

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

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM
FIBRA DE SISAL (*Agave sisalana*) UTILIZANDO *Trichoderma reesei* LCB 48**

CLOTILDES ALVINO LEITE

CAMPINA GRANDE - PB
FEVEREIRO/2015

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM
FIBRA DE SISAL (*Agave sisalana*) UTILIZANDO *Trichoderma reesei* LCB 48**

CLOTILDES ALVINO LEITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

Orientadora: Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira (UAEQ/UFPG)

CAMPINA GRANDE - PB

FEVEREIRO/2015

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM
FIBRA DE SISAL (*Agave sisalana*) UTILIZANDO *Trichoderma reesei* LCB 48**

CLOTILDES ALVINO LEITE

Dissertação aprovada em 03 de Fevereiro de 2015

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira - UFCG
Orientadora

Dr. Everaldo Paulo de Medeiros – EMBRAPA Algodão
Examinador Externo

Dr. Douglas Alexandre Saraiva Leão - UFCG
Examinador Interno

Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa - UEPB
Examinador Externo

**CAMPINA GRANDE - PB
FEVEREIRO/2015**

DEDICATÓRIA

Dedico a meu pai Claro Alvino da Silva (in memoriam), exemplo de vida, fé e perseverança.

AGRADECIMENTOS

É excelente passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer e querer a tantos homenagear. É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de mestrado, se mantiveram simplesmente presentes, ao nosso lado. Por isso meus sinceros agradecimentos.

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, minha primeira estrutura, que durante toda a minha vida caminhou ao meu lado, que me proporcionou a oportunidade de chegar até aqui. A Ele dou graças todos os dias pelo dom da vida.

À minha família, especialmente meu pai Claro Alvino da Silva (*in memoriam*), que acreditou em mim, que sempre me apoiou na caminhada do saber, e, sobretudo, pelo seu imenso amor.

Ao meu noivo Anderson Ferreira Guedes pela compreensão, apoio, companheirismo, amor e cuidado incondicionais, e pelo incentivo que com certeza não faltou.

A minha orientadora, professora Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela orientação, conduta, ensinamentos e pela paciência em ensinar cada passo a seguir durante o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao pessoal do Laboratório Avançado de Tecnologia Química da EMBRAPA-Algodão, em especial ao pesquisador Dr. Everaldo Paulo de Medeiros e aos técnicos Joabson e Edjane, pelos inúmeros momentos em que me ajudaram.

A todos os amigos do Laboratório, pelo companheirismo durante todo período experimental, pela troca de experiências e pela contribuição para a realização desse trabalho, por terem ajudado nos momentos mais difíceis e por não deixarem me faltar esperança.

Aos funcionários dos Laboratórios de Engenharia Bioquímica e Processos Químicos da UAEQ, seu Jardes e seu Lopes pela grande colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFCG pela oportunidade concedida.

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

À Capes pelo apoio à pesquisa e incentivo financeiro.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

Apesar da ampla utilização das celulases, 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 em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, diminuindo assim os custos de produção da enzima, e agregando valor ao resíduo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção enzimática de celulases pelo fungo filamentosso *Trichoderma reesei* LCB 48 por fermentação em estado sólido utilizando a fibra de sisal como substrato. Foi realizada a caracterização da fibra de sisal visando conhecer sua composição física, físico-química e química. A caracterização mostrou que este substrato tem potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulolíticas, principalmente por ter apresentado um percentual de alfacelulose satisfatório (58,40%), que é indutor dessas enzimas e pH ácido ideal para a produção de enzimas em fermentação em estado sólido com fungos (4,35). Foi realizada a fermentação utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48 com uma concentração de 10^7 esporos/g, a uma temperatura de 28 °C, em substrato com 70, 80 e 90% de umidade e suplementação com os meios básico indutores da atividade enzimática de Mandels e Weber. Amostras foram coletas ao longo do processo para análises de pH, umidade, açúcares redutores e atividade enzimática, expressa em carboximetilcelulase, até um tempo de 474 horas. A maior atividade enzimática obtida para a fibra de sisal foi de 1,21 U/g em 450 horas de fermentação, em substrato com 70% de teor de água, sendo um fator positivo devido a redução do uso de água no processo fermentativo.

Palavras-chaves: enzimas fúngicas, hidrólise enzimática, lignocelulose.

ABSTRACT

Despite the wide use of cellulases, the high cost has made some expensive processes, studies have been developed in order to produce this enzyme through a process of solid state fermentation from lignocellulosic agroindustrial residues, thereby reducing the production costs of enzyme, and adding value to waste. The objective of this study was to evaluate the enzymatic production of cellulases by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* LCB 48 by solid state fermentation using sisal fiber as substrate. The characterization of sisal fiber was performed to meet their physical composition, physico-chemical and chemical. The characterization demonstrated that this substrate has the potential to be used in the fermentation for production of cellulolytic enzymes, especially for introducing a satisfactory alfacelulose percentage (58.40%), which is inducer of these enzymes and acid pH optimum for the production of enzymes in solid state fermentation with fungi (4.35). Fermentation was performed using the microorganism *Trichoderma reesei* LCB 48 with a concentration of 107 spores/g, at a temperature of 28 °C, substrate at 70, 80 and 90% humidity and supplementation with the basic means of inducing enzyme activity of Mandels and Weber. Samples were collected during the process to pH, moisture, reducing sugars and enzymatic activity, expressed as carboxymethylcellulase, until a time of 474 hours. The higher enzyme activity obtained for sisal fiber was 1.21 U/g in 450 hours of fermentation, in a substrate with 70% water content, a positive factor due to reduction of water use in the fermentation process.

Keywords: fungic enzymes, enzymatic hydrolysis, lignocellulose.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Planta de sisal (<i>Agave sisalana</i>)..... | 16 |
| Figura 2 - Desfibramento do sisal (<i>Agave sisalana</i>)..... | 17 |
| Figura 3 - Estrutura lignocelulósica..... | 19 |
| Figura 4 - Esquema representativo da associação entre as estruturas de celulose, hemicelulose e lignina..... | 21 |
| Figura 5 - Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos..... | 26 |
| Figura 6 - Fibra de sisal (<i>Agave sisalana</i>)..... | 28 |
| Figura 7 - Aspecto da fibra de sisal cortada (a) e triturada (b)..... | 29 |
| Figura 8 - Placa de petri com meio básico contendo o microrganismo <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48..... | 38 |
| Figura 9 - Fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48..... | 42 |
| Figura 10 - Fibra de sisal coberta de esporos de <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 após 42 horas de fermentação em estado sólido..... | 42 |
| Figura 11 - Extrato enzimático da fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48..... | 43 |
| Figura 12 - Perfis granulométricos da fibra de sisal moída | 47 |
| Figura 13 - Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação em estado sólido com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em fibra de sisal, na umidade (a) 70, (b) 80 e (c) 90% e fonte de suplementação de acordo com o meio básico de Mandels e Weber..... | 49 |
| Figura 14 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase dos ensaios com 70, 80 e 90% de umidade..... | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição lignocelulósica da fibra de sisal (<i>Agave sisalana</i>)..... | 18 |
| Tabela 2 - Composição química do meio de cultura..... | 37 |
| Tabela 3 - Composição dos meios de complementação usados para indução da atividade enzimática na fermentação em estado sólido por <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48..... | 41 |
| Tabela 4 - Composição física, físico-química e química da fibra de sisal..... | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| ABS | Absorbância |
| AR | Açúcares Redutores |
| CCT | Centro de Ciências e Tecnologia |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CMCase | Carboximetilcelulases |
| CPATSA | Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido |
| CTAA | Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos |
| DNS | Dinitrosalicílico |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| F _c | Fator de conversão |
| FES | Fermentação em Estado sólido |
| LATECQ | Laboratório Avançado de Tecnologia Química |
| LEB | Laboratório de Engenharia Bioquímica |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| UAEQ | Unidade Acadêmica de Engenharia Química |
| U _{B.U.} | Umidade em Base Úmida |
| UFMG | Universidade Federal de Campina Grande |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1 - Objetivo geral..... | 14 |
| 1.2 - Objetivos específicos..... | 14 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 15 |
| 2.1 - Sisal (<i>Agave sisalana</i>)..... | 15 |
| 2.2 - Biomassa lignocelulósica..... | 18 |
| 2.3 - Enzimas celulolíticas..... | 21 |
| 2.4 - Gênero <i>Trichoderma</i> | 23 |
| 2.5 - Fermentação em estado sólido..... | 24 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 3.1 - Matéria Prima..... | 28 |
| 3.1.1 - Processamento da fibra do sisal..... | 28 |
| 3.2 - Caracterização física, físico-química e química da fibra de sisal..... | 29 |
| 3.2.1 - Granulometria..... | 29 |
| 3.2.2 - Massa específica aparente..... | 30 |
| 3.2.3 - Massa específica..... | 30 |
| 3.2.4 - Porosidade do leito..... | 31 |
| 3.2.5 - Umidade do substrato..... | 31 |
| 3.2.6 - Cinzas..... | 32 |
| 3.2.7 - pH..... | 32 |
| 3.2.8 - Açúcares redutores..... | 33 |
| 3.2.9 - Teor de Extrativos..... | 34 |
| 3.2.10 - Teor de Lignina Insolúvel..... | 34 |
| 3.2.11 - Teor de Holocelulose..... | 35 |
| 3.2.12 - Teor de Alfacelulose e Hemicelulose..... | 35 |
| 3.3 - Processo Fermentativo..... | 36 |
| 3.3.1 - Microrganismo..... | 36 |
| 3.3.2 - Propagação do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48..... | 36 |
| 3.3.3 - Inóculo do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48..... | 38 |
| 3.3.4 - Experimentos de Fermentação..... | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.5 - Extração das enzimas..... | 42 |
| 3.3.6 - Determinação da atividade enzimática..... | 43 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 45 |
| 4.1 - Caracterização física, físico-química e química da fibra de sisal..... | 45 |
| 4.2 - Processo Fermentativo..... | 48 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 55 |
| 6. PERSPECTIVAS..... | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |

1. INTRODUÇÃO

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, sendo 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 mercado de enzimas especiais (terapêuticas, enzimas para diagnóstico e enzimas para química quiral). As celulases e as amilases estão entre as principais enzimas de uso industrial no mundo, representando 22% desta demanda (POLITZER; BON, 2006).

