



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA DE CIÊNCIA DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

ANDRÉA CRISTIANE FISCHBORN

APROVEITAMENTO DO RESÍDUO SÓLIDO DA HIDRODESTILAÇÃO DE *Aniba parviflora* (Meissn) Mez E *Aniba rosaeodora* Ducke (LAURACEAE): OBTENÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS

MANAUS

2013

ANDRÉA CRISTIANE FISCHBORN

APROVEITAMENTO DO RESÍDUO SÓLIDO DA HIDRODESTILAÇÃO DE *Aniba parviflora* (Meissn) Mez E *Aniba rosaeodora* Ducke (LAURACEAE): OBTENÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

Coorientador: Dr. Lauro Euclides Soares Barata

MANAUS

2013

ANDRÉA CRISTIANE FISCHBORN

APROVEITAMENTO DO RESÍDUO SÓLIDO DA HIDRODESTILAÇÃO DE *Aniba parviflora* (Meissn) Mez E *Aniba rosaeodora* Ducke (LAURACEAE): OBTENÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Banca Examinadora:

Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
Universidade do Estado do Amazonas

Dra. Érica Simplício de Souza
Universidade do Estado do Amazonas

Dra. Teresa Alarcón Castillo
Universidade do Estado do Amazonas

MANAUS

2013

*Aos meus pais Rogério e Leocádia
Aos meus irmãos Adriana e André
Aos meus sobrinhos Luan e Guilherme*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado do Amazonas, em especial ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, pela oportunidade e pela condição oferecida;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso;

À Coleção de Culturas DPUA do laboratório de Micologia da UFAM, por ter cedido a cepa da espécie *Trichoderma harzianum*.

À Escola Superior de Tecnologia (EST/UEA) pelo suporte de laboratórios, da área experimental e de equipamentos;

À todos os professores, funcionários, colegas, amigos e bolsistas dos Laboratórios da EST/UEA, que de uma forma ou de outra contribuíram para execução dos experimentos;

À minha orientadora, Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque, pelos momentos de descontração e principalmente por confiar na minha capacidade;

Aos colegas de pós-graduação, em especial, ao meu amigo MSc. Geverson Façanha da Silva pela segurança e ajuda em diversos momentos do mestrado, compartilhando as alegrias e tristezas, e agradeço, principalmente, pelo carinho e amizade proporcionados;

À minha família pelo apoio e auxílio em vários momentos, principalmente por parte de meus pais, pessoas maravilhosas e que tenho muita admiração.

Obrigada!!!

RESUMO

A indústria de óleos essenciais gera resíduos que podem ser reaproveitados como substratos em processos biotecnológicos. Neste trabalho o resíduo sólido gerado após a extração do óleo essencial de *Aniba parviflora* e *A. rosaeodora* foi utilizado na fermentação sólida de duas espécies fúngicas, *Aspergillus brasiliensis* e *Trichoderma harzianum*, para obtenção de celulase, xilanase e pectinase, enzimas com ampla aplicação industrial. Após o cultivo fúngico, o extrato aquoso obtido foi utilizado para avaliar a atividade celulolítica, xilanolítica e pectinolítica por meio da reação com carboximetilcelulose, xilano e ácido poligalacturônico, respectivamente. Primeiramente, foi realizado um planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , para selecionar as variáveis (umidade do substrato, tempo, temperatura e adição dos nutrientes nitrogênio e fósforo) que influenciam de forma significativa a atividade enzimática, para então definir as melhores condições de cultivo dos fungos em meio sólido que promovam as maiores atividades enzimáticas, utilizando os dois fungos inoculados nas formas de disco micelial e suspensão de esporos, nos dois resíduos. Após, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , onde as melhores variáveis foram selecionadas, utilizando o fungo *A. brasiliensis* inoculado nas formas de disco micelial e suspensão de esporos no resíduo de macacaporanga. Os valores das variáveis tempo de cultivo (9 dias) e temperatura (24°C) foram fixados. O melhor resultado foi apresentado para a atividade enzimática pectinolítica (53,18 U/gbs), utilizando como inóculo disco micelial, umidade 95%, e suplementação do resíduo com 1,5% de nitrogênio e 1,0% de fósforo. Em seguida, foi realizado o planejamento fatorial completo 2^2 , a fim de se obter os melhores resultados para a enzima pectinase, utilizando o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de disco micelial no resíduo de macacaporanga, com 9 dias de cultivo a 24°C. O melhor resultado (211,57 U/gbs) foi obtido utilizando-se 99% de umidade e suplementação do resíduo de macacaporanga com 0,5% de nitrogênio e 1,0% de fósforo. Por meio do planejamento experimental foi possível aumentar em 8,4 vezes a atividade pectinolítica do fungo *A. brasiliensis*. A partir dos resultados obtidos, comprova-se que o resíduo sólido da hidrodestilação pode ser empregado para a produção de enzimas fúngicas, tendo em vista um melhor aproveitamento dos recursos naturais da Amazônia. Contudo, sugere-se que estudos de otimização com outras variáveis sejam realizados, a fim de se obter maiores atividades enzimáticas.

Palavras-chave: resíduo sólido, fermentação sólida, celulase, xilanase, pectinase.

ABSTRACT

The essential oils industry generates waste that can be reused as substrates in biotechnological processes. In this work, the solid waste generated after the extraction of essential oil *Aniba parviflora* (macacaporanga) and *A. rosaeodora* (rosewood) was used in the solid fermentation for two fungal species *Aspergillus brasiliensis* and *Trichoderma harzianum* for obtaining cellulase, xylanase and pectinase, enzymes with wide industrial application. After the fungal culture, the aqueous extract obtained was used to evaluate the cellulolytic, xylanolytic and pectinolytic activity by reacting it with carboxymethylcellulose, xylan and polygalacturonic acid, respectively. First, we conducted a 2^{5-1} experimental design, to select variables (substrate moisture, time, temperature and addition of the nutrients nitrogen and phosphorus) that significantly influence enzyme activity, and then determine the best growing conditions of fungi on solid media that promote the highest enzymatic activities, using both fungi inoculated in the form of mycelia disks and spore's suspension on the two residues. After, it was carried out a 2^3 full factorial design, where the best variables were selected using the fungus *A. brasiliensis* inoculated as mycelia disks and spore's suspension on macacaporanga's residue. The value of variables cultivation time (9 days) and temperature (24°C) were fixed. The best result was obtained for pectinolytic enzyme activity (53.18 U/gbs), using as inoculum mycelial disks, 95% moisture content, and the supplementation of the residue with 1.5% nitrogen and 1.0% phosphorus. Then it was performed a 2^2 full factorial design in order to obtain the best results for pectinase enzyme, using the fungus *A. brasiliensis* inoculated as mycelial disks on the macacaporanga's residue, during a 9 days at 24°C. The best result (211.57 U/gbs) was observed when using 99% moisture content and the residue was supplemented with 0.5% nitrogen and 1.0% phosphorus. Using the experimental design it was possible to increase *A. brasiliensis* pectinolytic activity by 8.4 times. From the results, it was proven that the solid residue of the steam distillation can be employed for the production of fungal enzymes in order to make better use of Amazon natural resources. However, it is suggested that more detailed optimization studies with other variables should be performed in order to obtain higher enzymatic activities.

Keywords: solid waste, solid fermentation, cellulase, xylanase, pectinase.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke (pau-rosa). | 21 |
| Figura 2 - <i>Sassafras albidum</i> (Nutt.) Nees. | 21 |
| Figura 3 - <i>Laurus nobilis</i> L. (louro). | 21 |
| Figura 4 - <i>Cinnamomum verum</i> (canela). | 21 |
| Figura 5 - <i>Persea americana</i> Mill (abacate). | 22 |
| Figura 6 - <i>Ocotea porosa</i> (Nees.) L. Barroso (imbuia). | 22 |
| Figura 7 - Estrutura química do linalol. | 23 |
| Figura 8 - Plantio de <i>Aniba parviflora</i> , Fazenda Pematec, Santarém/PA. | 24 |
| Figura 9 - Plantio de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, Fazenda Magaldi, Maués/AM. | 26 |
| Figura 10 - Sistema Clevenger sendo utilizado na extração do óleo essencial de folhas e galhos. | 30 |
| Figura 11 - Fluxograma simplificado das etapas envolvidas na obtenção do óleo essencial... 31 | 31 |
| Figura 12 - Resíduo sólido gerado na indústria de extração de óleo essencial. | 31 |
| Figura 13 - Fluxograma das etapas de uma fermentação sólida. | 34 |
| Figura 14 - Gênero <i>Aspergillus</i> | 38 |
| Figura 15 - Gênero <i>Trichoderma</i> | 38 |
| Figura 16 - Estrutura química da celulose. | 40 |
| Figura 17 - Estrutura química da xilana. | 44 |
| Figura 18 - Estrutura química da pectina. | 45 |
| Figura 19 - Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem. | 53 |
| Figura 20 - Resíduo sólido autoclavado. | 55 |
| Figura 21 - Amostra do extrato bruto. | 55 |
| Figura 22 - Curvas analíticas para a quantificação de açúcares redutores equivalentes à glicose (a), xilose (b) e ácido D-galacturônico (c). | 62 |

| | |
|---|----|
| Figura 23 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática celulolítica do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo de pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d). | 71 |
| Figura 24 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática celulolítica do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d). | 72 |
| Figura 25 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática celulolítica do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração do fósforo; cultivado no resíduo de pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) como uma função da umidade e da temperatura; e cultivado no resíduo de pau-rosa e inoculado na forma de suspensão de esporos (d) como uma função da umidade e da concentração do fósforo. | 75 |
| Figura 26 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática xilanolítica do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d). | 79 |
| Figura 27 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática xilanolítica do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d). | 81 |
| Figura 28 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração do nitrogênio; inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d) como uma função da concentração do fósforo e da umidade. | 83 |
| Figura 29 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da concentração do nitrogênio e do fósforo; inoculado na forma de disco micelial (c) como uma função da temperatura e da umidade. | 85 |
| Figura 30 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (a) como uma função da umidade e do tempo; inoculado na forma de suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração do nitrogênio; inoculado na forma de suspensão de esporos (c) como uma função da umidade e da temperatura; inoculado | |

na forma de suspensão de esporos (d) como uma função da temperatura e da concentração do nitrogênio. 86

Figura 31 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d). 89

Figura 32 - Superfície de resposta para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da temperatura; cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio e inoculado na forma de suspensão de esporos (d) como uma função da umidade e da temperatura. 91

Figura 33 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática celulolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b). 96

Figura 34 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática celulolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b). 99

Figura 35 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática celulolítica inoculado na forma de disco micelial como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (a), como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio (b); e inoculado na forma de suspensão de esporos como uma função da umidade e da concentração de fósforo (c) e como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (d). 100

Figura 36 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b). 102

Figura 37 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b). 105

Figura 38 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (a), como uma da umidade e da concentração de fósforo (b) e como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio (c). 106

Figura 39 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de

suspensão de esporos como uma função da umidade e da concentração de fósforo (a), como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (b) e como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio (c). 108

Figura 40 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b). 110

Figura 41 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b). 113

Figura 42 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração de fósforo. 114

Figura 43 - Diagrama de Pareto para atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 116

Figura 44 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 118

Figura 45 - Superfície de resposta para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga como uma função da umidade e da concentração do fósforo obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 119

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Campo de contagem da câmara de Neubauer com as respectivas áreas, volumes e fatores de conversão para mL..... | 54 |
| Tabela 2 - Variáveis e seus níveis utilizados para os ensaios de fermentação sólida. | 54 |
| Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} | 58 |
| Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3 | 59 |
| Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^2 | 59 |
| Tabela 6 - Soluções estoque adicionadas aos diferentes ensaios do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , com seus respectivos volumes e concentrações de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 para 100 mL de água destilada, em função da umidade desejada..... | 61 |
| Tabela 7 - Atividades enzimáticas de celulase, xilanase e pectinase, obtidas a partir do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} para os ensaios de fermentação sólida utilizando como substrato os resíduos de macacaporanga e pau-rosa e o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos..... | 64 |
| Tabela 8 - Atividades enzimáticas de celulase e xilanase, obtidas a partir do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} para os ensaios de fermentação sólida utilizando como substrato os resíduos de macacaporanga e pau-rosa e o fungo <i>Trichoderma harzianum</i> inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. | 65 |
| Tabela 9 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática celulolítica obtida com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos..... | 73 |
| Tabela 10 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática xilanolítica obtida com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos..... | 82 |
| Tabela 11 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos..... | 90 |
| Tabela 12 - Soluções estoque adicionadas aos diferentes ensaios do planejamento fatorial completo 2^3 , com seus respectivos volumes e concentrações de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 para 100 mL de água destilada, em função da umidade desejada..... | 93 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 13 - Atividades enzimáticas de celulase, xilanase e pectinase, obtidas a partir do planejamento experimental fatorial completo 2^3 para os ensaios de fermentação sólida utilizando o resíduo de macacaporanga e o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. | 94 |
| Tabela 14 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática celulolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. ... | 97 |
| Tabela 15 - Análise de variância do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para atividade enzimática celulolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. | 98 |
| Tabela 16 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática xilanolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. . | 103 |
| Tabela 17 - Análise de variância do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para atividade enzimática xilanolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. | 104 |
| Tabela 18 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. . | 111 |
| Tabela 19 - Análise de variância do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos. | 111 |
| Tabela 20 - Soluções estoque adicionadas aos diferentes ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 , com seus respectivos volumes e concentrações de KH_2PO_4 para 100 mL de água destilada, em função da umidade desejada..... | 115 |
| Tabela 21 - Atividade enzimática pectinolítica obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 utilizando o resíduo de macacaporanga e o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> inoculado na forma de disco micelial..... | 116 |
| Tabela 22 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga. | 117 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 23 - Análise de variância para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado no resíduo de macacaporanga. | 117 |
|---|-----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC – Atividade Enzimática Celulolítica

AEP – Atividade Enzimática Pectinolítica

AEX – Atividade Enzimática Xilanolítica

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CITES – Comércio Internacional de Espécie da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção

CMC - Carboximetilcelulose

C:N – Carbono:Nitrogênio

CO₂ – Gás Carbônico

DM – Disco Micelial

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalisílico

FS – Fermentação Sólida

FES – Fermentação no Estado Sólido

INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

KH₂PO₄ – Fosfato Monobásico de Potássio

N – Nitrogênio

NH₄NO₃ – Nitrato de Amônio

NaCl – Cloreto de Sódio

P – Fósforo

R² – Coeficiente de Regressão Linear

SE – Suspensão de Esporos

T – Temperatura

t – tempo

U – Umidade

UEA – Universidade do Estado do Amazonas

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFOPA – Universidade do Oeste do Pará

Unicamp – Universidade de Campinas

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1 FAMÍLIA LAURACEAE | 20 |
| 2.1.1 Gênero <i>Aniba</i> | 23 |
| 2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS | 27 |
| 2.2.1 Métodos de Extração dos Óleos Essenciais | 28 |
| 2.2.2 Resíduos Obtidos da Hidrodestilação..... | 30 |
| 2.3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS..... | 32 |
| 2.4 FERMENTAÇÃO SÓLIDA (FS) | 33 |
| 2.4.1 Variáveis que Influenciam a Fermentação Sólida..... | 34 |
| 2.5 FUNGOS | 37 |
| 2.5.1 Fungos como Agentes em Bioprocessos..... | 38 |
| 2.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS | 38 |
| 2.6.1 Celulase | 39 |
| 2.6.2 Xilanase | 42 |
| 2.6.3 Pectinase | 45 |
| 2.7 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS | 48 |
| 3 OBJETIVOS | 51 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 51 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 51 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 52 |
| 4.1 RESÍDUO SÓLIDO | 52 |
| 4.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE | 52 |
| 4.3 MICRORGANISMOS | 52 |

| | |
|---|------------|
| 4.4 INÓCULOS..... | 53 |
| 4.4.1 Disco Micelial..... | 53 |
| 4.4.2 Suspensão de Esporos | 53 |
| 4.5 CULTIVO DOS FUNGOS UTILIZANDO A FERMENTAÇÃO SÓLIDA | 54 |
| 4.6 ENSAIO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS | 55 |
| 4.6.1 Atividade Celulolítica..... | 55 |
| 4.6.2 Atividade Xilanolítica | 56 |
| 4.6.3 Atividade Pectinolítica | 56 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA | 57 |
| 4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 58 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 60 |
| 5.1 CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES NUTRIENTES | 60 |
| 5.2 CURVAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA | 61 |
| 5.3 OBTENÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS | 63 |
| 5.3.1 Triagem das Variáveis Significativas para o Processo Fermentativo | 65 |
| 5.3.2 Estudo das Melhores Condições de Cultivo Utilizando o Planejamento Experimental Fatorial Completo 2³..... | 92 |
| 5.3.3 Estudo das Melhores Condições de Cultivo Utilizando o Planejamento Experimental Fatorial Completo 2²..... | 114 |
| 6 CONCLUSÃO | 120 |
| REFERÊNCIAS | 121 |

1 INTRODUÇÃO

As plantas da família Lauraceae apresentam-se amplamente distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, ocorrendo em todo o mundo, principalmente nas florestas da América Central e do Sul (VAN DER WERFF e RICHTER, 1996). Esta família possui espécies de elevado valor econômico, com diversas utilizações, tais como alimentares (RIBEIRO et al., 1999), aromáticas e produtoras de óleos voláteis, além de espécies com amplo uso na medicina popular, fornecedoras de madeira, utilizadas na fabricação de papel, compensado e produção de energia (MARQUES, 2001).

A família Lauraceae apresenta o gênero *Aniba*, a qual compreende cerca de 40 espécies cuja maioria encontra-se na Amazônia. Algumas espécies são exploradas para a preparação de produtos medicinais, porém as espécies desse gênero são mais conhecidas pela produção e constituição dos seus óleos essenciais para a indústria de perfumaria, destacando-se a espécie *Aniba roseadora* Ducke, conhecida como pau-rosa, que possui o linalol como principal constituinte do seu óleo essencial, muito utilizado como fixador (MELO et al., 2006). Outras espécies, como *A. canellila* (H.B.K) Mez (preciosa) e *A. parviflora* (Meissn) Mez (macacaporanga) também são usadas na perfumaria (MARQUES, 2001).

Técnicas de extração dos compostos aromáticos de plantas, incluindo os óleos essenciais e os extratos, são citadas na literatura, entre elas a extração com solventes orgânicos, enfloração, prensagem ou utilização de CO₂ supercrítico, hidrodestilação por arraste a vapor (PYBUS e SELL, 1999; SIMÕES et al., 2001). Nesta última, além de se obter resíduo líquido, conhecido como hidrolato, também se obtêm resíduos sólidos, os quais podem ser utilizados como substratos em bioprocessos.

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo assim, para a redução de problemas ambientais (MACIEL, 2006).

Muitas são as fontes de enzimas utilizadas industrialmente. Embora algumas sejam extraídas de tecidos animais e vegetais, as enzimas usadas na indústria são geralmente obtidas

de microrganismos. A grande variedade e disponibilidade de bactérias, leveduras e fungos, aliada ao domínio das técnicas de cultivo, tornam as enzimas de origem microbiana as mais utilizadas em processos industriais. Apesar de um microrganismo ser capaz de produzir mais de mil enzimas distintas, é necessário um trabalho cuidadoso para o isolamento de espécies que produzam determinadas enzimas com as características desejadas (FABER, 2004).

Os ambientes tropicais brasileiros mostram uma rica biodiversidade, tornando-se promissores para a pesquisa de novos microrganismos com aplicações biotecnológicas, em especial os fungos. Numerosos fungos, como os dos gêneros, *Trametes*, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são capazes de produzir celulasas, xilanase e pectinases em diferentes condições (SOUZA et al., 2009). A necessidade de se obter enzimas industriais de maneira economicamente viável determina a busca de matérias-primas renováveis e de baixo custo para o processo de produção das mesmas. Os resíduos agroindustriais que possuem em sua composição material lignocelulósico demonstram potencial como meio de cultura para produção das enzimas celulase, xilanase e pectinase (BCC, 2005).

Diversos estudos têm reportado a produção destas enzimas utilizando a Fermentação Sólida (FS), processo onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos (SOUZA et al., 2009), que se apresenta como uma excelente alternativa para a utilização de resíduos agroindustriais (SILVA et al., 2005; RODRÍGUEZ-ZUÑIGA et al., 2008; SINGHANIA et al., 2009).

As xilanasas são um grupo de enzimas presente nas mais diversas aplicações industriais, destacando-se especialmente na indústria de polpa e papel, com significativa expansão de aplicações no setor de alimentos e em rações animais. São enzimas que degradam a xilana, a qual é o principal componente da hemicelulose vegetal (METZLER, 2001).

A celulase também é uma enzima de grande interesse industrial. O nome celulase corresponde às diversas enzimas presentes na biodegradação da celulose, polímero vegetal mais abundante na natureza. A aplicação industrial das celulasas atinge áreas como a produção de bebidas, alimentos, rações, indústria têxtil, bem como a hidrólise enzimática da celulose, com objetivo de se obter açúcares fermentáveis, utilizados para produção de biocombustíveis (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécicas (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). Podem ser

produzidas, em diferentes combinações, por plantas e por microrganismos, como fungos, leveduras e bactérias (SILVA et al., 2005). Conforme Uenojo e Pastore (2007) as pectinases são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas (filtração e clarificação), de vinho (tratamento preliminar da uva), óleos vegetais (melhorar a extração) e indústria têxtil e de papel (tratamento e degomagem de fibras vegetais).

Muitos produtos de utilidade para o homem são obtidos por processos biotecnológicos, os quais despertam grande interesse aos pesquisadores e à indústria. O campo de bioprocessos aplicados, também denominado por alguns autores de biotransformação ou tecnologia enzimática, é uma das ferramentas mais promissoras da biotecnologia (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004), em especial para o aproveitamento de resíduos.

Portanto, neste trabalho, foi investigada a produção de enzimas fúngicas com aplicação industrial a partir do aproveitamento do resíduo da obtenção do óleo essencial de duas espécies de Lauráceas, visando a utilização sustentável de plantios florestais que possibilite o desenvolvimento de tecnologias adequadas à realidade da Região Amazônica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta, aproximando-se de outras famílias devido as suas características morfológicas e anatômicas como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (CRONQUIST, 1988). Seu nome é originado do gênero *Laurus* L., que em latim significa louro. Porém, a literatura indica que esse nome é oriundo de *laus* – louvor, em referência às coroas de louro que eram oferecidas aos heróis em louvor a atos de bravura (ALVES e PAULA, 1997).

Com cerca de 50 gêneros e 2.750 espécies, a maioria dos representantes da família Lauraceae é constituída por árvores e arbustos. Esta família é pantropical, comum em regiões tropicais e subtropicais, com alta diversidade de espécies no norte da América do Sul, sudeste da Ásia e Madagascar (JUDD et al., 1999; MADRIÑÁN, 2004), e com poucas espécies em regiões temperadas. Já na América Central, com ampla diversidade, ocorrem cerca de 30 gêneros e 900 espécies (VICENTINI, VAN DER WERFF e NICOLAU, 1999).

No Brasil ocorrem 22 gêneros e cerca de 390 espécies, com alta diversidade nas florestas pluviais e também nas restingas e no cerrado (BARROSO et al., 2002). Na Mata Atlântica, as espécies da família Lauraceae são as mais representativas, ocorrendo nos mais diversos ecossistemas.

As espécies desta família possuem considerável importância econômica. Suas madeiras são usadas em construções leves e pesadas e em móveis de luxo, algumas espécies são frutíferas, oleaginosas, fornecedoras de condimentos e usadas na medicina popular (INPA, 1991; MOURA, WALTER FILHO e ABSY, 1993; VAN DEN BERG, 1993; BRITO e BRITO, 1993; RIZZINI e MORS, 1995). Indústrias também utilizam plantas desta família para fabricação de diversos produtos, destacando-se as espécies aromáticas e produtoras de óleos, as quais alcançam um alto valor no mercado. As espécies aromáticas desta família estão compreendidas principalmente entre os gêneros: *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Licaria* e *Dicypellium* (MARQUES, 2001).

Entre as espécies importantes economicamente podem ser mencionadas *A. duckei* Ducke; *A. rosaeodora* Ducke (Figura 1); *A. canellila*; *A. guianensis*; *L. puchury-major*; *O.*

odorifera e *Sassafras albidum* (Nutt.) Nees (Figura 2), produtoras de óleos essenciais, usadas em perfumaria e na indústria farmacêutica; *O. aciphylla* (Nees) Mez; *O. spectabilis* (Meissn.) Mez; *O. teleiandra* (Meissn.) Mez; *O. guianensis* Aubl.; *O. barcellensis* Mez; *L. puchury-major* Kosterm.; *A. riparia* (Nees) Mez e *A. hostmanniana* (Nees) Mez), utilizadas na medicina popular; *Laurus nobilis* L (louro) (Figura 3) e *Cinnamomum verum* (canela) (Figura 4), usadas na culinária; *Persea americana* Mill (abacate) (Figura 5), espécie muito conhecida por seus frutos comestíveis (RIZZINI e MORS, 1976).

Figura 1 - *Aniba rosaedora* Ducke (pau-rosa). Figura 2 - *Sassafras albidum* (Nutt.) Nees.



Fonte: qnint.sbjq.org.br



Fonte: amkennerdell.com

Figura 3 - *Laurus nobilis* L. (louro).



Fonte: myspiceblends.com

Figura 4 - *Cinnamomum verum* (canela).



Fonte: en.wikipedia.org

Figura 5 - *Persea americana* Mill (abacate). Figura 6 - *Ocotea porosa* (Nees.) L. Barroso (imbuia).



