



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

AISLA RAYANNY BARBOSA DO NASCIMENTO

**DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO DA CASCA DO COCO VERDE
PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**SUMÉ-PB
2018**

AISLA RAYANNY BARBOSA DO NASCIMENTO

**DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO DA CASCA DO COCO VERDE
PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

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

Orientador: Professor Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes.

**SUMÉ-PB
2018**

N244d Nascimento, Aisla Rayanny Barbosa do.
Deslignificação do bagaço da casca do coco verde para aplicação em processos biotecnológicos. / Aisla Rayanny Barbosa do Nascimento. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

58 f.

Orientador: Professor Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes.

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

1. Procesos biotecnológicos. 2. Coco verde – deslignificação do bagaço da casca. 3. Fermentação em estado sólido. I. Título.

CDU: 60(043.1)

AISLA RAYANNY BARBOSA DO NASCIMENTO

DESIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO DA CASCA DO COCO VERDE PARA
APLICAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

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

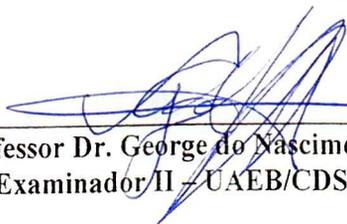
BANCA EXAMINADORA



Professor Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes.
Orientador – UAEB/CDSA/UFCG



Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.
Examinadora I – UAEB/CDSA/UFCG



Professor Dr. George do Nascimento Ribeiro.
Examinador II – UAEB/CDSA/UFCG

Trabalho aprovado em 30 de julho de 2018.

A Maria Ivoneide (In memorian) minha inesquecível mãe e Adomauro meu pai, por tudo que fizeram e fazem por mim, às minhas irmãs Ayslanny e Ana Caroliny, e meu namorado Rhaman Bento. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Para realizarmos nossos sonhos e chegarmos à vitória precisamos enfrentar grandes obstáculos, e quando temos por perto pessoas que ajudaram para que a realização dos sonhos tornarem-se possível, os desafios se tornam bem menores.

Meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente à DEUS por ser a luz da minha vida, o meu escudo, a minha fortaleza e ter me dado sabedoria e força nos momentos difíceis, guiando sempre o meu caminho.

À minha amada mãe Maria Ivoneide (In Memoriam) que foi o início de tudo, que é foi meu porto seguro e exemplo de força e honestidade, todo meu amor e gratidão, sempre sonhou com esse momento e essa conquista é toda dela.

Ao meu pai Adomauro por sempre proporcionar a educação que não pôde ter, sempre acreditando que meus objetivos seriam alcançados e apoiando-me nos momentos difíceis com paciência, dedicação e muito amor.

Às minhas irmãs Ayslanny e Ana Caroliny por apesar todos nossos atritos nunca desistem de mim, nossos laços serão eternos. Também à Larissa e Iohrana por toda irmandade e amizade apesar o tempo corrido e a distância.

Ao meu amado namorado Rhaman Bento por sempre ser fonte de incentivo, amor, companheirismo e paciência, obrigada por ter acreditado em mim, ter vivido comigo cada momento de alegria e dificuldade. Toda minha gratidão por me fazer acreditar que tudo daria certo e por ser incondicionalmente meu maior incentivador. Bem como, aos meus sogros Urbanita e Juarez, cunhada Ana Gilda e Tia postíça Vera por sempre me acolherem como família, se preocupando e sendo presentes nos felizes e triste momentos, dando conselhos e incentivando a nunca desistir.

Aos meus familiares, em especial meus avós, Maria Helena Barbosa, Israel Leopoldo, Maria José (In memoriam) e Heleno por todo amor e carinho e preocupação de sempre. Também aos queridos e presentes Gilvaneide, Maria da Paz, Netinha, Neginha, Verônica e Antônio, também agradeço aos demais.

Ao Professor e orientador Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes, obrigada pela oportunidade de conhecê-lo e por sua orientação, competência, sabedoria, confiança e apoio constante em todos os momentos na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho e ao prof Dr. George Ribeiro Nascimento por tão gentilmente aceitarem participar da banca de defesa deste trabalho de conclusão.

Aos amigos que a universidade me presenteou Darlyson Guimarães, André Junior, Pedro Jordan (In memoriam), Rodolfo Inácio, Ana Carla Fonseca, Renato França, Aparecida Yasmim, Livia Malta, Andreia Cabreira, Elielson Barros, Eder Nascimento, Jéssica Moreira, Mayk Albuquerque, Neto Lino, Élide Martins, Laís Vaz, Karol Borges e Danieli Silva pelas

diversas contribuições. Vocês são parte dessa história, seja na sala de aula ou na praça jogando conversa fora.

Aos meus amigos-irmãos Monique Ellen, Rickson Riccelli e Daniel Guimarães por toda amizade mesmo a distância, desde a infância e adolescência.

À Jaqueline Siqueira pelas contribuições e ajudas na realização deste trabalho.

À Maysa Bernardino e Suelen Lins pelos laços de irmandade.

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

À todos dos Laboratórios de Microbiologia e Química pela ajuda e local para realização deste trabalho, bem como o porteiro Cristiano por toda prontidão e amizade.

Enfim, a todos que contribuíram e me apoiaram, de forma direta ou indireta, na realização desse trabalho, meu muitíssimo obrigada.

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

(Anatole France)

RESUMO

A produção de enzimas por processos fermentativos apresenta-se como grande área de estudo da biotecnologia. A aplicação da fermentação semi-sólida para este fim tem recebido atenção especial, principalmente aquelas envolvidas na degradação de macromoléculas vegetais complexas. Dentre estas, a casca do coco verde surge como uma matéria-prima que apresenta características interessantes, como o baixo custo e a composição, o que torna possível o uso como substrato para a obtenção de enzimas celulolíticas. Um dos fatores que pode atrapalhar este processo é a grande quantidade de lignina presente na constituição da casca do coco que pode ocasionar uma limitação no crescimento do microrganismo utilizado. Com isso, objetivou-se avaliar a redução no teor de lignina presente na estrutura dessa biomassa por meio do pré-tratamento pelo método hidrotérmico e alcalino (NaOH - 3%), para posterior aplicação na produção de enzimas. A temperatura de operação foi de 120°C e os tempos de incubação foram de 60, 120 e 180 minutos. Para a caracterização da casca do coco (ou do substrato) foram determinadas as frações de lignina, extrativos e umidade da biomassa *in natura* e após o pré-tratamento. Os materiais *in natura* e pré-tratados foram incubados a 30°C para produção de celulase (CMCase) por meio da fermentação em estado sólido utilizando um isolado fúngico, denominado F1C3, que foi obtido na fase termofílica de um processo de compostagem. A aplicação do pré-tratamento hidrotérmico não causou grandes alterações na composição do material, porém a aplicação do pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio a 3% promoveu a redução do teor de lignina de 41,79 para 12,91%, no tempo de 120 minutos e temperatura de 120 °C. E apesar do bagaço de coco apresentar altas concentrações de celulose e da remoção de lignina conseguida, não foi verificada a produção de enzima celulase expressa em CMCase pelo Fungo F1C3.

PALAVRAS-CHAVE: Pré-tratamento. Resíduo lignocelulósico. Fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

The production of enzymes by fermentative processes presents itself as a large area of study of biotechnology. The application of semi-solid fermentation for this purpose has received special attention, especially those involved in the degradation of complex plant macromolecules. Among these, the green coconut shell appears as a raw material that presents interesting characteristics, such as the low cost and the composition, which makes possible the use as a substrate for obtaining cellulolytic enzymes. One of the factors that can disrupt this process is the large amount of lignin present in coconut husk constitution that can cause a limitation in the growth of the microorganism used. The objective of this study was to evaluate the reduction of lignin content in the structure of this biomass by hydrothermal and alkaline pretreatment (NaOH - 3%), for later application in the production of enzymes. The operating temperature was 120°C and the incubation times were 60, 120 and 180 minutes. For characterization of coconut shell (or substrate) the lignin fractions, extractives and moisture of the natural biomass were determined and after pretreatment. The in natura and pre-treated materials were incubated at 30°C for cellulase production (CMCase) by solid state fermentation using a fungal isolate, called F1C3, which was obtained in the thermophilic phase of a composting process. The application of the hydrothermal pretreatment did not cause major changes in the composition of the material, but the application of alkaline pretreatment with 3% sodium hydroxide promoted the reduction of the lignin content from 41.79 to 12.91% in time of 120 minutes and a temperature of 120 ° C. And although the coconut bagasse presented high concentrations of cellulose and the obtained lignin removal, the production of cellulase enzyme expressed in CMCase by Fungi F1C3 was not verified.

KEYWORDS: Pretreatment. Lignocellulosic residue. Solid state fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das extremidades não redutora e redutora da molécula de celulose. -----	18
Figura 2 - Ação das celulasas sobre a molécula de celulose -----	18
Figura 3 - Representação da atividade das celulasas celobiohidrolase, endo- β -1,4-glicanase e β -glicosidade.-----	19
Figura 4 - Estrutura Lignocelulósica da biomassa vegetal-----	22
Figura 5 - Estrutura da celulose -----	22
Figura 6 - Modelo estrutural de microfibrila de celulose -----	23
Figura 7 - Estrutura parcial da hemicelulose-----	24
Figura 8 - Estruturas monossacarídicas das hemiceluloses. -----	25
Figura 9 - Alcoóis precursores da lignina-----	26
Figura 10 - Representação esquemática da molécula de lignina -----	27
Figura 11 - Estrutura do coco em um corte longitudinal -----	28
Figura 12 - Alterações estruturais do complexo celulose, hemicelulose, lignina determinadas pelo pré-tratamento -----	30
Figura 13 - Sequência da preparação do mesocarpo de coco verde -----	36
Figura 14 - Etapas do processo de fermentação em estado sólido (FES)-----	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos produtores de celulases e respectivos substratos.....	34
Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço coco verde in natura, lavado, seco.	44
Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço coco verde após pré-tratamento hidrotérmico fixando dois tempos	45
Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço coco verde após pré-tratamento alcalino fixando três tempos.....	46

LISTA DE FOTOS

Foto 1 - Conjunto utilizado para determinação do teor de extrativos	37
Foto 2 - Almofariz e pistilo utilizados na determinação do teor de lignina	39
Foto 3 - Recipientes com bagaço de coco pré-tratado e in natura	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μmol	Micromol
ADE	Água destilada esterilizada
Atm	Atmosfera
BDA	Batata-ágar-dextrose
CBH	Celobiohidrolase
CBH I	Celobiohidrolase I
CBH II	Celobiohidrolase II
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Sumiárido
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
FIC3	Fungo 1 da coleta 3
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
g	Gramas
IN	In natura
L	Litro
M	Metro
m/v	Massa/volume
MA	Massa da amostra
MAU	Massa do recipiente/ amostra úmida
MF	Massa do papel filtro seco
MFL	Massa papel filtro somado a lignina
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MR	Massa recipiente
MRAS	Massa recipiente / amostra seca
MRE	Massa recipiente/ extrativo
MRRS	Massa recipiente resíduos de solvente
Nm	Nanômetro
°brix	Sólido solúveis
°C	Graus Celsius
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PTA	Pré-tratamento alcalino
PTH	Pré-tratamento hidrotérmico
Rpm	Rotação por minuto
TE%	Teor de extrativos
TLI	Teor de lignina solúvel
TU%	Teor de umidade
UAEB	Unidade acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos
UFCC	Universidade Federal de Campina Grande
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E SUA PRODUÇÃO	17
3.2. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	21
3.2.1 Celulose	22
3.2.2 Hemicelulose	24
3.2.3 Lignina	25
3.3 CARACTERÍSTICAS DO FRUTO DO COQUEIRO(COCOS NUCIFERA L.)	27
3.4. TRATAMENTO DA BIOMASSA PARA REMOÇÃO DE LIGNINA.....	29
3.4.1 Pré-Tratamento Hidrotérmico	31
3.4.2 Pré-Tratamento Alcalino com Hidróxido de Sódio	32
3.5. FEMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	32
4 METODOLOGIA	35
4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	35
4.2 MATÉRIA-PRIMA.....	35
4.2.1 Preparação do Mesocarpo de Coco Verde Triturado	35
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO MESOCARPO DO COCO VERDE	36
4.3.1 Umidade	36
4.3.2 Extrativos	37
4.3.3 Lignina	38
4.4 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO.....	39
4.4.1 Pré-Tratamento Hidrotérmico	40
4.4.2 Pré-Tratamento Com Hidróxido De Sódio (NaOH)	40
4.5PRODUÇÃO DAS CELULASES.....	40
4.5.1 Microrganismos	40
4.5.1.1 <i>Repique dos microrganismos</i>	40
4.5.2 Processo Fermentativo	41
4.5.2.1 <i>Preparação do sistema de cultivo</i>	41
4.5.2.2 <i>Inóculo</i>	41
4.5.2.3 <i>Incubação</i>	41
4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	42
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MESOCARPO DO COCO VERDE <i>IN NATURA</i>	44
5.3 ANÁLISE ENZIMÁTICA DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO MESOCARPO DO COCO VERDE	48
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O coqueiro é considerado uma planta que apresenta funcionalidades múltiplas e encontra-se difundida em praticamente todos os continentes, sendo que a maioria dos países que a cultivam utilizam-na para produção de frutos com os objetivos de explorarem comercialmente a venda de óleo e de coco seco desidratado (MARTINS, 2014).