A necessidade de se obter enzimas industriais de maneira economicamente viável determina a busca de matérias-primas de custo baixo e renováveis para o processo de produção das mesmas. Os resíduos agroindustriais que possuem na sua composição material lignocelulósico demonstram potencial de aplicação como meio de cultura para a produção de celulases (SILVA, 2008). Na maior parte dos trabalhos reportados na literatura, os materiais utilizados para a produção de celulases são de origem lignocelulósica ou celulósica pura (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Apesar da ampla utilização das celulases, o seu elevado custo tem tornado alguns processos onerosos. Estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de produzir essa enzima por meio de um processo de fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais, diminuindo assim o custo de produção da enzima (AMORIM, 2010).

Devido aos baixos níveis de água na fermentação em estado sólido, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam maior capacidade de crescimento em baixas quantidades de água livre, uma vez que se adequam ao meio e excretam grandes quantidades de enzimas nestas condições (AMORIM, 2010).

A estrutura dos materiais lignocelulósicos tem como principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

A fibra de sisal possui alto teor de celulose e é uma matéria-prima de baixo custo. Uma das formas de agregar valor a este material é utilizá-la na obtenção de enzimas, tais

como celulases, por meio da fermentação em estado sólido utilizando microrganismos como o agente metabolizador de açúcares e celulose. A fibra de sisal é material alternativo para a produção de celulases devido à sua alta disponibilidade, aliada ao fato de o Brasil ser o maior produtor mundial, levou a escolha desta fibra no presente trabalho, bem como, agregar valor a essa matéria-prima, por meio da produção de substâncias de interesse econômico.

1.1 - Objetivo geral

Estudar a produção de CMCase por meio de processo de fermentação em estado sólido da fibra de sisal, utilizando como agente da fermentação o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48.

1.2 - Objetivos específicos

- Observar por meio da caracterização física, físico-química e química da fibra de sisal a granulometria, massa específica aparente, massa específica, porosidade do leito formado a partir da fibra de sisal, umidade do substrato, cinzas, pH da suspensão, açúcares redutores, extrativos, lignina insolúvel, holocelulose, alfacelulose e hemicelulose;
- Avaliar o efeito do pH da suspensão, a umidade e a concentração de açúcares redutores na obtenção de CMCase, por meio de cinética de fermentação em estado sólido;
- Avaliar o efeito do teor de água na produção de enzimas celulolíticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - Sisal (*Agave sisalana*)

O sisal (*Agave sisalana* Perrine), originário da península de Yucatan (México), adaptou-se muito bem ao semiárido Nordeste, onde é cultivado em largas extensões (ABREU, 2010). Seu cultivo ocupa uma extensa área de solos pobres em nutrientes na região semiárida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, em áreas onde, não raro, é a única alternativa de cultivo com resultados econômicos satisfatórios (SANTOS *et al.*, 2010).

O híbrido 11648 é originário da África e foi introduzido no Brasil na década de 70, sendo resultante do cruzamento entre *Agave angustifolia* e *Agave amaniensis*. Comparado ao sisal comum, o híbrido 11648 tem a vantagem de ser mais produtivo e tolerante à seca, o que permite a colheita durante todo o ano. Por outro lado, é mais exigente em fertilidade do solo e possui folhas de menor comprimento, exigindo maior esforço para o desfibramento (SILVA *et al.*, 2007).

Em relação à denominação botânica, o sisal pertence à classe *Monocotiledônea*, série *Liliflórea*, família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea*, gênero *Agave*, espécie *Agave sisalana*. A denominação *Agave* dada ao gênero é derivada, apropriadamente, de agavos que, em grego, significa admirável, magnífico (SILVA; BELTRÃO, 1999).

De acordo com sua classificação taxonômica, o sisal pertence ao reino *Plantae*, filo *Magnoliophyta*, classe *Equisetopsida*, subclasse *Magnoliidae*, superordem *Lilianaes*, ordem *Asparagales*, família *Asparagaceae*, subfamília *Agavoideae*, gênero *Agave* e espécie *Agave sisalana* (Figura 1).

Figura 1 - Planta de sisal (*Agave sisalana*)



Silva e Coutinho (2006) afirmam que apenas 3 a 5% da massa das folhas dessa fibrosa são aproveitados, e que os resíduos do desfibramento são compostos, em média, por 15% de mucilagem ou polpa (formado pela cutícula e por tecido palissádico e parenquimatoso), 1% de bucha (fibras curtas) e 81% de suco ou seiva clorofilada.

A Região Nordeste se destaca na produção de sisal. Nessa região o cultivo das folhas da planta é feito de maneira muito simples. O corte é feito próximo ao tronco, em seguida é feito o desfibramento (Figura 2), processo em que se separa o resíduo das fibras. Após esta fase, as fibras são secas em varais e depois comercializadas.

Figura 2 - Desfibramento do sisal (*Agave sisalana*)



Do ponto de vista anatômico, as fibras extraídas do sisal se inserem no grupo de fibras denominadas estruturais, cuja função é dar sustentação e rigidez às folhas (LI; MAI; YE, 2000). São rígidas, apresentam superior resistência em comparação às demais fibras naturais, além de boa durabilidade (SAPUAN *et al.*, 2006).

As fibras são extraídas das folhas, que possuem de 8 a 10 cm de largura e de 150 a 200 cm de comprimento (MARTIN *et al.*, 2009). As fibras de sisal são constituídas de 70 a 78% de celulose, 10 a 13% de hemicelulose, 7 a 11% de lignina, 2% de pectina e ceras e 0 a 1% de cinzas (MARTIN *et al.*, 2009). Lima *et al.* (2013) caracterizou a composição lignocelulósica da fibra do sisal, proveniente do município de Nova Floresta - PB. Os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição lignocelulósica da fibra de sisal (*Agave sisalana*)

| Parâmetros analisados | Valor médio |
|------------------------------|--------------------|
| Umidade (%) | 5,70 |
| Cinzas (%) | 2,10 |
| Celulose alfa (%) | 48,80 |
| Celulose beta (%) | 4,00 |
| Celulose total (%) | 52,80 |
| Hemicelulose (%) | 19,30 |
| Holocelulose (%) | 72,1 |
| Lignina (%) | 13,50 |
| Extrativos (%) | 5,80 |

Fonte: Lima *et al.* (2013)

A fibra de sisal beneficiada é destinada principalmente à indústria de cordoaria (para confecção de cordéis, cordas, tapetes, capachos e outros), mas também pode ser utilizada na fabricação de pasta celulósica, empregada na confecção do papel kraft e de outros tipos de papeis finos (AGOPYAN *et al.*, 2005). É usada como fibra de reforço em compósitos com plásticos para aplicação automobilística, adição de reforço no cimento e concreto para aumento da resistência mecânica e redução do peso (SILVA *et al.*, 1999). Pode ser usada também na fabricação de fios agrícolas.

Uma pesquisa desenvolvida por Lima *et al.* (2013) usando fibra de sisal hidrolisada para produção de etanol obtiveram 92% de conversão de glicose em etanol, o que demonstra potencial de aplicabilidade do sisal em processos biotecnológicos.

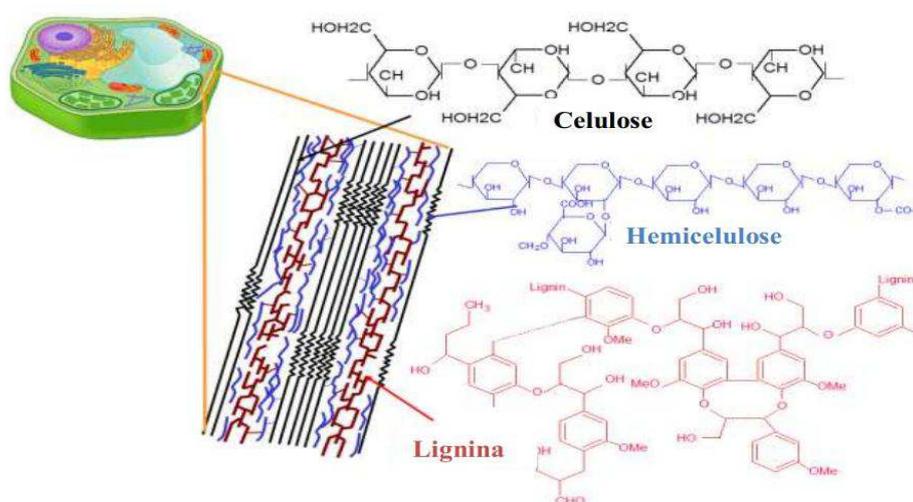
2.2 - Biomassa lignocelulósica

Os resíduos lignocelulósicos geralmente contêm de 30 a 45% de celulose, 25 a 30% de lignina, 25 a 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). A proporção de cada componente depende também da fonte a partir da qual o material foi extraído, além de ter influências de condições edafoclimáticas e tipo de solo (DING; HIMMEL, 2006).

Materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente de celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. A maior porção de carboidratos dos materiais lignocelulósicos é composta por polímeros de celulose e hemicelulose, com menor quantidade de outros açúcares. Denomina-se holocelulose a combinação de celulose e hemicelulose (SANTOS, 2008).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos de estruturas duras e fibrosas, compostas principalmente dos polissacarídeos celulose e hemicelulose (aproximadamente 70% da massa seca), intercalados por lignina, uma macromolécula composta de álcoois aromáticos. A lignina encontra-se fortemente unida aos polissacarídeos por ligações covalentes e hidrogênicas (NEUREITER *et al.*, 2002). A Figura 3 exibe a estrutura lignocelulósica.

Figura 3 - Estrutura lignocelulósica



Fonte: Zampieri (2011)

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; WEGENER, 1989).

Nas plantas, a celulose está associada a outro grupo de polímeros, como hemiceluloses, pectinas e ligninas, o que remete a designação de materiais lignocelulósicos (DESVAUX, 2005) e são considerados os recursos renováveis mais abundantes na natureza

(HAN *et al.*, 2004). A celulose tem sido considerada como um dos mais importantes objetos de estudo na história da ciência dos polímeros (ZUGENMAIER, 2008).