Fonte: hort.purdue.edu



Fonte: fm1.fieldmuseum.org

Outras espécies, como *Beilschmiedia rígida* (Mez) Kosterm, *Nectandra rígida* (H.B.K) Nees; *O. porosa* (Nees.) L. Barroso (Figura 6); *O. puberula* (Nees.); *O. guianensis* Aubl.; *O. acutifolia* Mez; *O. aciphylla* (Nees) Mez; *A. terminalis* Ducke fornecem madeira de lei e são amplamente usadas em marcenaria, na construção civil, na fabricação de papel, compensado e produção de energia (VATTIMO, 1956; BARROS et al., 1997).

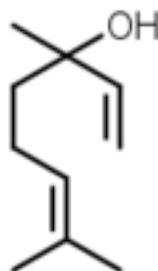
As espécies da família Lauraceae apresentam características morfológicas marcantes: porte geralmente arbóreo variando de arbustos a árvores de dossel, raramente lianescente. As folhas são alternas, inteiras, peninérveas ou 3-5 nérveas, glabras ou pilosas; inflorescências paniculadas e fruto do tipo baga, drupa ou núcula (BARROSO et al., 1999; 2002). Para reconhecimento no campo, são observadas características como tronco liso e lenticelado, odor de óleo volátil ao corte, muitas vezes presentes também nas folhas.

A maioria dos seus gêneros não pode ser distinguida seguramente com base apenas em caracteres vegetativos (ROHWER, 1993). O gênero *Aniba*, um dos mais importantes dessa família, é conhecido por suas espécies aromáticas.

2.1.1 Gênero *Aniba*

O gênero *Aniba* compreende cerca de 40 espécies cuja maioria encontra-se na Amazônia. Algumas espécies são exploradas para a preparação de produtos medicinais, porém as espécies desse gênero são mais conhecidas pelo seu alto valor econômico na produção e constituição química dos óleos essenciais, encontrados em grande quantidade principalmente no lenho e na casca, para a indústria de perfumaria (MELO et al., 2006). Em 1881, Morim purificou o óleo essencial de *A. roseodora* e o chamou de linalol, seu principal constituinte (MARQUES, 2001), cuja estrutura química está apresentada na Figura 7.

Figura 7 - Estrutura química do linalol.



O rendimento do óleo extraído de folhas frescas de espécies nativas de *A. roseodora* Ducke pode chegar a até 2,4%, o que é excelente comparado com outras espécies aromáticas, fornecendo até 90% de linalol (ARAÚJO et al., 1971). O linalol e seus ésteres, como acetato de linalila, são matérias odoríferas de cheiro intenso e agradável. Esse álcool é um importante intermediário na produção de vitamina E (OHASHI, 1997).

As espécies produtoras de óleos do gênero *Aniba* podem ainda ser separadas em três grupos, de acordo com o constituinte químico predominante no óleo essencial: o grupo do linalol formado pelas espécies *A. roseodora* e *A. duckei*; o grupo do benzoato que reúne as espécies *A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri* (Meiss.) Mez, *A. burchelli* Kosterm., *A. parviflora*, *A. permolis* (Nees) Mez e *A. guianensis* Aubl.; e o grupo do alibenzeno com as espécies *A. canellila*, *A. hostmanniana* (Nees) Mez e *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm (MORAES et al., 1972; GOTTLIEB et al., 1981).

2.1.1.1 *Aniba parviflora* (Meissn) Mez

A *Aniba parviflora* (Meissn) Mez, conhecida popularmente como macacaporanga, é uma espécie nativa da Amazônia, e é bastante semelhante à *A. rosaeodora* (pau-rosa), da qual se extrai um óleo essencial que é altamente valioso. O óleo da *A. parviflora* pode ser obtido a partir de suas folhas e galhos, apresentando em média 35% de linalol e se caracteriza por um aroma forte e agradável. Esta espécie pertencente ao grupo benzoato, é usada em perfumaria, porém sua ocorrência é muito rara, o que restringe sua exploração (MARQUES, 2001).

A macacaporanga é uma árvore de médio porte, encontrada nos arredores de igarapés da Floresta Amazônica Ocidental, distribuída nas localidades de Santarém, Faro e médio rio Tapajós (REVILLA, 2002). Por ser bastante aromática, sua madeira e seus ramos, quando secos e transformados em pó, são utilizados como sachês aromatizantes (CORRÊA, 1974) e em “banhos de cheiro” (RODRIGUES, 1989) pela população da região. Na Figura 8, observa-se um plantio de macacaporanga em Santarém, PA.

Figura 8 - Plantio de *Aniba parviflora*, Fazenda Pematec, Santarém/PA.



Fonte: Barata, 2010.

Na década de 1970 alguns trabalhos foram desenvolvidos com a espécie *A. parviflora*, como o de Bittencourt e colaboradores (1971), onde a partir da madeira da espécie, crescente na densa floresta perto de Santarém no vale do Amazonas, foram isolados e fracionados cromatograficamente quatro produtos naturais (6-stiril-2-pironas), dos quais três eram inéditos e suas estruturas químicas foram confirmadas por meio de síntese, principalmente com

análises espectroscópicas. O quarto produto natural, previamente isolado e identificado, apresentou-se, também em outras espécies de *Aniba*, incluindo *A. duckei* Kosterm, *A. rosaeodora* Ducke, *A. fragrans* Ducke e *A. firmula* (Nees and Mart.) Mezn. Rezende e colaboradores (1971) realizaram outro estudo utilizando a madeira do tronco de *A. parviflora*, isolando dois novos componentes: 6-(4'-hidroxi-trans-stiril)-2-pironas e 6-(3',4'-di-hidroxi-trans-stiril)-2-pironas, complementando o trabalho descrito anteriormente.

Pesquisas científicas recentes com *A. parviflora* estão sendo realizadas na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), em Santarém/PA, em cooperação com a Unicamp e o Instituto Butantan, sobre o cultivo e a extração do óleo essencial. Um dos trabalhos realizados visa o estudo da composição química e influência da variação sazonal no rendimento de óleo essencial de *A. parviflora*. O outro trabalho visa à avaliação do efeito dos diferentes substratos na germinação das sementes, e na descrição da morfologia de plântulas de *A. parviflora*, realizado no Viveiro Florestal da UFOPA, utilizando-se 90 sementes coletadas no plantio da Fazenda Pematec. O trabalho de Pereira (2012) teve como objetivo analisar a composição química e o rendimento do óleo essencial extraído de folhas, flores, frutos, caules, caulículos e folíolos, bem como avaliar os aspectos morfofisiológicos (biometria, germinação e desenvolvimento de plântulas) de *A. parviflora* cultivadas no município de Santarém-PA.

Também está sendo desenvolvido um trabalho no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), em Manaus/AM em parceria com a UEA, com o objetivo de investigar as características químicas dos óleos essenciais e extratos alcoólicos de folhas e galhos em cultivos de *A. parviflora*.

2.1.1.2 *Aniba rosaeodora* Ducke

A *Aniba rosaeodora* Ducke (Figura 9) é uma árvore conhecida como pau-rosa. Seu óleo é utilizado na fabricação de cosméticos, perfumes caseiros, sprays para aromatizar ambientes e em loções com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) para reumatismo. Na aromaterapia, o óleo essencial é aconselhado como estimulante celular, regenerador de tecidos, antidepressivo, tônico dos nervos, calmante e contra dores de cabeça e náuseas. Na cosmetologia, é indicado para cuidado com peles sensíveis, pele envelhecida, rugas, cicatrizes, lesões, acne e dermatite. Indicado, também, para qualquer tipo de preparado para o

corpo ou a pele (óleos de banho, loções, máscaras e massagens faciais). No interior do Estado do Amazonas, as lavadeiras utilizam-na durante o último enxágue das roupas, para conferir aroma de limpeza (LUPE, 2007).

Figura 9 - Plantio de *Aniba rosaeodora* Ducke, Fazenda Magaldi, Maués/AM.



Fonte: Barata, 2011.

O pau-rosa amazônico é uma espécie florestal nativa da Região Amazônica. Sua árvore pode atingir até 30 m de altura e 1 m de diâmetro de seu tronco em floresta primária, tendo sua ocorrência natural ao sul e ao norte do Rio Amazonas. Tem casca pardo-avermelhada, folhas semicoriáceas, lisas e inflorescência em panículas multifloras delicadas. As flores são ferrugíneas e o fruto é uma drupa, de 2 a 3 cm de comprimento, com cúpula bastante espessa. O tipo de vegetação onde ocorre é de floresta tropical úmida de terra firme (VIEIRA, 1979; MAGALHÃES e ALENCAR, 1979).

Análises do óleo essencial das folhas de *A. rosaeodora* apresentaram alta concentração de linalol extraído da madeira, cerca de 85%, e nas folhas, cerca de 81% (LUPE, 2007). O pau-rosa é uma espécie de grande valor econômico, devido à produção do linalol, óleo obtido por destilação das folhas, galhos, madeira e raízes, com alta demanda no mercado nacional e internacional, tendo em vista seu uso como fixador na indústria de perfumes (HANDA, SAMPAIO e QUISEN, 2005).

Pelo fato de possuir importância econômica, a espécie *A. rosaeodora* teve uma exploração de forma não planejada, levando à erosão genética, que impediu sua regeneração natural. Esta espécie faz parte do anexo II da Convenção sobre o Comércio Internacional de

Espécie da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção – CITES desde junho de 2010, o que significa que é uma espécie ameaçada de extinção e precisa de um maior cuidado em seu comércio (IBAMA, 2011).

Assim, os trabalhos utilizando o uso de galhos e folhas na extração de óleo essencial, se tornam necessários, pois demonstram que a quantidade e a qualidade do óleo são boas, sem precisar derrubar a árvore. No trabalho de Sampaio e colaboradores (2007), foi avaliado se a capacidade da rebrota da copa das árvores de pau-rosa diminui com o número de podas realizadas; os autores também quantificaram a biomassa da rebrota num período de 36 meses após a poda e avaliaram se a produção de biomassa da rebrota da copa estava associada com alguns parâmetros. Concluiu-se que a capacidade de rebrota de árvores adultas, aliado à maior produtividade de óleo a partir de galhos e folhas pode constituir uma alternativa para o manejo, por meio de plantios através de podas sucessivas.

No trabalho de Chaar (2000), o óleo essencial contido em folhas e galhos finos do pau-rosa foi objeto de estudos analíticos, com a finalidade de caracterizá-lo física e quimicamente, visando o aproveitamento desse importante produto vegetal sob uma forma inteiramente sustentável. A modificação química do linalol foi proposta, visando sua aplicação industrial. Como resultado, mostrou-se uma grande possibilidade para a exploração do óleo de folhas e galhos finos, com a adição de alto valor agregado ao óleo essencial.

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são misturas complexas de substâncias voláteis, com solubilidade baixa em água e solúveis em solventes orgânicos, geralmente odoríferas e líquidas a temperatura ambiente, com aparência de óleo. São chamados de essências por possuírem a volatilidade como principal característica. São princípios imediatos de origem vegetal, próprios de vários grupos de espécies. Outra característica importante dos óleos essenciais é o aroma agradável e intenso (SIMÕES e SPITZER, 1999).

Os óleos essenciais constituem, de uma maneira geral, uma mistura muito complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e aromáticos, encontrados em todo tecido vivo de plantas, em geral concentrados na casca, nas flores, nas folhas, nos rizomas e nas sementes (ARAÚJO, 1995). Eles podem ser utilizados nas indústrias: farmacêutica, como fragrância em

cosméticos, perfumaria, sabonetes, aromatizantes de ambientes, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, como, por exemplo, detergentes, sabões, desinfetantes, plásticos, tintas, borrachas, repelentes de insetos, além de seu emprego como intermediários sintéticos de perfumes (COSTA, 1994; WOOLF, 1999; MAIA, ZOGHBI e ANDRADE, 2001).

2.2.1 Métodos de Extração dos Óleos Essenciais

Os métodos de extração de óleos essenciais variam de acordo com o estado em que a planta se encontra (CRAVEIRO et al., 1981; CHAAR, 2000) assim, como para cada finalidade do óleo pode-se optar por uma técnica diferente. Dentre as técnicas empregadas na extração dos óleos essenciais, inclui-se a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfloração, gases supercríticos e micro-ondas (GUENTHER, 1972; SANTOS et al., 2004).

2.2.1.1 Enfloração

Conforme Simões e colaboradores (2003), esse método já foi muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumaria, sendo utilizadas algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. Consiste na deposição das pétalas à temperatura ambiente sobre uma camada de gordura durante certo período de tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Visando a obtenção de um óleo volátil, o álcool é destilado à baixas temperaturas e o produto, assim obtido, possui alto valor comercial.

2.2.1.2 Prensagem

Esse método é empregado para a extração dos óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES e SPITZER, 1999).

2.2.1.3 Extração com Solventes Orgânicos

O processo de extração utilizando solvente consiste em colocar um solvente orgânico em contato com a matriz vegetal. Após um intervalo de tempo, suficiente para que ocorra a transferência dos constituintes solúveis presentes na planta, efetua-se a separação das fases sólida e líquida. O óleo é obtido pela evaporação do solvente presente na fase líquida (STEFFANI, 2003).

2.2.1.4 Extração por Fluido Supercrítico

Esse método é uma opção para extração industrial de óleos essenciais, pois permite recuperar os aromas naturais de vários tipos, não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31° C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (FUH et al., 1996; SIMÕES e SPITZER, 1999).

2.2.1.5 Arraste por Vapor d'água

Existem três tipos de extração para a técnica de arraste por vapor d'água na indústria de óleos essenciais, distinguidas pela forma na qual se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor. A primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira. Na segunda, chamada de destilação pela água e vapor, a amostra permanece contida em um recipiente logo acima da água da caldeira, ficando assim separada da água. Na terceira, chamada propriamente de destilação pelo vapor de água, a amostra é mantida em um recipiente separado e o vapor de água que flui provém de um gerador próprio independente (CRAVEIRO et al., 1981; SIMÕES e SPITZER, 1999).

A indústria utiliza, de preferência, o terceiro método de extração, por ser reduzido o contato da amostra com a água e por ser menos acentuada a hidrólise dos ésteres, a oxidação

de componentes voláteis e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos (BRUNETON, 1991; COSTA, 1994; FUH et al., 1996).

Na técnica de hidrodestilação, em escala laboratorial (SANTOS et al., 2004), o sistema Clevenger (Figura 10) é o mais conhecido e bastante utilizado, através do método de coobação (recirculação de águas condensadas). Construído em vidro e operando em tempos longos, pode apresentar bons resultados, mas com limitações quanto à quantidade de matéria-prima que suporta (ATKINS, 1990).

Figura 10 - Sistema Clevenger sendo utilizado na extração do óleo essencial de folhas e galhos.



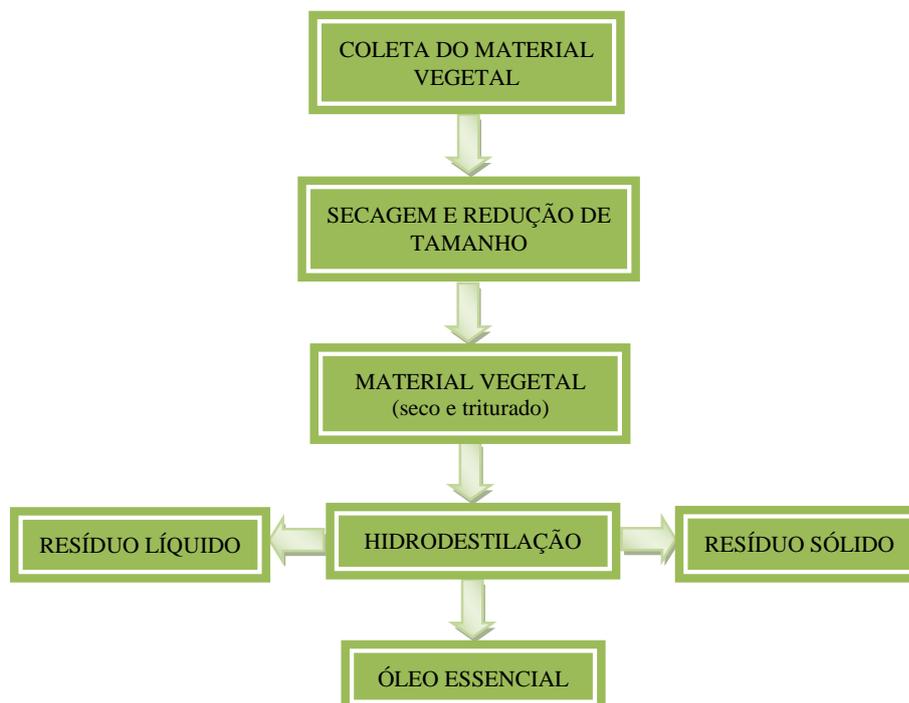
Fonte: Fischborn, 2012.

2.2.2 Resíduos Obtidos da Hidrodestilação

Ao final do processo da hidrodestilação se obtêm resíduos sólidos e líquidos, os quais muitas vezes são descartados diretamente no meio ambiente, sem serem aproveitados para outros fins. Na Figura 11, observa-se um fluxograma simplificado das etapas envolvidas na obtenção de óleo essencial e geração de subprodutos.

A água residual desse método de extração é chamada de hidrolato, sendo normalmente rica em compostos do óleo essencial solubilizados. Muitas vezes o hidrolato é descartado em rios, gerando um foco de poluição, que pode prejudicar o ecossistema aquático.

Figura 11 - Fluxograma simplificado das etapas envolvidas na obtenção do óleo essencial.



Já o resíduo sólido (Figura 12), muitas vezes é reutilizado pela própria indústria de extração de óleo essencial, na queima do mesmo, gerando energia. Mas este resíduo pode ser destinado para outras finalidades, como, por exemplo, adubo agrícola ou suplementação em ração animal, sendo necessários estudos sobre a composição centesimal deste. Outra aplicação viável para o resíduo sólido da extração de óleos essenciais é o seu uso como substrato em bioprocessos, para o cultivo de microrganismos e obtenção de metabólitos de interesse.

Figura 12 - Resíduo sólido gerado na indústria de extração de óleo essencial.



Fonte: Barata, 2011.

2.3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O Brasil é um país rico em biomassa e em resíduos agroindustriais. O acúmulo destes resíduos gera poluição no meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. (PANDEY et al., 2000).

Os resíduos agroindustriais depois de gerados necessitam de destino adequado, pois, além de criar potenciais problemas ambientais, representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. Se for empregada uma tecnologia adequada, estes materiais podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (AQUARONE, BORZANI e LIMA, 1990; LAUFENBERG, 2003).

Estes resíduos podem ser, ou reutilizados pela própria indústria que os produzem, principalmente como energia, ou podem ser vendidos para outras empresas e aplicados em usos diversos, como por exemplo, substrato para o cultivo de fungos. Se isto for feito, os resíduos deixam de ser um problema e passam a ser um subproduto da empresa em questão, podendo até gerar lucro (LIMA e SILVA, 2005).

Trabalhos vêm sendo executados utilizando diversos resíduos para produção de enzimas, como no caso do estudo de Rocha (2010), onde verificou-se que entre os resíduos secos de arroz e cascas de maracujá utilizados para produção de várias enzimas (invertase, amilase, celulase, pectinase e protease) utilizando o fungo *A. niger* ATCC 16404, o mais promissor foi a casca de maracujá. No trabalho de Dantas e Aquino (2010), avaliou-se o potencial de resíduos agroindustriais (torta de mamona, torta de babaçu, sementes de abóbora, casca de abacate e borra de café) para a obtenção de lipase microbiana utilizando o microrganismo *A. niger*. Os autores verificaram que todos os resíduos demonstraram potencial para a obtenção da enzima. E no trabalho de Sales e colaboradores (2010), verificou-se que o tipo de bagaço da cana-de-açúcar teve influência na produção das enzimas celulase e xilanase, com o fungo *A. aculeatus* URM 4953.

Desta forma, verifica-se que os resíduos agroindustriais podem ser empregados como matéria-prima em bioprocessos na obtenção de compostos de interesse industrial, como

ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustíveis, compostos aromáticos e enzimas (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000; RODRÍGUEZ-COUTO e SANROMÁN, 2005; GRAMINHA et al., 2008), entre outros. Neste sentido, a fermentação sólida destaca-se como uma técnica adequada para o aproveitamento de resíduos em bioprocessos, pois além de utilizar o resíduo sólido, podem-se produzir enzimas e outros compostos de interesse, a partir de microrganismos.

2.4 FERMENTAÇÃO SÓLIDA (FS)

A fermentação sólida (FS) ou fermentação em estado sólido (FES) tem se destacado nos estudos e avanços obtidos no aproveitamento de resíduos agroindustriais. De um modo geral, a FS é um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997).

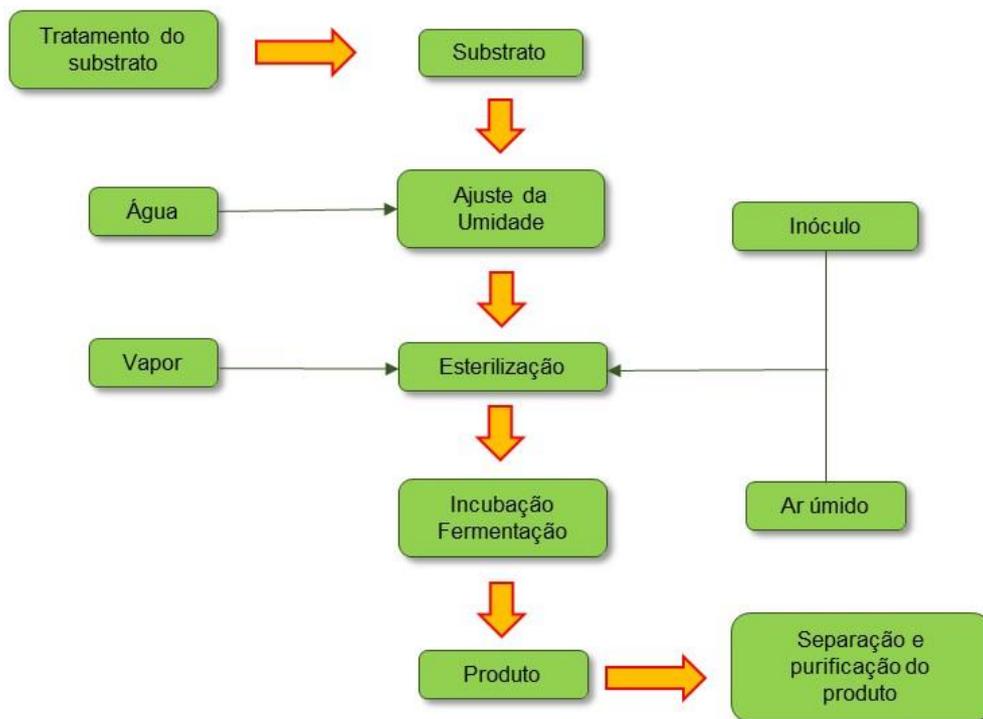
Comparada à fermentação submersa, esta técnica oferece vantagens adicionais, com uma substancial redução de efluentes, além da possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e alimentícios como matriz sólida, resultando num processo mais favorável ao meio ambiente. A FS certamente será de grande valia para os países em desenvolvimento num futuro próximo, promovendo a obtenção de alimentos nutritivos a partir de substratos sem nenhum valor comercial.

No desenvolvimento de um bioprocessos, a natureza do substrato sólido empregado em uma FS é o fator mais importante, sendo a sua seleção dependente de diversos fatores, principalmente do custo e da sua disponibilidade. Pesquisas voltadas para o uso de resíduos agroindustriais de todo o mundo vêm sendo feitas a fim de selecionar substratos adequados para a FS (ZADRAZIL e PUNIA, 1995).

A Figura 13 apresenta um fluxograma das etapas de uma FS, onde se observa que cada uma destas operações unitárias são etapas individuais e indispensáveis ao processo de fermentação (ZADRAZIL e PUNIA, 1995). Neste processo, além da seleção do substrato, deve-se levar em consideração outros aspectos importantes, como a seleção do microrganismo, a otimização dos parâmetros do processo, o isolamento e a purificação do produto, dentre outros fatores (PANDEY, 2003). O ajuste da umidade da água é uma variável

importante para o cultivo de um microrganismo, assim como a suplementação de nutrientes, temperatura e tempo de cultivo.

Figura 13 - Fluxograma das etapas de uma fermentação sólida.



Fonte: Zadrazil e Punia, 1995.

2.4.1 Variáveis que Influenciam a Fermentação Sólida

Fatores ambientais como temperatura, níveis de atividade e pH da água, oxigênio, umidade, concentrações de nutrientes, agitação, tamanho de partícula e tempo podem afetar significativamente o crescimento microbiano e a formação do produto, pois são fatores de fundamental importância nos processos de FS (RAIMBAULT, 1998; PANDEY et al., 2001).

2.4.1.1 Umidade

A umidade é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo. O teor de água adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e

oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor (GERVAIS e MOLIN, 2003; SANCHEZ, 2009).

A umidade dos substratos utilizados em FS pode variar de 30 a 85%, e esses valores interferem na cinética de crescimento microbiano. Os requerimentos de água pelos microrganismos são mais bem expressos em termos de atividade de água, que representa a disponibilidade de água no substrato sólido. A redução da atividade de água normalmente alonga a fase lag, diminui a velocidade específica de crescimento, resultando em baixa produção de biomassa (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000). A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida na superfície das partículas (ROBINSON e NIGAM, 2003).

Para Pandey e colaboradores (2001), os valores típicos de atividade de água para substratos sólidos encontram-se entre 0,95 e 0,98. Já Robinson e Nigam (2003), dizem que a atividade de água varia entre 0,40 - 0,99, o que mimetiza condições encontradas na natureza e permite que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação, pelo menos por bactérias seja pouco provável.