No Brasil, o coqueiro é cultivado com a finalidade de produzir frutos destinados à agroindústria, principalmente, para produção de coco ralado e leite de coco, além da água de coco. O país é o quarto maior produtor de coco verde, com uma produção anual de quase três bilhões de frutos (MARTINS, 2014), e um dos motivos para esses resultados são as condições climáticas que favorecem a adaptação e o desenvolvimento para a cultura.

O Nordeste é a região com maior produção e é responsável por cerca de 80,7% da área plantada e 68,9% da produção do país, segundo o órgão fiscalizador (MARTINS, 2014; SOUZA et al., 2009; EMBRAPA, 2010). No entanto, em função da alta rentabilidade financeira e ao crescente consumo da água de coco, normalmente associado à qualidade de vida e à saúde, e também à boa aceitação no mercado, tem havido um grande interesse entre os produtores pelo cultivo e manejo do coco verde, o que pode gerar aumentos significativos na produção anual.

Devido a este aumento do consumo da água do coco verde, grandes quantidades de rejeitos têm sido geradas. O bagaço do coco colabora para a redução da vida útil dos aterros sanitários, trazendo risco ao ambiente e também à saúde da população, já que, demora cerca de 10 a 12 anos para decompor-se na natureza (SANTOS; AMICO; SYDENSTRICKER, 2006). A utilização das fibras vegetais é uma boa alternativa para a diminuição da quantidade de resíduos no ambiente, devido à ampla aplicabilidade, por ser um material renovável, biodegradável e de baixo custo (TAKAHASHI, 2009; (MONTEIRO; TERRONES; D'ALMEIDA, 2008).

As fibras que compõem o coco são materiais lignocelulósicos, sendo obtidas tanto no mesocarpo como também no epicarpo (ESMERALDO, 2006). As fibras do coco verde são compostas por polímeros de carboidratos complexos, composto basicamente por celulose $(C_6H_{10}O_5)_x$, hemicelulose $(C_5H_8O_4)_m$ e lignina $(C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7})_n$, totalizando 90% da massa seca, sendo o restante, 10% correspondente aos extrativos e às cinzas (BALAT, 2011). A presença da lignina representa a principal dificuldade para o processo de conversão da biomassa, já que a estrutura da lignina se apresenta como uma molécula com a capacidade de

fornecer rigidez e atuar como uma barreira natural de resistência a agressão microbiana, (VÁSQUEZ et al., 2007). Tendo em vista essa característica da lignina, antes da realização de qualquer bioprocessos faz-se indispensável o uso de um tratamento inicial para remover este constituinte e reduzir a cristalinidade da estrutura celulósica, auxiliando os resultados esperados.

Dentre os bioprocessos que utilizam resíduos lignocelulósicos, a produção de enzimas encontra-se em grande ascensão no campo de estudos da biotecnologia. Com características particulares por ter alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade, as enzimas são denominadas de biocatalisadores proteicos (PEREIRA Jr. et al., 2008).

Dentre muitas enzimas, as celulasas vêm se destacando nos setores alimentício, farmacêutico, têxtil, celulose e papel, na produção de detergentes e no tratamento de efluentes e resíduos, além da produção de biocombustíveis, como o bioetanol. Mesmo com a vasta utilização das celulasas, o alto custo de produção tem tornado alguns processos dispendiosos. Neste sentido, estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de diminuir os custos de produção da enzima através de processo fermentativo semi sólido em resíduos agroindustriais (AMORIM, 2010).

Devido à larga disponibilidade de resíduos agroindustriais do coco na região Nordeste e à possibilidade de agregar valor a tais resíduos, com significativa redução do impacto ambiental causado pelo acúmulo do resíduo do coco verde, propõe-se nesse trabalho o uso do pré-tratamento alcalino do bagaço do mesocarpo do coco verde para sua posterior utilização como substrato para a obtenção de enzimas celulasas para degradação de materiais lignocelulósicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar processos de deslignificação aplicados ao mesocarpo de coco verde para sua posterior aplicação como substrato na produção de enzimas celulases por meio de fermentação em estado sólido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a umidade, extrativos, lignina, pH e °brix, antes e depois do pré-tratamento;
- Avaliar o efeito do tempo de incubação dos pré-tratamentos alcalino (NaOH) e hidrotérmico;
- Realizar testes fermentativos para avaliar a aplicabilidade do material pré-tratado como substrato na obtenção da enzima celulase (CMCase).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E SUA PRODUÇÃO

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

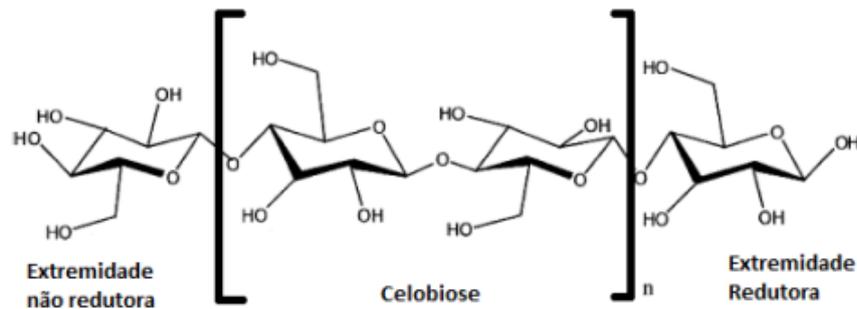
As celulasas são enzimas com a capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, como celobiose e glicose (DILLON, 2004). Segundo os autores Sun e Cheng (2002), as celulasas estão divididas em três grandes grupos: a) endoglicanases, b) exoglucanases e c) β -glucosidases.

As endoglicanases possuem a função de hidrolisar aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares, oligossacarídeos e, conseqüentemente, e novas cadeias laterais (LYND et al., 2002). Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celulosas modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose (CMC) (MARTINS, 2005) que é o substrato preferencialmente empregado na determinação da atividade das endoglicanases (CAO e TAN, 2002). Além disso, também atuam na rápida solubilização do polímero celulósico, reduzindo o grau de polimerização da molécula. Tal processo ocorre devido à fragmentação da cadeia polimérica em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES; EGYHÁZI; RÉCZEY, 2004). As regiões que detêm menor organização estrutural são facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações intermoleculares tão fortes como pontes de hidrogênio, quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, à uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (MARTINS, 2005).

As celobiohidrolases (CBH) e as glucanohidrolases constituem o grupo das enzimas denominadas exoglucanases (LYND et al., 2002). Essas enzimas atuam nas extremidades redutoras (CBH I) e nas extremidades não redutoras (CBH II) da cadeia de celulose, produzindo celobiose (OYEKOLA et al., 2007) (Figura 1). As celobiohidrolases são enzimas que não atuam sobre celulose solúvel por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes como carboximetílico (CMC). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Assim, ensaios de atividade sobre CMC são característicos para endoglicanases, enquanto que

a atividade contra celulose microcristalina caracteriza as celobiohidrolases, tornando possível a diferenciação entre as enzimas (MARTINS, 2005).

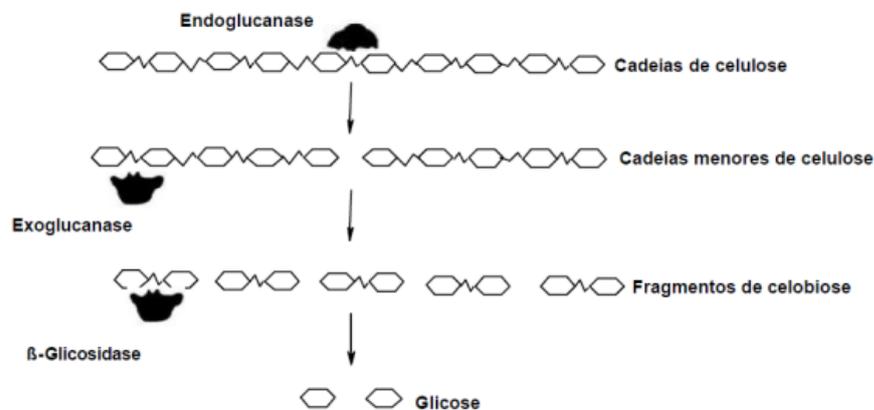
Figura 1 - Representação das extremidades não redutora e redutora da molécula de celulose.



Fonte: ZHANG & LYND, 2004

As β -glicosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de modificar a celobiose gerada pelas endoglicanases e celobiohidrolases em glicose. Precisamente falando, β -glicosidases agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficácia da hidrólise da celulose e remoção da celobiose do meio reacional (MEDVE, 1997). A atividade das β -glicosidases pode ser determinada usando celobiose, a qual não é hidrolisada por endoglicanases ou exoglicanases, visto na Figura 2 (GHOSE, 1987).

Figura 2 - Ação das celulases sobre a molécula de celulose

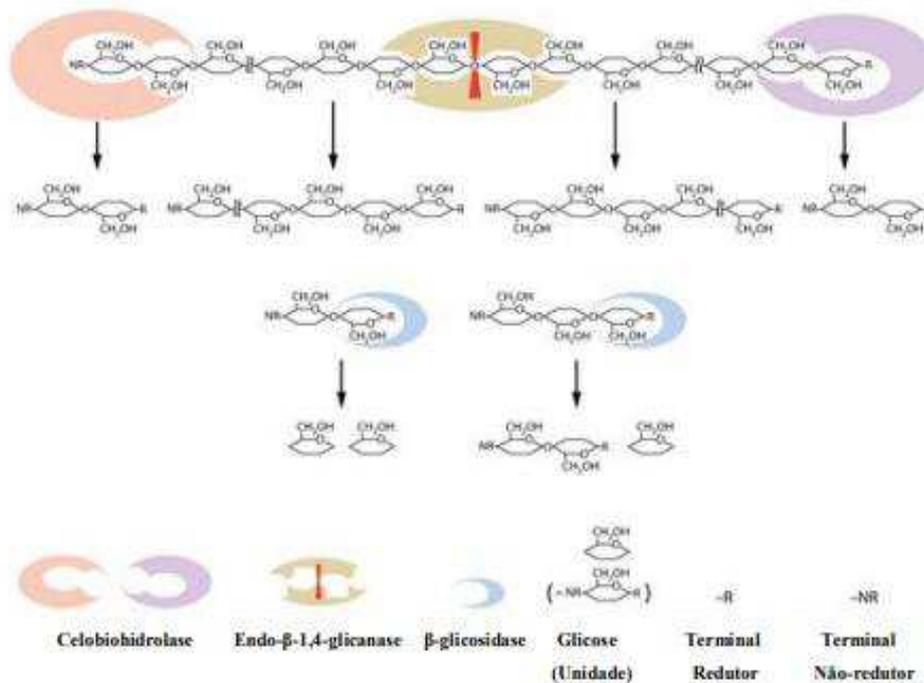


Fonte: Wright et al. (1988)

Essas três classes de celulases atuam simultaneamente para a hidrólise da celulose (Figura 3). Assim a eficiência do ataque ao complexo celulósico é bem maior do que se cada

enzima agir em separado. Apesar de serem enzimas diferentes, as celulases apresentam um modo de ação similar proporcionado por suas características estruturais comuns.