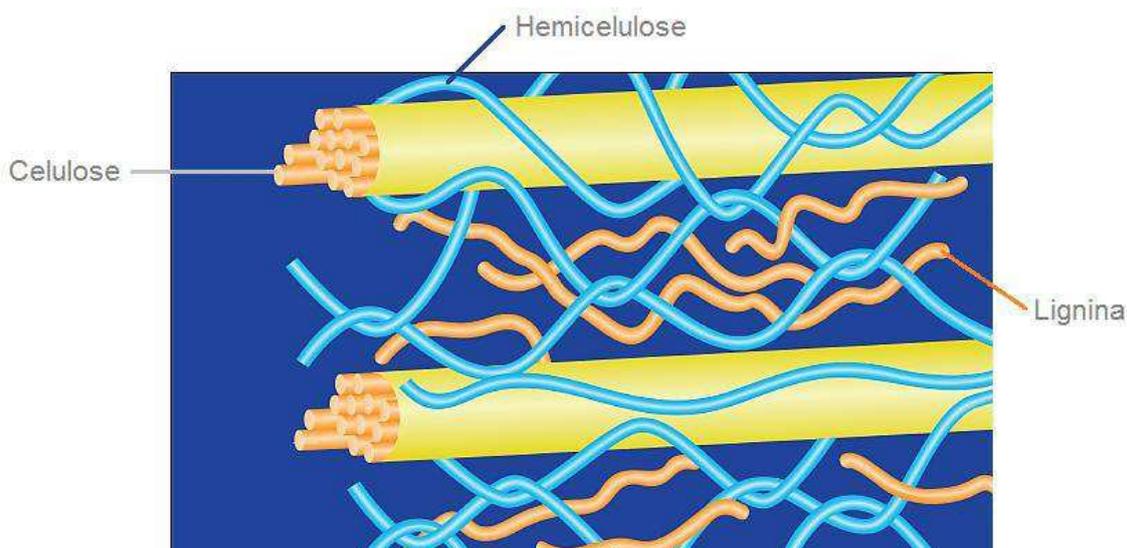
A hemicelulose é ligada fortemente à celulose por grupos de pontes de hidrogênio (RAVEN, 2001) e também por meio de ligações covalentes e não covalentes com lignina, celulose e outros polímeros essenciais à parede da célula (POLIZEI *et al.*, 2005). A xilana é um dos maiores constituintes das hemiceluloses nos materiais lignocelulósicos (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000).

No sisal, as hemiceluloses são predominantemente constituídas por xilanas, elas constituem cerca de 68% do total das hemiceluloses do sisal (MEGIATTO JÚNIOR *et al.*, 2007). Por outro lado 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. A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico (RABELO, 2007).

A presença da lignina na parede celular dos vegetais denota a importância de uma matriz rígida em torno das fibras de celulose/hemicelulose, assumindo, principalmente, funções de coesão e barreira frente à umidade (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010). À medida que ocorre o envelhecimento da planta, a quantidade de lignina tende a aumentar (RAVEN, 2001).

Na biomassa vegetal, as cadeias de celulose se associam às hemiceluloses para formar estruturas lineares de alta resistência conhecidas como microfibrilas. Camadas sobre camadas de microfibrilas compõem as fibras da parede celular das plantas. As cadeias celulósicas que fazem parte de regiões cristalinas e não cristalinas são rodeadas por hemiceluloses que se associam entrecruzando-se com a lignina, nas fibras lignocelulósicas (GANDINI, 2010) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema representativo da associação entre as estruturas de celulose, hemicelulose e lignina



Fonte: Lacerda (2012)

2.3 - Enzimas celulolíticas

A tecnologia enzimática é, atualmente, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis (BON, 2002).

Celulases é o nome genérico correspondente às enzimas presentes na biodegradação da celulose, polímero vegetal abundante na natureza. A aplicação das celulases abrange áreas como a produção de bebidas, alimentos, alimentação de animais, indústria têxtil e a hidrólise enzimática da celulose com o objetivo de se obter açúcares fermentáveis, utilizados para produção de biocombustíveis (SILVA, 2008). Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

As celulases são enzimas capazes de hidrolisar a ligação β -1,4-glicosídica da cadeia da celulose, que é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal. Os principais

obstáculos à exploração em potencial da celulase são rendimento, estabilidade, especificidade e custos de produção (Md. *et al.*, 2008).

O complexo enzimático celulolítico consiste de três classes de enzimas que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (1,4- β -D-glucanglucanohidrolase), exoglucanases (exo 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolase) e β -D-glucosidases ou celobiasas (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

As endoglucanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam aleatoriamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES; EGYHAZI; RECZEY, 2004).

A carboximetilcelulose é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas. As exoglucanases ou celobiohidrolases atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO; TAN, 2002).

As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose. Por isso é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico - as β - glucosidases (BOM; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

As β - glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose a glicose, reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA; BAKALOVA; KOLEV, 2002).

Carboidratos ou seus derivados são indutores de grande parte das enzimas celulolíticas. Por isso, a fonte de carbono utilizada é de grande importância na produção de enzimas. Altos rendimentos de celulases têm sido obtidos pela utilização de fontes de carbono contendo celulose (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

As celulases são produzidas por uma variedade de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Contudo, poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulases em quantidades suficientes para degradar a celulose cristalina (BHAT; BHAT, 1997).

A produção de celulases 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) os fungos ocupam papel fundamental na degradação de biopolímeros de celulose e hemiceluloses sendo por isso, essenciais para a produção de complexos enzimáticos.

Para Menezes (1997) os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas. As celulases fúngicas tem sido estudadas devido ao seu potencial biotecnológico (NG, 2004). Entre os produtores de celulases estão os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND *et al.*, 2001).

2.4 - Gênero *Trichoderma*

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

Conhecidos vulgarmente como bolores ou mofos, os fungos filamentosos produzem numerosos produtos metabólicos, alguns de grande interesse industrial, tais como: enzimas, álcoois, ácidos, pigmentos corantes, polissacarídeos, esteróis, substâncias antibióticas (penicilina, notatina, flavicina) e algumas bastantes complexas como a ergotina (CARVALHO, 1999).

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). *Trichoderma reesei* é economicamente um importante produtor de celulases e hemicelulases e também é usado para produção heteróloga de proteínas (KUBICEK; PENTTLILA, 1998).

De acordo com 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 fermentescível.

O complexo celulolítico extracelular do *Trichoderma reesei* é composto por 60 a 80% de celobiohidrolases ou exogluconases, 20 a 36% de endoglicanases e 1% de β -glucosidases, os quais atuam 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; VERMETTE, 2008).

2.5 - Fermentação em estado sólido

Pinto *et al.* (2006) definem as fermentações em estado sólido (FES) como sendo o processo em que há crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas da matriz sólida, onde a quantidade de líquido representa um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e o metabolismo dos microrganismos, mas não excede à máxima capacidade de ligação da água com a matriz.

A FES também apresenta as seguintes características (PINTO *et al.*, 2006):

- ✓ A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas;
- ✓ O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas;
- ✓ O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas aos do habitat natural;
- ✓ O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

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 Singhanian *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 vantagens ecológicas da fermentação em estado sólido refletem o fato de que os processos são conduzidos sem excesso de água livre, o que resulta em um consumo mínimo de água, uma baixa produção de água efluente e eliminação da necessidade do uso de agentes anti-espumantes (ALCÂNTARA, 2008). Outra vantagem da fermentação em estado sólido é que, em muitos casos, pode-se usar resíduos agrícolas como fonte de carbono e energia (PINTO *et al.*, 2006).

Embora a fermentação em estado sólido proporcione alta produtividade, alta concentração de produtos e necessite de pouco espaço e energia; tem como desvantagem a dificuldade no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Além disso, vários grupos microbianos não conseguem se desenvolver em baixos teores de umidade. Por isso são utilizados fungos filamentosos no processo, pois os mesmos adaptam-se bem a essa condição (PANDEY *et al.*, 1999).

A produtividade enzimática da fermentação em estado sólido, como todo processo biotecnológico, é definida pelo microrganismo e as condições de cultivo. Variáveis como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, pH, umidade, atividade de água e temperatura representam condições operacionais determinantes no processo de fermentação (SINGHANIAN *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; HOFER; LENZ, 2004).

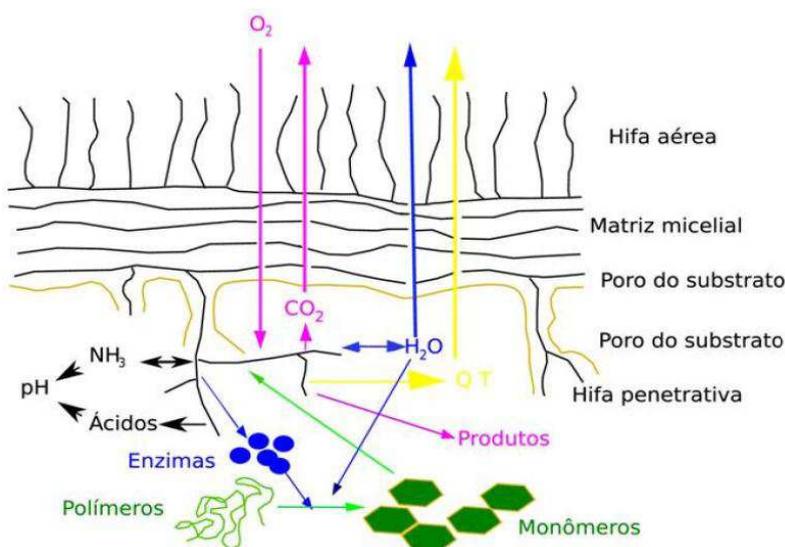
Robinson e Nigam (2003) ainda afirmam que nesses processos o teor de umidade varia entre 30 a 85% e a atividade de água típica vai de 0,40 a 0,90, mimetizando condições

encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é pouco provável.

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água destaca-se na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS; MOLIN, 2003). A água é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo (PANDEY, 2003).

Na FES, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre (MITCHELL; LONSANE, 1992). O substrato sólido não apenas fornece os nutrientes para os microrganismos, mas também serve de suporte para o crescimento destes (PANDEY, 2002). Aqueles materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária suplementação do meio (ROCHA, 2010). A Figura 5 ilustra o crescimento de um fungo filamentoso em meio sólido.

Figura 5 - Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos



Fonte: Holker e Lenz (2005)

Pode-se também incorporar soluções de nutrientes ao substrato sólido, visando adequá-lo melhor às condições nutricionais do microrganismo para a fermentação desejada, como no caso de enriquecimento protéico, no qual são utilizadas fontes de nitrogênio tais como amônia, uréia ou soluções sintéticas como o sulfato de amônia (ROCHA, 2010).