2.4.1.2 Nutrientes

Em processos de FS alguns dos nutrientes podem estar disponíveis em concentrações reduzidas ou mesmo ausentes nos substratos, especialmente em resíduos agroindustriais. Nesses casos, torna-se necessário suplementá-los, podendo passar por um pré-tratamento (quimicamente ou mecanicamente) antes de usá-lo nestes processos, facilitando o crescimento microbiano (GOMES et al., 2007).

A fonte de nitrogênio corresponde a uma grande variedade de compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos. Pode-se utilizar amônia, ureia, triptona ou soluções sintéticas como sulfato de amônia (PANDEY et al., 2001), peptona e extrato de levedura. A relação C:N deve ser levada em consideração e, quando da formulação do meio de cultura, deve-se considerar a composição da biomassa e fornecer as percentagens mínimas de cada nutriente necessárias ao desenvolvimento microbiano (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

As principais fontes de carbono e energia para os processos microbianos são os açúcares, como glicose e sacarose (BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008). Do ponto de vista industrial, os meios sintéticos são muito caros, e a opção geralmente é feita por meios

que contenham apreciáveis quantidades de matérias-primas provenientes da agroindústria (SANT'ANNA JR, 2001).

O fósforo é utilizado nas reações biossintéticas e também pode ser polimerizado para manter um nível de fosfato celular e promover o crescimento da célula (PANDEY et al., 1994). O efeito do fósforo na forma de fosfato foi evidenciado por Agüero e colaboradores (1996) para a produção da enzima glicoamilase fúngica.

2.4.1.3 Temperatura de Cultivo

A temperatura tende a aumentar durante os processos fermentativos como consequência da liberação de calor pelos microrganismos durante as atividades metabólicas. O controle de temperatura é uma das maiores dificuldades encontradas nos processos de FS, especialmente em grande escala, pois pelo fato do substrato não ser homogêneo, formam-se gradientes de temperatura dentro do reator, o que dificulta a remoção de calor. A temperatura pode ser controlada de forma eficiente através da passagem de ar por entre o meio de cultivo (PANDEY et al., 2001).

Conforme Carlile e Watkinson (1997), esta variável afeta diferentemente os parâmetros de crescimento microbiano, como o tempo de adaptação (fase lag), a taxa específica de crescimento e o rendimento em células, bem como influencia tanto o metabolismo primário quanto o secundário de vários modos. Os fungos, na sua maioria, são mesófilos, isto é, apresentam faixa ótima de temperatura de crescimento entre 25-40°C. Alguns toleram temperaturas próximas ao congelamento da água e outros temperaturas acima de 40°C.

2.4.1.4 Microrganismo e Inóculo

Os ambientes tropicais brasileiros mostram uma rica biodiversidade, tornando-se promissores para a pesquisa de novos microrganismos com aplicações biotecnológicas. Os microrganismos são largamente utilizados em processos biotecnológicos, como fontes de compostos de interesse e hospedeiros de genes heterólogos.

Na fermentação submersa, o inóculo deve ser suficientemente grande, pois a esterilização em escala industrial pode não ser absoluta e o microrganismo produtor deve

competir e reprimir qualquer contaminante. A quantidade de inóculo pode variar de 1 a 10% (p/v) e a produção de enzima pode ser afetada por esse parâmetro, assim como pelo estado fisiológico das células presentes no inóculo (SANT'ANNA JR, 2001).

Na FS, o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou em suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre. Neste caso, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre sua superfície consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (RAHARDJO, TRAMPER e RINZEMA, 2005; MITCHELL et al., 2006).

Dentre os microrganismos utilizados como produtores de enzimas destacam-se os fungos dos gêneros *Trametes*, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* que são capazes de produzidas enzimas celulasas e xilanases (WAMMER e PETERS, 2005; SOUZA et al., 2009), bem como as enzimas pectinases (PANDEY et al., 2000; GUMMADI e PANDA, 2003) em diferentes condições.

2.5 FUNGOS

Os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; têm parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos quimiotróficos, dependendo de substâncias orgânicas disponíveis. Desprovidos de clorofila, são incapazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. Pertencentes ao reino Fungi, são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos e podem se apresentar nas formas leveduriforme e hifal. Responsáveis pela produção de importantes ácidos, fármacos e enzimas de interesse comercial, os fungos também representam importantes agentes decompositores de componentes primários da madeira - lignina e celulose - o que resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MINAMI, 2003).

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente da lignocelulose (VELÁZQUEZ-CEDENO, MATA e SAVOIE, 2002).

2.5.1 Fungos como Agentes em Bioprocessos

A utilidade dos fungos em processos fermentativos já é conhecida há séculos. Eles podem ser utilizados em fermentação de bebidas alcoólicas, como também servindo de alimentos (uma vez que são ricos em vitaminas do complexo B), na fabricação de pães, queijos, até a capacidade metabólica em produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas, como por exemplo, a produção de antibióticos (MORAES, PAES e HOLANDA, 2010). Podem ser utilizados na fermentação sólida, degradando material lignocelulósico utilizado como substrato para crescimento do mesmo.

Os fungos sintetizam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas. Várias espécies são usadas para a produção de enzimas industrialmente importantes, tais como proteases, celulases, amilases, lipases, entre outras (ALVES et al., 2002).

Os principais produtores de enzimas, responsáveis por 20% do mercado mundial, são os fungos dos gêneros *Aspergillus* (Figura 14) e *Trichoderma* (Figura 15). Estes fungos são responsáveis pela produção do grupo de enzimas formado por celulases, pectinases e hemicelulases.

Figura 14 - Gênero *Aspergillus*.



Fonte: www2.ac-lyon.fr

Figura 15 - Gênero *Trichoderma*.



Fonte: en.wikipedia.org

2.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003). Podem ser produzidas por FS e são importantes economicamente para países como o Brasil,

que possui abundância em biomassa e resíduos agroindustriais, que podem ser usados como matérias primas de baixo custo (CASTILHO, ALVES e MEDRONHO, 2000).

O uso de enzimas é considerado um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A exploração vem sendo feita sem purificação prévia, de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (COLEN, 2006).

As enzimas hidrolíticas são agentes de biocatálise que clivam diferentes ligações químicas, em presença de água. Estas enzimas são produzidas por uma grande diversidade de espécies, em meio líquido e em meio sólido, e atuam sobre diferentes substratos (JECU, 2000). Celulases, proteases, amilases, xilanases, pectinases, hemicelulases e lipases são exemplos de enzimas hidrolíticas utilizadas em diferentes processos industriais (TOLAN e FOODY, 1999).

As celulases e hemicelulases tiveram seu uso mais intenso nos primeiros anos da década de 80, primeiro na indústria de alimentação animal, seguindo na aplicação na indústria de alimentos. Subsequentemente, estas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e de lavanderia (BHAT, 2000).

2.6.1 Celulase

As celulases são capazes de degradar a parede celular das plantas e frequentemente são utilizadas em processos industriais como na extração de suco de frutas, na indústria de celulose e papel, na indústria têxtil (GAO et al., 2008), na clarificação de sucos de frutas cítricas e vinhos, na extração de óleos essenciais (COURI et al., 2000), na obtenção de componentes do chá verde, proteína de soja, aromatizantes e amido da batata doce, na produção do vinagre de laranja e do ágar. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (RUEGGER e TAUK-TORNISIELO, 2004).

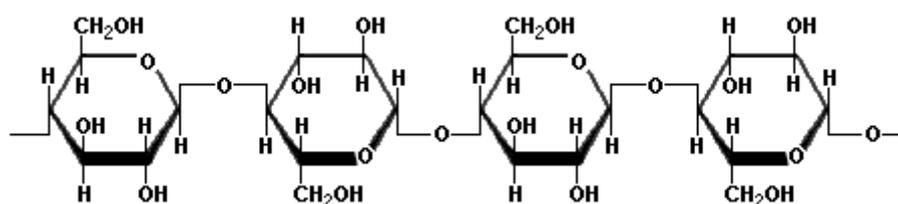
Gao e colaboradores (2008) citam que a comunidade científica tem forte interesse nas celulases e em suas aplicações industriais. Porém, um grande problema se apresenta referente ao custo de produção da enzima. Logo, os mesmos autores indicam que uma produção de celulase por meio fermentativo sólido seria uma boa alternativa, já que os microrganismos são

exímios produtores desta enzima. A produção de celulases microbianas a partir de resíduos lignocelulósicos agroindustriais é particularmente interessante, porque eles são abundantes, baratos e não-tóxicos, podendo ser reaproveitados na obtenção de compostos de alto valor agregado (BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008). Diversos resíduos agroindustriais produzidos a partir do beneficiamento de matérias-primas da região amazônica podem ser utilizados como substratos em FS para produção de enzimas, tendo em vista sua composição química, rica em fontes de carbono.

A celulase de origem fúngica é produzida quando o microrganismo é inoculado em meios de culturas que contenham celulose, sefaroose (polissacarídeo bastante utilizado na produção de resinas para a purificação de proteínas), lactose ou celobiose como fonte de carbono. A glicose, utilizada como fonte de carbono, não serve como indutora da produção de celulase e, ainda, reprime fortemente a produção dessa enzima mesmo na presença de indutores. A maior produtividade é obtida quando se utiliza a celulose na forma pura (cristalina) ou complexada (PEIXOTO, 2006).

A celulose (Figura 16) é o principal componente estrutural dos vegetais, principalmente de madeiras e plantas fibrosas. É um homopolissacarídeo linear de β -D-glicose, e todos os resíduos estão unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. As cadeias individuais de polissacarídeos são unidas por ligações de hidrogênio, dando às fibras dos vegetais sua força mecânica (CAMPBELL e FARRELL, 2007). Bon, Girio e Pereira Junior (2008) citam que estas cadeias são rígidas e em forma de fita. O estabelecimento de ligações de hidrogênio intracadeias resulta na formação de fibrilas, uma estrutura altamente ordenada que se associa formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas regiões amorfas. Estas características conferem à molécula elevada resistência à hidrólise ácida e enzimática.

Figura 16 - Estrutura química da celulose.



As celulasas têm sido divididas em dois grupos, dependendo do seu sítio ativo de ação na celulose: as endoglicanases e as exoglicanases. As endoglicanases hidrolisam randomicamente regiões internas na molécula da celulose. Da sua ação, que envolve o consumo de uma molécula da água, resulta um novo terminal redutor e um novo terminal não redutor. As exoglicanases do tipo I (CBH I) hidrolisam terminais redutores, enquanto que as do tipo II (CBH II) hidrolisam terminais não redutores. Apresentam em sua estrutura uma região responsável pela ligação da molécula ao substrato e sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose. E para completar a degradação da celulose à glicose, a celobiose, dissacarídeo solúvel em água, e potente inibidor de muitas celulasas, é hidrolisada em duas moléculas de glicose pela enzima celobiose (β -glicosidase ou β -glicosídeo glico-hidrolases). O nível de atividade da celobiase nas preparações de celulasas é crítico, não apenas para evitar a inibição das celulasas, como também para finalizar a degradação completa da celulose em glicose, fundamental para a produção de etanol de biomassa. É também reportado que a celobiase sofre inibição pelo seu produto de hidrólise, a glicose (BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008).

Alguns animais, particularmente os ruminantes, não possuem as enzimas celulasas, que hidrolisam celulose em glicose, mas podem digerir celulose com a ajuda de microrganismos simbióticos (GAN e ALLEN, 2002). Tais enzimas atacam as ligações β entre glicoses, que são comuns em polímeros estruturais; as enzimas que degradam a ligação β entre glicoses, a qual os animais não podem digerir, são encontradas em determinadas bactérias, incluindo a bactéria que habita o trato digestivo de insetos, como os cupins, e os animais de pasto, como gado e cavalo. A presença dessas bactérias explica por que vacas e cavalos podem viver de pastagem e do feno e os seres humanos não. Os danos causados pelos cupins às partes de madeira em construções surgem de sua capacidade de utilizar a celulose da madeira como nutriente, em razão da presença da bactéria adaptada aos seus tratamentos digestivos (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

As fontes de celulasas microbianas mais importantes para a produção industrial constituem linhagens de fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. O potencial de mercado destas enzimas tem sido estimado em cerca de 400 milhões de dólares por ano, com crescente aplicação na produção e desenvolvimento de biocombustíveis (UHLIG, 1998; ZANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006).

Trabalhos vêm sendo executados na produção da enzima celulase, e como exemplo pode-se citar o trabalho de Jecu (2000), onde o objetivo foi obter níveis ótimos de celulase por *A. niger* utilizando substratos facilmente disponíveis como palha de trigo e farelo de trigo na FS. Foram investigados os efeitos dos níveis de umidade, os valores de pH e temperatura de crescimento em diferentes proporções nos substratos. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que *A. niger* pode ser cultivado em FS para a produção de enzima celulolítica utilizando como fonte de carbono disponível os resíduos agrícolas. Nas condições mistas de FS, o fungo celulolítico produziu 14,80 IU de atividade de endoglucanase/mL em 96 h. O desempenho do fungo poderia ser melhorado através de uma operação em grande escala e por métodos mutagênicos.

O trabalho de Couri e colaboradores (2000), por sua vez, teve o objetivo de estudar a influência de composição do meio de FS por *A. niger* 3T5B8, especialmente a cinética de produção de enzimas hidrolíticas (celulase, xilanase e protease), e desenvolver modelos empíricos para interpretação quantitativa das inter-relações entre as variáveis. No trabalho realizado, diferentes resíduos agroindustriais foram usados como substratos, a fim de minimizar os problemas associados com sua disposição. Celobiose, um produto essencial obtido a partir da hidrólise enzimática de celulose, foi adicionado como um indutor de celulase. As preparações foram testadas na extração de óleo vegetal. As atividades enzimáticas foram avaliadas utilizando modelos empíricos a partir de dados experimentais como uma função do tempo de fermentação e concentração de celobiose no meio. A utilização de farelo de trigo como substrato sem adição de celobiose e com 42 h de fermentação foram as condições mais favoráveis para produzir a mistura de enzimas hidrolíticas. Outra condição favorável foi obtida quando a casca de manga foi utilizada como substrato na presença de celobiose a 0,2%, com 24 h de fermentação.

2.6.2 Xilanase

Entre as enzimas mais estudadas e conhecidas, estão as xilanases, por participarem da degradação da xilana, principal hemicelulose das plantas (METZLER, 2001). O interesse industrial pelas enzimas fúngicas e por fungos produtores de xilanases, cresceu nas últimas décadas. As xilanases são produzidas, principalmente em escala industrial, por *Aspergillus* e *Trichoderma* (HALTRICH et al., 1996) e podem ser empregadas em indústrias de papel como

auxiliares no branqueamento de polpas Kraft, facilitando a remoção da lignina, levando à diminuição do consumo de branqueadores químicos, sem comprometer, entretanto, o resultado final, em termos da alvura do papel (SILVA, FRANCO e GOMES, 1997). No entanto, deve-se ressaltar que, para maior eficiência desta aplicação específica das xilanases, deve-se trabalhar com extratos enzimáticos resistentes à alcalinidade e à alta temperatura, e totalmente livre de celulasas (KULKARNI, SHENDYE e RAO, 1999).

Estas enzimas atuam principalmente na xilana reprecipitada, após o cozimento, na superfície das fibras da polpa, hidrolisando este polissacarídeo e proporcionando maior permeabilidade à estrutura das mesmas. Também podem ser utilizadas em outras etapas do processo, como refino e dissolução de polpas, para modificar a polpa na formação do papel ou ainda serem utilizadas na reciclagem do papel, e em geral, reduzem o gasto de energia dos processos. Possuem uma significativa expansão de aplicações no setor de alimentos e em rações animais (VIAKARI et al., 1991; BIELY, 1993; METZLER, 2001).

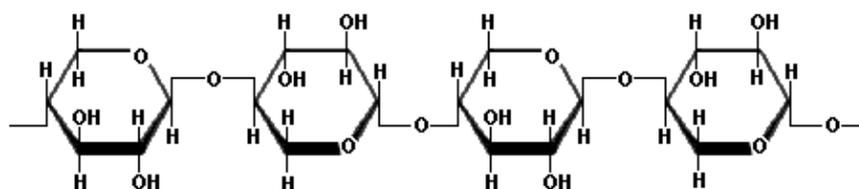
As xilanases também são aplicadas no tratamento de resíduos agroindustriais e na bioconversão de materiais lignocelulósicos em açúcares para a produção de bioetanol (BHAT, 2000). A xilose é o principal açúcar obtido na hidrólise da fração hemicelulósica de resíduos agrícolas e madeiras duras, sendo sua bioconversão um passo importante na utilização destes materiais (NAKAMURA, SAWADA e INOUE, 2001; GUO et al., 2008). Existe grande interesse em utilizar a xilanase para produção de xilose, xilobiase e xilooligômeros que podem ser empregados como insumos para produção de xilitol ou ácido láctico por via fermentativa (WONG, TAN e SADDLER, 1988; GILBERT et al., 1992).

Estas enzimas, em associação com celulasas, podem ser utilizadas para remover as paredes das células vegetais e desta forma, aprimorar o processo de extração de óleos vegetais. Podem também ser utilizadas na produção de sucos de frutas, na clarificação de sucos e vinhos, na fabricação de café solúvel, na liberação do conteúdo celular para produção de várias substâncias, na produção de protoplastos para uso em engenharia genética, no aumento do teor nutricional da silagem, no melhoramento da re-hidratação de vegetais secos e dar textura aos derivados lácteos (WONG e SADDLER, 1992; TEUNISSEN e CAMP, 1993).

A xilana (Figura 17) comercial é a fonte de carbono mais utilizada para obtenção de xilanases de microrganismos. Infelizmente seu uso fica restrito a estudos em laboratório, já que para a produção de xilanase em escala industrial ela é economicamente inviável. Em

razão disto, estudos têm sido realizados procurando matérias-primas mais baratas que possibilitem alto nível de produção da enzima (SENIOR, MAYERS e SADDLER, 1989).

Figura 17 - Estrutura química da xilana.



As hemiceluloses (xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas) são polissacarídeos de baixa massa molecular, apresentando entre 100 a 200 unidades glicosídicas. Consistem em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses. Contém, também, acetatos e substituintes na cadeia principal ou nas ramificações. A variedade de ramificações assim como a presença de diferentes unidades monoméricas contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações. Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, sendo mais suscetível à hidrólise química, sob condições mais brandas. A hemicelulose está intimamente associada à celulose na estrutura da parede celular e estabelece a ligação entre a celulose e a lignina. As hemiceluloses, que constituem o segundo grupo de polissacarídeo mais abundantes na biosfera, são decompostos por um conjunto amplo de microrganismos, em particular os fungos filamentosos e actinomicetos. A variedade de ligações químicas e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008).

Silva e colaboradores (2005) estudaram a produção de CMCase (endoglucanase) e xilanase de uma cepa de *Thermoascus aurantiacus* em FS usando diferentes resíduos agrícolas como substratos sem o enriquecimento do meio. A produção máxima de xilanase foi obtida a partir do meio contendo espiga de milho, seguido de grama verde, capim seco, palha de milho e farelo de trigo. Os pesquisadores reconheceram o sabugo de milho como um ingrediente útil e rentável para o meio, porque é em grande parte produzido como um produto, durante o processamento do milho. O estudo de enzimas extracelulares hemicelulolíticas de *T. arantiacus* mostraram que o fungo é muito mais xilanolítico do que

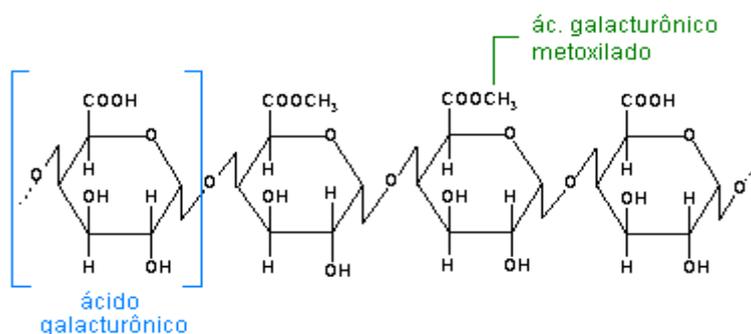
celulolítico. Todas as enzimas foram estáveis sob uma ampla gama de pH e temperatura. Como resultado, o microrganismo mostra-se promissor para aplicação industrial, uma vez que cresce rapidamente em condição estacionária simples e em substratos de baixo custo, e assim este conjunto de enzimas exhibe propriedades que correspondem às necessidades frequentes na aplicação industrial.

Kheng e Omar (2005) verificaram a produção em massa de xilanase usando matérias-primas indígenas locais e selecionaram *Aspergillus niger* USM AI1 como potente produtor de xilanase via fermentação em estado sólido, otimizando o sistema de cultivo e a composição do meio no aumento da produção da enzima. Como substrato foi utilizado a torta de dendê. E como resultado, as condições otimizadas mostraram uma produção de xilanase maior em relação a otimização inicial do sistema em FES.

2.6.3 Pectinase

As pectinases, ou enzimas pectinolíticas, representam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas. Estas substâncias, também chamadas de pectinas (Figura 18), são polissacarídeos ramificados, cuja cadeia principal é constituída por resíduos de ácido D-galacturônico, parcialmente esterificados com grupos metila, e polimerizados pelas ligações glicosídicas α -1,4 (ROMBOUTS e PILNIK, 1980). Embora o ácido D-galacturônico seja o principal constituinte das pectinas, proporções variáveis de outros açúcares também podem ser encontrados, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose e traços de 2-O-metilfucose (JARVIS, 1984; LEITÃO et al., 1995).

Figura 18 - Estrutura química da pectina.



As substâncias pécnicas, associadas à celulose, hemicelulose e lignina, proporcionam adesão entre as células e resistência mecânica à parede celular. Sua quantidade e natureza são determinantes para a textura de frutos e vegetais durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento, sendo mais abundante em frutos e em tecidos jovens (ALKORTA et al., 1998; BRANDÃO e ANDRADE, 1999; BHAT, 2000; CASTILHO, ALVES e MEDRONHO, 2000; JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

As enzimas pectinolíticas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas principalmente por plantas, fungos, leveduras, bactérias, insetos, nematoides e protozoários (ROMBOUTS e PILNIK, 1980; BRAVO et al., 2000; TEIXEIRA, LIMA FILHO e DURAN, 2000; VENDRUSCOLO et al., 2008). Os fungos patogênicos de plantas secretam enzimas que hidrolisam a parede celular, e também são capazes de polimerizar cada um dos seus diferentes componentes. Estas enzimas podem ser utilizadas com diferentes propósitos pelos microrganismos, ou seja, participam de sua ação patogênica favorecendo a penetração e ramificação no tecido do hospedeiro. Muitas destas enzimas são importantes para o seu ciclo de vida saprofítico (RONCERO et al., 2000).

O estudo das pectinases tem sido considerado de grande importância, em razão da aplicação nas indústrias que processam matéria-prima vegetal, para remoção de substâncias pécnicas, as quais inviabilizam o produto desejado (GHILDYAL et al., 1981; WHITAKER, 1984). Por isso estas enzimas vêm sendo objeto de intensas pesquisas, além do fato de se acreditar que constituem importantes fatores de patogenicidade e/ou virulência de microrganismos (ANNIS e GOODWIN, 1997; HERBERT et al., 2004).

A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos varia entre as espécies de microrganismos. Portanto, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é um processo fundamental para uso industrial (UEDA, FUJIO e LIM, 1982). O isolamento de microrganismos que produzem eficientemente enzimas pectinolíticas, a seleção das condições ótimas de produção e caracterização bioquímica dessas enzimas, constituem linhas de pesquisa importantes e essenciais para o desenvolvimento de processos biocatalíticos economicamente mais competitivos (MARCHI, BORGES e MIZUBUTI, 2006).

Na década de 30, realizaram-se as primeiras aplicações comerciais das pectinases, onde indústrias de frutas começaram a produzir sucos e vinhos. Estas apresentavam o rendimento baixo e algumas dificuldades foram encontradas, como a de se filtrar e atingir uma clarificação aceitável (BHAT, 2000). Mas, a partir dos anos 60, estas enzimas foram

utilizadas em vários outros processos, superando as dificuldades (KASHYAP et al., 2001; JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). Assim, o uso das pectinases, celulasas e hemicelulasas de microrganismos, juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas (BHAT, 2000), ajudaram na otimização de parâmetros fermentativos, na purificação e no estudo de suas propriedades bioquímicas, proporcionando um uso mais eficiente destas, como catalisadores, nos diferentes processos em que são aplicadas (LANG e DÖRNENBURG, 2000; GUMMADI e PANDA, 2003).

Industrialmente, as pectinases apresentam ampla utilização e aplicação e estão bastante difundidas. Sua principal aplicação está na indústria de processamento de sucos e vinhos, usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração. Na indústria de óleos vegetais, a pectinase pode ser usada para extrair óleo em um processo aquoso, liquefazendo os componentes estruturais da parede celular das sementes que contém o óleo. Óleos de canola, de coco, semente de girassol e oliva são tradicionalmente produzidos por extração com solventes orgânicos, mais comumente o hexano (ROMBOUTS e PILNIK, 1986; MANACHINI, PARINI e FORTINA, 1988; KASHYAP et al., 2001; JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005; MARTIN, 2006; UENOJO e PASTORE, 2007).