Figura 3 - Representação da atividade das celulases celobiohidrolase, endo- β -1,4-glicanase e β -glicosidase.



Fonte: Watababe e Tokuda(2010).

As celulases são utilizadas em inúmeras aplicações biotecnológicas. Na indústria têxtil, para dar melhor acabamento aos tecidos, tornando-os mais lisos, e com melhor caimento. Também podem ser aplicadas facilitando a extração de sucos de frutas pelo rompimento da rede de celulose que retém o líquido nas células vegetais na produção de néctares de frutas na indústria de bebidas, facilitando a extração de sucos de frutas pelo rompimento da rede de celulose que retém o líquido nas células vegetais na produção de néctares de frutas e em processos de vinificação. As celulases também exercem papel importante na nutrição animal, pois são incorporadas à ração, que juntamente com as celulases produzidas pelos microorganismos presentes no rúmen do animal, aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal, melhorando a conversão da pastagem em carne e leite. Ainda tem aplicações na fabricação de detergentes, proporcionando maior limpeza e menor degradação dos tecidos e na indústria de polpa e papel, tornando o papel

mais branco e liso. Entretanto, o interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido à sua utilização no processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais como bagaço e palha de cana, sabugo e palha de milho, cascas de arroz e demais grãos, além de restos de madeiras, os chamados materiais lignocelulósicos (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Existe uma grande variedade de microorganismos na natureza que produzem celulasas, mas apenas alguns são conhecidos como celulolíticos de verdade, isto é, que possuem a capacidade de degradar a celulose natural (ROBSON e CHAMBLISS, 1989). A produção de celulasas por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos com objetivo de estabelecer as melhores condições para a produção dessas enzimas. No procedimento de produção das enzimas, para elas serem sintetizadas e excretadas, um microorganismo é usado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes no meio de cultura ou substrato. (TAVARES, 2009).

As celulasas, geralmente, são produzidas por dois métodos de cultivo: fermentação submersa ou em estado sólido. Muitas pesquisas são geridas utilizando cultivo submerso em que o meio fermentativo é líquido e permite controlar a aeração, o pH e a temperatura, para o crescimento ótimo do microorganismo. No entanto, na produção de enzimas lignocelulolíticas, a fermentação em estado sólido tem sido preferida, devido ao grande número de vantagens econômicas e de processos, nos quais se destaca a natureza dos substratos utilizados como base e/ou fonte indutora na produção da enzima (FERREIRA, 2010).

Como todo processo biotecnológico, a produtividade enzimática da fermentação em estado sólido é definida pelo microorganismo e as condições de cultivo. Alguns parâmetros como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade, atividade de água e temperatura, representam variáveis operacionais determinantes no processo fermentativo (SINGHANIA et al., 2010). O nível de umidade varia de acordo com a afinidade formada entre o microrganismo e o substrato. Baixos níveis de umidade podem levar à inibição do crescimento microbiano e, portanto, à ineficiência do uso do substrato. Em compensação, o excesso de umidade pode resultar na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana no meio (HOLKER et al., 2004).

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

Resíduos lignocelulósicos disponíveis em abundância na natureza, quando moídos ou triturados podem ser excelentes matérias-primas para a produção enzimática por fermentação em estado semi-sólido, servindo de fonte de nutrientes, principalmente de carbono na fermentação. Esses materiais possuem na estrutura como principais componentes, a celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e de energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

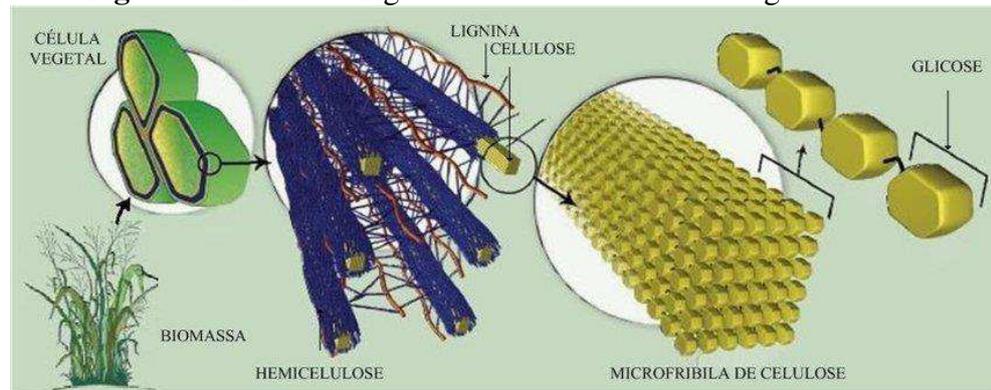
3.2. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

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

Esses materiais incluem os resíduos agrícolas (bagaços, cascas, palhas), resíduos industriais, resíduos sólidos urbanos e resíduos domésticos (MTUI, 2009), que são basicamente compostos de celulose (30% - 45%), hemicelulose (25% – 30%), lignina (25% – 30%) e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos, apresentando baixo teor de nitrogênio (GLAZER e NIKAIDO, 2007). A proporção percentual desses componentes depende do tipo de material, da sua idade e do estágio vegetativo (FUENTES, 2009).

O Brasil dispõe de uma grande variedade desses resíduos, cujo bioprocessamento representa interesse econômico e social. Esses resíduos são potenciais fontes de matéria-prima para fermentação, originando compostos químicos com alto valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros (MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009).

Com relação a estrutura, quatro fibrilas elementares são agrupadas por uma monocamada de celulose, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemicelulose e lignina, essa associação consiste na microfibrila celulósica (FENGEL E WEGENER, 1989; WYMAN et al., 2005), formando uma estrutura de difícil separação (Figura 4).

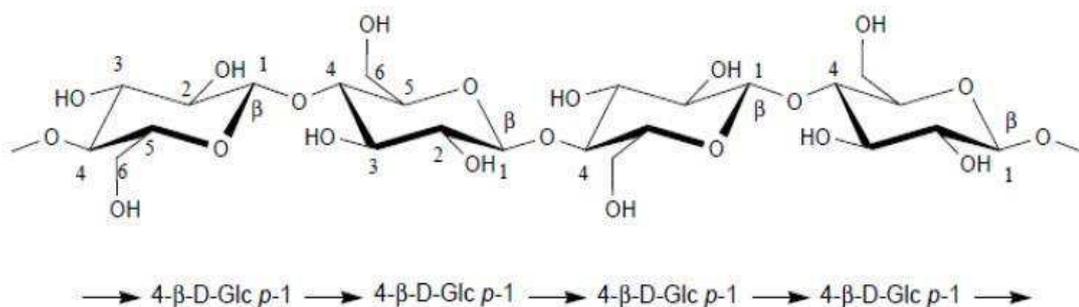
Figura 4 - Estrutura Lignocelulósica da biomassa vegetal

Fonte: Ghaffar e Fan (2014)

3.2.1 Celulose

A celulose é o polímero mais abundante existente na Terra. A cada ano mais de 1011 toneladas de gás carbônico são fixadas por meio da fotossíntese derivada de material vegetal, e metade desse material consiste em celulose. Ela responde isoladamente por cerca de 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 (AGUIAR, 2010)

A celulose é composta por cadeias lineares de D-glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 5) com alto grau de polimerização e elevada massa molecular, principalmente na forma cristalina que confere alta resistência ao rompimento das ligações por substâncias químicas (BORTOLAZZO, 2011).

Figura 5 - Estrutura da celulose

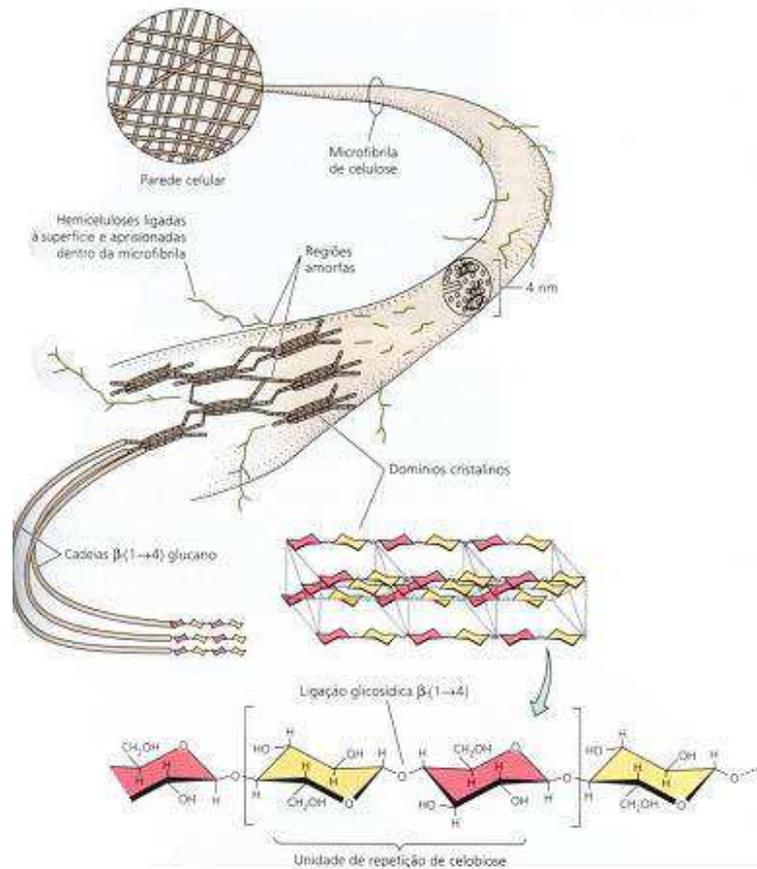
Fonte: Santos (2013)

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

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

Os glucanos, polímeros de glicose (Figura 6) que formam a microfibrila da celulose estão alinhados e interligados, constituindo uma fita cristalina, que exclui água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. Neste sentido, a celulose é forte, estável e resistente à degradação, e devido à configuração espacial alternante das ligações glicosídicas que unem resíduos de glicose, a unidade de repetição da celulose é a celobiose, dissacarídeo de D-glicose com ligações β -(1 \rightarrow 4) (KIMURA et al., 1999). Ademais, os modelos atuais da organização microfibrilar formam uma subestrutura de domínios altamente cristalinos unidos a regiões amorfas menos organizadas. Quando a celulose é degradada, primeiramente são atacadas as regiões amorfas, liberando pequenas cristalitas, que correspondem aos domínios cristalinos da microfibrila (SANTOS et al., 2012).

Figura 6 - Modelo estrutural de microfibrila de celulose

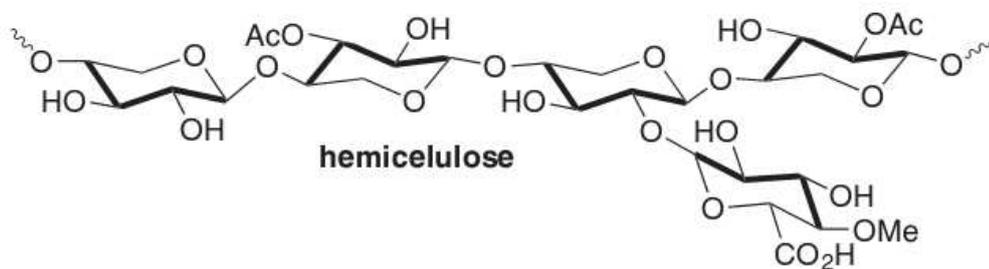


Fonte: Gallão (2012).