A principal fonte de carbono para fermentação microbiana é a glicose, bem como outros açúcares (sacarose e maltose), além de outros compostos orgânicos mais complexos, como por exemplo, amido e celulose (PELCZAR *et al.*, 1980). Para isso, é interessante que a glicose esteja disponível para o microrganismo no substrato em quantidade suficiente a proporcionar um crescimento inicial da população microbiana, mas não o bastante para impedir que o microrganismo seja capaz de metabolizar a fonte indutora, a celulose. Por outro lado, é importante que a fonte indutora não apresente um valor percentual acentuado de forma a inibir a excreção da enzima pelo microrganismo (AMORIM, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desta pesquisa foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química no Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande - PB.

3.1 - Matéria Prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho, como meio de cultivo no processo de fermentação em estado sólido para obtenção da enzima celulase, foi a fibra de sisal (*Agave sisalana*) (Figura 6) processada em desfibrador, cedida pela fazenda Montevidéu do município de Nova Floresta - PB.

Figura 6 - Fibra de sisal (*Agave sisalana*)



3.1.1 - Processamento da fibra do sisal

A fibra de sisal foi colocada em embalagem de vidro hermeticamente fechada e posteriormente foi moída em moinho de facas da marca TECNAL MARCONI MA 048, para determinação da granulometria e da biomassa que será utilizada como substrato no processo fermentativo. A fibra de sisal foi armazenada em embalagem hermeticamente fechada até o momento de ser utilizado. A Figura 7 ilustra o aspecto da fibra de sisal cortada e triturada.

Figura 7 - Aspecto da fibra de sisal cortada e triturada respectivamente



3.2 - Caracterização física, físico-química e química da fibra de sisal

A caracterização física, físico-química e química da fibra de sisal foi realizada avaliando-se a granulometria, massa específica aparente, massa específica, porosidade do leito, umidade do substrato, cinzas, pH da suspensão, açúcares redutores, extrativos, lignina insolúvel, holocelulose, alfacelulose e hemicelulose. A caracterização foi realizada conforme procedimentos descritos a seguir. As análises foram realizadas em triplicata.

As análises de extrativos, lignina insolúvel, holocelulose, alfacelulose e hemicelulose foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Morais *et al.*(2010), baseada nos procedimentos para análise de material lignocelulósico, documento 236 da EMBRAPA.

3.2.1 - Granulometria

O perfil granulométrico da fibra de sisal, foi determinado a partir de 50 g da fibra de sisal em uma balança analítica, os quais foram transferidos para um agitador de peneiras PRODUTEST na velocidade de agitação de 50 rpm por 13 min, em jogo constituído por sete peneiras da série Tyler, 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), 42 mesh (0,355 mm), 65 mesh (0,212 mm) e 115 mesh (0,125 mm). O material retido em cada peneira foi medido e os resultados expressos percentualmente em relação a massa da amostra analisada.

O cálculo do diâmetro médio da partícula D foi obtido utilizando a equação de Sauter apresentada por Pereira *et al.* (2009), em que Δx_i representa a fração de mássica retida sobre cada peneira e D_i o diâmetro médio de abertura das peneiras superior e inferior, por meio da utilização da Equação 1.

$$D = \frac{1}{\sum_i \frac{\Delta x_i}{D_i}} \quad (1)$$

3.2.2 - Massa específica aparente

A massa específica aparente do material foi determinada seguindo a metodologia descrita por Brasil (2005), na qual 100 g do material foram colocados em uma proveta de 500 mL, sem que houvesse compactação, para determinar o volume ocupado. O valor da massa específica aparente foi obtido seguindo a Equação 2.

$$\rho_{ap} = \frac{m}{V} \quad (2)$$

Em que:

ρ_{ap} - Massa específica aparente

m – Massa da amostra (g)

v - Volume ocupado (mL)

3.2.3 - Massa específica

A massa específica da fibra de sisal foi determinada a partir da relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra, por meio do deslocamento de um fluido de volume conhecido, que nesse caso foi o óleo de soja. Inicialmente colocou-se 10 mL de óleo de soja em uma proveta e mediu-se o volume ocupado (V_1), em seguida adicionou-se 2 g da fibra de sisal (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 massa específica foi determinada pela Equação 3.

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

Em que:

ρ - Massa específica

m_A - Massa da amostra (g)

V_1 - Volume ocupado (cm^3)

V_2 - Volume indicado na proveta (cm^3)

3.2.4 - Porosidade do leite

A porosidade do leite contendo fibra de sisal como substrato foi determinada seguindo a metodologia descrita por Keey (1991), como mostrado na Equação 4.

$$\zeta = 1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho} \quad (4)$$

Em que:

ζ - Porosidade do leite

ρ_{ap} - Massa específica aparente

ρ - Massa específica

3.2.5 - Umidade do substrato

A determinação da umidade do material foi realizado seguindo-se a metodologia descrita em Brasil (2005). Para análise de umidade mediu-se 3 gramas da amostra em cadinho de porcelana previamente seco e tarado. Os cadinhos foram colocados em estufa a 105 °C por 24 horas. Após a secagem, o material foi colocado em um dessecador, no qual permaneceu até

resfriamento total da amostra e, por fim, foi medida a massa da amostra seca. A umidade, em base úmida, foi determinada seguindo a Equação 5.

$$U_{B.U.} (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

$U_{B.U.}$ - Umidade em base úmida

m_i - Massa inicial da amostra (g)

m_f - Massa final da amostra (g)

3.2.6 - Cinzas

O teor de cinzas contidos na fibra de sisal foi determinado seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005). Cadinhos de porcelana vazios foram depositados em mufla e mantidos a 550 °C, durante 15 min. Depois foram mantidos em dessecador até atingir a temperatura ambiente e em seguida foram medidos vazios e com 3 g da amostra. Logo após a medição os cadinhos foram levados à mufla durante 5 h a 550 °C, até obter cinza clara. Foram então mantidos no dessecador até temperatura ambiente e novamente sua massa foi medida. O teor de cinzas foi calculado seguindo a Equação 6.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (6)$$

Em que:

m_i - Massa inicial da amostra (g)

m_f - Massa final da amostra (g)

3.2.7 - pH

Preparou-se uma suspensão com 20,0 mL de água destilada e 2,0 g da amostra. Após homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 min, depois o pH

foi mensurado em pHmetro, previamente calibrado com as soluções padrões de pH 4,0 e 7,0 (BRASIL, 2005).

3.2.8 - Açúcares redutores

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

Para o desenvolvimento da metodologia foi medida 1,0 g da amostra (m_A) em balança analítica a qual foi adicionada 20,0 mL de água destilada (V_A) de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração elaborada previamente, para que a concentração de açúcares redutores pudesse ser calculada com base no fator de conversão (F_C).

Depois de dissolver determinada quantidade de amostra em um volume definido de água, transferiu-se 1 mL para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. Em seguida os tubos foram levados para banho de água fervente por exatos 5 min. Após este intervalo, os tubos foram retirados do banho de água quente e colocados em banho de água fria por 3 min, até completo resfriamento. Em cada tubo foram adicionados 8 mL de água destilada e feita a leitura da absorbância imediatamente em espectrofotômetro a 540 nm, em solução branco, mas ao invés de 1 mL de extrato de açúcares, foi utilizado 1 mL de água destilada que foi o fluido utilizado na extração dos açúcares presentes na amostra a ser analisada. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância (ABS) em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução. Efetuaram-se os cálculos para expressar os resultados, seguindo a Equação 7.

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

Em que:

AR - Açúcares redutores

ABS - Absorbância

F_C - Fator de conversão

V_A - Volume de água (mL)

m_A - massa da amostra (g)

3.2.9 - Teor de Extrativos

Para a determinação do teor de extrativos foi empregado o método de extração em Soxhlet, sendo utilizados 6,0 g da amostra seca e 200 mL de uma mistura de ciclohexano e etanol na proporção de 1:1 (ciclohexano/etanol). As amostras foram adicionadas em um cartucho confeccionado com papel de filtro e colocadas no extrator Soxhlet. O material foi extraído durante um período de 6 horas. Após a extração, os cartuchos foram secos em estufa à temperatura de 105 °C até massa constante, por meio da diferença entre massa do conjunto recipiente/extrativos (MRE) e da massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente (MRRS), fazendo-se uma correção com relação ao teor de umidade (TU), calculou-se o teor de extrativos em % conforme as Equações 8 e 9.

$$\% \text{ Teor de Extrativos} = \frac{\text{MRE(g)} - \text{MRRS(g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (8)$$

$$\% \text{ Teor de Extrativos Corrigido} = \frac{\% \text{ Teor de Extrativos} \times (100 - \% \text{ TU})}{100} \quad (9)$$

3.2.10 - Teor de Lignina Insolúvel

Para a determinação de lignina de Klason, utilizou-se cerca de 1,0 g de amostra seca e extrativos. Esse material foi colocado em um almofariz e adicionou-se 17 mL de ácido sulfúrico 72%, previamente resfriado em geladeira a 10 °C a 15 °C. Após 15 min de agitação vigorosa com o pistilo, até não haver mais partículas visíveis não solubilizadas, a mistura permaneceu em repouso por um período de 24 horas para digestão. Depois de 24 horas de digestão, adicionou-se 306 mL de água destilada para o almofariz para diluir a solução de ácido sulfúrico a 4%. A mistura foi quantitativamente transferida para um balão de 1000 mL. O balão foi levado para uma manta aquecedora, conectada em um condensador, então o material ficou sob aquecimento e refluxo por 4 horas, contadas a partir do início da fervura.