Além disso, as pectinases podem substituir tratamentos químicos tóxicos no processamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami, na maceração do linho, na indústria de papel e celulose e na desengomagem de fibras vegetais. Também são utilizadas para acelerar a fermentação de café, chá e chocolate, extração de polpa de tomate, tratamento de resíduos vegetais, enriquecimento protéico de alimentos infantis, para melhorar a quantidade e valor nutricional da ração animal (BRAVO et al., 2000; KASHYAP et al., 2001; JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005; UENOJO e PASTORE, 2007), no setor farmacêutico (BLANCO, SIEIRO e VILLA, 1999) e no tratamento de efluentes pécticos.

Patil e Dayanand (2006) investigaram a otimização das variáveis tamanho do inóculo, pH, temperatura, tamanho de partícula e teor de umidade, com o objetivo de alcançar a máxima produção de pectinase a partir da cabeça de girassol sem sementes, na fermentação submersa e FS, utilizando *A. niger* DMF 27 e DMF 45, respectivamente. Assim, para condições submersas e sólidas, foi registrado como melhor nível de produção de pectinase, a utilização do pH 5,0 e da temperatura de 34°C. O tamanho do inóculo para condições submersas foi 1×10^5 /mL e para condições sólidas foi de 1×10^7 /g. Para a FS o tamanho de partícula mais adequado foi de quinhentos micrômetros e 65% foi o teor de umidade

escolhido. Sob condições ideais, a produção máxima de exo-pectinase foi de 34,2 U/g e de endo-pectinase foi de 12,6 U/mL, ambas em FS.

Santos e colaboradores (2008) utilizaram a metodologia do planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta para verificar as influências das variáveis: umidade inicial do meio, adição de sulfato de amônia e de fosfato de potássio no estudo da produção da poligalacturonase através da FS, usando como substrato o pedúnculo de caju seco e como agente da fermentação o microrganismo *A. niger* CCT0916. Como resultado, a melhor condição de produção da poligalacturonase foi com umidade de 40%, 1% de sulfato de amônia e sem adição do fosfato de potássio atingindo-se uma atividade da poligalacturonase de 16 U/g e 82% de redução de viscosidade com 30 horas de fermentação.

2.7 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Novas técnicas sistemáticas de planejamento para a necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, são requeridas por muitos profissionais de diferentes formações.

O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas confiáveis possam ser realizadas. O desenvolvimento de produtos e processos através de procedimentos de tentativa e erro, conforme registros do início do século passado foram, de fato, importantes naquele momento. No entanto, a forte competitividade, a difusão da tecnologia, bem como a competência e a responsabilidade dos pesquisadores atuais inviabiliza tais procedimentos (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A obtenção de dados confiáveis requer a execução de um procedimento experimental bem definido, cujos detalhes são determinados pela finalidade do experimento. Para se ter uma resposta final, precisa ter uma estimativa da incerteza associada a esses resultados. Assim, os experimentos devem ser feitos em duplicata, para poder ter uma maneira de estimar o erro experimental, e a partir disso avaliar a significância estatística dos efeitos. Para isso a

duplicação tem de consistir numa *repetição autêntica* (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

A metodologia de superfícies de resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais. Ela é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

Singh e colaboradores (2009) descrevem a otimização bem sucedida para o sistema termoestável da atividade de celulase para a cepa *Aspergillus heteromorphus*. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para conhecer as condições ótimas de reação, pH, temperatura, concentração de substrato e concentração de enzima. Este estudo demonstrou que *A. heteromorphus* pode oferecer novas opções para a expressão de enzimas celulolíticas termoestáveis para aplicações industriais.

A metodologia de superfície de resposta é uma ferramenta poderosa não só para a otimização das melhorias de controle de processo em atividades enzimáticas específicas, mas também para o conhecimento adicional fornecido sobre os processos de otimização em qualquer parte do domínio experimental. A atividade enzimática na temperatura mais alta poderia ser a fonte atraente e alternativa para a enzima termoestável para indústria do papel, melhorando a eficácia do branqueamento convencional e para as indústrias alimentares por operação do processo em maior temperatura para verificar a contaminação. O valor do coeficiente de correlação (R^2 0,9977) e valor significativo para o modelo de $p < 0,0001$ indicam a validade de adequação do modelo e a otimização (SINGH et al., 2009).

No trabalho de Rajendran e Thangavelu (2009), foi determinado o efeito de vários componentes do meio de cultivo na produção de lipase por *Rhizopus arrhizus* usando um delineamento experimental estatístico de Plackett-Burman e modelos cinéticos não estruturados. Os autores verificaram que o planejamento estatístico de experimentos ofereceu uma metodologia eficiente para identificar as variáveis significativas e para otimizar os diferentes fatores, usando um número mínimo de experimentos para a produção de lipase.

Portanto, no presente trabalho foi utilizado um planejamento experimental fatorial para verificar as variáveis que influenciam de forma significativa as atividades enzimáticas fúngicas, bem como a metodologia de superfície de resposta para encontrar as melhores condições de cultivo que levem ao aumento da atividade celulolítica, xilanolítica e pectinolítica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aproveitar o resíduo sólido gerado durante a hidrodestilação de galhos e folhas das espécies *Aniba parviflora* (Meissn) Mez e *Aniba rosaeodora* Ducke (família Lauraceae) como substrato na fermentação sólida para obtenção das enzimas celulase, xilanase e pectinase a partir de fungos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Utilizar o resíduo sólido gerado durante a hidrodestilação de galhos e folhas das espécies *Aniba parviflora* e *Aniba rosaeodora* como substrato em fermentação sólida para cultivo de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*;
- b) Selecionar as variáveis que influenciam significativamente a produção das enzimas em meio sólido: tempo e temperatura de cultivo, adição de nutrientes (nitrogênio e fósforo), umidade do substrato, tipo de inóculo e linhagem fúngica, utilizando um planejamento experimental fatorial fracionado;
- c) Determinar experimentalmente as melhores condições para a produção de celulase, xilanase e pectinase fúngicas em meio sólido, por meio de um planejamento experimental completo e metodologia de superfície de resposta.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 RESÍDUO SÓLIDO

O resíduo sólido utilizado como substrato na fermentação foi obtido da hidrodestilação dos galhos finos (± 3 cm de diâmetro) e folhas das espécies *A. parviflora* e *A. rosaeodora*, coletadas na Fazenda Pematec Santarém-PA e na Fazenda Magaldi (Maués-AM), respectivamente. O material vegetal foi seco à temperatura ambiente durante 10 dias, e triturado, separadamente, em moinho de facas com tela de 3 mm, sendo utilizado para a extração do óleo essencial em hidrodestilador tipo Clevenger.

4.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

A umidade do resíduo da *A. parviflora* e da *A. rosaeodora* foi obtida pelo método de dessecação, com o aquecimento direto da amostra a 50°C em estufa, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Foram pesados cerca de 3,0 g do resíduo sólido em recipientes previamente tarados e secos até peso constante. O experimento foi realizado em triplicata. A partir do cálculo da umidade foi determinada a quantidade de solução nutriente que foi adicionada nos experimentos de FS.

4.3 MICRORGANISMOS

Foram testadas na FS duas espécies fúngicas: *Aspergillus brasilienses* (ATCC-AA001) adquirido comercialmente e *Trichoderma harzianum* (DPUA 188/UFAM), cedido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os fungos foram mantidos em meio batata-ágar-dextrose (BDA) e ágar-aveia, respectivamente, e repicados periodicamente. Para o preparo dos inóculos, os isolados foram cultivados utilizando os mesmos meios de cultura, sendo incubados em estufa BOD durante sete dias a 28°C.

4.4 INÓCULOS

Duas formas de inóculo fúngico, disco micelial e suspensão de esporos, foram utilizadas para avaliar a produção das enzimas celulase, xilanase e pectinase por meio da FS.

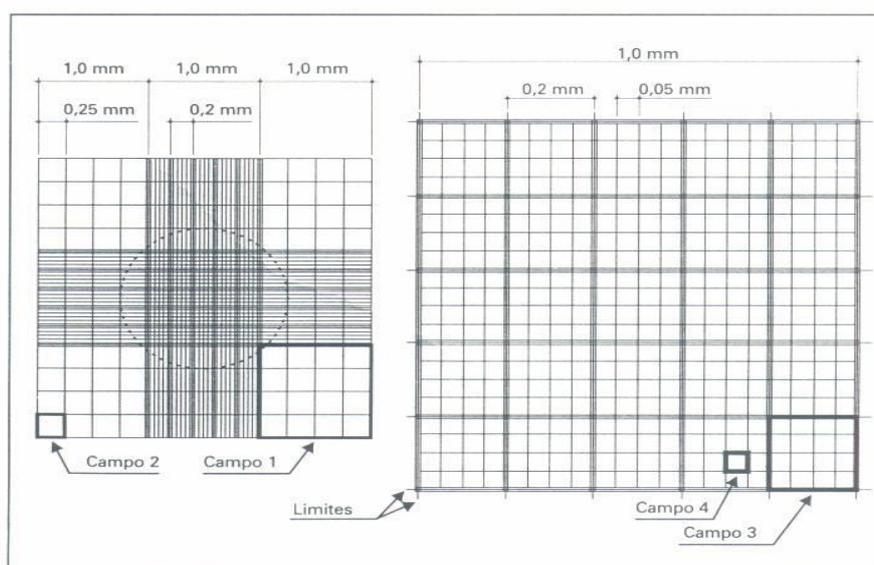
4.4.1 Disco Micelial

Das placas cultivadas com os fungos *A. brasiliensis* e *T. harzianum*, foram cortados cinco discos miceliais de 1,0 cm de diâmetro, os quais foram retirados e inoculados no meio sólido para a produção de enzimas.

4.4.2 Suspensão de Esporos

A partir das placas cultivadas com os fungos esporulados, foi feita a suspensão de esporos, preparando-se uma solução salina a 1% contendo água destilada e NaCl. Desta foram retirados 3 mL e pipetados em cada placa com esporos fúngicos. Após, raspou-se levemente a superfície para os esporos se soltarem, retirando-se 1 mL de amostra a ser quantificada. Esta foi homogeneizada perfeitamente em agitador tipo vortex e com o auxílio da Câmara de Neubauer (Figura 19) e de uma pipeta Pasteur de ponta fina, depositou-se uma gota entre a câmara e a lamínula pela borda da câmara.

Figura 19 - Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem.



Na sequência, realizou-se a contagem de esporos e padronizou-se o número de células de forma a atingir a concentração de 1×10^8 UFC/mL, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Campo de contagem da câmara de Neubauer com as respectivas áreas, volumes e fatores de conversão para mL.

| Campos de contagem * | Área (mm ²) | Volume | | Fator de conversão (células/mL) |
|----------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------------|
| | | mm ³ | mL | |
| 1 | 1,0000 | 0,10000 | 10^{-4} | $n \times 10^4$ |
| 2 | 0,0625 | 0,00625 | $62,5 \times 10^{-7}$ | $n \times 16 \times 10^4$ |
| 3 | 0,0400 | 0,00400 | 4×10^{-6} | $n \times 2,5 \times 10^5$ |
| 4 | 0,0025 | 0,00025 | $2,5 \times 10^{-7}$ | $n \times 4 \times 10^6$ |

*distância entre a lâmina e a lamínula = 0,1mm; n = número médio de esporos contados/campo.

4.5 CULTIVO DOS FUNGOS UTILIZANDO A FERMENTAÇÃO SÓLIDA

Os fungos foram cultivados no resíduo sólido complementado com uma solução de nutrientes. O meio de cultivo foi composto por 7 g de resíduo sólido seco e triturado (Figura 20) acrescidos de solução contendo diferentes concentrações dos nutrientes (NH₄NO₃ e KH₂PO₄), com quantidade de água deionizada suficiente para atingir os valores de umidade estudados, sendo posteriormente autoclavado à 121°C/15 min. Em seguida, cinco discos miceliais ou 50 µL da suspensão de esporos, contendo aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, foram inoculados no meio de cultivo sólido mantido a diferentes temperaturas e períodos de tempo para produção das enzimas. As variáveis estudadas e seus valores estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 -Variáveis e seus níveis utilizados para os ensaios de fermentação sólida.

| Variáveis | -1 | +1 |
|------------------|-----|-----|
| Umidade (%) | 70 | 90 |
| Nitrogênio (%) | 1,5 | 4,5 |
| Fósforo (%) | 3,0 | 6,0 |
| Tempo (dias) | 9 | 15 |
| Temperatura (°C) | 24 | 30 |

Após o crescimento, 20 mL de água deionizada autoclavada foram adicionadas ao meio, para facilitar a extração das enzimas. Durante 2 minutos, o meio contendo água foi colocado em um banho com ultra-som e por 10 minutos sob agitação em incubadora tipo

shaker. A seguir, foi realizada uma filtração a vácuo, em funil de *Büchner* e então as amostras dos extratos brutos (Figura 21) foram armazenadas em freezer para posterior avaliação das atividades enzimáticas.

Figura 20 - Resíduo sólido autoclavado.



Figura 21 - Amostra do extrato bruto.



4.6 ENSAIO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As atividades enzimáticas de celulase, xilanase e pectinase foram dosadas para todos os extratos obtidos da FS com o fungo *A. brasiliensis* e para os extratos obtidos da FS com o fungo *T. harzianum* foram verificadas as atividades de celulase e xilanase.

4.6.1 Atividade Celulolítica

A partir da metodologia de Silva e Carmona (2008), a atividade de enzimas celulolíticas foi determinada pela avaliação da atividade de endoglucanase. A dosagem da atividade de endoglucanase ou de carboximetilcelulase (CMC) consistiu na adição de 500 μL do extrato bruto a 500 μL do substrato CMC a 1% em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, incubando a mistura por 30 min/50°C, onde a reação foi interrompida com a adição de 500 μL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Após, agitou-se no vórtex e manteve-se por 5 min/100°C em banho-maria para a desativação da enzima. Resfriou-se em temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se água destilada, completando para 10 mL. A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Para cada amostra analisada

foi preparado um branco, incubando-se primeiramente 500 μ L do extrato bruto por 30 min/50°C, após acrescentando-se 500 μ L da solução de CMC e 500 μ L de DNS para a reação não ocorrer.

4.6.2 Atividade Xilanolítica

Para a atividade xilanolítica também seguiu-se a metodologia de Silva e Carmona (2008), onde a mesma foi determinada por meio de incubação de 500 μ L do extrato enzimático com 750 μ L de solução de xilano a 1% em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 por 10 min/50°C, formando o complexo enzima/substrato. Transcorrido o tempo reacional adicionou-se 500 μ L de DNS e incubou-se a 100°C/5 min. Em seguida, foram adicionados 8250 μ L de água destilada e as soluções foram homogeneizadas por inversão. Por fim, foi feita a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Para o experimento controle (branco) incubou-se 750 μ L do substrato (xilano) durante 10 min/50°C e após esse período, adicionou-se 500 μ L do extrato enzimático e 500 μ L de DNS.

4.6.3 Atividade Pectinolítica

Para a avaliação da atividade enzimática pectinolítica, adaptou-se a metodologia descrita por De Gregorio e colaboradores (2002) e por Rocha (2010), onde foi preparada uma amostra, contendo 4 mL do ácido poligalacturônico a 0,2% em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 acrescido de 1 mL do extrato enzimático e incubada a 30°C/30 min. Dessa amostra, após agitação em aparelho tipo vortex, retirou-se 500 μ L e foi adicionado 1 mL de DNS, agitando-se novamente. Na sequência, incubou-se a 100°C/5 min e após o resfriamento adicionaram-se 12,5 mL de água destilada. Foi preparado um branco para cada amostra, onde 1 mL do extrato enzimático foi colocado em banho-maria durante 30°C/30 min. Após, adicionaram-se 4 mL do ácido poligalacturônico, agitou-se, foi retirada uma alíquota de 500 μ L e a esta adicionou-se 1 mL de DNS. Agitando-se novamente, incubou-se a 100°C/5 min. Após o resfriamento, completou-se o volume com 12,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da determinação dos açúcares redutores liberados em cada reação conforme a metodologia descrita por Miller (1959). A partir da leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 540 nm foram construídas as curvas padrão, cujos cálculos de regressão linear foram obtidos com o auxílio do software *Origin 8.0*. A partir da obtenção da equação da reta padrão e consequentemente do coeficiente angular, calculou-se a absorvância (ε) para o comprimento de onda utilizado (Equação 1) para cada açúcar redutor (glicose, xilose ou ácido D-galacturônico).

$$\varepsilon = a * MM \quad (1)$$

Onde:

ε = absorvância a 540 nm

a = coeficiente angular da curva padrão

M.M. = massa molecular da glicose, xilose ou ácido D-galacturônico

A partir do cálculo da absorvância, verificou-se o quanto de xilose, glicose ou ácido D-galacturônico reage com o DNS, determinando assim a quantidade de açúcares redutores presentes na amostra. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como aquela correspondente à liberação de um μmol de açúcar redutor equivalente a glicose, xilose ou ácido D-galacturônico, por minuto, por mL da amostra, nas condições do ensaio. Para o cálculo da atividade enzimática, em U/mL, foi empregada a Equação 2.

$$U = Abs * \frac{1}{t} * 1000 * \frac{1}{\varepsilon} * \frac{1}{V_a} * V_f \quad (2)$$

Onde:

Abs = absorvância da amostra a 540 nm

t = tempo de reação em minutos

ε = absorvância

V_a = volume da amostra em mL

V_f = volume final da reação em mL

Após a obtenção da atividade em U/mL, usando os valores de umidade de cada experimento, converteram-se os valores para U/g de substrato (em base seca).

4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , cuja matriz está apresentada na Tabela 3, para selecionar as variáveis - umidade do substrato, adição de nutrientes (fontes de nitrogênio e de fósforo), tempo e temperatura de cultivo – que influenciam de forma estatisticamente significativa as atividades enzimáticas.

O programa *Statistica* 10.0 foi utilizado para analisar os dados experimentais. Assim, utilizando a ferramenta do planejamento experimental foi possível investigar a influência das variáveis na produção enzimática. O erro experimental foi avaliado a partir da triplicata no ponto central (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} .

| Ensaio | Variáveis codificadas | | | | | Variáveis reais | | | | |
|--------|-----------------------|----------|-------|-------|-------|-----------------|----------|-------|-------|-------|
| | T (°C) | t (dias) | N (%) | P (%) | U (%) | T (°C) | t (dias) | N (%) | P (%) | U (%) |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | +1 | 24 | 9 | 1,5 | 3 | 90 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 30 | 9 | 1,5 | 3 | 70 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | 24 | 15 | 1,5 | 3 | 70 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | +1 | 30 | 15 | 1,5 | 3,0 | 90 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | -1 | 24 | 9 | 4,5 | 3,0 | 70 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | +1 | 30 | 9 | 4,5 | 3,0 | 90 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 24 | 15 | 4,5 | 3,0 | 90 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 | 30 | 15 | 4,5 | 3,0 | 70 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | 24 | 9 | 1,5 | 6,0 | 70 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | 30 | 9 | 1,5 | 6,0 | 90 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | 24 | 15 | 1,5 | 6,0 | 90 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | 30 | 15 | 1,5 | 6,0 | 70 |
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 24 | 9 | 4,5 | 6,0 | 90 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 30 | 9 | 4,5 | 6,0 | 70 |
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | 24 | 15 | 4,5 | 6,0 | 70 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | 30 | 15 | 4,5 | 6,0 | 90 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 | 12 | 3,0 | 4,5 | 80 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 | 12 | 3,0 | 4,5 | 80 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 | 12 | 3,0 | 4,5 | 80 |

T = temperatura; t = tempo; N = nitrogênio (NH_4NO_3); P = fósforo (KH_2PO_4); U = umidade.

Após a triagem das variáveis, um planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4) foi realizado para as três enzimas (celulase, xilanase e pectinase), utilizando as variáveis estatisticamente significativas do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} e as condições que forneceram as maiores atividades enzimáticas, o fungo mais promissor inoculado nas duas formas (DM e SE) e o melhor resíduo sólido. Definiu-se então as melhores condições de cultivo em meio sólido para promover as maiores atividades enzimáticas (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Estes ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3 .

| Ensaio | Variáveis codificadas | | | Variáveis reais | | |
|--------|-----------------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| | N (%) | P (%) | U (%) | N (%) | P (%) | U (%) |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 0,5 | 1,0 | 85 |
| 2 | -1 | -1 | +1 | 0,5 | 1,0 | 95 |
| 3 | +1 | -1 | -1 | 1,5 | 1,0 | 85 |
| 4 | +1 | -1 | +1 | 1,5 | 1,0 | 95 |
| 5 | -1 | +1 | -1 | 0,5 | 3,0 | 85 |
| 6 | -1 | +1 | +1 | 0,5 | 3,0 | 95 |
| 7 | +1 | +1 | -1 | 1,5 | 3,0 | 85 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | 1,5 | 3,0 | 95 |

N = nitrogênio (NH_4NO_3); P = fósforo (KH_2PO_4); U = umidade.

Após a análise dos melhores resultados, foi realizado, um planejamento experimental fatorial completo 2^2 (Tabela 5), para a enzima que mostrou-se mais promissora, utilizando-se o melhor fungo inoculado na forma de DM e o melhor resíduo, a fim de se buscar maiores valores de atividade enzimática. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^2 .

| Ensaio | V. codificadas | | V. reais | |
|--------|----------------|-------|----------|-------|
| | P (%) | U (%) | P (%) | U (%) |
| 1 | -1 | -1 | 1,0 | 95 |
| 2 | -1 | +1 | 1,0 | 99 |
| 3 | +1 | -1 | 0,1 | 95 |
| 4 | +1 | +1 | 0,1 | 99 |

P = fósforo (KH_2PO_4); U = umidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES NUTRIENTES

Amostras dos resíduos de *A. parviflora* (macacaporanga) e *A. rosaeodora* (pau-rosa) foram submetidas à determinação da umidade, conforme descrito no item 4.2. O valor médio das triplicatas obtido para a umidade foi de $6,53\% \pm 0,83$ (macacaporanga) e $7,83\% \pm 0,25$ (pau-rosa). Estes valores são similares aos obtidos no trabalho realizado por Santos e colaboradores (2008) que utilizaram o resíduo do pedúnculo de caju seco (7,7% de umidade) para obtenção da enzima pectinase, através da FS com o microrganismo *A. niger* CCT 0916; no trabalho realizado por Silva (2008), que para produzir celulasas utilizou o resíduo de uva (8,13% de umidade) suplementado com peptona, por fermentação submersa do fungo *A. phoenicis*; e no estudo realizado por Rocha (2010), que utilizou a mistura da casca do maracujá e o resíduo de arroz (9,67% de umidade) para produção das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease com o fungo *A. niger*.

A composição das cinco soluções estoque, as quais foram preparadas a partir da umidade inicial determinada para os resíduos de macacaporanga e pau-rosa, apresentando concentrações diferentes dos nutrientes - fontes de nitrogênio (NH_4NO_3) e de fósforo (KH_2PO_4) está apresentada na Tabela 6. Estas soluções foram adicionadas com volumes diferentes ao substrato sólido, a fim de se atingir a umidade desejada (70 – 90%), conforme a matriz do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} (Tabela 3).

Segundo Pandey (2003) e Raghayarao, Ranganathan e Karanth (2003), nos resíduos utilizados em processos de FS ocorre a ausência ou quase da água livre, a qual encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30-85% e a atividade de água típica vai de 0,40-0,90, mimetizando condições encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é pouco provável (RAIMBAULT, 1998; ROBINSON e NIGAM, 2003). Além da umidade, a fonte de nitrogênio é outro fator que tem mostrado grande influência sobre a produção de enzimas. Tanto o nitrogênio orgânico quanto o inorgânico, apresentam um importante papel na síntese de enzimas (TAN et al., 2003). Assim como o nutriente fósforo, que é oferecido sob a forma de sais (COLEN, 2006).