3.2.2 Hemicelulose

Os polissacarídeos de cadeia linear e ramificada, chamados de hemiceluloses (Figura 7) ou polioses são polissacarídeos que possuem massa molecular relativamente baixa. Junto com a celulose, a lignina, a pectina e as proteínas, formam a parede celular das plantas (MARTINS, 2005). As hemiceluloses conferem elasticidade e flexibilidade ao agregado de microfibrila, impossibilitando o contato entre elas (AGUIAR, 2010).

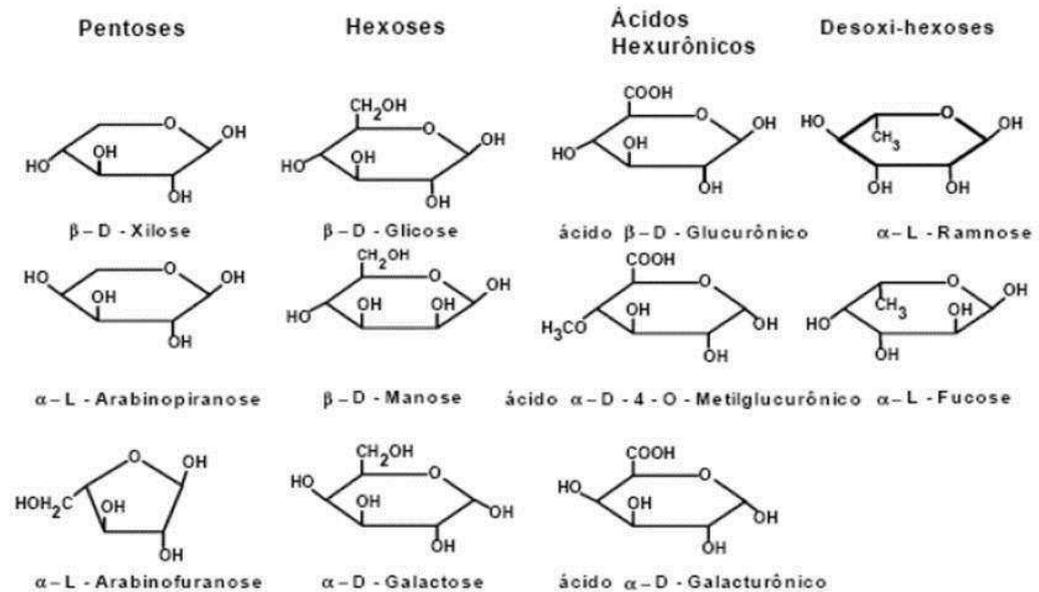
Figura 7 - Estrutura parcial da hemicelulose



Fonte: Ferreira et al. (2009)

Assim, a hemicelulose constitui uma estrutura complexa de carboidratos e de diferentes polímeros, como polímeros de pentoses (xilose e arabinose), e polímeros de hexoses (manoses, glicose e galactose), além de ácidos hexurônicos e desoxiexoses (TAVARES, 2009), como é apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Estruturas monossacarídicas das hemiceluloses.



Fonte: Fengel; Wegener, 1989.

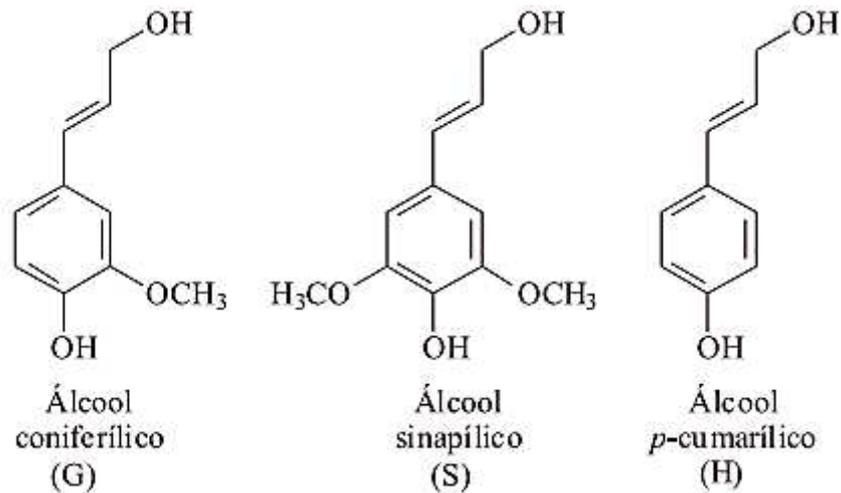
A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, a depender do tipo de tecido vegetal e espécies a quem pertencem. As madeiras em geral possuem de 20 a 30% de hemicelulose, já o coco apresenta em média 15% de hemicelulose na composição (SATYNARAYANA; GUIMARÃES; WYPYCH, 2007).

3.2.3 Lignina

A lignina, assim como a celulose, é uma macromolécula orgânica altamente abundante entre os materiais lignocelulósicos. Trata-se de uma substância incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades de fenilpropano, macromolécula tridimensional e amorfa. A lignina engloba de 20% a 30% da massa total do material lignocelulósico (RABELO, 2007).

Diferente da celulose e da hemicelulose, a estrutura da lignina, segundo Rabelo (2007), processa-se por via radicalar a partir da reação de três diferentes alcoóis cinâmílicos precursores: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico (Figura 9).

Figura 9 - Alcoóis precursores da lignina

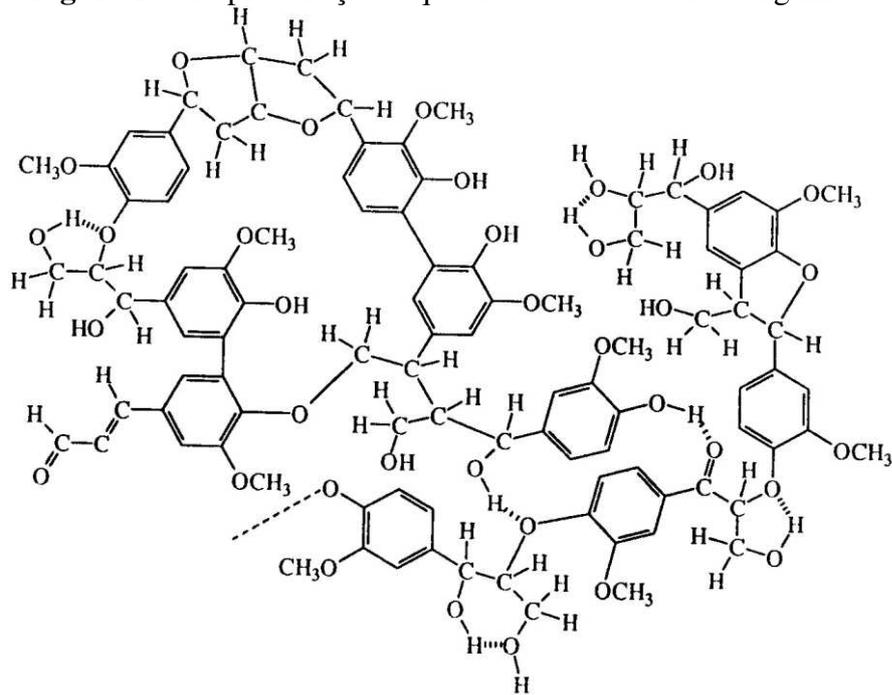


Fonte: Barbosa et al. (2008).

A presença da lignina nos materiais lignocelulósicos, interfere no processo de conversão da biomassa, atuando como uma barreira. Esta estrutura representa uma molécula capaz de fornecer rigidez às plantas, bem como, grande resistência ao ataque de microorganismos comuns (VÁSQUEZ et al., 2007).

Neste sentido, segundo Cardoso et al. (2012), a lignina, bem como a distribuição desse polímero (Figura 10) constituem o fator responsável pela degradação enzimática, limitando a acessibilidade das enzimas hidrolíticas, como a celulase e a xilanase entre outras, a agirem nas fontes de carbono, impossibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio. Ademais, Rajarathnam et al. (1992), estudou a influência de microorganismos em contato com a lignina, observando que essa macromolécula forma uma barreira física que dificulta a atividade de inúmeros organismos produtores de enzimas celulolíticas, já que a lignina limita as áreas de ataques enzimáticos e a entrada de enzimas de maior peso molecular, devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa.

Figura 10 - Representação esquemática da molécula de lignina



Fonte: Fengel e Wegener, 1989.

3.3 CARACTERÍSTICAS DO FRUTO DO COQUEIRO(*COCOS NUCIFERA L.*)

O coqueiro (*Cocos nucifera L.*) é uma das árvores frutíferas mais distribuídas em todo o planeta, sendo encontrada em praticamente todos os continentes, especialmente na Ásia, África, América Latina e região do Pacífico (SIQUEIRA et al., 2002). Encontra-se distribuído em mais de 200 países (FAO, 2012). O clima ideal para o cultivo é o tropical úmido, pois desenvolvem em solos pobres, arenosos e toleram curto período exposto à água salina (ETHERINGTON, 2005). É uma cultura tropical que estende-se ao longo da faixa costeira, entre os trópicos de Câncer e de Capricórnio (SIQUEIRA et al., 2002). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco, responsável por mais de 80,0% da produção, sendo a Região Nordeste responsável por 82,28% do total da área plantada (IBGE, 2012), sendo que no ano de 2017 foram produzidos, 1,721 milhões de frutos (IBGE, 2017).

O coqueiro chegou ao Brasil por volta do ano de 1553, adentrando pela Bahia, em embarcações portuguesas vindas das ilhas de Cabo Verde. Por ser uma planta tropical, encontrou condições favoráveis para seu desenvolvimento no país e se espalhou pelas regiões Norte e Nordeste e, mais recentemente, na Sudeste (PEREIRA, 2012).

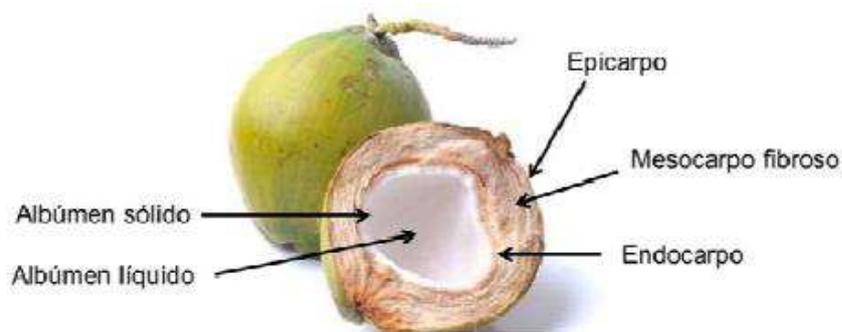
Segundo Vilela (2010), existem três variedades de coqueiro exploradas no Brasil:

- a) Coqueiro gigante: planta de porte alto, podendo atingir em média 35 m de altura, cujo intuito principal é o fornecimento de polpa para a indústria de derivados de coco (coco ralado e leite de coco). Sua produção média é de 70 frutos/planta/ano;
- b) Coqueiro anão: planta de porte baixo que atinge em média 12 metros de altura, e é utilizada para atendimento do consumo de água-de-coco (in natura ou envasada). Sua produtividade é de 120 frutos/planta/ano e pode alcançar 250 frutos em sistemas irrigados;
- c) Coqueiro híbrido: plantas de porte intermediário, atingindo cerca de 20 metros de altura, com dupla finalidade de fornecimento de coco, ou seja, tanto para a indústria quanto para o consumo da água. Sua produtividade alcança de 120 a 150 frutos/planta/ano. Tem participação pouco significativa na produção.

Com relação à estrutura do coco (Figura 11), Ferreira et. al (1998) descreve as principais partes do coco em um corte longitudinal:

- a) Epicarpo: camada lisa e externa do fruto.
- b) Mesocarpo: parte mais desenvolvida do coco, constituída de fibras.
- c) Endocarpo: camada pétreo que envolve a parte comestível, estrutura que forma a casca dura em torno da semente.
- d) Semente: toda estrutura que serve para reproduzir um vegetal.
- e) Albúmen: tecido contendo substâncias nutritivas na semente. O albúmen líquido é a água de coco, enquanto que o albúmen sólido é a polpa, também chamada de copra.