Após o resfriamento o material foi filtrado em kitassato e seco em estufa a 105 °C até massa constante. O teor de lignina insolúvel (TLI) foi quantificado pelas Equações 10 e 11, com base na massa do funil limpo e seco (MF) e na massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa (MFL).

$$\% \text{ TLI} = \left(\frac{\text{MFL(g)} - \text{MF(g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \right) - \% \text{ Teor de Cinzas} \quad (10)$$

$$\% \text{ TLI corrigido} = \frac{\% \text{ TLI} \times [100 - (\% \text{ Teor de Extrativos} - \% \text{ TU})]}{100} \quad (11)$$

3.2.11 - Teor de Holocelulose

Para a determinação do teor de holocelulose foi adicionado em um Erlenmeyer de 500 mL 3,0 g da amostra, 120 mL de água destilada, 2,5 g de clorito de sódio (NaClO₂) e 1 mL de ácido acético concentrado. A mistura permaneceu sob agitação em agitador até que o clorito fosse dissolvido. O conjunto Erlenmeyer-reagente foi coberto com um Erlenmeyer de 25 mL e a mistura foi mantida sob agitação à temperatura de 75 °C por 1 hora. A mesma quantidade de reagentes foi adicionada ao Erlenmeyer a cada hora, totalizando um período de digestão de 3 h. O sistema foi resfriado, e depois filtrado a vácuo. O resíduo foi lavado com água destilada, e seco em estufa a 105 °C até massa constante e medido em balança analítica. O teor de holocelulose foi determinado pela diferença entre massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa (MFH) e da massa do funil limpo e seco (MF), podendo-se calcular o teor de holocelulose (TH%), conforme as fórmulas 12 e 13:

$$\% \text{ Teor de Holocelulose} = \frac{\text{MFH(g)} - \text{MF(g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (12)$$

$$\% \text{ TH corrigido} = \frac{\% \text{ TH} \times [100 - \% (\text{Teor de Extrativos} + \% \text{ TU})]}{100} \quad (13)$$

3.2.12 - Teor de Alfacelulose e Hemicelulose

Para 1,0 g de holocelulose seca adicionada a um almofariz, adicionou-se 15 mL de uma solução de NaOH a 17,5%. Após 2 min de contato entre a solução e a holocelulose,

iniciou-se a maceração do material por 8 min. Terminando esse tempo adicionou-se 40 mL de água destilada ao almofariz e então realizou-se a filtração do material que, em seguida, foi seco em estufa a 105 °C até massa constante. O teor de alfacelulose (TA) foi determinado por meio das fórmulas 14 e 15, com base na massa do funil limpo e seco (MF), na massa da amostra de holocelulose (MAH) e na massa do funil somada à massa de alfacelulose, após a secagem em estufa (MFA) e o teor de hemicelulose foi obtido a partir da diferença entre holocelulose e celulose, conforme a Equação 16.

$$\% \text{ Teor de Alfacelulose} = \frac{\text{MFA(g)} - \text{MF(g)}}{\text{MAH(g)}} \times 100 \quad (14)$$

$$\% \text{ TA corrigido} = \frac{(\% \text{ TH corrigido} \times \% \text{ TA})}{100} \quad (15)$$

$$\text{TheC corrigido} = \text{TH corrigido} - \text{TA corrigido} \quad (16)$$

3.3 - Processo Fermentativo

3.3.1 - Microrganismo

Foi utilizado o fungo lignocelulolítico *Trichoderma reesei* LCB 48, proveniente do 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 a 6 mm³, na presença água destilada, e estocados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/UAEQ/UFCG) a temperatura de 8 °C (CASTELLANI, 1939).

3.3.2 - Propagação do *Trichoderma reesei* LCB 48

A partir do tubo tipo Eppendorf contendo o fungo em água destilada foi realizado a primeira propagação. 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 observa-se na Tabela 2.

Tabela 2 - 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)

Os componentes presentes na Tabela 2 foram dissolvidos em água destilada. O meio formado foi autoclavado por 15 min a 120 °C em Erlenmeyer de 250 mL. Após resfriamento o meio básico estéril foi distribuído nas placas de Petri, após a solução de ágar solidificar o microrganismo foi inoculado.

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 8).

Figura 8 - Placa de petri com meio básico contendo o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48



A partir da propagação em placas de Petri, foi realizada uma segunda propagação em grãos de arroz como meio de cultivo, partindo dos esporos da primeira propagação. Este meio de cultura foi preparado segundo protocolo da EMBRAPA/CPATSA. Para o preparo dos grãos de arroz foi utilizado um béquer de 500 mL, no qual foi adicionado aproximadamente 125 g de grãos de arroz comercial e água destilada numa quantidade suficiente para cobrir os grãos de arroz. Deixaram-se os grãos de arroz imersos na água destilada por aproximadamente 30 min, e com auxílio de peneira foi retirado o excesso de água. Erlenmeyers de 250 mL, contendo 15 g de grãos de arroz previamente umedecidos foram autoclavados por 15 minutos a 120 °C. Após resfriamento os grãos de arroz esterilizados foram inoculados.

O grão de arroz foi usado como substrato devido o fungo crescer em uma superfície maior e que conseqüentemente aumentar sua esporulação.

3.3.3 - Inóculo do *Trichoderma reesei* LCB 48

Para preparo do inóculo, foi adicionado a cada placa de Petri com microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48, 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 estéril, 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. 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.

O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado adicionando-se 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3% (v/v) aos Erlenmeyers contendo grãos de arroz com esporos. Após agitação, os esporos foram transferidos para béquer estéril com auxílio de gaze e algodão estéril (autoclavados a 120 °C por 15 minutos) para a contagem e posteriormente ser incubado.

A quantificação da suspensão de esporos obtida foi feita por meio de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada, também conhecida como hemacitômetro e um microscópio óptico. Para a contagem de esporos, diluiu-se a suspensão do inóculo e promoveu-se a homogenização com uma vigorosa agitação. Colocou-se esta solução, com o auxílio de uma micropipeta estéril, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70% (v/v). Realizou-se a contagem dos esporos em microscópio óptico.

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.

A concentração de esporos do inóculo foi calculada seguinte a Equação 17 e o volume de suspensão a ser inoculada foi calculado por meio da Equação 18.

$$C_{\text{Esporos}} (\text{esporos/mL}) = \bar{E} \times 24 \times 10^4 \times F_D \quad (17)$$

$$V_{\text{Suspensão}} (\text{mL}) = \frac{C_{\text{Inóculo}} (\text{esporos/g}) \times m (\text{g})}{C_{\text{Esporos}} (\text{esporos/mL})} \quad (18)$$

Em que:

C_{Esporos} - Concentração de esporos na suspensão;

E - Média de Esporos contados na Câmara de Neubauer;

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

$C_{\text{Inóculo}}$ - Concentração de Inóculo desejada para a fermentação;

m - Massa de substrato utilizada.

3.3.4 - Experimentos de Fermentação

Nos testes as fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de polietileno de 250 mL contendo 15 g do substrato previamente umidificado. A umidade inicial do meio foi ajustada para 70, 80 e 90% (base úmida), pela adição de um volume definido de água destilada, que foi determinado por meio de um balanço de massa, seguindo a Equação 19, o qual leva em consideração que a densidade da água é igual a 1,00 g/cm³.

$$V_{AA} = m_{AA} = \frac{m_i (U_2 - U_1)}{(1 - U_2)} \quad (19)$$

Em que:

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

m_i - massa de meio a ser umidificado;

U_1 - umidade do meio;

U_2 - umidade do meio desejada;

Obs.: U_1 e U_2 expressos em valores decimais.

A suplementação do substrato foi realizada adicionando-se os meios de cultura básico que foi o utilizado por Mandels e Weber (MANDELS; WEBER, 1969). Para isso, as massas dos meios de cultura foram pesadas e diluídas no volume de água calculado pelo balanço de massa (Equação 19). Por fim, adicionou-se ao substrato a água destilada já com o suplemento básico de Mandels e Weber e homogeneizou-se completamente. O meio foi deixado em repouso por 30 min. A composição dos meios de cultura está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos meios de complementação usados para indução da atividade enzimática na fermentação em estado sólido por *Trichoderma reesei* LCB 48

| Componentes | Concentração (g/L) |
|---|---------------------------|
| Ureia | 0,30 |
| Peptona | 0,75 |
| Extrato de levedura | 0,25 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,40 |
| Minerais* | 2,70 |

(*) 2 g/L de KH₂PO₄; 0,30 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,40 g/L de CaCl₂.2H₂O; 1,40 mg/L de ZnSO₄; 5,00 mg/L de FeSO₄.7H₂O; 2,00 mg/L de CoCl₂.6H₂O; 1,60 mg/L de MnSO₄.5H₂O. Fonte: Mandels e Weber (1969)

Após os 30 min, 15 g do substrato foi colocado em Erlenmeyers de 250 mL, vedados com algodão envolvido com gaze e papel alumínio e em seguida autoclavados por 15 min a 120 °C a 1 atm.

Após resfriamento, o substrato foi inoculado com suspensão de esporos de *Trichoderma reesei* LCB 48. As suspensões foram ajustadas para conter 10⁷ esporos por massa de substrato. Os Erlenmeyers foram incubados em estufa a 28 °C (Figura 9), sendo esta a temperatura favorável ao desenvolvimento do microrganismo. Em intervalos regulares de 24 horas foram retiradas periodicamente as amostras do processo, até 474 horas de fermentação, determinando-se a umidade (base úmida), pH, açúcares redutores e atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase. Para cada amostragem um Erlenmeyer foi retirado da estufa, ou seja, a cada 24 horas um Erlenmeyer foi analisado, estando todos nas mesmas condições iniciais do processo. As análises realizadas ao longo das fermentações de umidade, pH e açúcares redutores seguiram as mesmas metodologias utilizadas na caracterização da fibra de sisal. A metodologia utilizada para determinar a atividade enzimática será descrita posteriormente, ainda neste tópico. Após 42 horas de fermentação a fibra de sisal estava coberta de esporos (Figura 10).

Figura 9 - Fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48



Figura 10 - Fibra de sisal coberta de esporos de *Trichoderma reesei* LCB 48 após 42 horas de fermentação em estado sólido



3.3.5 - Extração das enzimas

A extração do complexo enzimático foi realizada segundo o procedimento descrito por Portela (2011): 2,0 g do meio fermentado foi incubado com 15 mL de tampão citrato de sódio 50 mol/L, pH 4,8, na temperatura de 28 °C, velocidade de agitação de 150 rpm, por 30 min, em incubadora do tipo shake da marca MARCONI. A amostra foi filtrada em papel de filtro qualitativo e algodão, ambos estéreis (autoclavados a 120 °C por 15 minutos), para remoção

dos esporos. O extrato enzimático (Figura 11) foi utilizado para a determinação da atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase e açúcar redutor.