Tabela 6 - Soluções estoque adicionadas aos diferentes ensaios do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , com seus respectivos volumes e concentrações de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 para 100 mL de água destilada, em função da umidade desejada.

| Ensaio | Solução | Macacaporanga | Pau-rosa | Concentração dos nutrientes | | Umidade (%) |
|--------|---------|---------------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------|
| | | Volume (mL) | Volume (mL) | NH_4NO_3 (%) | KH_2PO_4 (%) | |
| 1 | A | 5,84 | 5,75 | 1,5 | 3,0 | 90 |
| 2 | A | 4,44 | 4,35 | 1,5 | 3,0 | 70 |
| 3 | A | 4,44 | 4,35 | 1,5 | 3,0 | 70 |
| 4 | A | 5,84 | 5,75 | 1,5 | 3,0 | 90 |
| 5 | B | 4,44 | 4,35 | 4,5 | 3,0 | 70 |
| 6 | B | 5,84 | 5,75 | 4,5 | 3,0 | 90 |
| 7 | B | 5,84 | 5,75 | 4,5 | 3,0 | 90 |
| 8 | B | 4,44 | 4,35 | 4,5 | 3,0 | 70 |
| 9 | C | 4,44 | 4,35 | 1,5 | 6,0 | 70 |
| 10 | C | 5,84 | 5,75 | 1,5 | 6,0 | 90 |
| 11 | C | 5,84 | 5,75 | 1,5 | 6,0 | 90 |
| 12 | C | 4,44 | 4,35 | 1,5 | 6,0 | 70 |
| 13 | D | 5,84 | 5,75 | 4,5 | 6,0 | 90 |
| 14 | D | 4,44 | 4,35 | 4,5 | 6,0 | 70 |
| 15 | D | 4,44 | 4,35 | 4,5 | 6,0 | 70 |
| 16 | D | 5,84 | 5,75 | 4,5 | 6,0 | 90 |
| 17 | E | 5,14 | 5,05 | 3,0 | 4,5 | 80 |
| 18 | E | 5,14 | 5,05 | 3,0 | 4,5 | 80 |
| 19 | E | 5,14 | 5,05 | 3,0 | 4,5 | 80 |

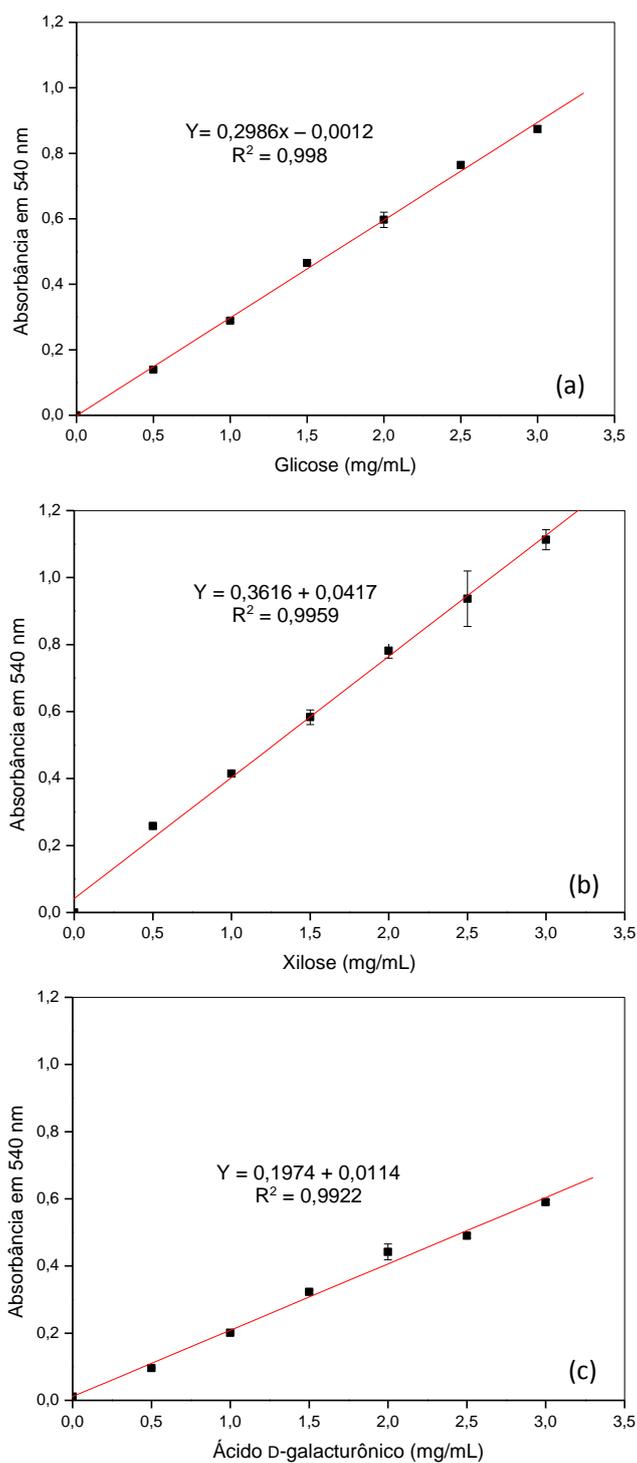
No trabalho de Jecu (2000), foram realizados experimentos para se obter níveis ótimos de celulase por *A. niger*, utilizando como substrato da FS a palha e o farelo de trigo. O teor de umidade foi variado por adição de água destilada para se obter uma umidade na faixa de 55-80%, sendo os melhores resultados observados com 74% de umidade. No trabalho de Anto, Trivedi e Patel (2006) a maior produção da enzima glicoamilase foi obtida utilizando o fungo *Aspergillus* sp. HA-2, quando o substrato (flocos de arroz, farelo de trigo e farinha de arroz) da FS foi suplementado com nitrogênio orgânico (extrato de levedura e peptona a 0,02%). No trabalho de Gao e colaboradores (2008) foi observado um meio ótimo de produção de celulase com 80% de umidade, contendo palha de milho e 0,8% de extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio para o substrato da FS, utilizando o fungo *A. terreus* M11.

5.2 CURVAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A partir de concentrações conhecidas de glicose, xilose e ácido D-galacturônico, foram construídas as curvas analíticas para a quantificação de açúcares redutores, utilizadas no

cálculo da atividade enzimática, conforme descrito no item 4.7. As curvas analíticas para a quantificação de açúcares redutores equivalentes à glicose, xilose e ácido D-galacturônico estão apresentadas na Figura 22.

Figura 22 - Curvas analíticas para a quantificação de açúcares redutores equivalentes à glicose (a), xilose (b) e ácido D-galacturônico (c).



Considerando os valores dos coeficientes de regressão linear (R^2) obtidos nas curvas analíticas apresentadas na Figura 22, pode-se confirmar a relação linear existente entre o aumento da concentração de açúcares redutores e a absorvância a 540 nm. Portanto, os cálculos de atividade enzimática que foram realizados a partir destas curvas analíticas podem ser considerados confiáveis.

5.3 OBTENÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS

Uma cultura em estado sólido pode ser definida como aquela em que há crescimento microbiano em materiais sólidos, com baixa quantidade de água livre (DOMINGUEZ et al., 2003). Conforme Alves e colaboradores (2002), a utilização do meio sólido faz com que haja um rápido crescimento da população de fungos filamentosos, permitindo a detecção de enzimas específicas.

O planejamento experimental fracionado 2^{5-1} foi realizado utilizando-se dois tipos de resíduos: *A. parviflora* (macacaporanga) e *A. rosaeodora* (pau-rosa); dois tipos de inóculo: disco micelial (DM) e suspensão de esporos (SE); e duas espécies de fungos: *A. brasiliensis* na obtenção das enzimas celulase, xilanase e pectinase e *T. harzianum* na obtenção das enzimas celulase e xilanase. Verificaram-se também os efeitos da umidade inicial do meio, da adição de soluções contendo nutrientes (nitrogênio e fósforo), da temperatura e do tempo sobre a produção das enzimas fúngicas por FS.

A partir da extração das enzimas foram determinadas as atividades enzimáticas obtidas em cada ensaio, a fim de verificar a influência das variáveis, de acordo com o planejamento experimental descrito no item 4.8. Através do planejamento experimental, foi possível determinar os parâmetros do processo que apresentam influência sobre o mesmo, definindo os mais significativos e permitindo dispensar outros menos influentes (MONTGOMERY, 1997). Um primeiro planejamento torna-se útil para avaliar o impacto dos fatores sobre as respostas, permitindo selecionar as variáveis estatisticamente significativas.

Os resultados da atividade enzimática celulolítica (AEC), xilanolítica (AEX) e pectinolítica (AEP) obtidos a partir do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} com o cultivo do fungo *A. brasiliensis* em FS, para cada tipo de inóculo utilizado (DM e SE) e para os dois substratos sólidos (resíduos de macacaporanga e de pau-rosa), estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Atividades enzimáticas de celulase, xilanase e pectinase, obtidas a partir do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} para os ensaios de fermentação sólida utilizando como substrato os resíduos de macacaporanga e pau-rosa e o fungo *Aspergillus brasiliensis* inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| E N S A I O | VARIÁVEIS | | | | | MACACAPORANGA | | | | | | PAU-ROSA | | | | | |
|----------------------------|-----------|----------|----------|----------|---------|---------------|-------|-------------|------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | | | | | | AEC (U/gbs) | | AEX (U/gbs) | | AEP (U/gbs) | | AEC (U/gbs) | | AEX (U/gbs) | | AEP (U/gbs) | |
| | T (°C) | T (dias) | N (%) | P (%) | U (%) | DM | SE | DM | SE | DM | SE | DM | SE | DM | SE | DM | SE |
| 1 | 24 (-1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | 7,15 | 9,98 | 36,79 | 8,69 | 17,68 | 23,18 | 7,94 | 10,38 | 3,95 | 14,16 | 25,18 | 18,02 |
| 2 | 30 (+1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 2,51 | 3,89 | 11,74 | 3,27 | 6,44 | 7,68 | 1,61 | 1,68 | 0,83 | 1,95 | 6,25 | 4,15 |
| 3 | 24 (-1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 2,72 | 4,23 | 12,93 | 5,07 | 7,96 | 7,03 | 1,96 | 2,47 | 1,51 | 4,86 | 6,23 | 2,65 |
| 4 | 30 (+1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | 8,46 | 12,86 | 30,62 | 8,43 | 21,32 | 22,90 | 2,67 | 8,38 | 2,81 | 6,85 | 17,74 | 11,60 |
| 5 | 24 (-1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 1,85 | 0,78 | 5,90 | 0,48 | 7,16 | 7,28 | 2,09 | 2,17 | 0,79 | 1,81 | 7,37 | 6,48 |
| 6 | 30 (+1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | 6,63 | 10,92 | 11,85 | 2,81 | 21,72 | 23,46 | 5,03 | 7,29 | 3,55 | 1,58 | 11,64 | 14,55 |
| 7 | 24 (-1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | 6,21 | 9,59 | 24,98 | 2,77 | 22,46 | 23,12 | 5,91 | 9,18 | 0,83 | 6,72 | 11,65 | 20,35 |
| 8 | 30 (+1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 2,14 | 3,20 | 3,70 | 0,57 | 6,31 | 7,40 | 1,29 | 1,56 | 0,10 | 0,44 | 3,57 | 2,99 |
| 9 | 24 (-1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | 2,26 | 2,54 | 11,59 | 0,28 | 4,46 | 7,67 | 2,66 | 1,85 | 0,68 | 2,08 | 5,57 | 5,46 |
| 10 | 30 (+1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | 5,60 | 7,56 | 15,54 | 1,23 | 25,28 | 23,07 | 7,35 | 6,38 | 1,49 | 2,19 | 21,43 | 15,46 |
| 11 | 24 (-1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | 6,20 | 9,44 | 21,40 | 5,66 | 18,95 | 21,42 | 8,51 | 8,31 | 3,62 | 8,08 | 22,85 | 18,99 |
| 12 | 30 (+1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | 2,33 | 2,64 | 4,02 | 0,41 | 5,02 | 7,61 | 1,79 | 1,54 | 0,03 | 1,38 | 6,13 | 5,57 |
| 13 | 24 (-1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | 3,83 | 1,44 | 14,00 | 0,46 | 18,19 | 21,81 | 5,44 | 5,72 | 3,88 | 0,92 | 5,76 | 18,91 |
| 14 | 30 (+1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | 1,51 | 2,07 | 5,64 | 0,20 | 7,13 | 8,13 | 2,23 | 1,50 | 0,45 | 0,50 | 1,48 | 5,63 |
| 15 | 24 (-1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | 1,56 | 1,52 | 8,05 | 0,48 | 7,15 | 7,64 | 1,91 | 2,61 | 0,06 | 0,91 | 1,20 | 6,76 |
| 16 | 30 (+1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | 5,07 | 5,95 | 7,77 | 0,88 | 21,79 | 22,50 | 4,05 | 3,73 | 0,83 | 1,01 | 1,59 | 17,85 |
| 17 | 27 (0) | 12 (0) | 3,0 (0) | 4,5 (0) | 80 (0) | 3,54 | 1,72 | 12,81 | 0,92 | 11,41 | 11,10 | 3,23 | 4,07 | 0,81 | 1,48 | 2,14 | 9,78 |
| 18 | 27 (0) | 12 (0) | 3,0 (0) | 4,5 (0) | 80 (0) | 2,99 | 3,53 | 12,73 | 0,89 | 11,03 | 11,17 | 2,49 | 3,45 | 0,64 | 1,25 | 0,97 | 8,11 |
| 19 | 27 (0) | 12 (0) | 3,0 (0) | 4,5 (0) | 80 (0) | 3,73 | 1,94 | 14,95 | 0,97 | 12,03 | 11,25 | 1,90 | 2,42 | 0,68 | 2,24 | 1,95 | 8,67 |

T = temperatura; t = tempo; N = nitrogênio; P = fósforo; U = umidade; DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; AEC = atividade enzimática celulolítica; AEX = atividade enzimática xilanolítica; AEP = atividade enzimática pectinolítica.

Os resultados da AEC e AEX obtidos a partir do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} com o cultivo do fungo *T. harzianum* em FS, para cada tipo de inóculo utilizado (DM e SE), e para os dois substratos sólidos (resíduos de macacaporanga e de pau-rosa), estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividades enzimáticas de celulase e xilanase, obtidas a partir do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} para os ensaios de fermentação sólida utilizando como substrato os resíduos de macacaporanga e pau-rosa e o fungo *Trichoderma harzianum* inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| E N S A I O | VARIÁVEIS | | | | | MACACAPORANGA | | | | PAU-ROSA | | | |
|----------------------------|-----------|----------|----------|----------|---------|---------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | | | | | | AEC (U/gbs) | | AEX (U/gbs) | | AEC (U/gbs) | | AEX (U/gbs) | |
| | T (°C) | t (dias) | N (%) | P (%) | U (%) | DM | SE | DM | SE | DM | SE | DM | SE |
| 1 | 24 (-1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | -0,06 | -0,03 | -0,92 | 0,09 | 1,48 | 0,48 | -2,44 | 0,86 |
| 2 | 30 (+1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 0,02 | 0,60 | 0,60 | -0,09 | 0,58 | 0,02 | -0,18 | -0,41 |
| 3 | 24 (-1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 0,09 | 0,20 | -1,35 | 0,39 | 0,01 | -0,04 | 0,10 | 0,09 |
| 4 | 30 (+1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | 0,13 | 2,71 | -0,35 | 1,01 | 0,15 | 0,20 | 0,26 | 0,20 |
| 5 | 24 (-1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 0,01 | 0,22 | -0,12 | -0,01 | 0,77 | -0,01 | -0,04 | 0,01 |
| 6 | 30 (+1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | -0,05 | 1,31 | 0,75 | 1,14 | 0,57 | 0,25 | -2,8 | 0,22 |
| 7 | 24 (-1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 90 (+1) | 0,21 | 1,13 | 0,09 | 0,88 | 0,14 | 0,46 | -0,57 | -0,18 |
| 8 | 30 (+1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 3,0 (-1) | 70 (-1) | 0,06 | 0,21 | 0,09 | -0,09 | 0,16 | 0,19 | 0,13 | -0,06 |
| 9 | 24 (-1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | -0,15 | 0,23 | -0,41 | 0,41 | 0,07 | 0,18 | 0,10 | 0,16 |
| 10 | 30 (+1) | 9 (-1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | -0,59 | 0,83 | -0,92 | 1,05 | 1,36 | 0,09 | -1,51 | 0,39 |
| 11 | 24 (-1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | 0,18 | 0,78 | -0,31 | 0,61 | 1,59 | 0,14 | -2,90 | -1,54 |
| 12 | 30 (+1) | 15 (+1) | 1,5 (-1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | -0,03 | -0,09 | -0,42 | 0,12 | -0,01 | 0,06 | -0,03 | -0,18 |
| 13 | 24 (-1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | 0,09 | 0,42 | 0,39 | 0,26 | 0,93 | 0,14 | 0,83 | 0,22 |
| 14 | 30 (+1) | 9 (-1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | -0,11 | 0,21 | 0,26 | -0,03 | 0,03 | 0,28 | 0,09 | -0,07 |
| 15 | 24 (-1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 70 (-1) | 0,03 | -0,09 | -0,18 | 0,15 | 0,19 | 0,05 | -0,18 | -0,03 |
| 16 | 30 (+1) | 15 (+1) | 4,5 (+1) | 6,0 (+1) | 90 (+1) | 0,13 | -0,01 | 0,75 | 0,18 | -0,13 | 0,64 | 0,92 | 0,26 |
| 17 | 27 (0) | 12 (0) | 3 (0) | 4,5 (0) | 80 (0) | 0,22 | 0,11 | -0,22 | 0,28 | -0,48 | 0,05 | 0,53 | -0,42 |
| 18 | 27 (0) | 12 (0) | 3 (0) | 4,5 (0) | 80 (0) | 0,27 | -0,01 | 0,59 | 0,61 | -0,62 | 0,01 | -1,34 | 0,07 |
| 19 | 27 (0) | 12 (0) | 3 (0) | 4,5 (0) | 80 (0) | 0,54 | 0,11 | -0,15 | 0,55 | -0,55 | 0,05 | -0,26 | 0,02 |

T = temperatura; t = tempo; N = nitrogênio; P = fósforo; U = umidade; DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; AEC = atividade enzimática celulolítica; AEX = atividade enzimática xilanolítica

5.3.1 Triagem das Variáveis Significativas para o Processo Fermentativo

Analisando os resultados das atividades enzimáticas, apresentados nas Tabelas 7 e 8, utilizando os fungos *A. brasiliensis* e *T. harzianum*, respectivamente, pode-se observar que os maiores valores de atividades enzimáticas estão na Tabela 7, quando utilizado o fungo *A. brasiliensis*. Percebe-se também na Tabela 7 que, comparando os resíduos de macacaporanga e pau-rosa utilizados como substrato da FS, os melhores resultados para as atividades enzimáticas (celulase, xilanase e pectinase) foram obtidos nos ensaios com a macacaporanga.

Os valores de atividades enzimáticas (celulase e xilanase) apresentadas na Tabela 8, obtidas na FS com o fungo *T. harzianum*, estão abaixo do esperado, o que pode ser explicado pelo fato de que as espécies *A. parviflora* e *A. rosaeodora*, das quais os resíduos foram utilizados, produzem uma substância conhecida como linalol. Esta substância apresenta efeito antifúngico para alguns fungos, o que pode ter inibido o crescimento do *T. harzianum*, em especial quando o resíduo de pau-rosa foi utilizado, uma vez que a concentração de linalol

nesta espécie varia de 74 a 96% no seu óleo essencial (GOTTLIEB e MORS, 1958; ARAUJO et al., 1971; MAIA et al., 2007), enquanto que na macacaporanga, o linalol está presente, em média, na concentração de 35% (MARQUES, 2001).

Considerando que a destilação por arraste a vapor não extrai 100% do óleo essencial, é possível que substâncias com efeito antifúngico, como o linalol e a cotoína estivessem presentes no resíduo sólido utilizado nos ensaios de FS, dificultando a adaptação dos microrganismos para a produção enzimática. O fato de que o fungo *T. harzianum* mostrou-se menos adaptado aos resíduos da hidrodestilação de espécies da família Laurácea do que o *A. brasiliensis* pode ser explicado pela maior sensibilidade da espécie de *Trichoderma* às substâncias antifúngicas presentes nos substratos.

Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) utilizaram o fungo *T. harzianum* na produção de CMCase e obtiveram um bom valor de atividade enzimática (1,64 U/mL) após 4 dias de cultivo a uma temperatura de 25°C em farelo de trigo. Quando cultivado no resíduo de macacaporanga, a atividade máxima de CMCase observada foi de 0,45 U/mL e de 0,25 U/mL quando o resíduo de pau-rosa foi empregado.

Para a produção de xilanase, esta espécie fúngica também já foi relatada como promissora. Rezende e colaboradores (2002) utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a produção de xilanase pelo fungo *T. harzianum* Rifai, verificando a maior AEX (288 U/mL) no sétimo dia de cultivo. No presente trabalho, o fungo *T. harzianum* não apresentou resultado satisfatório para a AEX quando cultivado nos resíduos de macacaporanga (0,15 U/mL) e pau-rosa (0,14 U/mL).

Em geral, as espécies do gênero *Trichoderma* são relatadas como boas produtoras de celulasas e xilanasas, independentemente de suas condições de cultivo. No trabalho de Maurya e colaboradores (2012), por exemplo, foi obtida a produção máxima de celulase (2,63 U/mL) com o fungo *T. reesei* NCIM 992, utilizando como substrato farelo de trigo com umidade de 70%, na temperatura de 30°C após 6 dias de cultivo. Já no trabalho de Kar e colaboradores (2006), obtiveram a produção máxima de xilanase (4,75 U/mL) com o fungo *T. reesei* SAF3, em condições submersas contendo xilano, na temperatura de 30°C, durante 72 horas.

Considerando os baixos valores de atividade de celulase e xilanase obtidos com o *T. harzianum* cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, optou-se por não verificar a atividade pectinolítica deste fungo.

Cabe ressaltar que a maior concentração de linalol presente na espécie *A. rosaedora* e, conseqüentemente, no resíduo da hidrodestilação, pode explicar o fato de que as atividades celulolíticas, xilanolíticas e pectinolíticas foram menores quando o resíduo de pau-rosa foi utilizado na FS, quando comparadas às AEC AEX e AEP obtidas com o resíduo de *A. parviflora*, para ambos os fungos (Tabelas 7 e 8).

No que diz respeito às formas de inóculo, percebe-se na Tabela 7 que para o fungo *A. brasiliensis*, quando cultivado no resíduo de macacaporanga, o DM forneceu as maiores atividades de xilanase e pectinase, enquanto que a SE foi a melhor forma de inóculo para a produção de celulase. Quando este fungo foi cultivado no resíduo de pau-rosa, a SE foi a melhor forma de inóculo para a produção de celulase e xilanase, enquanto que o DM forneceu o maior valor de AEP.

Para o fungo *T. harzianum* cultivado no resíduo de macacaporanga (Tabela 8), o inóculo na forma de SE foi mais adequado para a produção de celulase e xilanase, enquanto que no resíduo de pau-rosa a forma de inóculo DM foi melhor para a produção das duas enzimas.

A continuação da discussão dos resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 está apresentada a seguir, considerando cada uma das enzimas de interesse e as variáveis de estudo.

5.3.1.1 Celulase

A comparação da AEC do fungo *A. brasiliensis* para os dois tipos de resíduos (macacaporanga e pau-rosa) e formas de inóculo (DM e SE) pode ser observada na Tabela 7. Para o resíduo de macacaporanga, observa-se que o melhor resultado para a atividade de celulase ($12,86 \text{ U/gbs} = 2,25 \text{ U/mL}$) foi obtido no ensaio 4, quando utilizado como inóculo a SE, níveis máximos de umidade (90%), temperatura (30°C) e tempo de cultivo (15 dias) e níveis mínimos de fósforo (3,0%) e nitrogênio (1,5%). Já para o resíduo de pau-rosa, o melhor resultado ($10,38 \text{ U/gbs} = 1,8 \text{ U/mL}$) foi obtido no ensaio 1, quando utilizado como inóculo a

SE, nível máximo de umidade (90%) e níveis mínimos de temperatura (24°C), tempo de cultivo (9 dias), fósforo (3,0%) e nitrogênio (1,5%).

A comparação da AEC do fungo *T. harzianum* para os dois tipos de resíduos (macacaporanga e pau-rosa) e formas de inóculos (DM e SE) pode ser observada na Tabela 8. Para o resíduo de macacaporanga, observa-se que o melhor resultado para a atividade de celulase (2,71 U/gbs = 0,45 U/mL) foi obtido no ensaio 4, quando utilizado como inóculo a SE, níveis máximos de umidade (90%), temperatura (30°C) e tempo de cultivo (15 dias) e níveis mínimos de fósforo (3,0%) e nitrogênio (1,5%). Este resultado corresponde à apenas 15% do valor apresentado para o fungo *A. brasiliensis* nas mesmas condições de cultivo. Já para o resíduo de pau-rosa, o melhor resultado (1,59 U/gbs = 0,25 U/mL) foi obtido no ensaio 11, quando utilizado como inóculo o DM, níveis máximos de umidade (90%), tempo de cultivo (15 dias) e fósforo (6,0%) e níveis mínimos de temperatura (24°C) e nitrogênio (1,5%). Este resultado corresponde a 21% do valor apresentado para o fungo *A. brasiliensis* utilizando a mesma umidade (90%), temperatura (24°C) e concentração de nitrogênio (1,5%).

No trabalho de Sales e colaboradores (2010), quando utilizado o fungo *A. aculeatus* URM 4953 na FS do bagaço de cana-de-açúcar com tempo de cultivo de 7 dias (168 horas) e temperatura de 30°C, foi verificado para a atividade de celulases totais 0,45 UI/mL e um valor de atividade de endoglucanase de 0,60 UI/mL, cerca de 3,8 vezes mais baixo que o observado no presente trabalho para esta enzima (2,25 U/mL).

Jecu (2000), utilizando a temperatura de cultivo de 30°C, encontrou o valor de atividade de endoglucanase de 10,30 IU/mL, cerca de 4,6 vezes mais alta que a observada neste trabalho em ensaio realizado nesta temperatura (Tabela 7, ensaio 4). O autor utilizou o fungo *A. niger* 38 e como substrato da FS uma mistura de palha e farelo de trigo em diferentes proporções, suplementada com 10 g/L de (NH₄)SO₄, 3 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O e 0,5 g/L de CaCl₂.H₂O (TOYAMA e OGAWA, 1977).

Segundo Singhania e colaboradores (2006), a temperatura de incubação é um fator importante que afeta a produção da enzima na FS, e normalmente, varia de 25 a 35°C, dependendo, principalmente, da cinética de crescimento do microrganismo utilizado. A temperatura encontrada pelos autores para a produção máxima de celulase (56,5 U/gds) foi de 28°C, um pouco abaixo da temperatura (30°C) do presente trabalho para a produção de celulase. Os autores utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato inoculado com o fungo *T. reesei* NRRL 11460.

A diferença dos resultados das AEC apresentadas nos trabalhos de Jecu (2000) e Sales e colaboradores (2010), quando comparados aos obtidos neste trabalho, pode ser devida a vários fatores, como a espécie de fungo utilizada pois, como reportado em vários trabalhos na literatura (JECU, 2000; KANG et al., 2004; SOHAIL et al., 2009; FARINAS et al., 2011; BANSAL et al., 2012; CUNHA et al., 2012; NCUBE et al., 2012), *A. niger* é a espécie mais utilizada para a produção de celulases. Além disso, a diferença entre a composição do substrato utilizado neste trabalho e no de Jecu (2000) pode ter sido a principal causa da diferença entre os valores de AEC, tendo em vista que os resíduos de macacaporanga e pau-rosa foram suplementados apenas com nitrogênio e fósforo.