Figura 11 - Estrutura do coco em um corte longitudinal



Fonte: FERREIRA et al. (1998)

A busca pela qualidade de vida e alimentação adequada gera inúmeros produtos alimentícios produzidos à base de coco, tais como a água de coco *in natura* e em pó, leite de coco, coco ralado e óleo de coco. Com esse avanço, a cadeia produtiva do coco não possui a destinação correta dos seus resíduos agroindustriais e urbanos. Em cidades litorâneas, principalmente as áreas com vocação turística, as cascas de coco verde chegam a representar até 80,0% do volume total dos resíduos sólidos rejeitados, que apresentam decomposição lenta, devido à alta concentração de lignina, hemicelulose e celulose, sendo que em torno de 85,0% do peso do fruto é constituído deste material (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

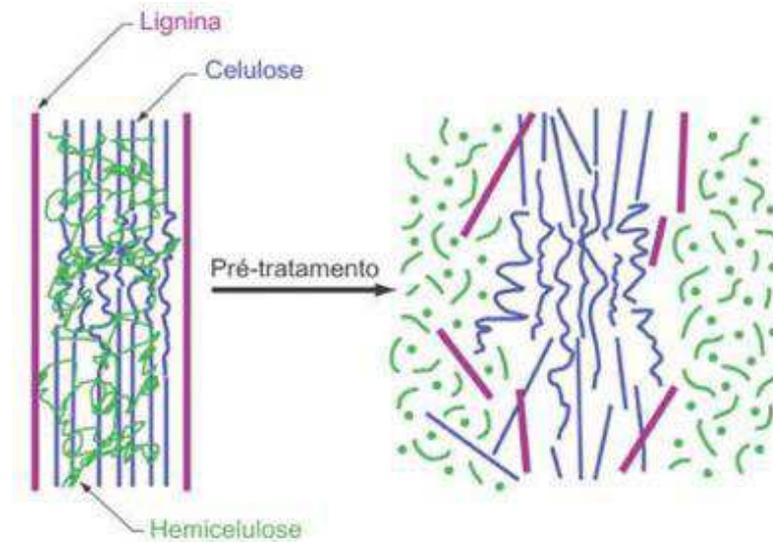
A expressiva quantidade de resíduos gerados no processamento do coco (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011) tem motivado o desenvolvimento de pesquisas, com o objetivo de agregar valor a estes rejeitos, por meio da fabricação de novos materiais. O desenvolvimento de alternativas de aplicação da casca de coco verde possibilita a redução do acondicionamento inadequado de resíduos sólidos e proporciona uma nova opção de rendimento junto aos locais de produção (MATTOS et al., 2011).

3.4. TRATAMENTO DA BIOMASSA PARA REMOÇÃO DE LIGNINA

O processo de pré-tratamento da biomassa é responsável pela modificação das ligações entre a lignina, a celulose e a hemicelulose, reduzindo a cristalinidade da celulose (GROSSI, 2015) e facilitando a quebra das macromoléculas de celulose em glicose na sacarificação (SANTOS et al., 2012).

O processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é importante para atingir altos rendimentos de glicose durante o processamento da biomassa, pois aumenta a sua área superficial, remove a hemicelulose e destrói o laço formado pela lignina, como detalha a Figura 12.

Figura 12 - Alterações estruturais do complexo celulose, hemicelulose, lignina determinadas pelo pré-tratamento



Fonte: Santos et al., 2012

Com isso, Galbe; Zacchi (2007), afirmaram que um pré-tratamento eficaz deve possuir as seguintes características:

- Elevada recuperação de todos os carboidratos;
- Produzir o mínimo de resíduos, em que o líquido resultante do pré-tratamento deve facilitar as etapas posteriores, como a fermentação;
- Apresentar uma grande concentração de sólidos e elevada concentração de açúcares liberados na fração líquida;
- Demandar baixa energia para a sua execução;
- Baixo investimento e custo operacional.

O pré-tratamento visando o ataque a estrutura da lignina é um passo necessário na conversão dos materiais lignocelulósicos em bioprodutos, já que, reduz a recalcitrância da biomassa e altera as características estruturais da parede celular, tornando a fração celulósica mais acessível. Além disso, é uma das etapas mais importantes em termos de custo direto e eficiência das etapas anteriores e subsequentes do processo (PIETROBON, 2008).

Nesta perspectiva, sem a realização da fase de pré-tratamento, o processamento da celulose apresenta rendimentos menores que vinte por cento. Porém, quando precedida de um pré-tratamento, pode, muitas vezes, apresentar rendimentos próximos a cem por cento (HAMELINCK et al., 2005).

Neste sentido, existem diversas maneiras de pré-tratamento, com efeitos e rendimentos variados, interferindo de maneira diferente em cada etapa.

Os tipos de pré-tratamento, podem ser divididos em diferentes grupos: físicos (moagem e trituração), químicos (ácido diluído, agentes oxidantes, alcalino, e solventes orgânicos), físico-químicos (hidrotérmicos, pré-tratamento a vapor e oxidação úmida), biológicos (uso de enzimas e fungos) e a combinação destes (OLIVEIRA, 2010).

3.4.1 Pré-Tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico, ou simplesmente, autocatalítico não requer descompressão rápida e não emprega nenhum tipo de catalisador ou produto químico. Trata-se de uma tecnologia limpa, uma vez que utiliza água como reagente principal, o que evita problemas de corrosão e necessidade de tratar os resíduos formados (neutralização) (SAHA et al., 2013). A pressão é aplicada para que a água permaneça no estado líquido à elevadas temperaturas (160-240°C), provocando mudança estrutural do material lignocelulósico. Esse processo minimiza a formação de inibidores. A água a elevadas pressões e temperaturas tem o seu equilíbrio deslocado e produz uma maior quantidade de íons hidrogênio, acidificando o meio. Estes íons atuam como catalisadores na hidrólise da hemicelulose liberando moléculas de ácido acético e outros ácidos orgânicos que também participam do processo (SILVA et al., 2013).

No pré-tratamento hidrotérmico as principais características que afetam a eficiência dos processos de pré-tratamento são o tempo de retenção e a temperatura do processo. A intensidade do pré-tratamento descreve o efeito conjunto da temperatura e do tempo sobre o material.

Dessa forma, para evitar a formação de inibidores, é necessário manter o pH entre 4-7, pois assim, os açúcares da fração hemicelulósica permanecerão na forma de oligômeros e a formação de monômeros será minimizada. O processo hidrotérmico é capaz de remover a hemicelulose e, por conseguinte, melhorar a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico (SOUZA, 2016).

3.4.2 Pré-Tratamento Alcalino com Hidróxido de Sódio

O termo pré-tratamento alcalino se dá devido a utilização de soluções de NaOH, para remover a lignina e parte da hemicelulose presente no material lignocelulósico (TAHERZADEH & KARIMI, 2008). As soluções alcalinas agem saponificando as ligações éster entre a hemicelulose e outros compostos da biomassa, como a lignina, causando a quebra da estrutura do material lignocelulósico (AGBOR *et al.*, 2011; SUN&CHEN, 2002). É observado também o aumento da hidrofiliabilidade do material e a redução da cristalinidade da celulose que causa o efeito de inchaço da fibra (KRONGTAEW *et al.*, 2010). Os efeitos de redução do teor de lignina e consequente aumento da digestibilidade do material lignocelulósico são mais evidentes em biomassas com reduzido teor de lignina, como resíduos da agricultura, e menos efetivos à medida que o teor de lignina da biomassa aumenta (AGBOR *et al.*, 2011).

O uso de soluções alcalinas para redução dos teores de lignina encontra-se bem descrito na literatura. Segundo Sun & Cheng (2002) o pré-tratamento com NaOH diluído ocasiona o inchaço da fibra da biomassa lignocelulósica levando assim o aumento da área superficial interna, redução do grau de polimerização, redução da cristalinidade, separação das ligações estruturais entre a lignina e os carboidratos celulose e hemicelulose e, por fim, a quebra da estrutura da lignina. Mathew *et al.* (2011) e Beukes&Pletschke (2011) avaliaram o efeito do pré-tratamento alcalino utilizando soluções de hidróxido de sódio (NaOH) na digestibilidade da fibra de cana-de-açúcar pela ação de hemicelulases, onde os autores relataram que os pré-tratamentos alcalinos foram eficientes na remoção parcial da lignina.

3.5. FEMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Existem dois tipos básicos de fermentação para produção de ácidos, enzimas e antibióticos, a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES).

A FES é um processo em que os microrganismos crescem em um ambiente com baixo teor de água livre, sendo um processo bastante importante para o processamento de alimentos, na produção de biomoléculas e enzimas, produtos farmacêuticos e têxteis (PANDEY *et al.*, 2003).

Um exemplo de enzimas produzidas por fermentação sólida são as celulasas, estando a produção relacionada com a composição do meio de cultivo e sendo diretamente influenciada

por fatores como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, água, agitação, presença de sais minerais e vitaminas (LIMA et al., 2003).

A fermentação em estado sólido (FES) está relacionada com a produção de extratos concentrados, a utilização de biomassas como substratos, baixo consumo energético, menor uso e descarte de água e condições de cultivo que simulam o habitat natural dos microrganismos (OLIVEIRA, JR., 2018) e tem o intuito de facilitar o crescimento de microrganismos em meio sólido sem a presença de água livre, pois a umidade necessária para o crescimento microbiano encontra-se agregada ao meio (CANNEL e MOO YOUNG, 1980) e o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato que o compõe (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato. O material sólido gerado é usado como fonte de nutrientes para o microrganismo. Este material sólido pode ser um resíduo agroindustrial, poliuretano ou resinas poliméricas, que facilitam o crescimento dos microrganismos (KRÜGER, 2017).

Outra alternativa para a fermentação é a utilização de resíduos lignocelulósicos (como o bagaço de cana-de-açúcar, o farelo de trigo e mesocarpo de coco verde), extremamente importantes para a diminuição do impacto ambiental, já que estes servem como suportes para os microrganismos crescerem e produzirem biomoléculas de interesse.

Vários trabalhos foram desenvolvidos com objetivo de analisar a produção de celulasas por fermentação semi-sólida por fungos cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos. Na Tabela 1 constam alguns microrganismos produtores de celulasas e os respectivos substratos utilizados nos processos de produção enzimática.

Tabela 1 - Microrganismos produtores de celulases e respectivos substratos

Autores	Substratos	Microorganismos
(RODRÍGUEZ-ZÚÑIG et al., 2011)	Bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo	<i>Aspergillusniger</i>
(AMORIM, 2010)	Bagaço do pedúnculo do caju	<i>Trichodermasp.</i>
(OLIVEIRA JUNIOR, 2018)	bagaço de cana-de-açúcar, fibra coco e o pedúnculo de caju.	<i>Aspergillusfumigatus</i>
(LINS, 2012)	Bagaço do pendúculo do caju	<i>Trichodermareesei</i> LCB 48
(SILVA, 2016)	Mesocarpo do coco verde	Fungo isolado em fase termofílica da compostagem.

Fonte: Autor, 2018.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de química e de microbiologia da Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos (UAEB) do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande, em Sumé – Paraíba.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

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

4.2.1 Preparação do Mesocarpo de Coco Verde Triturado

Os resíduos foram triturados em uma máquina desintegradora/trituradora de forragem, disponível na propriedade do produtor que fez a doação do bagaço de coco, para que o tamanho das fibras fosse reduzido e assim proporcionasse aumento da capacidade de retenção de umidade e nutrientes.