Figura 11 - Extrato enzimático da fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48



3.3.6 - 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 0,5 mL do extrato enzimático contendo 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 1% (m/v), preparada em solução de citrato de sódio 50 mol/L e pH 4,8, a uma temperatura de 50 °C por 30 minutos. Após esse tempo, foi colocado no tubo de ensaio 1 mL DNS para determinar a concentração de açúcares redutores conforme à metodologia de Miller (1959). Uma amostra em branco foi realizada para cada análise, empregando 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL da solução de carboximetilcelulose, colocou-se 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mol/L e pH 4,8. 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 μmol de glicose, por minuto, a 50 °C e, neste trabalho, a atividade enzimática foi expressa U/g de substrato úmido, a qual foi calculada seguindo a Equação 20.

$$CMCase(U/g) = \frac{AR_{Liberado} \times 10^6}{180 \times 30} = \frac{(AR_{Com\ CMC} - AR_{Sem\ CMC}) \times 10^6}{180 \times 30} \quad (20)$$

Nessa Equação, 10^6 é um fator de conversão que transforma as unidades de massa em micrograma (portanto, mol em micromol), 180 é a massa molar da glicose (g/mol), 30 é o tempo de reação em minutos, $AR_{Com\ CMC}$ é a leitura de açúcares redutores no tubo contendo o substrato, em que ocorreu reação enzimática e $AR_{Sem\ CMC}$ é a leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, com a qual não houve reação enzimática por não haver substrato.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Caracterização física, físico-química e química da fibra de sisal

A caracterização física, físico-química e química da fibra de sisal visou conhecer a sua composição, que são importantes na síntese das celulases como percentual de celulose e açúcares redutores, bem como, variáveis que afetam o processo de fermentação em estado sólido: pH, umidade e granulometria. Os resultados da caracterização estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição física, físico-química e química da fibra de sisal

| Parâmetros analisados | Fibra <i>in natura</i> |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Massa específica aparente (g/ml) | 0,30±0,01 |
| Massa específica (g/mL) | 1,33±0,00 |
| Porosidade | 0,22±0,04 |
| Umidade (b.u.) (%) | 4,12±0,28 |
| Cinzas (%) | 2,40±0,16 |
| pH | 4,34±0,08 |
| AR (%) | 0,32±0,04 |
| Extrativos (%) | 7,22±0,06 |
| Lignina Insolúvel (%) | 11,08±0,02 |
| Holocelulose (%) | 73,61±1,92 |
| Alfacelulose (%) | 58,40±0,94 |
| Hemicelulose (%) | 15,21±2,13 |

O teor de umidade corresponde à quantidade de água que o material contém. A umidade encontrada para a fibra de sisal foi de 4,12%, menor que a umidade encontrada por Medina (1959) que foi de 10,1%.

Para utilizar a fibra de sisal como substrato para produção de enzimas por FES, é necessário a adequação do teor de umidade, porque o *Trichoderma reesei* necessita de teores

mais elevados do que o encontrado (4,12%). Assim foi necessário a adição de água no substrato para o desenvolvimento do microrganismo.

Quanto ao teor de cinza da fibra de sisal, o valor encontrado foi de 2,40%. Este valor foi próximo ao encontrado por Lima *et al.* (2013) que caracterizou a fibra de sisal e encontrou valor de 2,10% o teor de cinza para o material e maior que o encontrado por Martin *et al.* (2009) que foi de 1,5%.

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. O valor de pH encontrado neste trabalho para o extrato aquoso da fibra de sisal foi de 4,34. Geralmente, os fungos preferem pH entre 4,5 e 5,0 (SANTOS *et al.*, 2005). Assim o pH do extrato aquoso da fibra de sisal pode vir a promover a produção de celulases sem necessidade do ajuste do pH.

A quantidade de açúcares redutores presente na fibra de sisal foi de 0,32%. Esta quantidade de açúcares foi suficiente para o crescimento inicial dos microrganismos. Lins (2012) encontrou valor de açúcares redutores de 0,21% no pedúnculo de caju usado na produção de celulase por fermentação em estado sólido.

A porcentagem de extrativos presentes na fibra de sisal (7,22%) é semelhante a porcentagem encontrada nas amostras de bagaço de caju lavado (7,60 %) (LINS, 2012).

O percentual de lignina encontrado para a fibra de sisal (11,08%) foi maior que o encontrado por Lima *et al.* (2013) que foi de 5,80% e maior que o encontrado por Medina (1954) que foi de 9,9% e semelhante o resultado obtido por Mwaikambo (2002) que foi de 11% e por Martin *et al.* (2009) que foi de 11,04%.

O percentual de carboidratos totais dos materiais lignocelulósicos é chamado de holocelulose. Neste trabalho, o valor de holocelulose obtido da fibra de sisal foi de 73,61%, próximo ao valor encontrado por Lima *et al.* (2013) que foi de 72,10% para a fibra de sisal.

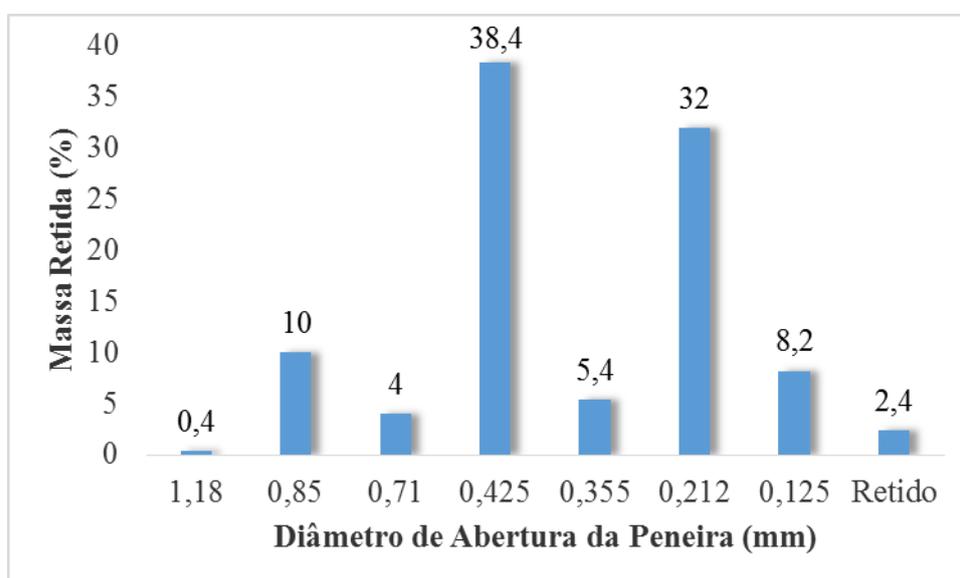
Avaliando o teor de alfacelulose encontrado para a fibra de sisal (58,40%) observa-se a presença da fonte indutora para produção de celulase. O valor encontrado neste trabalho foi bem superior ao encontrado por Lima *et al.* (2013) na fibra de sisal que foi de 48,80%. Esta diferença é devido ao teor de celulose variar de acordo com a idade da planta. O valor de aflu celulose encontrado neste trabalho é superior aos valores de celulose total de alguns resíduos industriais, como o bagaço de cana-de-açúcar com 46,62% (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*,

2011) e a palha de sorgo com 34% de celulose total (HERRERA *et al.*, 2004). Medina (1954) encontrou valor de celulose total de 65,8% para fibra de sisal, Martin (1998) encontrou valor de 75,20%.

Para hemicelulose da fibra de sisal foi obtido valor de 15,21%, o qual foi maior que o encontrado por Martin (1998) que foi de 13,87%, maior que o valor encontrado por Medina (1994) que foi de 12% e maior que o valor encontrado por Martin *et al.* (2009) que foi de 10,3%.

A Figura 12 ilustra a distribuição granulométrica da fibra de sisal após moagem mecânica.

Figura 12 - Perfis granulométricos da fibra de sisal moída



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).

A moagem mecânica do material lignocelulósico é classificada como um tratamento físico que aumenta a área de superfície exposta ao microrganismo. Como pode ser observado pela distribuição granulométrica, a fibra de sisal apresenta a maioria (70,4%) das suas partículas com um diâmetro de 0,425 e 0,212 mm, o que corresponde as peneiras de 35 e 65 mesh. Segundo Mitchell; Berovic e Krieger (2000), o tamanho ótimo da partícula deve

favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio, partículas com tamanho menores que 1 mm a 1 cm tem sido frequentemente usadas em FES.

Aplicando a equação de Sauter (Equação 1) obteve-se um diâmetro médio de 0,28 para partículas de fibra de sisal. Que foi o diâmetro do material utilizado no processo fermentativo.

O tamanho médio das partículas de resíduo do meio fermentativo deve ser obtido de forma que não se tenha nem partículas grandes nem pequenas. Partículas de tamanho reduzido promovem área superficial maior, e conseqüentemente maior grau de transformação. Porém, o processo necessita ter um diâmetro médio que permita a circulação de ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo (DEL BIANCHI *et al.*, 2001). Partículas maiores promovem mais espaço interpartículas, diminuindo o rendimento da absorção dos nutrientes pelos microrganismos (SOUZA *et al.*, 2007).

A massa específica aparente (0,30 g/mL) revela que os resíduos tendem a não se compactarem completamente, gerando os espaços vazios entre as partículas do substrato, suficientes para respiração e metabolismo por parte do microrganismo. A porosidade do leito formado pela fibra de sisal foi de 0,22, favorecendo a aeração do sistema, e disponibilizando o oxigênio necessário ao desenvolvimento do microrganismo.

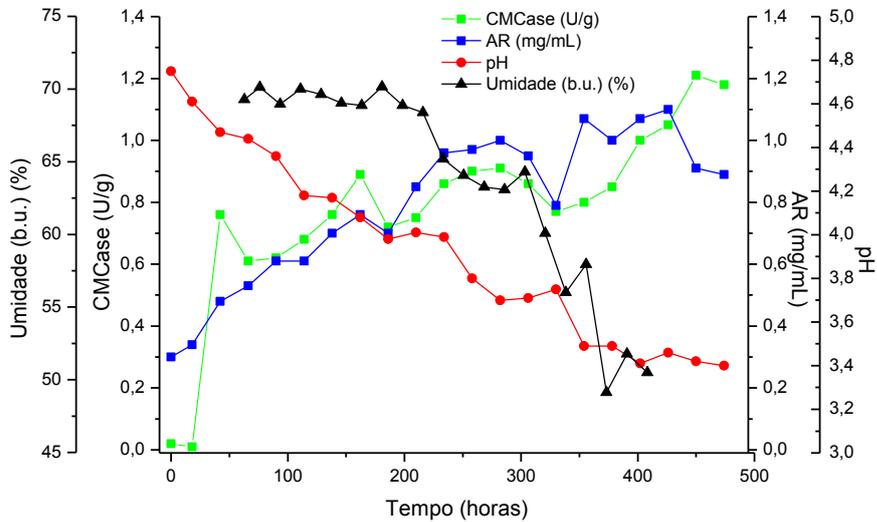
Partículas de tamanho reduzido oferecem maior área superficial ao ataque microbiana, mas ao mesmo tempo, tende a compactar-se facilmente. Neste caso, a respiração e aeração do sistema são dificultadas (SANTOS, 2007).