Para Montesinos e colaboradores (1996), a seleção da fonte de nitrogênio mais adequada depende do microrganismo usado e da associação com outros ingredientes no meio de cultura. Conforme Macedo (1998), um destes nutrientes é o fósforo, utilizado nas reações biossintéticas e que também pode ser polimerizado para manter o nível de fosfato celular e promover o crescimento da célula. O fosfato inorgânico é a fonte de fósforo necessária ao metabolismo de microrganismos. Numa célula fúngica, cerca de 0,4 a 4,5% da massa seca corresponde ao fósforo, embora o requerimento para cada microrganismo possa ser variável. A concentração ótima de fosfato depende de fatores tais como fontes de carbono, nitrogênio e oxigênio. No presente trabalho, as maiores atividades de celulase foram obtidas quando a menor concentração de fósforo foi utilizada (3,0%), valor este que encontra-se dentro da faixa da concentração deste nutriente na célula fúngica.

Na FS, após a escolha da espécie do fungo, um importante fator na hora de se produzir uma enzima é a forma de inóculo (DM ou SE). Em alguns trabalhos citados na literatura, o inóculo fúngico é utilizado na forma de SE, apresentando diferentes concentrações: 1×10^5 UFC/mL (JABASINGH, 2011); 1×10^6 UFC/mL (WEN, LIAO e CHEN, 2005; NCUBE et al., 2012); 1×10^7 UFC/mL (WEN, LIAO e CHEN, 2005; LIU, SUN e DU, 2011; CUNHA et al., 2012; NORATIQAHA et al., 2013); 1×10^8 UFC/mL (NARRA et al., 2012); $1,4 \times 10^7$ UFC/mL (SINGH et al., 2009) e $1,4 \times 10^8$ UFC/mL (ACHARYA et al., 2010). Também é utilizado na forma de DM, como reportado por Bansal e colaboradores (2012) que utilizaram 5 discos miceliais de 7 mm no inóculo de *A. niger*.

Assim, consolidando os resultados observados nas Tabelas 7 e 8, pode-se verificar que os fatores que proporcionaram a melhor AEC foram: a maior temperatura (30°C), o maior tempo de cultivo (15 dias), os menores níveis dos nutrientes, nitrogênio (1,5%) e fósforo

(3,0%) e a maior umidade (90%), utilizando o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de SE no resíduo de macacaporanga.

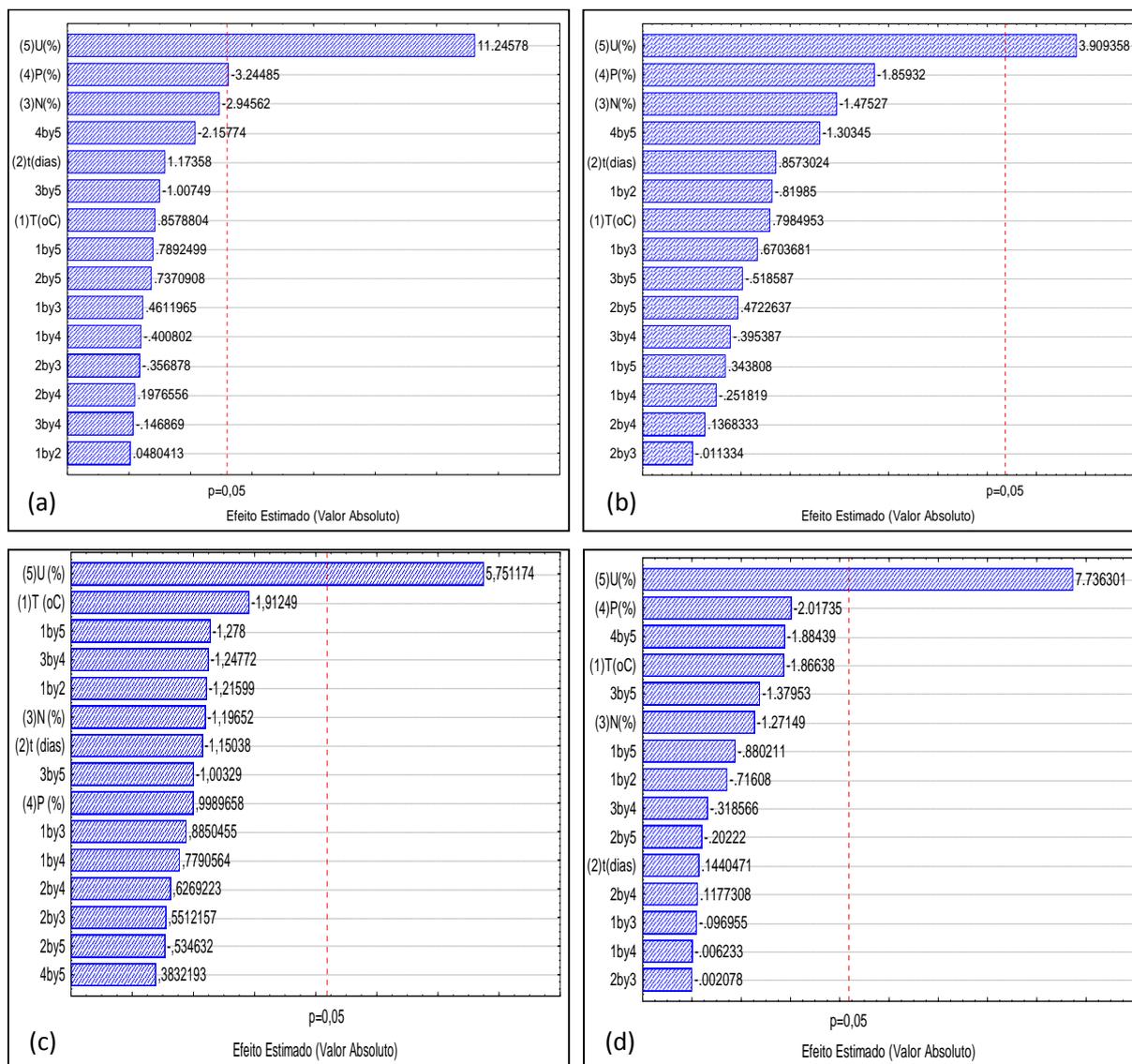
A partir da análise estatística, foram obtidos os valores dos efeitos de cada parâmetro estudado (umidade, temperatura, tempo, nitrogênio e fósforo) sobre a AEC. O Diagrama de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes. A Figura 23 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEC do fungo *A. brasiliensis*. De acordo com a Figura 23a, para a atividade de celulase, os efeitos umidade e fósforo foram estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%, utilizando o inóculo na forma de DM e o resíduo de macacaporanga. Na sequência, aparecem os efeitos da adição de nitrogênio, o tempo e a temperatura de cultivo, os quais não são estatisticamente significativos.

Nas Figuras 23b (inóculo na forma de SE e resíduo de macacaporanga), 23c (inóculo na forma de DM e resíduo de pau-rosa) e 23d (inóculo na forma de SE com o resíduo de pau-rosa) nota-se que somente a umidade é estatisticamente significativa para a AEC no nível de confiança de 95%. Os efeitos da adição de fósforo e nitrogênio, bem como o tempo e a temperatura de cultivo não apresentaram nenhuma significância estatística.

Analisando os Diagramas de Pareto da AEC para o fungo *A. brasiliensis* (Figura 23), pode-se afirmar que a variável umidade é a mais importante para a FS de resíduos de Lauráceas, afetando a produção de celulase de forma positiva, ou seja, observaram-se maiores valores de atividade enzimática quando as concentrações de umidade do meio eram maiores.

A umidade determina a concentração de água existente em um determinado material, sendo expresso normalmente em termos percentuais, indicando a quantidade de água disponível para o microrganismo. A adição de água ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo, assim como, a adição de soluções nutrientes (CORREIA, 2004). Conforme reportado em outros trabalhos (ALBERTON, 2004; VARGAS, 2004; SPIER, 2005; PARIS, 2008; ROCHA, 2010), o fator umidade também influencia de forma positiva a produção de enzimas fúngicas por FS.

Figura 23 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática celulolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo de pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d).

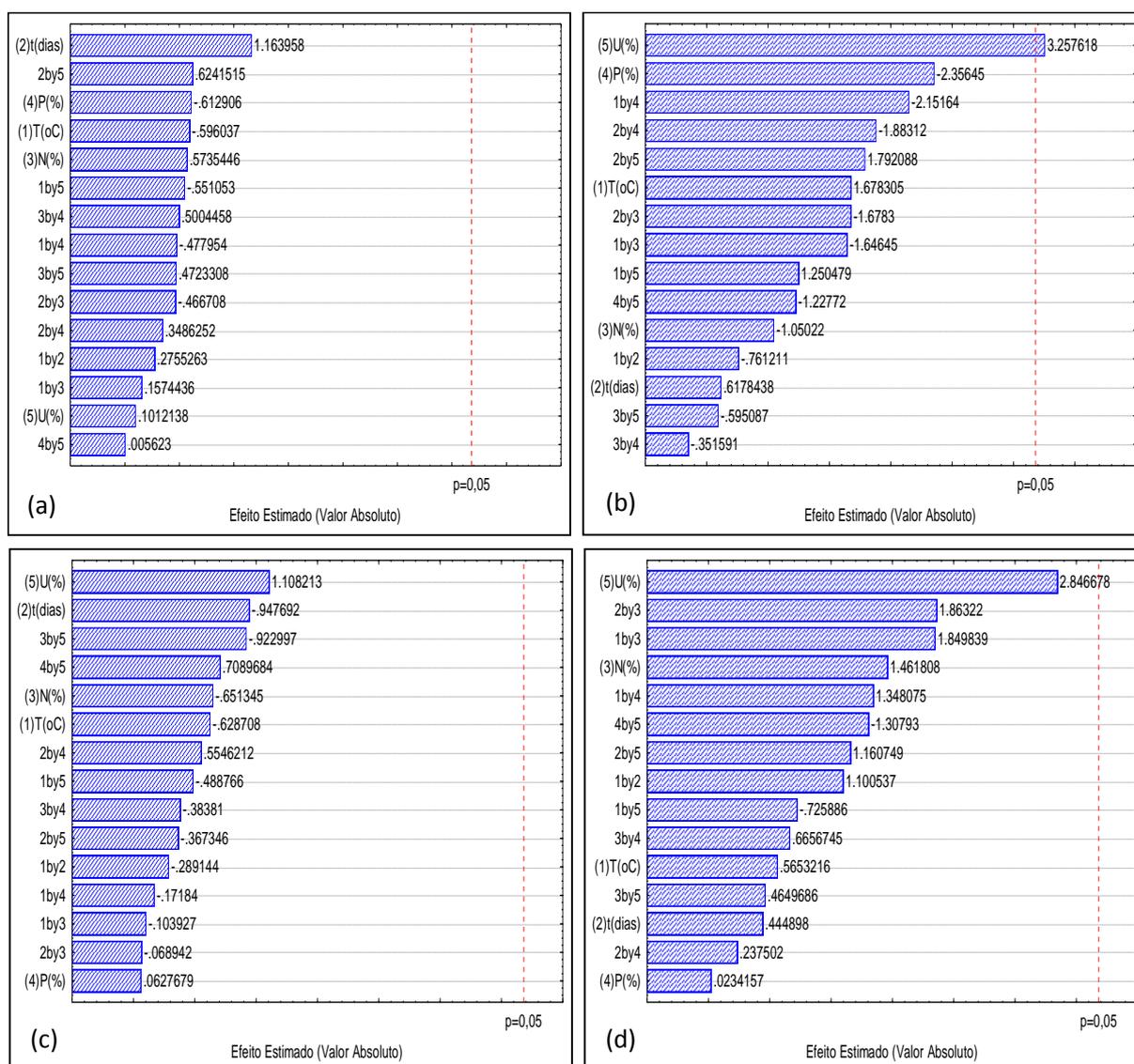


A Figura 24 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEC do fungo *T. harzianum*. De acordo com a Figura 24b, somente a umidade foi estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%, utilizando o inóculo na forma de SE e o resíduo de macacaporanga. Os efeitos da adição de fósforo e nitrogênio, tempo e temperatura de cultivo aparecem na sequência do Diagrama, e não apresentaram nenhuma significância estatística.

Nas Figuras 24a (inóculo na forma de DM e resíduo de macacaporanga), 24c (inóculo na forma de DM e resíduo de pau-rosa) e 24d (inóculo na forma de SE e resíduo de pau-rosa),

para a produção de celulase pelo fungo *T. harzianum*, nenhum dos efeitos (umidade, tempo e temperatura de cultivo, adição de fósforo e nitrogênio) mostrou-se estatisticamente significativo para o nível de confiança de 95%.

Figura 24 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática celulolítica do fungo *Trichoderma harzianum* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d).



Após analisar os resultados de atividade celulolítica do fungo *T. harzianum* (Tabela 8) e os Diagramas de Pareto (Figura 24), pode-se dizer que o mesmo não apresentou resultados satisfatórios para a produção dessa enzima. Sendo assim, para os resultados obtidos com este

fungo não serão apresentadas as tabelas das estimativas dos efeitos, nem as superfícies de resposta, apresentadas a seguir apenas para os resultados obtidos com o fungo *A. brasiliensis*.

Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a AEC obtidos com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo *A. brasiliensis* cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa e inoculado na forma de DM e SE estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática celulolítica obtida com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| | Macacaporanga | | | | Pau-rosa | | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | DM | | SE | | DM | | SE | |
| | Efeito | p | Efeito | p | Efeito | p | Efeito | p |
| Média | 4,01530 | 0,000151 | 5,04256 | 0,005234 | 3,68760 | 0,001317 | 4,45772 | 0,000847 |
| (X ₁)Temperatura | 0,30763 | 0,454031 | 1,19630 | 0,482951 | -1,30557 | 0,151754 | -1,32649 | 0,158822 |
| (X ₂)tempo | 0,42084 | 0,325256 | 1,28441 | 0,454305 | -0,78531 | 0,333368 | 0,10238 | 0,894595 |
| (X ₃)Nitrogênio | -1,05627 | 0,060237 | -2,21025 | 0,236605 | -0,81681 | 0,317431 | -0,90369 | 0,293178 |
| (X₄)Fósforo | -1,16357 | 0,047675 | -2,78563 | 0,159937 | 0,68195 | 0,391430 | -1,43379 | 0,137006 |
| (X₅)Umidade | 4,03263 | 0,001508 | 5,85699 | 0,029735 | 3,92607 | 0,010443 | 5,49842 | 0,004491 |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; $p \leq 0,05$.

Observa-se na Tabela 9 que a umidade apresentou efeito significativo e positivo sobre a AEC ($p \leq 0,05$). Este resultado indica que aumentando de 70 para 90% a umidade do meio sólido, a atividade enzimática aumenta. Dessa forma, esta variável deve ser avaliada nos planejamentos experimentais subsequentes, onde os valores dos níveis dessa variável devem ser deslocados para níveis superiores (acima de 90%), a fim de se obter maiores atividades celulolíticas.

A umidade ótima para o cultivo do microrganismo em FS é dependente da capacidade do substrato em reter água. Assim, o microrganismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento na FS. Uma pequena mudança nestes valores ótimos causa um grande distúrbio no crescimento e metabolismo dos microrganismos (ANDRADE, 1999). Por exemplo, o nível de umidade ótimo para o cultivo de *A. niger* em arroz é de 40%, entretanto, para polpa de café é de 80% (DOELLE, MITCHELL e ROLZ, 1992).

Segundo Dietenberger e colaboradores (1999), o teor de umidade da madeira depende da quantidade de vapor d'água ou de água armazenado no lúmen e nas cavidades e, também, das moléculas de água que estabelecem ligações químicas entre as paredes celulares. No

presente trabalho, para os resíduos de macacaporanga e de pau-rosa utilizados na FS do fungo *A. brasiliensis*, o melhor resultado de atividade de celulase foi obtido com o nível de umidade de 90%. Este alto valor de umidade provavelmente deve-se ao fato de que estes resíduos compostos por galhos e folhas são capazes de reter maior quantidade de água, e pelo fato do fungo se adaptar melhor ao meio com maior umidade para produzir a enzima.

Além da umidade, a adição de fósforo foi estatisticamente significativa para AEC dentro da faixa de significância estudada (5%), apenas para o resíduo de macacaporanga inoculado com DM. A adição de fósforo apresentou um efeito negativo sobre a atividade celulolítica, ou seja, com o aumento da concentração deste nutriente, verifica-se que a produção de celulase no fungo *A. brasiliensis* diminuiu. Sendo assim, esta variável deve ser avaliada em planejamentos experimentais subsequentes, onde o nível referente à concentração de fósforo deve ser deslocado para níveis inferiores (abaixo de 3,0%).

A concentração de nitrogênio, o tempo e a temperatura de cultivo foram as variáveis que não se mostraram estatisticamente significativas a 95% de confiança para a produção de celulase. Portanto, para os experimentos subsequentes, estas variáveis devem ser utilizadas em seus níveis mais baixos. A concentração de nitrogênio deve ser utilizada a 1,5%, e as variáveis tempo e temperatura de cultivo devem ser fixadas em 9 dias e 24°C, respectivamente.

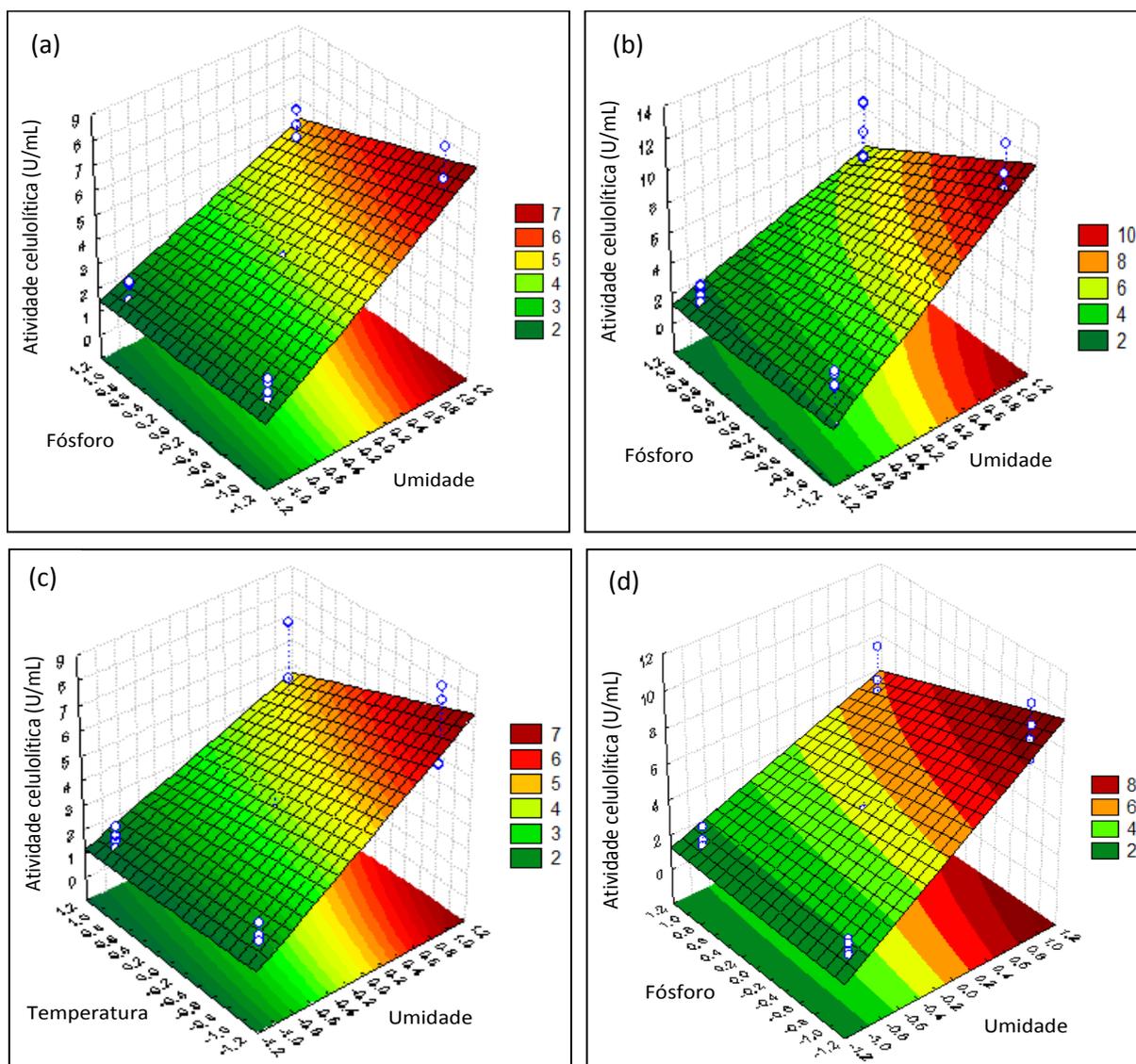
Tendo em vista as variáveis que não influenciam significativamente a produção de celulase por *A. brasiliensis* e considerando a produção industrial de enzimas, para garantir a viabilidade econômica do processo, torna-se mais interessante utilizar menores quantidades de insumos, bem como diminuir o tempo de processo. Estas medidas representariam uma forma mais vantajosa para a produção de celulases, pois seria utilizada menos energia, em temperaturas mais baixas, e um menor tempo de operação.

Utilizando a ferramenta de planejamento experimental e a análise de superfícies de resposta, torna-se possível investigar a influência de determinadas variáveis em um processo, bem como obter o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Na realização do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , que visou realizar a triagem das variáveis estatisticamente significativas sobre a produção de celulase pelo fungo *A. brasiliensis*, cultivado em resíduo de *A. parviflora* e *A. rosaeodora*, foi possível avaliar

graficamente o efeito das variáveis sobre a AEC com o uso do inóculo na forma de DM e SE através da análise das superfícies de resposta (Figura 25).

Figura 25 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática celulolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração do fósforo; cultivado no resíduo de pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) como uma função da umidade e da temperatura; e cultivado no resíduo de pau-rosa e inoculado na forma de suspensão de esporos (d) como uma função da umidade e da concentração do fósforo.



As variáveis apresentadas nas superfícies de resposta da Figura 25 foram escolhidas de acordo com sua influência sobre a resposta avaliada (AEC). Dessa forma, os dois fatores mais relevantes (e não necessariamente estatisticamente significativos) foram utilizados para a visualização dos efeitos.

Na Figura 25a observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEC do fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga e inoculado na forma de DM, como uma função da umidade e da concentração do fósforo. Fica clara a maior significância da variável umidade sobre a resposta AEC, pois o aumento da umidade leva a um significativo aumento na atividade enzimática, e este efeito é ainda mais pronunciado com baixas concentrações de fósforo. O mesmo comportamento ocorre nas Figuras 25b e 25d, onde observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEC do fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de SE nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, respectivamente, como uma função da umidade e da concentração do fósforo.

Na Figura 25c observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEC do fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo do pau-rosa e inoculado na forma de DM como uma função da umidade e da temperatura. Fica clara a maior significância da variável umidade sobre a AEC e o fato de que o aumento da temperatura também aumenta a AEC.

Uma vez que as variáveis U e P apresentaram significância estatística para a produção de celulase, estas devem ser estudadas no planejamento fatorial completo subsequente, utilizando o resíduo da macacaporanga e o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de SE. A umidade deve ser deslocada para níveis superiores (acima de 90%), a concentração de fósforo deve ser deslocada para níveis inferiores (abaixo de 3,0%), e as variáveis nitrogênio, tempo e temperatura de cultivo devem ser fixadas nos menores níveis estudados, de 1,5%, 9 dias e 24°C, respectivamente.

5.3.1.2 Xilanase

A comparação da AEX do fungo *A. brasiliensis* para os dois tipos de resíduos (macacaporanga e pau-rosa) e formas de inóculo (DM e SE) pode ser observada na Tabela 7. Observa-se que o melhor resultado para a atividade de xilanase, tanto para o resíduo de macacaporanga (36,79 U/gbs = 6,4 U/mL) como para o de pau-rosa (14,16 U/gbs = 2,45 U/mL), foi obtido no ensaio 1, quando utilizado como inóculo a SE, níveis máximos de umidade (90%) e níveis mínimos de temperatura (24°C), tempo de cultivo (9 dias), fósforo (3,0%) e nitrogênio (1,5%).

A comparação da AEX do fungo *T. harzianum*, para os dois resíduos (macacaporanga e pau-rosa) e formas de inóculo (DM e SE) está apresentada na Tabela 8. Para o resíduo de

macacaporanga, observa-se que o melhor resultado para a atividade de xilanase (1,14 U/gbs = 0,15 U/mL) foi obtido no ensaio 6, quando utilizado como inóculo a SE, níveis máximos de umidade (90%), temperatura (30°C) e nitrogênio (4,5%) e níveis mínimos do tempo de cultivo (9 dias) e de fósforo (3,0%). Este resultado corresponde a apenas 3,1% do valor apresentado para o fungo *A. brasiliensis* utilizando a mesma umidade (90%), tempo de cultivo (9 dias) e concentração de fósforo (3,0%). Já para o resíduo de pau-rosa, o melhor resultado (0,92 U/gbs = 0,14 U/mL) foi obtido no ensaio 16, quando utilizado como inóculo o DM, níveis máximos de umidade (90%), tempo de cultivo (15 dias), temperatura (30°C), fósforo (6,0%) e nitrogênio (4,5%). Este resultado corresponde a 6,5% do valor apresentado para o fungo *A. brasiliensis* utilizando a mesma umidade (90%).