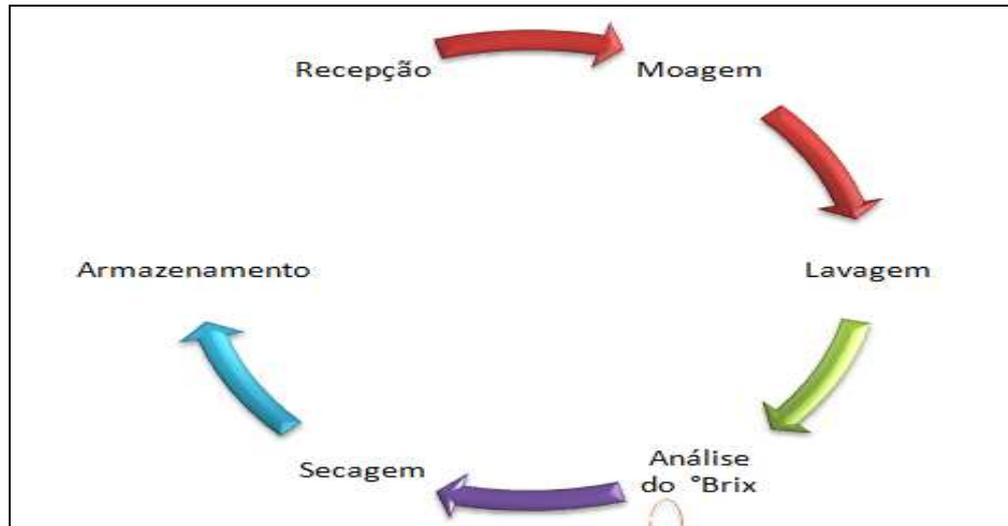
O resíduo utilizado no estudo da produção das celulases, após a etapa de pré-tratamento, passou pelo processo de lavagem até que todos os sólidos solúveis, presentes no bagaço fossem removidos. A determinação de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada utilizando-se refratômetro ABBE de bancada modelo Q767B da marca Quimis, a partir do líquido do processo de lavagem do mesocarpo triturado até que chegasse a zero.

O processo de lavagem teve o objetivo de remover os açúcares contidos no substrato, pois a presença de açúcares redutores, segundo Bon *et al.*, (2008), pode reprimir a síntese enzimática que, apesar de, em geral, ser excelente fonte para o crescimento celular é reportada como repressora, quando em grande quantidade, para a produção de diversas enzimas, sendo uma delas a celulase.

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

O fluxograma, presente na Figura 13, permite visualizar a sequência de etapas envolvidas na preparação do mesocarpo de coco verde para posterior uso nas etapas de pré-tratamento e fermentações.

Figura 13 - Sequência da preparação do mesocarpo de coco verde



Fonte: Autor, (2018).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO MESOCARPO DO COCO VERDE

A determinação dos teores de umidade, extrativose lignina do bagaço de coco, antes e após os pré-tratamentos, foi realizada de acordo com os procedimentos para análise lignocelulósica utilizados por Moraes et al. (2010).

4.3.1 Umidade

As amostras, do bagaço *in natura* foram colocadas em cadinhos, previamente lavados, secos e pesados, sendo utilizados entre 7,0 e 9,0 g do bagaço do coco verde. Em seguida os cadinhos com as amostras foram pesados e levados à estufa, onde foram mantidos a uma temperatura de 60 °C, durante 24h.

Os cadinhos foram retirados da estufa e colocados em um dessecador, para resfriar até temperatura ambiente por 30 min. Em seguida a amostra foi submetida a pesagem e a massa foi anotada.

Com o conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa do recipiente/amostra úmida (MRAU) e da massa recipiente/ amostra seca (MRAS), foi possível a determinação da massa da amostra úmida (MAU), dada pela diferença entre MRAU e MR e em seguida do teor de umidade (TU%), de acordo com a equação 1.

$$TU(\%) = \frac{(MRAU - MRAS)}{MAU} \times 100\% \quad (1)$$

4.3.2 Extrativos

Inicialmente, pesou-se um papel filtro previamente seco em estufa, a 60 °C por 24h, e resfriados à temperatura ambiente em dessecador, e anotou-se sua massa. Em seguida, foram pesados cerca de 20,0 g do bagaço do coco verde seco e este material foi colocado dentro do papel filtro. O conjunto papel-material foi dobrado e depositado dentro de um Soxhlet. Foi feito um sistema de extração, unindo-se o aparelho de Soxhlet a um condensador de bolas e um balão volumétrico de fundo redondo de 500 mL. Em seguida, foram adicionados 150 mL de álcool etílico e 150 mL de hexano ao sistema. Após isso, o conjunto foi colocado em uma manta aquecedora, permanecendo assim por um período de 6h de extração, Foto 1.

Foto 1 - Conjunto utilizado para determinação do teor de extrativos



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Depois desse tempo, o balão com solvente e os extrativos foi removido e o solvente recuperado. O cartucho de papel foi posto em uma estufa a 60 °C por 24h. Posteriormente, este foi colocado em dessecador por 15 minutos para que atingisse a temperatura ambiente e o cartucho de papel foi pesado em balança analítica. O procedimento foi realizado em duplicata.

Com o conhecimento dos valores da massa da amostra (MA), da massa do recipiente/extrativos (MRE) e da massa do recipiente/resíduos de solvente (MRRS), é possível a determinação do teor de extrativos (TE%), de acordo com a equação 2:

$$TE(\%) = \frac{(MRE - MRRS)}{MA} \times 100\% \quad (2)$$

4.3.3 Lignina

Na determinação de lignina foi utilizados 1,0 g de amostra moída, na forma sem extrativos. O material foi colocado em um almofariz, Foto 2, onde foram adicionados 17,0 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v), resfriado em geladeira a 15 °C, antes do uso. Após a adição do ácido, o material foi triturado por 15 minutos cuidadosamente com pistilo, até que não houvesse mais partículas visíveis não solubilizadas.

Completado este procedimento, deixou-se o material em descanso por 24 h, para o início da próxima etapa. Este processo foi realizado em duplicata. Decorrida às 24 h para o processo de digestão, adicionaram-se 306,0 mL de água destilada ao almofariz para diluir o ácido sulfúrico a 4% (v/v).

Feito isso, o conteúdo foi transferido para o balão de 500,0 mL, em várias porções. Depois, o balão foi conectado a um condensador de bolas, permanecendo esse sistema ligado a uma manta aquecedora. O material foi mantido sob aquecimento e refluxo por 4 h, contadas a partir do início da fervura. Acabado o tempo de refluxo, desligou-se o aquecimento e aguardou-se alguns minutos, até o balão atingir a temperatura ambiente.

Foto 2 - Almofariz e pistilo utilizados na determinação do teor de lignina



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Para o processo de filtração, papéis de filtro foram colocados na estufa a 105°C por 1h. Após isso, os papéis de filtro foram removidos com pinças e guardados em um dessecador, até o momento da utilização, quando se mediu sua massa. Para a realização da filtração a vácuo, o material foi transferido aos poucos para o funil, com uma agitação constante, para evitar a perda de precipitado. Após a transferência de todo o material contido no balão volumétrico, este foi lavado com água destilada, para que nenhum resíduo de lignina insolúvel fosse perdido. Posteriormente o papel filtro foi levado para uma estufa a 105° C durante 3 h.

Após a secagem, o conjunto papel-lignina foi resfriado em dessecador por 30 min, e mediu-se a massa do papel somada a massa de lignina em balança analítica.

Com base na massa do papel filtro limpo e seco (MF); na massa da amostra (MA); na massa do papel filtro somada a massa de lignina, após a secagem em estufa (MFL); pode-se calcular o teor da lignina insolúvel (TLI), conforme a equação 3:

$$TLI(\%) = \left[\frac{(MFL - MF)}{MA} \times 100 \right] (3)$$

4.4 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO

As condições aplicadas aos dois métodos de pré-tratamento foram definidas de acordo com o material disponível para realização desta etapa, baseadas na metodologia estudada por Nunes (2014).

4.4.1 Pré-Tratamento Hidrotérmico

Para a realização do pré-tratamento hidrotérmico, 150 mL de água destilada e 5,0 g do bagaço do coco verde foram transferidos para um Erlenmeyer. Em seguida, os Erlenmeyers foram lacrados com papel alumínio e autoclavados a uma temperatura (120 °C) avaliando a influência do tempo de reação (60 e 180 min), em duplicata, totalizando 6 amostras.

4.4.2 Pré-Tratamento Com Hidróxido De Sódio (NaOH)

O pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH), 150 mL de hidróxido de sódio (3%) e 5,0 g do bagaço do coco verde foram transferidos para um Erlenmeyer. Em seguida, os Erlenmeyers foram lacrados com papel alumínio e autoclavados a uma temperatura (120 °C) avaliando a influência do tempo de reação (60, 120 e 180 min), em duplicata.

4.5 PRODUÇÃO DAS CELULASES

4.5.1 Microrganismos

O fungo utilizado foi isolado da fase termofílica de um processo de compostagem e foi identificado como F1C3 (Fungo 1 da Coleta 3) e está depositado na coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia, e foram obtidos durante projeto realizado anteriormente intitulado “A compostagem como fonte de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial” em que foram isolados 37 (trinta e sete) fungos, sendo 06 (seis) isolados durante a fase termofílica do processo de compostagem, denominada Coleta 3. (NUNES, 2014)

4.5.1.1 Repique dos microrganismos

Para o preparo do meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) foram descascadas 200g de batatas inglesas, depois cortadas em pequenos pedaços e fervidas em água destilada esterilizada (ADE) durante 10 min, a partir do início da ebulição. Em seguida, o material foi filtrado para obtenção do caldo nutritivo de batata e acrescido de 20g de dextrose e 20g de

ágar para suporte do microrganismo e o volume ajustado para 1L. Ao final, foi esterilizado o meio por 20 min a 121°C e 1 atm.

O Repique do fungo foi realizado em placas de Petri contendo cerca de 30 ml de meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA), após solidificação do meio e com auxílio de uma alça de platina foi colocada uma quantidade da suspensão de esporos do fungo, em seguida transferida para o centro das placas de Petri as quais foram incubadas à temperatura de 30°C por um período de 10 dias ou tempo necessário para que as placas fossem totalmente cobertas.

4.5.2 Processo Fermentativo

4.5.2.1 Preparação do sistema de cultivo

Em recipientes de tamanho uniforme, com capacidade de 500 mL, foram colocados 15 g de mesocarpo do coco triturado na umidade pré-determinada para o crescimento, auto clavados por 1 hora a 121°C e 1 atm.

4.5.2.2 Inóculo

A suspensão de esporos foi obtida pela adição de água destilada esterilizada (ADE) à placa de Petri, onde os esporos foram raspados com uma alça de inoculação. A suspensão de esporos foi filtrada com auxílio de gaze e algodão esterilizados e quantificada em câmara de Neubauer espelhada e ajustado de modo a se obter um inóculo na concentração de 10^7 esporos.mL⁻¹.

4.5.2.3 Incubação

Aos recipientes contendo bagaço de casca de coco verde esterilizado e umidificado foi adicionado 1 (um) mL de inóculofúngico preparado nas condições listadas no item anterior. A incubação da Fermentação em estado sólido (FES) foi interrompida pela adição do DNS em 48h, 192h e 288h

A Figura 14 apresenta as etapas do processo de fermentação em estado sólido (FES), para a produção das enzimas celulolíticas (CMCase).

Figura 14 - Etapas do processo de fermentação em estado sólido (FES)



Fonte: SILVA, 2016

4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Para a obtenção do extrato enzimático, a cada frasco foi adicionado 90 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, segundo o procedimento descrito por MoreiraNeto (2012). O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente por 5 min, e em seguida agitado em mesa agitadora a 120 rpm durante 1h a 25 °C. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro qualitativo para remoção dos esporos. O extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática de carboximetilcelulase.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

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

mistura foi incubada a 50°C por 10 min, e após esse tempo foi retirado um volume de 500 µL do tubo de ensaio e colocado em outro tubo de ensaio com 500 µL de DNS (1 % 3,5-dinitrossalicílico; 1,6% hidróxido de sódio; 30 % tartarato de sódio e potássio), interrompendo a reação para determinar a concentração de açúcares redutores, seguindo a metodologia de Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto, a 50°C.