4.2 - Processo Fermentativo

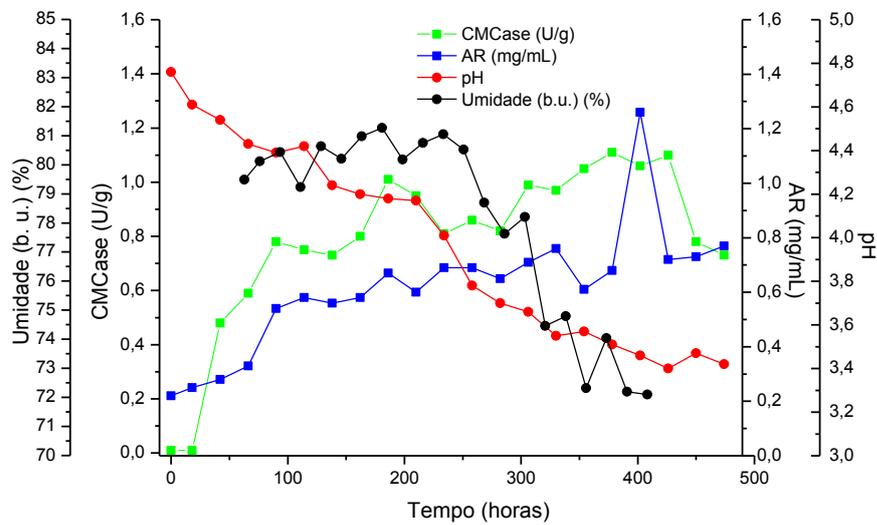
A Figura 13 (a) (b) e (c) apresenta o comportamento cinético da produção de enzima, bem como a avaliação do efeito da umidade inicial na fermentação, obtido para o substrato com 70, 80 e 90% de umidade e suplementação de acordo com o meio básico de Mandels e Weber.

Observa-se na Figura 13 o comportamento da umidade, pH, açúcares redutores e produção de CMC_{Case} em função do tempo de fermentação. Os dados de atividade no gráfico estão expressos em unidades de atividade por massa de substrato úmido (U/g).

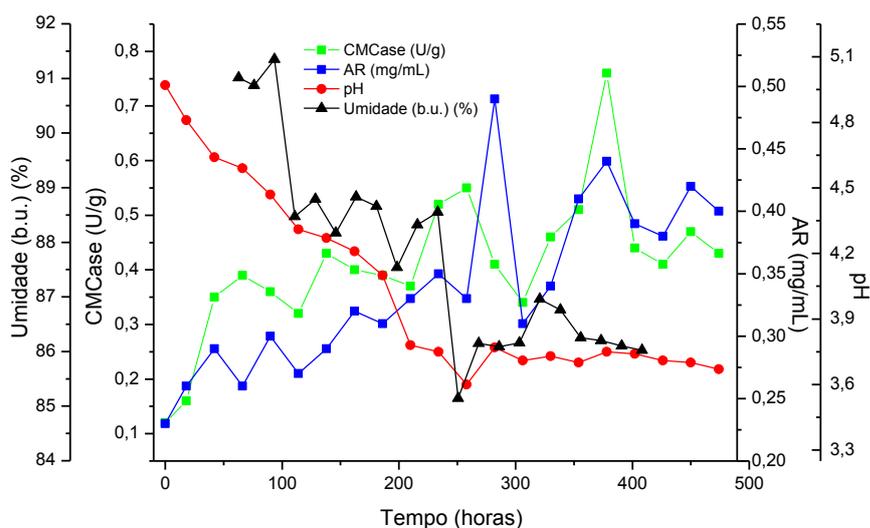
Figura 13 - Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* LCB 48 em fibra de sisal, na umidade (a) 70, (b) 80 e (c) 90% e fonte de suplementação de acordo com o meio básico de Mandels e Weber



(a)



(b)



(c)

A partir da Figura 13, observa-se a ocorrência de atividade enzimática já com 42 horas de cultivo em todos os ensaios, a partir de 42 horas de fermentação, observa-se uma produção crescente na atividade CMCCase em todos os ensaios.

O maior pico de atividade enzimática CMCCase utilizando 70% de umidade ocorre as 450 horas de fermentação, atingindo 1,21 U/g, utilizando 80% de umidade durante 378 horas de fermentação atinge um pico máximo de 1,11 U/g e utilizando a umidade de 90% o microrganismo encontrou condições desfavoráveis, a maior produção de CMCCase ocorreu as 378 horas de fermentação apresentando valor de apenas 0,76 U/g, valor inferior aos encontrados nos ensaios com 70 e 80% de umidade, sendo assim, a umidade de 90% torna-se um fator negativo para produção de CMCCase.

A Figura 13 ilustra a tendência de a fermentação ser conduzida por muito mais tempo, por não ter ocorrido redução da atividade enzimática.

Na fermentação com 80% de umidade há uma redução da atividade após 450 horas de fermentação. A Figura 13 (c) ilustra um pico de atividade em 258 horas de fermentação em substrato com 90% de umidade com valor de 0,55 U/g, seguido de um processo de inibição da enzima e um novo pico de atividade em 378 horas com valor de 0,76 U/g. Essa diminuição na atividade de celulase pode ser atribuída ao efeito cumulativo de oligossacarídeos

especialmente celobiose, um dímero de glicose, que é conhecido por inibir tanto endoglucanases como β -glucosidase (Md *et al.*, 2008).

O valor da atividade nos substratos com 70% de umidade (0,161 U/mL) e 80% de umidade (0,148 U/mL) foi maior que o valor encontrado por Lopes e Buzato (2008) ao estudar a produção de celulase com *Trichoderma* sp. T676 por fermentação em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar, os autores encontraram um valor de atividade enzimática de 0,042 U/mL em 72 horas de fermentação, este valor também é menor que o encontrado no substrato com 90% de umidade que foi de 0,101 U/mL.

O fungo *Trichoderma reesei* QMY-1 precisou de 14 dias de fermentação em estado sólido para atingir atividades de 6 - 6,5 UI de celulase total por grama (CHAHAL, 1985). Neste trabalho a maior atividade foi obtida em 19 dias de fermentação.

Amorim (2010) obteve uma atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase de 1,896 U/g em 18 horas de fermentação ao estudar a produção de celulases por *Trichoderma* sp. em bagaço de caju.

Lins (2012) trabalhando com o bagaço de caju lavado, utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48 como agente da fermentação, obteve uma atividade máxima de 0,71 U/g em 238 horas de fermentação. Assim, a fibra de sisal pode ser uma alternativa tão promissora quanto o bagaço do caju para a obtenção de celulases.

A produção de celulases por fermentação em estado sólido tem produzido extratos com atividade inferior a 1 U/mL. Rajeev *et al.* (2009) estudando a produção da enzima celulase utilizando *Trichoderma reesei* Rut C-30 em farelo de trigo quimicamente tratado como substrato, produziu níveis de atividade de endoglucanase de 0,45 U/mL.

Rodriguez-Zúñiga *et al.* (2011) obteve em 72 horas de fermentação CMCase de 0,3 U/g, utilizando *Aspergillus niger* em resíduo de cana-de-açúcar.

Basso *et al.* (2010) após 15 dias de fermentação obteve valor de 0,5 U/mL ao trabalhar com bagaço de cana-de-açúcar usando *Trichoderma reesei* QM9414.

O nível de umidade adequado na fermentação em estado sólido é variável e dependente da natureza do material, das necessidades do microrganismo e da expressão de metabólitos desejados (HOLKER *et al.*, 2004).

O teor de umidade do substrato exerce uma grande influência sobre o desempenho de fermentações, entretanto, seu controle durante o processo é muito difícil (LINS, 2012). Para Holker; Hofer e Lenz (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.

A Figura 13 (a) ilustra que a umidade permaneceu praticamente constante no substrato com 70% de umidade, em cerca de 70 a 68% durante 210 horas de fermentação, havendo uma redução após este tempo, tendo-se no final uma umidade de 50,49%. Portanto havia atividade de água suficiente para os microrganismos manterem-se vivos após 474 horas de fermentação.

Durante 258 horas de fermentação a umidade no substrato com 80% de umidade permanece praticamente constante, após este período ela começa a reduzir, tendo no final uma umidade de 72,1%. Na fermentação com 90% de umidade ocorre uma redução de 91,01 para 86,06% a umidade do meio.

Observa-se um comportamento semelhante da umidade em substrato com 70, 80 e 90% de umidade, em todos os ensaios ocorre uma redução no teor da umidade.

Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011) ao avaliar a produção enzimática de celulases pelo fungo filamentosos *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, em substrato com 90% bagaço de cana de açúcar e 10% farelo de soja utilizando os meios básico de cultura para suplementação de Mandels e Weber e umidade de 60, 70 e 80% obtiveram melhores resultados ao utilizar a umidade de 70 e 80%.

Ocorreu uma redução do pH de 4,75 para 3,4 durante a fermentação com 70% de umidade devido a produção de ácidos pelo *Trichoderma reesei* LCB 48.

Assim como no ensaio com 70% de umidade o valor do pH nos ensaios com 80 e 90% de umidade também decresce, devido a formação de ácidos orgânicos pelo microrganismo. A diminuição no pH pode ser atribuída, além da produção de ácidos orgânicos, à formação do íon hidrogênio durante o consumo da amônia que foi utilizada na suplementação de nutrientes com o sulfato de amônio (AMORIM, 2010).

O pH encontrou condições semelhantes para todos os ensaios estudados, ocorrendo uma redução do seu valor devido a produção de ácidos orgânicos. Mantendo-se numa faixa ideal para produção de enzimas com fungos filamentosos (ZHENG, SHETTY, 2000).

De acordo com Ferreira (2010), os valores ótimos de pH para produção de celulases é na faixa ácida (3,6 a 5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos (SINGH; BATRA e SOBTI, 2001). Para os resultados desse trabalho o valor do pH do meio está de acordo com os valores reportados por Ferreira (2010).

Em substrato com 70% de umidade observa-se dois picos de açúcares redutores em 354 e 402 horas de fermentação com valor de 1,07 mg/mL.

Durante a fermentação com 80% de umidade ocorre um aumento na concentração de açúcares redutores, às 402 horas observa-se um pico desta variável, isto pode significar que o microrganismo excretou enzima para hidrolisar a celulose e produzir açúcar.