No trabalho realizado por Maciel (2006) verificou-se que a melhor AEX (3,09 UI/gms) foi obtida quando utilizado uma mistura de bagaço de cana (65%) e farelo de soja (35%) com umidade de 85% na FS do fungo *A. niger* LPB 326 durante 10 dias de cultivo a 30°C. Este autor suplementou o substrato sólido com CuSO₄ a 0,4 g/L, KH₂PO₄ a 1,5 g/L e CoSO₄ a 0,0012 g/L. No presente trabalho, utilizando o resíduo de macacaporanga, obteve-se uma AEX 11,9 vezes mais alta que a reportada para Maciel (2006), utilizando-se o dobro da quantidade de KH₂PO₄, umidade um pouco mais alta (90%) e temperatura mais baixa (24°C).

Outros trabalhos reportados na literatura indicam a alta aplicabilidade do gênero *Aspergillus* na produção de xilanase. Sales e colaboradores (2010) utilizaram como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e observaram que a melhor AEX (30,05 U/mL) ocorreu quando o fungo *A. aculeatus* URM 4953 foi cultivado por 72h a 30°C. Por sua vez, Kheng e Omar (2005), verificaram a maior AEX (33,99 U/g), quando utilizaram torta de dendê como substrato, suplementada com fonte de nitrogênio (0,075%) para o cultivo do fungo *A. niger* USM AI 1 durante 7 dias a 28°C. Couri e colaboradores (2000) obtiveram a melhor AEX (30,62 U/mL) quando utilizaram farelo de trigo na FS do fungo *A. niger* 3T5B8, sendo cultivado durante apenas 42h.

Os diferentes substratos, bem como as diferentes linhagens fúngicas podem justificar as diferenças observadas para os valores de AEX obtidos neste trabalho e os reportados na literatura. Conforme Gutierrez e colaboradores (1998), as condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio, concentração de nutrientes afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto.

Cabe salientar que apenas no trabalho descrito por Kheng e Omar (2005) o tempo de cultivo (7 dias) para a produção de xilanase fúngica foi comparável ao utilizado neste trabalho (9 dias). Quando comparado aos tempos de cultivo descritos por Sales e colaboradores (2010) e Couri e colaboradores (2000) para a produção desta enzima, de 72 e 42h, respectivamente, verifica-se que esta é uma variável que deve ser considerada, especialmente para o aumento de escala deste processo.

Assim, consolidando os resultados observados nas Tabelas 7 e 8, pode-se verificar que os fatores que proporcionaram a melhor AEX foram: a menor temperatura (24°C), o menor tempo de cultivo (9 dias), os menores níveis dos nutrientes, nitrogênio (1,5%) e fósforo (3,0%) e a maior umidade (90%), utilizando o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM no resíduo de macacaporanga.

A partir da análise estatística, foram obtidos os valores dos efeitos de cada parâmetro estudado (umidade, temperatura, tempo, nitrogênio e fósforo) sobre a AEX. A Figura 26 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEX do fungo *A. brasiliensis*. De acordo com a Figura 26a, para a atividade de xilanase, os efeitos umidade, nitrogênio, fósforo e temperatura foram estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%, utilizando o inóculo na forma de DM e o resíduo de macacaporanga. Na sequência, aparece o efeito do tempo de cultivo, o qual não foi estatisticamente significativo.

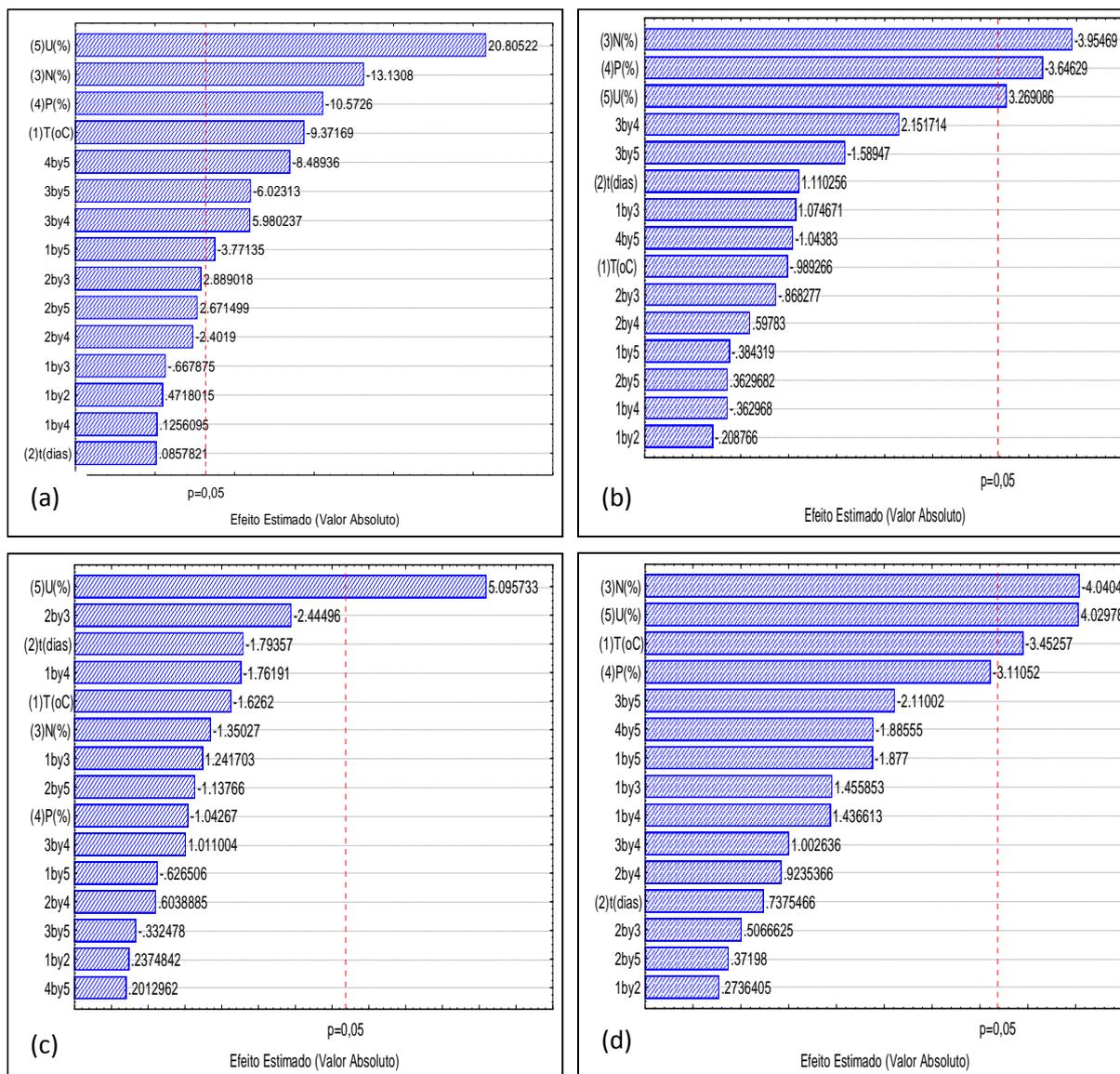
Na Figura 26b nota-se que o nitrogênio, o fósforo e a umidade são estatisticamente significativos para a AEX ao nível de confiança de 95% e que somente a umidade influencia positivamente na produção da xilanase utilizando o inóculo na forma de SE e o resíduo de macacaporanga. Os efeitos do tempo de cultivo e da temperatura aparecem na sequência, e não apresentaram significância estatística.

Na Figura 26c verifica-se que somente a umidade é estatisticamente significativa para a produção de xilanase ao nível de confiança de 95% e que a mesma influencia positivamente na produção da enzima utilizando o inóculo na forma de DM e o resíduo de pau-rosa. Os efeitos do tempo de cultivo, temperatura, nitrogênio e fósforo aparecem na sequência, e não são estatisticamente significativos.

Na Figura 26d observa-se que o nitrogênio, a umidade e a temperatura são estatisticamente significativos para a AEX ao nível de confiança de 95% e que somente a umidade influencia positivamente na produção da xilanase utilizando o inóculo na forma de

SE com o resíduo de pau-rosa. Aparecem na sequência os efeitos fósforo e tempo de cultivo, os quais não apresentaram nenhuma significância estatística para o nível de confiança 95%.

Figura 26 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d).



Analisando os Diagramas de Pareto da AEX para o fungo *A. brasiliensis*, pode-se afirmar que o único fator que não influenciou de forma estatisticamente significativa a produção de xilanase foi o tempo de cultivo. Esta variável, apesar de ser fundamental para

processos em escala industrial, não mostrou-se importante quando o fungo *A. brasiliensis* foi cultivado por FS nos resíduos de Lauráceas.

O controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Dessa forma pode-se afirmar que a observação desses fatores e o trato correto em relação a cada um deles certamente trará um melhor resultado ao processo de FS (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001; PANDEY, 2002).

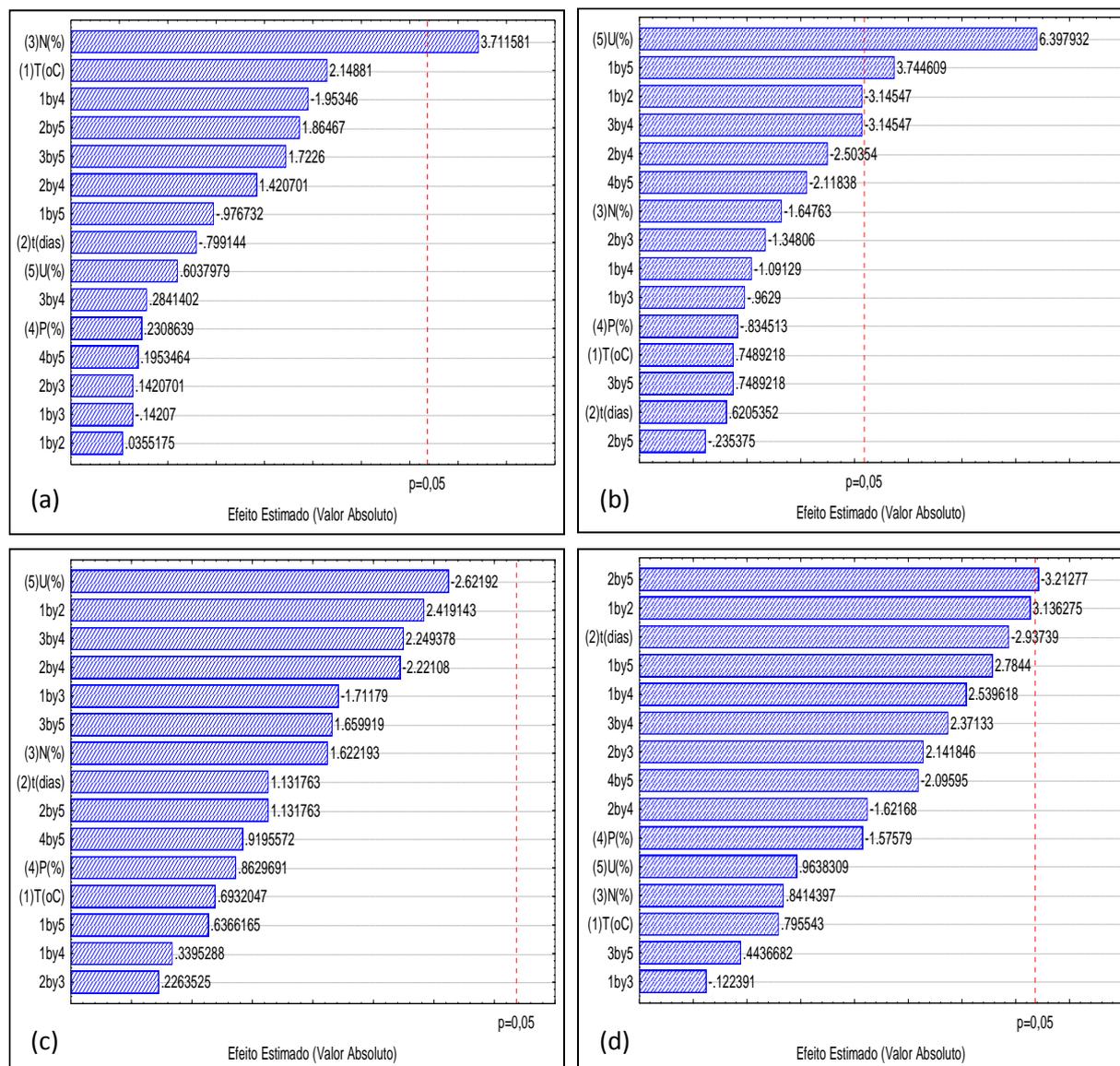
A Figura 27 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEX do fungo *T. harzianum*. De acordo com a Figura 27a, somente a adição de nitrogênio mostra-se estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95% e influencia positivamente a produção da xilanase, utilizando o inóculo na forma de DM e o resíduo de macacaporanga. Os efeitos temperatura, e tempo de cultivo, umidade e fósforo aparecem na sequência, e não apresentaram significância estatística.

Na Figura 27b, nota-se que utilizando o inóculo na forma de SE e o resíduo de macacaporanga, assim como observado na Figura 26c (inóculo na forma de DM e o resíduo de pau-rosa), somente a umidade mostrou-se estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95% e que a mesma influencia positivamente na produção da xilanase. Os efeitos da adição de nitrogênio e fósforo, temperatura e tempo de cultivo aparecem na sequência, e não apresentaram significância estatística.

Nas Figuras 27c (inóculo na forma de DM) e 27d (inóculo na forma de SE) verifica-se que para a produção da xilanase no resíduo de pau-rosa nenhum dos efeitos (umidade, nitrogênio, tempo de cultivo, fósforo e temperatura) apresentou-se estatisticamente significativo para o nível de confiança de 95%.

Após analisar os resultados de atividade xilanolítica do fungo *T. harzianum* (Tabela 8) e os Diagramas de Pareto (Figura 27), pode-se dizer que, assim como observado para a celulase, o mesmo não apresentou resultados satisfatórios para a produção dessa enzima. Sendo assim, para os resultados obtidos com este fungo não serão apresentadas as tabelas das estimativas dos efeitos, nem as superfícies de resposta, apresentadas a seguir apenas para os resultados obtidos com o fungo *A. brasiliensis*.

Figura 27 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Trichoderma harzianum* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d).



Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a AEX obtidos com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo *A. brasiliensis* cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa e inoculado na forma de DM e SE estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática xilanolítica obtida com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| | Macacaporanga | | | | Pau-rosa | | | |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | DM | | SE | | DM | | SE | |
| | Efeito | p | Efeito | p | Efeito | p | Efeito | p |
| Média | 14,05289 | 0,000016 | 2,34019 | 0,007034 | 1,448588 | 0,004373 | 3,17885 | 0,003936 |
| (X₁) Temperatura | -5,59499 | 0,002573 | -0,76270 | 0,395464 | -0,657535 | 0,202381 | -2,95388 | 0,040860 |
| (X ₂) tempo | 0,05121 | 0,937044 | 0,85598 | 0,347875 | -0,725209 | 0,170776 | 0,63101 | 0,514240 |
| (X₃) Nitrogênio | -7,83920 | 0,000954 | -3,04899 | 0,028855 | -0,545964 | 0,269763 | -3,45686 | 0,027279 |
| (X₄) Fósforo | -6,31197 | 0,001808 | -2,81121 | 0,035585 | -0,421590 | 0,373732 | -2,66123 | 0,052860 |
| (X₅) Umidade | 12,42091 | 0,000243 | 2,52040 | 0,046809 | 2,060397 | 0,014611 | 3,44771 | 0,027469 |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; $p \leq 0,05$.

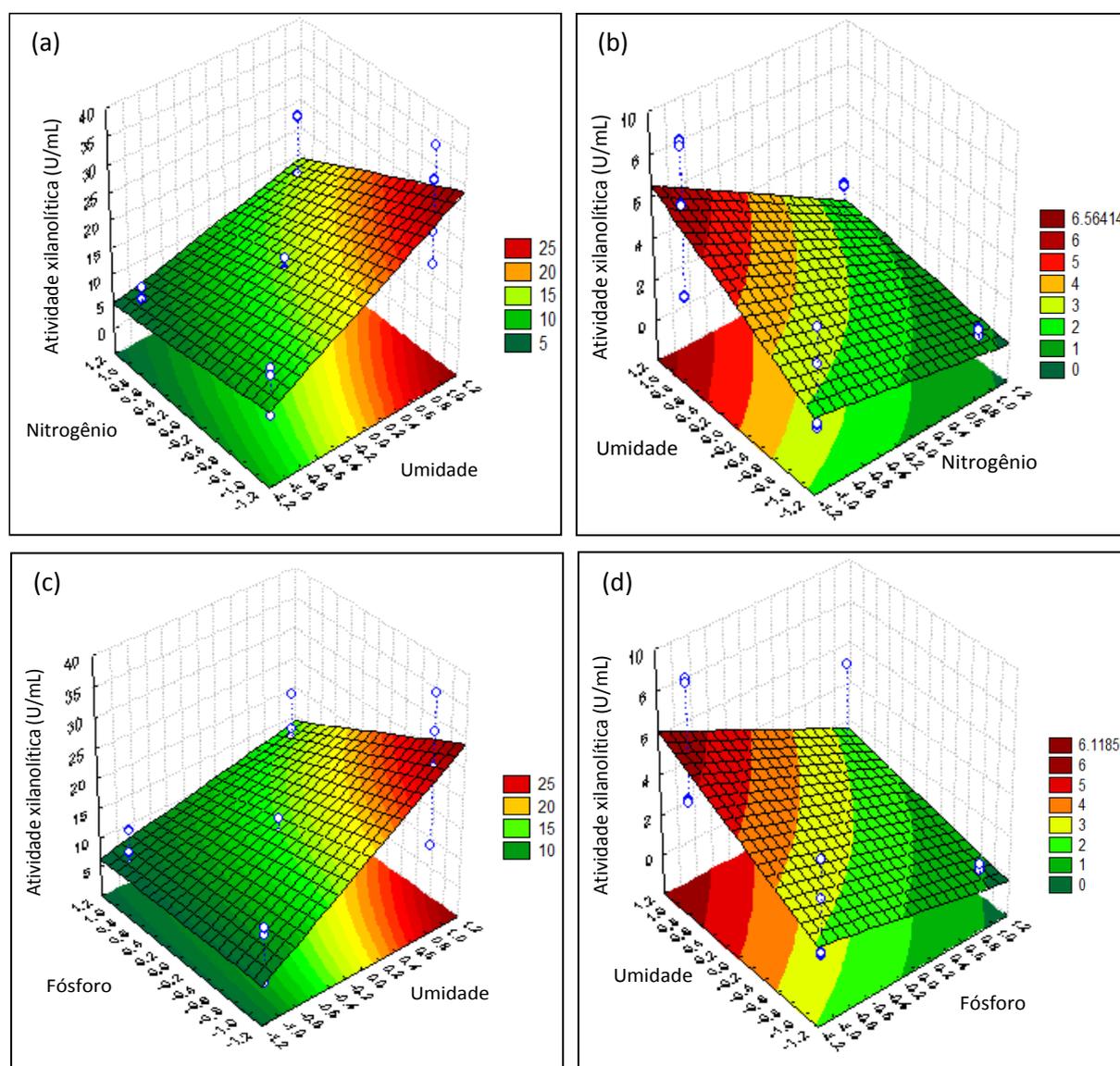
Observa-se que a umidade apresentou efeito significativo e positivo sobre a AEX ($p \leq 0,05$). Assim como observado para a celulase, este resultado indica que aumentando de 70 para 90% a umidade do meio sólido, a atividade enzimática aumenta. Dessa forma, esta variável deve ser avaliada nos planejamentos experimentais subsequentes, onde os valores dos níveis dessa variável devem ser deslocados para níveis superiores (acima de 90%), a fim de se obter maiores atividades xilanolíticas.

Nos experimentos de FS realizados com o fungo *A. brasiliensis* inoculado com disco micelial no resíduo da macacaporanga, as variáveis temperatura, adição de nitrogênio e fósforo apresentaram efeito significativo e negativo sobre a AEX. Este resultado indica que estas variáveis devem ser avaliadas nos planejamentos experimentais subsequentes, onde os valores dos níveis dessas variáveis devem ser deslocados para níveis inferiores (abaixo de 24°C, abaixo de 1,5% de nitrogênio e abaixo de 3,0% de fósforo).

Quando o fungo *A. brasiliensis* foi cultivado no resíduo do pau-rosa e inoculado com suspensão de esporos, as variáveis temperatura e nitrogênio também apresentaram efeito significativo e negativo sobre a AEX. Este resultado corrobora a importância de se utilizar valores abaixo de 1,5% de nitrogênio e de 3,0% de fósforo em planejamentos experimentais subsequentes.

Na realização do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , que visou realizar a triagem das variáveis estatisticamente significativas sobre a produção de xilanase pelo fungo *A. brasiliensis*, cultivado em resíduo de *A. parviflora* e *A. rosaeodora*, foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a AEX com o uso do inóculo DM e SE através da análise das superfícies de resposta (Figuras 28, 29 e 30).

Figura 28 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração do nitrogênio; inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d) como uma função da concentração do fósforo e da umidade.



As variáveis apresentadas nas superfícies de resposta das Figuras 28, 29 e 30 foram escolhidas de acordo com sua influência sobre a resposta avaliada (AEX). Dessa forma, os dois fatores mais relevantes (e não necessariamente estatisticamente significativos) foram utilizados para a visualização dos efeitos.

As Figuras 28 e 29 apresentam as superfícies de resposta para a atividade xilanolítica obtidas com o resíduo de macacaporanga. Nas Figuras 28a e 28b observam-se as superfícies de resposta para a AEX utilizando como inóculo o DM e a SE, respectivamente, como uma

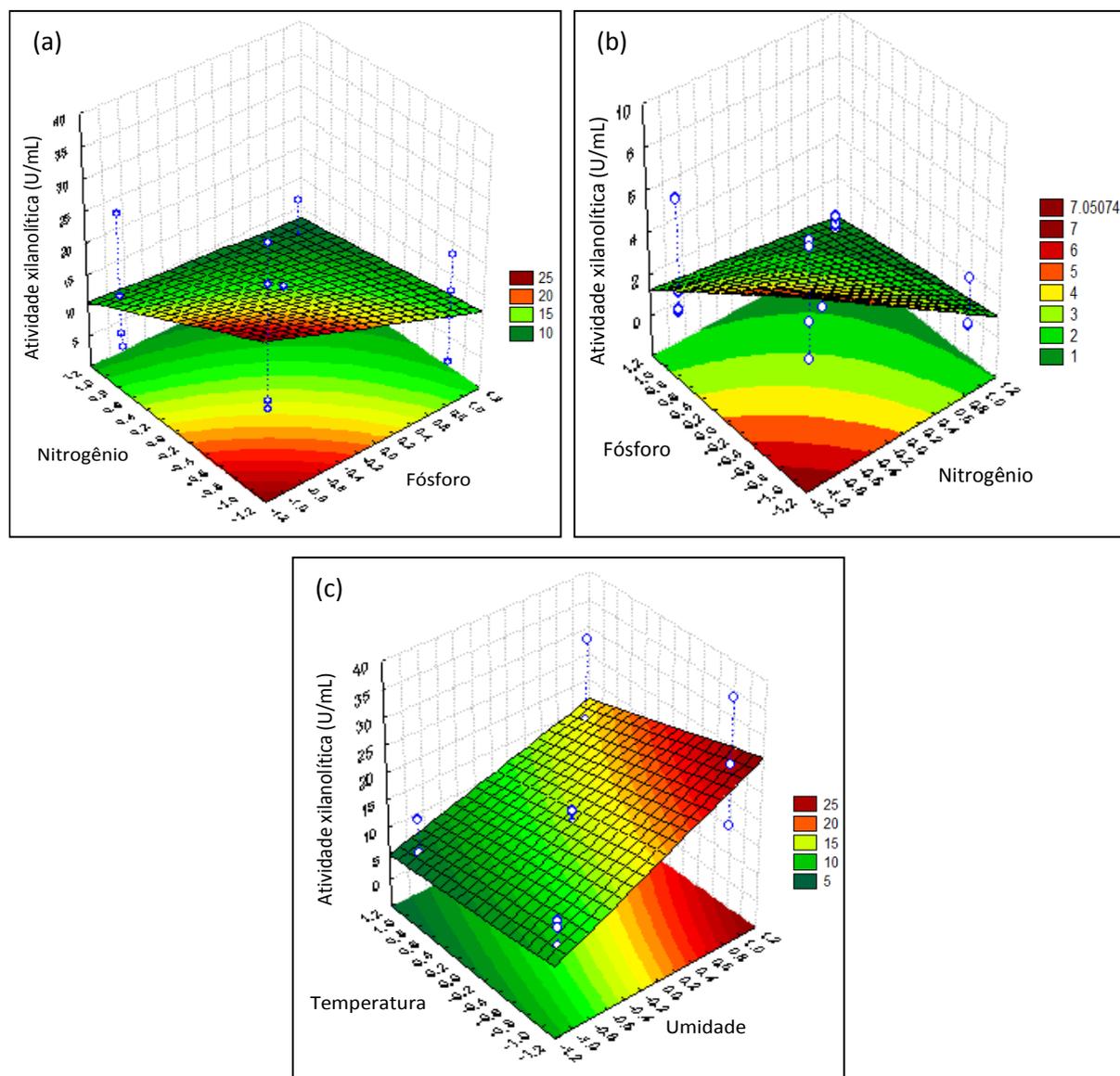
função da umidade e da concentração do nitrogênio. Nota-se que com a diminuição da concentração de nitrogênio no meio de cultivo, a AEX aumenta consideravelmente e este aumento é incrementado com a alta umidade.