As amostras foram fervidas por 5 (cinco) minutos, diluídas e em seguida resfriadas. Foi adicionado 2500 µL de água destilada autoclavada, em seguida homogeneizados e lidos em colorímetro numa curva de 540 nm. Os testes foram feitos em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em três partes, sendo a primeira relativa as análises de caracterização da biomassa, mesocarpo do coco verde, *in natura*; a segunda referente a biomassa pré-tratada em duas metodologias diferentes, pré-tratamento hidrotérmico e pré-tratamento alcalino e a última a análise enzimática da fermentação em estado sólido do mesocarpo do coco verde.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MESOCARPO DO COCO VERDE *IN NATURA*

A caracterização foi realizada visando determinar a composição química do mesocarpo do coco, umidade, extrativos e percentuais de lignina presentes no resíduo, já que o mesmo foi utilizado como substrato durante o processo de fermentação semi-sólida para a produção das celulases. A Tabela 2 apresenta os resultados das análises físico-químicas realizadas no bagaço do coco, lavado e seco em secador solar.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço coco verde *in natura*, lavado, seco.

Parâmetros	Valores
Sólidos solúveis (°Brix)	0,00 ± 0,00
Extrativos (%)	1,39 ± 0,12
Lignina (%)	41,79 ± 3,28
Umidade (%)	7,31 ± 0,07

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

A fibra da casca de coco verde apresentou alto teor de lignina, fato este que influencia na alta recalcitrância mostrada por este material lignocelulósico. Resultado semelhante foi obtido por Cabral (2015), que ao estudar o aproveitamento da casca do coco verde encontrou em sua caracterização um teor de lignina de 40,10 %, o que explica o alto grau de resistência e durabilidade deste material.

Corradini et al. (2009) também encontraram altos teores de lignina na determinação da composição química da fibra de cinco cultivares de coqueiro, que apresentaram uma composição média entre 37,9 a 43,9 %. Em estudos realizados por Ferraz (2009) e Nascimento

et al. (2014), os teores de lignina, obtidos após a caracterização do bagaço do coco verde, foram inferiores aos encontrados neste trabalho, com valores, respectivamente, de 34,24 % e 23,29 %. Essa variação pode ser observada de acordo com o grau de maturidade da planta e de sua procedência.

Com o intuito de reduzir os teores de lignina, uma vez que altos valores não são interessantes para os processos que envolvem o material lignocelulósico, ou causar alteração na estrutura do material, pela solubilização da hemicelulose, foram avaliados os métodos de pré-tratamento hidrotérmico (autocatalítico) e alcalino.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO MESOCARPO DO COCO VERDE APÓS PRÉ-TRATAMENTOS

O bagaço de coco utilizado foi caracterizado após a aplicação dos métodos de pré-tratamento. Os dados relativos à umidade e quantidade de lignina, °brix e extrativos presentes nas amostras após o tratamento se encontram na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço coco verde após pré-tratamento hidrotérmico fixando dois tempos

Tempo	° Brix	Extrativos	Lignina
60 min	0,0	13,18 ± 0,27	39,75 ± 3,94
180 min	0,0	17,09	35,21 ± 0,06

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

O pré-tratamento autocatalítico ou hidrotérmico solubilizou pequenas quantidades de lignina, sendo que os valores permaneceram próximos do valor encontrado para o bagaço *in natura*. Gonçalves *et al.* (2015) usaram o pré-tratamento autocatalítico sobre diversos materiais lignocelulósicos, dentre eles a fibra de coco verde, onde as condições operacionais de temperatura e tempo de residência variaram entre 160°C – 200°C e 10 – 50 min, respectivamente. Os autores reportaram valores de 41,28% para os teores de lignina para a fibra de coco verde, quando as condições operacionais do pré-tratamento foram 200°C e 50min. Estes resultados são análogos aos valores encontrados neste estudo, no tempo de 60 min.

Nascimento et al. (2014) aplicaram o mesmo método de pré-tratamento, entretanto com temperatura de 186°C e tempo de 10 minutos, e conseguiram reduzir o teor de lignina de 26,29 para 19,62% e comentaram que o pré-tratamento autocatalítico age nas camadas mais

externas dos compostos amorfos da parede da célula vegetal, sendo que a hemicelulose pode ser hidrolisada dando origem a monômeros e oligômeros, enquanto que celulose e lignina permanecem, em sua maioria, inalteradas.

Avaliando o teor de sólidos solúveis totais, expressos em °brix, poderíamos ter uma indicação da presença de açúcares no meio reacional, devido a degradação das frações celulose e hemicelulose, entretanto, como o valor permaneceu inalterado, provavelmente, pequenas quantidades desses compostos encontram-se nas soluções, uma vez que houve uma baixa alteração nos teores de extrativos.

Com isso, amostras do bagaço foram também submetidas ao pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio a 3%, com temperatura de 120°C, variando o tempo em 60, 120 e 180 min, e os resultados obtidos após a aplicação encontram-se listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço coco verde após pré-tratamento alcalino fixando três tempos

Tempo	° Brix	Extrativos	Lignina
60 min	6,0	28,77 ± 0,85	14,87 ± 1,66
120 min	7,0	24,55 ± 0,66	12,91 ± 0,09
180 min	7,5	31,51 ± 1,09	15,49 ± 0,37

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

A aplicação do pré-tratamento alcalino proporcionou a redução do teor de lignina para todos os tempos de processo avaliados, sendo a maior redução de 41,83%, na fibra não tratada, para 12,91%, no tempo de 120 minutos. Cabral (2015) estudou a aplicação do pré-tratamento alcalino da fibra da casca do coco nas mesmas condições de temperatura que este trabalho, variando as concentrações do hidróxido de sódio, de 0 a 10 %, e o tempo, de 20 a 60 minutos, e conseguiu a maior redução no teor de lignina para um tempo de 40 min e concentração de reagente de 5%, partindo de 40,10 para 29,91%.

Ferraz (2011) utilizou uma solução de hidróxido de sódio a 5%, por 72 horas, e conseguiu diminuir a concentração de lignina presente na fibra de coco de 34,24 para 27,23%. Este resultado foi inferior ao apresentado neste trabalho, sendo que este comportamento pode ser explicado pela condução do processo a temperatura ambiente.

Nascimento et al. (2014) utilizaram a mesma metodologia que foi aplicada neste estudo, com concentração de hidróxido de 5%, temperatura de 121°C e tempo de 30 minutos, e conseguiu reduzir a fração lignina presente na fibra de coco a um valor de 5,1%.

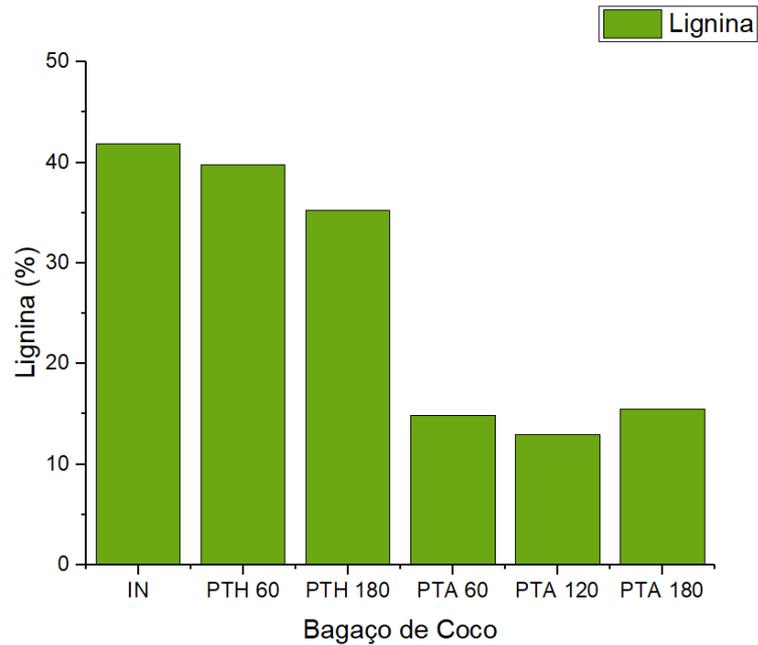
Os resultados obtidos comprovam que as condições aplicadas ao bagaço do coco verde foram satisfatórias na remoção da lignina e isto ocorre porque durante o pré-tratamento alcalino este constituinte é devido à saponificação das ligações lignina-carboidrato que acontecem devido à presença de ligações éster entre resíduos de ácido ferúlico da lignina e as cadeias laterais da arabinose presente na hemicelulose (NASCIMENTO et al., 2014).

Com relação ao teor de sólidos solúveis totais, observa-se que os resultados foram diferentes dos obtidos na aplicação do método hidotérmico, uma vez que houve elevação de 0,0 para até 7,5 °brix, quando o tempo foi de 180 minutos. Os resultados em ° brix são uma medida indireta que relaciona o teor de sólidos solúveis dissolvidos em água baseando-se nas mudanças de índice de refração da solução, sendo uma medida amplamente utilizada como forma de indicar a presença de açúcares, porém não especificando qual açúcar está presente no meio (SIMEONE et al., 2016). Assim, devido ao incremento nos valores de °brix, para todos os tempos, associados a elevação no teor de extrativos, é possível inferir que houve solubilização de parte dos outros constituintes, celulose e hemicelulose.

O Gráfico 1, a seguir, contém os resultados, expressos em teor de lignina, obtidos após a caracterização do bagaço de coco antes e após as etapas de pré-tratamento.

A partir do Gráfico 1 e dos resultados presentes na Tabela 4 é possível visualizar que o pré-tratamento químico causou uma maior alteração na composição do bagaço, quando comparado com os dados referentes ao material *in natura*, sendo observada a maior redução nos teores de lignina no tempo de 120 minutos, que passaram de 41,83 para 12,91%. Por conseguinte, houve aumento na quantidade de açúcar disponível no líquido após o tratamento alcalino, comparado com o hidotérmico e o bagaço *in natura*. Quando se aplicou o método hidotérmico, não houve alteração significativa na composição do bagaço, quando comparado com o bagaço *in natura*.

Gráfico 1 - Fração de lignina (%) do Bagaço in natura (IN) e do bagaço pré-tratado pelos métodos hidrotérmico (PTH) e alcalino (PTA), nos tempos de 60, 120 e 180 minutos



Fonte: Autor, 2018

5.3 ANÁLISE ENZIMÁTICA DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO MESOCARPO DO COCO VERDE

A análise do crescimento microbiano foi determinada por meio da observação do bagaço de mesocarpo de coco verde submetido à Fermentação em estado sólido, FES, onde na análise visual não foi observado crescimento aparente, como mostrado na Foto 3 a seguir.

Foto 3 - Recipientes com bagaço de coco pré-tratado e in natura



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Visto que o fungo utilizado foi isolado numa temperatura de $43,0 \pm 2,0$ °C (NUNES et al., 2014), era esperado um crescimento, devido a temperatura de incubação, o que não foi observado. O Fungo F1C3 foi utilizado por (SILVA, 2016) e teve seu melhor crescimento na temperatura de 30°C sem pré-tratamento no bagaço utilizado. As fermentações do bagaço *in natura* não mostraram nenhum crescimento do fungo, bem como também não mostraram nenhuma atividade enzimática.

Tendo essas informações pré-estabelecidas, o bagaço de coco verde rico em material lignocelulósico foi tratado por dois diferentes protocolos e submetido à fermentação sólida, incubados a 30°C. Assim, foi observado o mesmo comportamento nos bagaços pré-tratados, inclusive o de tratamento alcalino a 120 minutos, onde foi alcançada a maior remoção de lignina. Uma das possíveis causas para a ausência de atividade pode ser explicada pelo fato de que quando se utiliza fungos na produção dessas enzimas, o pH em que há maior desenvolvimento e maior atividade metabólica, gerando maior produção de enzimas, é ácido, variando entre 4 a 6 (PEREIRA, 2013). Após a etapa de pré-tratamento do bagaço de coco não foi realizada a lavagem do mesmo, com isso, devido a utilização de um reagente alcalino nesta etapa, o pH do meio pode ter sofrido elevação, sendo seu valor superior aos considerados ideais para o processo. Com isso, na realização de trabalhos posteriores, torna-se imprescindível a realização da lavagem do bagaço após o processo de pré-tratamento, acompanhada do monitoramento do pH.