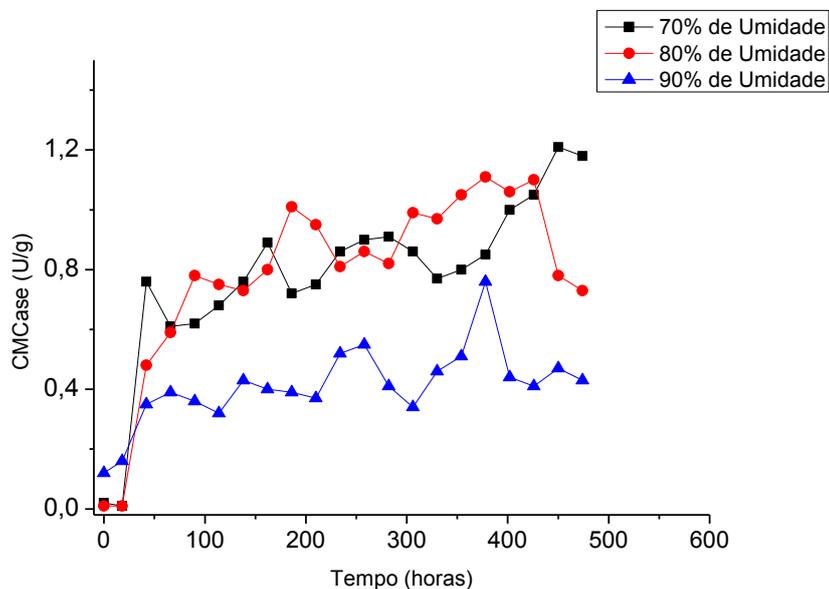
Como pode ser observado na Figura 13 (c) a maior produção de açúcar pelo microrganismo na fermentação com 90% de umidade ocorre durante 282 horas de fermentação com produção de 0,49 mg/mL de açúcares redutores.

O aumento na produção de açúcares redutores pelo microrganismo pode ser observado em todos os ensaios.

O acúmulo de açúcares redutores ocorre quando a velocidade de hidrólise de outros carboidratos, como por exemplo, a celulose, é maior que a velocidade de absorção de açúcares redutores por parte dos microrganismos (AMORIM, 2010).

Na Figura 14 tem-se a cinética das atividades expressas em CMC_{case} dos ensaios com 70, 80 e 90% de umidade.

Figura 14 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase dos ensaios com 70, 80 e 90% de umidade



Observando a Figura 14 é possível verificar que a maior atividade observada entre os ensaios realizados com 70, 80 e 90% de umidade foi o pico de 1,21 U/g em 450 horas de fermentação no substrato com 70% de umidade.

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.

5. CONCLUSÕES

- A caracterização físico-química da fibra de sisal demonstra ser matéria-prima viável como substrato para obtenção de celulasas por meio de fermentação em estado sólido, principalmente por apresentar um percentual de alfa-celulose satisfatório, que é uma substância indutora dessas enzimas.
- A maior produção de enzima celulase expressa em CMC_{Case} foi 1,21 U/g obtida em 450 horas de fermentação com 70% de umidade.
- A melhor umidade para produção de CMC_{Case} em fibra de sisal foi de 70%, sendo um fator positivo devido a redução do uso de água no processo fermentativo.

6. PERSPECTIVAS

Usar o sisal híbrido como substrato para produção de celulase;

Verificar o potencial do fungo causador da doença podridão do caule no sisal como produtor de metabólito secundário;

Utilizar outros produtos lignocelulósicos da *Agave sisalana* (pó de bateadeira e bagaço) para produção de celulase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABREU, K. C. L de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia**. Cruz das Almas: UFRB, 2010. 100p. (Tese de Doutorado).

ABUD, A. K. S.; SILVA, G. F.; NARAIN, N. Caracterização de resíduos de indústria de processamento de frutas visando à produção de pectinases por fermentação semi-sólida. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM). **Anais**. Curitiba, 2007.

AGOPYAN, V.; SAVASTANO JUNIOR, H.; JOHN, V. M.; CINCOTTO, M. A. Developments on vegetable fibre-cement based materials in São Paulo, Brazil: an overview. **Cement and Concrete Composites**. v. 27, p. 527-536, 2005.

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 do pedúnculo do caju: influência da atividade de água e fonte de nitrogênio**. Campina Grande: UFCG, 2008. 91p. (Dissertação de Mestrado).

AMORIM, B. C. **Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium Orcidentalle Lineu*) utilizando o microrganismo *Trichoderma sp.*** Campina grande: UFCG, 2010. 86p. (Dissertação de Mestrado).

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.

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

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

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. Enzimas industriais: política e gestão. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2002, Brasília. **Anais**. Brasília, DF, 2002.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol**. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. 1. ed. Rio de Janeiro. BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A.; COELHO, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.

BRASIL, M. D. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 1017 p. 2005.

- BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 724-732, 2010.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291–1296, 2002.
- CARVALHO, S. M. S. **Análise das Enzimas Amiolíticas Produzidas por Microrganismos Isolados do Tarubá**. Manaus: UFAM, 1999. (Dissertação de Mestrado).
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 225-226, 1939.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CHAHAL, D.S. Solidstate fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 205-210, 1985.
- COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por Aspergillus niger mutante 3T5B8**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1993. 198 p. (Tese de Doutorado).
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 2, 2001.
- DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 373-385, 2005.
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RECZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases*. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 11-21, 2004A
- DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006.
- EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - naturally occurring xylans structures, procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000.
- 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**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2010. 123 p. (Tese de Doutorado).
- 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**. Campinas: UNICAMP. 2009. 169 p. (Dissertação de Mestrado).
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 85-101, 2003.

- HAN, S. O.; CHO, H.; YUKAWA, H.; INUI, M.; DOI, R. H. Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (hemi)cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186 (13), p. 4218-4227, 2004.
- 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.
- HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratoryscale solidstate fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p.175-186, 2004.
- HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: 1995.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.
- KEEY, R. B. **Drying of loose and particulate materials**. New York: Hemisphere, 57 p., 1991.
- 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., p. 49-72, 1998.
- LACERDA, T. M. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais**. São Carlos: USP, 2012, 252p. (Tese de Doutorado).
- LIMA, C. S. S.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S.; LEÃO, D. A. S. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy**, v. 102, p. 254 – 259, 2013.
- LI, Y.; MAI, Y. W.; YE, L. Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. **Composites Science and Technology**, v. 60, p. 2037-2055, 2000.
- LINS, S. A. S. Produção de celulases por fermentação semi-sólida com bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48. Campina Grande: UFCG, 2012, 74p. (Dissertação de Mestrado).
- 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.

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

MARTIN, A. R. **Avaliação das propriedades de fibras de sisas de diferentes variedades visando aplicação em compósitos poliméricos.** São Carlos: UFSC, 1998. (Dissertação de Mestrado).

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

MEDINA, J. C. **O sisal.** Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. São Paulo, 286p. 1954.

MEDINA, J. C. **Plantas fibrosas da flora mundial.** Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, 913p. 1959.

MEGIATTO JÚNIOR, J. D.; HOAREAU, W.; GARDRAT, C.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Sisal Fibers: Surface chemical modification using reagent obtained from a renewable source; characterization of hemicellulose and lignin as model study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8576-8584, 2007.

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

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

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

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

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61 - 138, 2000.

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

MORAIS, J. P. S; ROSA, M. F. R.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para Análise Lignocelulósica.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

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

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41 (242), p. 28-33, 2007.

- MWAIKAMBO, L.Y.; ANSELL, M. P. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 84, p. 2222, 2002.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p.49-58, 2002.
- NG, T. B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, New York, v. 25, p. 1055-1073, 2004.
- OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.
- ORBERG, P. K. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Oregon: Oregon State University, 1981. (Dissertação de mestrado).
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v.77, p.149-162, 1999.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p. 81-84, 2003.
- PERCIVAL ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.
- PEREIRA, V. R.; COSTA, S. S.; ROCHA, S. C. S. Análise do crescimento da celulose microcristalina granulada em leito vibrofluidizado. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia/MG, **Anais...** Campus de Santa Mônica: UFU, 2009.
- PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 2107- 2111, 2002
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**. v. 74, p. 17-20, 2006.
- 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, 580 p. 2006.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, p. 577-591, 2005.
- PORTELA, D. G. **Estudo da produção de enzimas celulolíticas por fermentação semi-sólida do bagaço do caju deslignificado**. Iniciação Científica CNPq/UFCEG/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**. - Campinas: UNICAMP, 2007. 180 p. (Dissertação de Mestrado).

- RAJEEV, K. S.; REETA, R. S.; GINCY, M. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421 - 424, 2009.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Hoogan. 2001.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 197, 2003.
- ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 626-644, 1989.
- ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. Uberlândia: UFU, 2010. 161p. (Dissertação de Mestrado).
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.
- SANTOS, I. D. **Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica, contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado**. Brasília: UnB, 2008. (Dissertação de Mestrado).
- SANTOS, M. B.; SANTOS, C. Y.; ALMEIDA, M. A.; SANTOS, C. R. S.; SANT'ANNA, H. L. S.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, F.; MARTINS, G. N. Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n.1, p. 13-17, 2010.
- SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Natal: UFRN, 2007. 130p. (Tese de Doutorado).
- 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.
- SAPUAN, S. M.; LEENIE, A.; HARIMI, M.; BENG, Y. K. Mechanical properties of woven banana fibre reinforced epoxy composites. **Materials & Design**, v. 27, p. 689-693, 2006.
- SILVA, L. A. D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 119 p. (Dissertação de Mestrado).
- SILVA, O. R. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do Sisal**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2006.
- SILVA, O. R. R. F. da; SUINAGA, F. A.; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V. Cadeia produtiva. In: ANDRADE, W. **O sisal do Brasil**. cap. 3, p. 30-45, 2007.
- SILVA, O. R. R. da; BELTRÃO, N. E. de M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1999. 205p.
- 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.

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.

SOUZA, R. L. A.; AMORIM, B. C.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S. Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM). **Anais**. Curitiba, 2007.

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***. Campina Grande: UFCG, 2009. 108 p. (Dissertação de Mestrado).

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.

ZAMPIERI, D. **Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum***. Caxias do Sul: UCS, 2011. (Dissertação de Mestrado).

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

ZUGENMAIER, P. **Crystalline cellulose and derivatives**. New York: Springer, 285 p. 2008.