-455, Cambridge University Press, ISBN 978-0-521-84210-5, New York, 2007.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, Vol. 30, Nº 1, p. 136-145, 2007.

GOMES, R. P. O coqueiro-da-baía. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 111 p.

GRAMINHA, et al. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p. 1-22, 2008.

HARLAND, P. D. **Experimental design in biotechnology.** New York: Marcel Dekker Inc., 1989. ISBN 0-8247-7881-2.

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

HON, D. N. S., SHIRAISHI, N. *Wood and cellulosic chemistry.* New York: Marcel Dekker, p.1032, 1991.

HOWARD, R. L. *et al.* Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, Toronto, v.2, p. 602-19, 2003.

IBGE. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil.** Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 25, p. 1-88, 2012.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces transformant* T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. V.1, P. 263-268, 2003.

KARADAG, D.; ÖZKAYA, B.; ÖLMEZ, E.; NISSILA, M. E.; ÇAKMAKÇI, M.; YILDIZ, S.; PUHAKKA, J. A. Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.77, p.85-90, 2013.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes Orgânicos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1985, 492p.

KIEHL, Edmar José. **Manual de compostagem**: maturação e qualidade do composto. 4.ed. Piracicaba: E. J. Kiehl, 2004, 173p.

KLYOSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Journal of Biochemistry**, Tokio, Japan, v.29, n.47, p.10577-85, 2015.

KUMAR, M.; OU, Y-L.; LIN, J-G. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio. **Waste Management**, v.30, n.4, p.602-609, 2010.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass.

LESCHINE, S. **Cellulose degradation in anaerobic environments**. Annual Review of Microbiology, v.49, p.399-426, 1995.

LESCHINE, S. **Cellulose degradation in anaerobic environments**. Annual Review of Microbiology, v.49, p.399-426, 1995.

LI, X.; ZHANG, R.; PANG, Y. Characteristics of dairy manure composting with rice straw. **Bioresource Technology**, v.99, p.359-367, 2008.

LINS, S. A. da S. **Produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 75 p. 2012.

LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulases utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.66, n.3, p. 506-77, 2002.

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

MEDINA, J. C. Coco I - Cultura. In: MEDINA, J. C.; GARCIA, J. L. M.; DE MARTIN, Z. J.; KATO, K.; TERUO, P.; TURATTI, J. M.; SANTOS, L. C.; SILVA, M. T. C.; CANTO, W. L.; BICUDO NETO, L. C.; MORETTI, V. A. (Ed.). *Coco da cultura ao processamento e comercialização*. São Paulo: ITAL, 1980. p.7-172. (Série Frutas Tropicais, 5).

MELO, I. S. de. A importância da celulase na degradação de matéria orgânica. In: FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000.

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. ISSN 1520-6882.

MOREIRA-NETO, S, L. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinérea* e estudo do potencial e aplicação biotecnológica**. 2012. 168 p. il. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, São Paulo. 2012.

MTUI, G.Y.S. Recent Advances in Pretreatment of Lignocellulosic Wastes and Production of Value Added Products. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 8, p. 1398-1415, ISSN 1684-5315, 2009.

MUHLBACH, P. R. F. et al. **Silagem de Alfafa Colhida no Início do Florescimento e Submetida ao Emurchimento e à Ação de Aditivos Biológicos**. Revista brasileira de zootecnia, v 29, p.349-356, 2000.

NUNES, J.S.; DELGADO, R.F.A.; SOUSA, E.N.; COELHO, G.D. **A compostagem como fonte de micro-organismos com potencial biotecnológico**. ANAIS ENAMA, 2014.

OJUMU, T.V. et al, **Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob**. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (6), pp. 150–152, 2003.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semisólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. 113f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; SOUZA FILHO, P. F. de; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. dos; ASSIS, C. F. Produção de enzimas pelo fungo *Penicillium chrysogenum* e um fungo isolado da casca do coco (*Aspergillus fumigatus*) em FSS utilizando resíduo de coco como substrato. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. v.1, nº 2, fevereiro 2015.

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

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

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

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

PASSOS, E. E. M. Morfologia do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). *A cultura do coqueiro no Brasil*. 2. ed. Aracaju: Embrapa-SPI, 1998b. p. 57-64.

PEIXOTO, R. T. dos G. **Compostagem**: opção para o manejo orgânico do solo. Londrina; IAPAR, 1998, 46p.

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

PEREIRA NETO, J. T. **Manual de compostagem**: processo de baixo custo. Viçosa: UFV, 2007, 81p.

PERSLEY, G.J. **Replanting the tree of life: towards an international agenda for coconut palm research**. Wallingford: CAB, 1992.

PÉREZ-PONS, J. A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Induction and preliminary characterization of intracellular  $\beta$ -glucosidases from a cellulolytic *Streptomyces* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v.128, p.235-39, 1995.

PETRIC, I.; SESTAN, A.; SESTAN, I. Influence of initial moisture content on the composting of poultry manure with wheat straw. **Biosystems Engineering**, v.104, p.125-134, 2009.

PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; CHZANOWSKI, L.; CYPLIK, P.; DACH, J.; OLEJNIK, A.; STANINSKA, J.; CZARNY, J.; LEWICKI, A.; MARECIK, R.; POWIERSKA-CZARNY, J. Composting of oiled bleaching earth: Fatty acids degradation, phytotoxicity and mutagenicity changes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.78, p.49-57, 2013.

PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. Coconut. In: PLOETZ, R. C. (Ed) Compendium of tropical fruit diseases. 2. ed. Minnesota: APS, 1998.p. 23-32.

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.

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.

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.

ROSA, M.F., BEZERRA, F.C., ARAÚJO, F.B. S NORÕES, E.R.V. **Utilização do pó de coco verde na germinação de alface hidropônico**. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 19, n. 2, p. 294, jul. 2001.

ROSSI, S. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PEREIRA, B. M. P.; GAGO, F. D.; RIZZOLO, J. A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MEDEIROS, A. B. P. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Res. Int.*, v. 42, p. 484-486, 2009.

RUGGIERI, L.; GEA, T.; ARTOLA, A.; SANCHEZ, A. A study on air filled porosity evolution in sludge composting. **International Journal of Environment and Waste Management**, v.9, n.1, p.56-58, 2012.

SHRESTHA, P.; KHANAL, S.K.; POMETOIII, A.L.; VAN LEEUWEN, J.H. Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by

simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, v.57, p. 4156-4161.

SIGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

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

TAUK, SÂMIA MARIA. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociência**, v.20, p.299-301, 1990.

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.

TRAUTMANN, N.; OLYNCIW, E. **Compost Microorganisms**. In: CORNELL. Composting, Science & Engineering. Cornell University Ithaca, 2005.

VAITHANOMSAT, P., APLWATANAPIWAT, W., CHUMCHUENT, N., KONGTUD, W., SUNDHRARAJUN, S. The potential of coconut husk for bioethanol production. *Kasetsart J* 2011; 45: 159-164.

VALENTE, B. S. **Tecnologias aeróbias no tratamento de resíduos da produção animal: compostagem e vermicompostagem**. 2013. 102f. Tese de Doutorado em Ciências (Produção Animal) - Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKAAHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Adv Biochem EnginBiotechnonol**. V. 108, p. 121-145, 2007.

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