Sales et al. (2010) estudando a produção de celulasas por espécies de *Aspergillus* observaram que as mais altas atividades de celulasas totais ($0,45$ e $0,27$ UI mL⁻¹) foram obtidas no menor pH (6,0) e no maior tempo de cultivo (168 horas).

O tempo de processo também pode ser considerado uma variável importante em processos de produção de enzimas celulolíticas. Em estudo realizado por Castro e Pereira Jr., (2010) verificou-se que quando *Trichoderma reesei* e *Humicola grisea* foram cultivados em substratos insolúveis (celulignina de bagaço de cana-de-açúcar e avicel), foram observadas cinéticas mais lentas de produção das enzimas, especialmente a de origem lignocelulósica, devido a um período inicial de aclimação das células a essa matéria-prima. Já quando a Carboximetilcelulase (CMC) e celobiose foram consideradas, os tempos correspondentes à produção enzimática máxima foram antecipados em cerca de 50 h.

6 CONCLUSÕES

A aplicação do pré-tratamento hidrotérmico não causou alterações significativas na composição do material, porém a aplicação do pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio a 3% promoveu a redução do teor de lignina de 41,79 para 12,91%, no tempo de 120 minutos e temperatura de 120 °C, mostrando-se eficiente, mesmo a uma temperatura que pode ser considerada moderada e baixa concentração de reagente. Apesar do bagaço de coco apresentar altas concentrações de celulose e de ter sido realizada a remoção de lignina, não foi verificada a produção de enzima celulase (CMCase) pelo Fungo F1C3, provavelmente devido a possível alcalinidade do substrato após pré tratamento, visto que o pH do meio pode ser inadequado para o desenvolvimento do microrganismo e conseqüentemente para a produção da enzima.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. v. 29. p. 675-685, 2011.
- AGUIAR, C. M. **Hidrólise Enzimática de Resíduos Lignocelulósicos Utilizando Celulasas Produzidas pelo Fungo *Aspergillus niger***, Dissertação de Mestrado, UNIOESTE, Toledo-PR, 2010.
- AMORIM, B. C. **Estudo da produção de celulasas por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium occidentale* L.) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 86 p. 2010.
- BALAT, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 2, 858-875.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHAE, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.
- BEGUIN, P., AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:25-58, 1994.
- BEUKES, N.; PLETSCHE, B. I. Effect of alkaline pre-treatment on enzyme synergy for efficient hemicellulose hydrolysis in sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 5207-5213, 2011.
- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- CABRAL, M. M. S. **Aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol de segunda geração**. Maceió – AL. Dissertação (PPGEQ). 2015.
- CANNEL, E and MOO-YOUNG, M. Solid State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*, June/July and August/september, 1980.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research*, Amsterdã, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.
- CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, F. D.; RESENDE, S. T.. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. *Revista Analytica*, n. 56, p. 64-76, 2012.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

- CORRADINI, E.; ROSA, M. F.; MACEDO, B.P.; PALADIN, P.D.; MATTOSO, L.H.C. COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PROPRIEDADES MECÂNICAS E TÉRMICAS DA FIBRA DE FRUTOS DE CULTIVARES DE COCO VERDE. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p.837-846, Setembro 2009.
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 20, n. 1, p. 11-21, 2004.
- DILLON, A. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-270.
- EMBRAPA - AGROINDUSTRIAL. 2010. Disponível em: < WWW.embrapa.com>. Acesso em: 19 de Novembro de 2017.
- ESMERALDO, M. A. **Preparação de novos compósitos suportados em matriz de fibra vegetal/natural**. 2006, 119f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ETHERINGTON, D. Bringing hope to remote communities with virgin coconut oil production. **ACIAR Proceedings** 2005;125:57-64.
- FAO. 2012. **World Production. Available in**. Acessado em fevereiro de 2018.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERRAZ, J.M. **Produção e propriedade de painéis de fibra de coco verde (*Cocos nucifera L.*) em mistura com cimento portland**. Brasília – DF, UnB, 2011
- FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2ª ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. 292p.
- FERREIRA, V. **Produção de B-glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 123 p. 2010.
- FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L. M. F., FERRARA, M. A., NEPOMUCENO, A. L., MOLINARI, H. B. C., BON, E. P. S. Biomass residues in Brazil; availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**. 2010; 1: 65-75.
- FUENTES, L. L. G. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 169 p. 2009.
- GALBE, M., ZACCHI, G. **Produção de Etanol a Partir de Materiais Lignocelulósicos, Bioetanol de Cana-de-açúcar P&D para Produtividade e Sustentabilidade**, p.697, Editora Blucher, São Paulo, 2007.
- GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. São Paulo: **Química Nova**, 2009.

GALLÃO, M. I. Parede celular vegetal, 2012. Disponível em: <www.biologia.ufc.br/backup/docentes>. Acesso em: 25 fev. 2018.

GHAFFAR, S.H., FAN, M., , “Lignin in straw and its applications as an adhesive”. *International journal of Adhesion & Adhesives*, v. 48, pp. 92-101. 2014

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

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

GONÇALVES, F. A; RUIZ, H. A; NOGUEIRA, C. C; SANTOS, E. S; TEXEIRA, J.A; MACEDO, G. R, Comparison of deslignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semisimultaneous saccharification and fermentation strategies. *Fuel*, v. 131, p. 66-76, 2015.

GROSSI, E. Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose. 2015
HAMELINK, C. N., HOOIJDONK, G. V., FAAJI, A. PC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. ***Biomass and Bioenergy***. v. 28, p. 384-410, 2005.

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.

IBGE. **Levantamento da produção Agrícola: pesquisa de previsão e acompanhamento das safras agrícolas**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 25, p. 1-88, 2017.

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

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

KRONGTAEW, C., MESSNER, K., TERS, T., FACKLER, K. Characterization of key parameters for biotechnological lignocellulose conversion assessed by FT-NIR spectroscopy. Part I: qualitative analysis of pretreated straw. ***BioResources***. v. 5(4), p. 2063-2080, 2010.

KRÜGER, Cíntia. **SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTER DO BIODIESEL A PARTIR DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**, TOLEDO-PR, 2017 Dissertação (PPGB).

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass, 2008.

LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P. H. M. Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de pedúnculos de caju submetidos a desidratação osmótico-solar. ***Revista Ciência Agronômica.***, v. 34, n. 2, p. 139-145, 2003.

LINS, S.A.S. **PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA EM BAGAÇO DE PEDÚNCULO DO CAJU UTILIZANDO *Trichoderma reesei* LCB 48 - 2012.**

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, Nova York, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR., L. A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2011. 28 p. (Documentos, n. 164).

MARTINS, Carlos Roberto Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional : panorama 2014 / Carlos Roberto Martins – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. 51 p. (**Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros**, ISSN 1517- 1329; 184). Disponível em <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/>

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

MATHEW, A. K.; CHANEY, K.; CROOK, M.; HUMPHRIES, A. C. Dilute acid pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production. **Renewable Energy**. v. 36, p. 2424-2432, 2011.

MATTOS, A. L. A.; ROSA, M. F.; CRISÓSTOMO, L. A.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; VERAS, L. G. C. **Beneficiamento da casca de coco verde.** EMBRAPA, 2011.

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

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

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

MONTEIRO, S. N., TERRONES, L. A. H., D'ALMEIDA, J. R. M. Mechanical performance of coir fiber/polyester composites, **Polymer Testing**, v.27, p.591-595, 2008.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F.; MARCONCINI, J. M.; Procedimentos para Análise Lignocelulósica, **Embrapa – Documentos – 236**, Embrapa algodão, Campina Grande – PB, 2010.

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

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

NASCIMENTO, R. J. A.; FLORENTINO, A. P. P.; SANTOS, E.S.; OLIVEIRA, J.A.; MACEDO, G.R. **Caracterização Qualitativa e Quantitativa do Bagaço da Casca de Coco**

Verde Utilizando Métodos Tradicionais e a Espectroscopia no Infravermelho Próximo(NIRS). UFRN, 2014.

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

OLIVEIRA JÚNIOR, Sergio Dantas de. **Produção de celulases por *Aspergillusfumigatus* através da fermentação em estado sólido e recuperação e purificação por sistema micelar em duas fases aquosas.** NATAL-RN, 2018 Tese (PPGEQ).

OLIVEIRA, F. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana.** 2010. 99f. Dissertação (Mestrado) – Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2010.

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

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

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

PEREIRA, C. L. **Aproveitamento do resíduo do coco verde para a produção de compósitos destinados à construção rural.** 2012. 137p. Tese (Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal) – Departamento de Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2012.

PEREIRA, D.E.P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado.** Goiânia-GO, Dissertação (PPGBCM). 2013.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais,** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2008.

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

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

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulasesofbacterial origin.. **Enzymeand Microbial Technology**, p. 626-644, 1989.

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

- ROSSI, S. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PEREIRA, B. M. P.; GAGO, F. D.; RIZZOLO, J. A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MEDEIROS, A. B. P. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Res. Int.*, v. 42, p. 484-486, 2009.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 30, p. 279-291, 2013.
- SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas como agentes biotecnológicos. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 1, p. 1-7.
- SALES, M.R.; Moura, R.B.; Porto, T.S; Macedo, G.R.; Porto, A.L.F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.11, p.1290-1296, nov. 2010.
- SANTOS, A. M.; AMICO, S. C.; SYDENSTRICKER, T. H. D. **Desenvolvimento de compósito híbrido polipropileno/fibras de vidro e coco para aplicações de engenharia** In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 17º CBCiMat, Foz do Iguaçu, 2006.
- SANTOS, F. A, QUEIRÓZ, J. H. de, COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para Produção de Etanol, **Química Nova**, vol. 35, nº5, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, S. R. dos. Influência da qualidade da madeira de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptusurophylla* e do processo Kraft de polpação na qualidade da polpa branqueada.. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2013.
- SATYANARAYANA, K.G; Guimarães, J.L; Wypych, F. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production: morphology, properties and applications. **Composites: Part A applied science and manufacturing**, n.38. 2007.
- SILVA, A. S., **Pré-Tratamento Do Bagaço De Cana-De-Açúcar Com Líquidos Iônicos: Efeito Na Desestruturação Da Parede Celular E Na Eficiência Da Hidrólise Enzimática**, Tese de Doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, 2013.
- SILVA, Lucas Rodolfo Inácio da. **Produção de celulase por fermentação e estado sólido empregando resíduo de coco verde (Mesocarpo) sob a ação de um fungo isolado na fase termofílica de um processo de compostagem**. Sumé - PB, 2016.
- SIMEONE, M.L.F.; Coelho, L.F.D. ; Souza, E.A.; Leal, M.C.B.; Parrella, R.A.C. **Avaliação do Brix e Perfil de Açúcares em Diferentes Genótipos de Sorgo Sacarino**. Bento Gonçalves- RS. 2016.
- 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.

SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **A introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica.** Aracaju. Documento 47. Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2002. 24p.

SOUZA, O. C.; MELO, R. B.; CANDIDO, A. S.; SILVA, M. G.; FEITOSA, T. B. **Aspectos da comercialização do coco no pólo Petrolina (Pe) e Juazeiro (Ba).** In Congress: Simpósio de Produtividade em Pesquisa e II Encontro de Iniciação Científica do IFPI, 2009.

SOUZA, Renata Beraldo Alencar De . **ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.** São Carlos - SP, 2016 Tese (PPGEQ) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAKAHASHI, H. Aproveitamento de fibra de coco verde com amido de mandioca visando aplicações em sistemas de embalagem. **XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp**, 2009

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

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

VILELA, P. **A água de coco e suas propriedades isotônicas impulsionam a produção de coco verde no país, inclusive no interior.** Sebrae, Brasília, 2010. Portal Sebrae. Acesso em fevereiro 2018.

WATANABE, H., TOKUDA, G., 2010. **Cellulolytic Systems in Insects.** Annual Review of Entomology.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 75-90, 1988.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment Technologies. **Bioresource technology**, n96. 2005.

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

ZHANG, P.; LYND, R. L. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.