Nas Figuras 28c e 28d observam-se as superfícies de resposta para a AEX, utilizando como inóculo o DM e a SE, respectivamente, como uma função da umidade e da concentração do fósforo. Fica clara a maior significância da variável umidade sobre a resposta AEX, sendo que o aumento desta variável aumenta a atividade enzimática e este efeito é ainda mais pronunciado a baixas concentrações de fósforo.

Nas Figuras 29a e 29b observam-se as superfícies de resposta para a AEX, utilizando como inóculo o DM e a SE, respectivamente, como uma função da concentração do fósforo e da concentração do nitrogênio. Nota-se uma pequena alteração nos valores de AEX quando se altera a concentração de nitrogênio do meio, sendo que menores valores de nitrogênio promovem o aumento da produção enzimática e este efeito é mais pronunciado com a diminuição da concentração de fósforo.

Observa-se na Figura 29c a superfície de resposta para a AEX, utilizando como inóculo o DM, como uma função da umidade e da temperatura. Nota-se a maior significância da variável umidade sobre a resposta AEX. Quando os valores de umidade são mais altos, maiores atividades enzimáticas são observadas e este efeito é mais acentuado quando a temperatura é mais baixa.

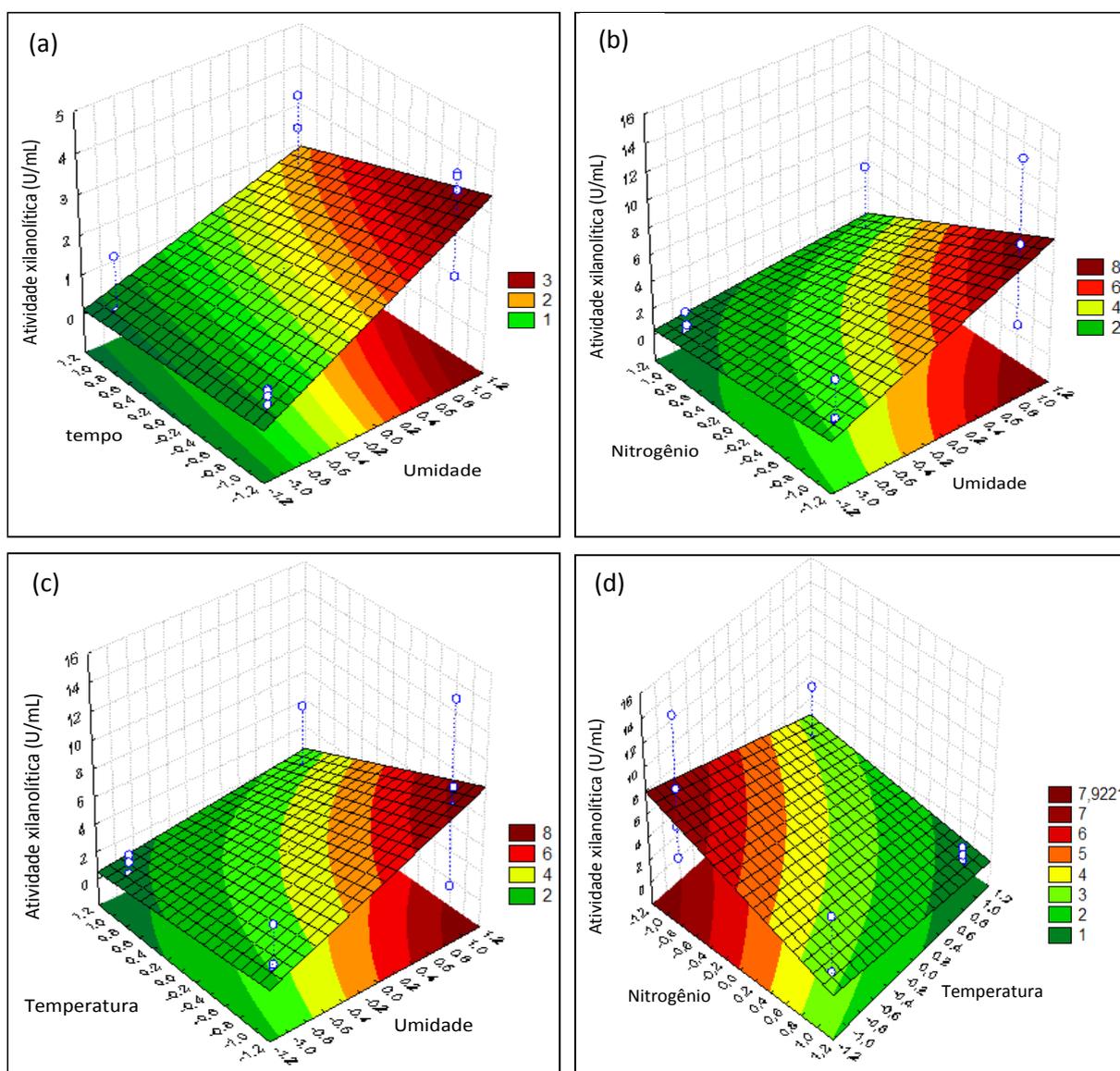
Figura 29 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanólítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da concentração do nitrogênio e do fósforo; inoculado na forma de disco micelial (c) como uma função da temperatura e da umidade.



A Figura 30 apresenta as superfícies de resposta para a atividade xilanólítica obtidas com o resíduo de pau-rosa. Na Figura 30a observa-se a superfície de resposta para a AEX, utilizando como inóculo o DM, como uma função da umidade e do tempo, onde a variável umidade apresenta uma grande significância sobre a resposta AEX, enquanto que a variação do tempo de cultivo não apresenta influência sobre a atividade enzimática.

Na Figura 30b observa-se a superfície de resposta para a AEX, utilizando como inóculo a SE, como uma função da umidade e da concentração do nitrogênio. Nota-se que a AEX aumenta consideravelmente em altos valores de umidade e a diminuição da concentração de nitrogênio no meio de cultivo evidencia este efeito.

Figura 30 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (a) como uma função da umidade e do tempo; inoculado na forma de suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração do nitrogênio; inoculado na forma de suspensão de esporos (c) como uma função da umidade e da temperatura; inoculado na forma de suspensão de esporos (d) como uma função da temperatura e da concentração do nitrogênio.



Na Figura 30c observa-se a superfície de resposta para a AEX, utilizando como inóculo a SE, como uma função da umidade e da temperatura. Fica claro que a AEX aumenta devido ao aumento da variável umidade e que a diminuição da temperatura evidencia o aumento da atividade xilanolítica.

Na Figura 30d observa-se a superfície de resposta para a AEX, utilizando como inóculo a SE, como uma função da concentração de nitrogênio e da temperatura. Nota-se que os valores da AEX aumentam quando a concentração de nitrogênio no meio diminui e este efeito é ainda mais pronunciado quando os valores de temperatura são menores.

Uma vez que as variáveis U, P, N e T apresentaram significância estatística para a produção de xilanase, estas devem ser estudadas no planejamento fatorial completo subsequente, utilizando o resíduo da macacaporanga e o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM. A umidade deve ser deslocada para níveis superiores (acima de 90%), a concentração de fósforo, nitrogênio e temperatura devem ser deslocados para níveis inferiores (abaixo de 3,0% de P, abaixo de 1,5% de N e abaixo de 24°C) e a variável tempo de cultivo deve ser fixada no menor nível estudado, de 9 dias.

5.3.1.3 Pectinase

A comparação da AEP do fungo *A. brasiliensis* para os dois tipos de resíduos (macacaporanga e pau-rosa) e formas de inóculo (DM e SE) pode ser observada na Tabela 7. Para o resíduo de macacaporanga, observa-se que o melhor resultado para a atividade de pectinase (25,28 U/gbs = 4,4 U/mL) foi obtido no ensaio 10, quando utilizado como inóculo DM, níveis máximos de umidade (90%), temperatura (30°C) e fósforo (6,0%) e níveis mínimos de tempo de cultivo (9 dias) e nitrogênio (1,5%). Já para o resíduo de pau-rosa, o melhor resultado (25,18 U/gbs = 4,4 U/mL) foi obtido no ensaio 1, quando utilizado como inóculo DM, nível máximo de umidade (90%) e níveis mínimos de temperatura (24°C), tempo de cultivo (9 dias), fósforo (3,0%) e nitrogênio (1,5%).

Camargo e colaboradores (2005), verificaram que as maiores atividades de poligalacturonase (3,60 U/mL) e pectina liase (11,30 U/mL), cerca de 1,2 vezes mais baixa, e 2,6 vezes mais alta que a observada neste trabalho, respectivamente, ocorreram após 168 horas de fermentação, utilizando o fungo *Aspergillus* sp. inoculado na forma de suspensão de esporos e o bagaço da laranja como substrato. No presente trabalho, o inóculo de *A.*

brasiliensis na forma de disco micelial mostrou-se um pouco mais adequado para a obtenção de pectinase, quando comparado ao uso da suspensão de esporos, tanto no resíduo de macacaporanga (23,07 U/gbs = 4,04 U/mL), como no de pau-rosa (18,02 U/gbs = 3,15 U/mL), como pode ser observado na Tabela 7.

Utilizando a metodologia do planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta para verificar as influências das variáveis umidade inicial do meio, adição de sulfato de amônia e de fosfato de potássio no estudo da produção da poligalacturonase através da fermentação em estado sólido, Santos e colaboradores (2008) obtiveram a maior atividade de pectinase (16 U/g) com o fungo *A. niger* CCT0916, utilizando o pedúnculo de caju como substrato com umidade inicial de 40%, adição de 1% de fonte de nitrogênio (sulfato de amônia), sem adição de fósforo e 30 horas de cultivo. O resultado apresentado no presente trabalho (25,28 U/gbs) é cerca de 1,6 vezes maior que o obtido por Santos e colaboradores (2008), utilizando-se umidade do substrato de 90%, 1,5% de nitrogênio e 6,0% de fósforo. Porém, o tempo de cultivo utilizado neste trabalho (9 dias) foi muito superior ao reportado pelos referidos autores (30 horas) para a produção da enzima.

A geração de diversos açúcares no meio de cultura resultante da hidrólise da pectina, por ação das enzimas pectinolíticas, leva à repressão catabólica da síntese de poligalacturonase, conforme afirmam vários autores (MALDONADO, STRASSER DE SAAD e CALLIERI, 1989; FONSECA e SAID, 1994; SCHMIDT et al., 1995). Considerando que o menor tempo de cultivo utilizado neste trabalho foi de 9 dias e que a concentração de açúcares no meio não foi quantificada ao longo do tempo, a produção máxima de pectinases pode ter ocorrido em tempos menores de fermentação, antes de ocorrer a repressão catabólica devido à presença de açúcares.

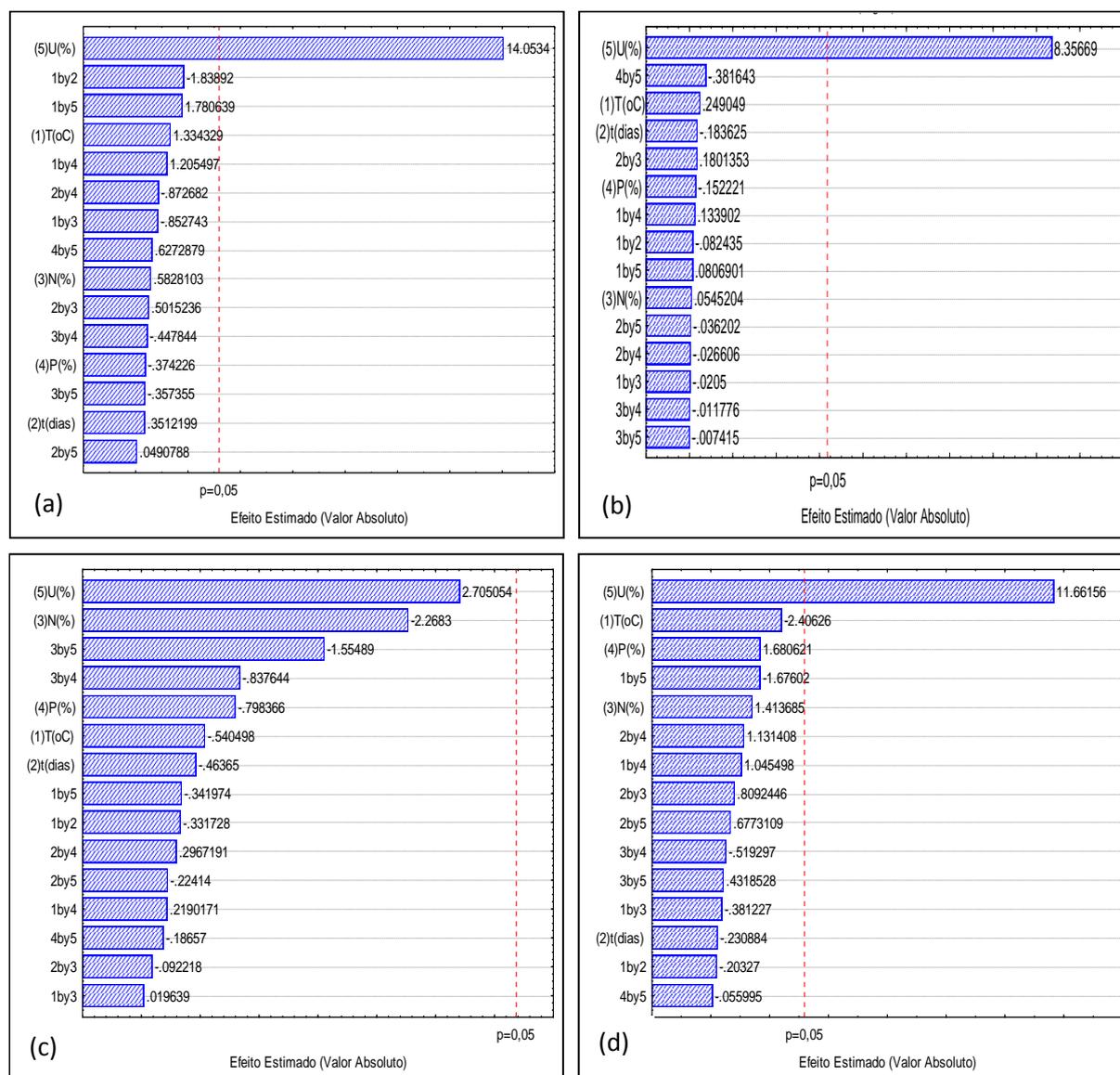
Assim, consolidando os resultados observados na Tabela 7 para a produção de pectinase, pode-se verificar que os fatores que proporcionaram a melhor AEP foram: a maior umidade (90%), a maior temperatura (30°C), o menor tempo de cultivo (9 dias), nível menor de nitrogênio (1,5%) e maior de fósforo (6,0%), utilizando o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM no resíduo de macacaporanga.

A Figura 31 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEP do fungo *A. brasiliensis*. De acordo com as Figuras 31a (inóculo na forma de DM e o resíduo de macacaporanga), 31b (inóculo na forma de SE e o resíduo de macacaporanga) e 31d (inóculo na forma de SE e o resíduo de pau-rosa), para a produção de pectinase, somente o efeito umidade foi

estatisticamente significativo para o nível de confiança de 95%. Os efeitos da adição de nitrogênio e fósforo, temperatura e tempo de cultivo aparecem na sequência do Diagrama e não foram estatisticamente significativos.

Na Figura 31c, para a produção da pectinase utilizando o inóculo na forma de DM e o resíduo de pau-rosa, nenhum dos efeitos (umidade, adição de nitrogênio e fósforo, temperatura e tempo de cultivo) foi estatisticamente significativo para o nível de confiança de 95%.

Figura 31 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b); e cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) e suspensão de esporos (d).



Analisando os Diagramas de Pareto da AEP para o fungo *A. brasiliensis* (Figura 31), pode-se afirmar que a variável umidade é a mais importante para a FS de resíduos de Lauráceas, afetando a produção de pectinase de forma positiva. Ao contrário do observado para a produção das enzimas celulase e xilanase, a temperatura de cultivo aparece para a pectinase como o segundo fator mais relevante na maioria dos ensaios, embora este não seja significativo estatisticamente.

Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a AEP obtidos com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo *A. brasiliensis* cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa e inoculado na forma de DM e SE estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento experimental fracionado 2^{5-1} utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| | Macacaporanga | | | | Pau-rosa | | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | DM | | SE | | DM | | SE | |
| | Efeito | p | Efeito | p | Efeito | p | Efeito | p |
| Média | 13,34155 | 0,000097 | 14,49486 | 0,000410 | 8,45895 | 0,015528 | 10,63211 | 0,000192 |
| (X ₁)Temperatura | 1,37392 | 0,274337 | 0,45086 | 0,819400 | -1,99929 | 0,674467 | -2,47700 | 0,095337 |
| (X ₂)tempo | 0,36164 | 0,748642 | -0,33242 | 0,866018 | -1,71503 | 0,108094 | -0,23767 | 0,832255 |
| (X ₃)Nitrogênio | 0,60010 | 0,600936 | 0,09870 | 0,959948 | -8,39037 | 0,483015 | 1,45525 | 0,252355 |
| (X ₄)Fósforo | -0,38533 | 0,733122 | -0,27557 | 0,888674 | -2,95313 | 0,073471 | 1,73003 | 0,191428 |
| (X₅)Umidade | 14,47036 | 0,000780 | 15,12840 | 0,003593 | 10,00591 | 0,761918 | 12,00441 | 0,001355 |

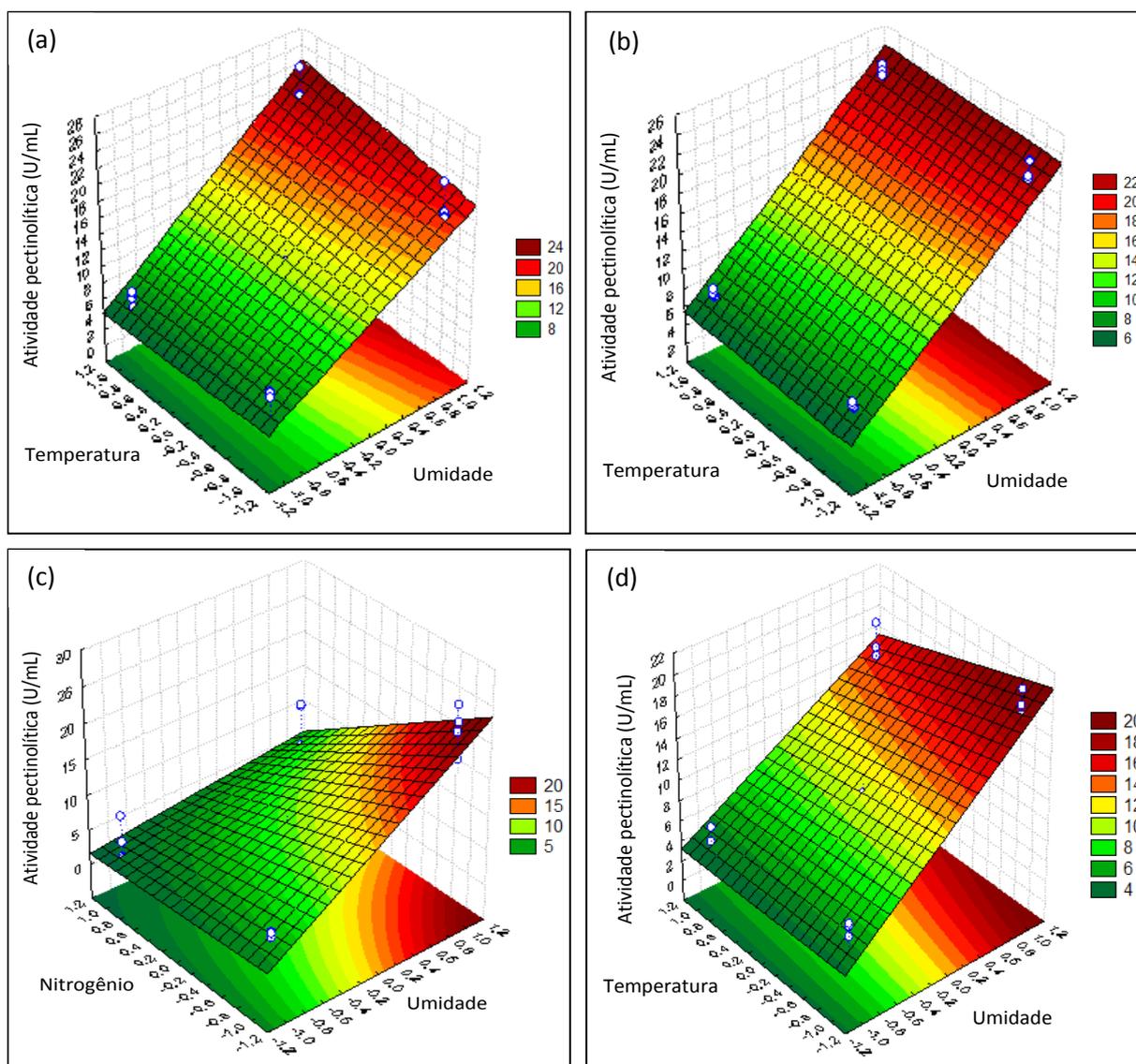
DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; $p \leq 0,05$.

Observa-se na Tabela 11 que a umidade apresentou efeito significativo e positivo sobre a AEP ($p \leq 0,05$) nos experimentos realizados com o resíduo de macacaporanga, utilizando as duas formas de inóculo (DM e SE), bem como no experimento realizado com o resíduo de pau-rosa e SE como inóculo.

Na realização do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , que visou realizar a triagem das variáveis estatisticamente significativas sobre a produção de pectinase pelo fungo *A. brasiliensis*, cultivado em resíduo de *A. parviflora* e *A. rosaeodora*, foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a AEP com o uso do inóculo na forma de DM e SE através da análise das superfícies de resposta (Figura 32). As variáveis apresentadas nas superfícies de resposta da Figura 32 foram escolhidas de acordo com sua influência sobre a

resposta avaliada (AEP). Dessa forma, os dois fatores mais relevantes (e não necessariamente estatisticamente significativos) foram utilizados para a visualização dos efeitos.

Figura 32 - Superfície de resposta para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da temperatura; cultivado no resíduo do pau-rosa, inoculado na forma de disco micelial (c) como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio e inoculado na forma de suspensão de esporos (d) como uma função da umidade e da temperatura.



Na Figura 32a observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEP do fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga e inoculado na forma de DM, como uma função da umidade e da temperatura. Fica clara a maior significância da variável umidade

sobre a resposta AEP, pois o aumento da umidade leva a um significativo aumento na atividade enzimática, e este efeito é ainda mais pronunciado a baixas temperaturas. O mesmo comportamento ocorre nas Figuras 32b e 32d, onde observam-se os gráficos de superfícies de resposta para a AEP do fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de SE nos resíduos de macacaporanga e pau-rosa, respectivamente, como uma função da umidade e temperatura.

Na Figura 32c observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEP do fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo do pau-rosa e inoculado na forma de DM como uma função da umidade e da concentração do nitrogênio. Nota-se a maior significância da variável umidade sobre a AEP, pois quando a umidade aumenta, a atividade também aumenta e este efeito é melhor visto com a diminuição da concentração de nitrogênio.

Uma vez que a variável U apresentou significância estatística para a produção de pectinase, esta deve ser estudada no planejamento fatorial completo subsequente, utilizando o resíduo da macacaporanga e o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM. Dessa forma, assim como observado para as AEC e AEX, esta variável deve ser avaliada nos planejamentos experimentais subsequentes, onde os valores dos níveis dessa variável devem ser deslocados para níveis superiores (acima de 90%), a fim de se obter maiores atividades pectinolíticas. As demais variáveis devem, portanto, ser fixadas em seus níveis mais baixos.

5.3.2 Estudo das Melhores Condições de Cultivo Utilizando o Planejamento Experimental Fatorial Completo 2³

Após análise dos fatores que influenciam significativamente as atividades enzimáticas (AEC, AEX e AEP), por meio do planejamento experimental fatorial fracionado 2⁵⁻¹, determinaram-se as variáveis que seriam utilizadas no planejamento experimental fatorial completo 2³ a fim de obter condições de cultivo que aumentem os valores de atividade enzimática. Considerando que para a produção de celulase, xilanase e pectinase por meio da FS, o uso do resíduo de macacaporanga promoveu a obtenção de maiores valores de atividade enzimática do que o resíduo de pau-rosa, e que o fungo *A. brasiliensis*, inoculado nas duas formas (DM e SE), demonstrou melhor crescimento e produção de enzimas que o *T. harzianum*, estes (*A. brasiliensis*, resíduo de macacaporanga e inóculo nas formas de DM e SE) foram selecionados para o planejamento experimental completo 2³.

No que diz respeito ao tempo de cultivo, este foi fixado no nível mínimo, de 9 dias, pois não apresentou efeito significativo sobre as AEC, AEX e AEP em nenhum dos experimentos. O efeito da temperatura, por sua vez, apresentou significância estatística apenas para a produção de xilanase com o uso do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, e este efeito foi negativo. Dessa forma, optou-se por fixar esta variável em seu valor mínimo, de 24°C.

As variáveis umidade, concentração de fósforo e de nitrogênio foram as que apresentaram influência significativa sobre as AEC, AEX e AEP do fungo *A. brasiliensis* na maioria dos experimentos de FS. Portanto, estas variáveis continuaram sendo estudadas no planejamento experimental completo 2³, conforme a matriz apresentada na Tabela 4.

Para a obtenção das melhores condições de cultivo do fungo *A. brasiliensis* foram calculadas e preparadas quatro soluções estoque (Tabela 12) a partir do valor da umidade do resíduo da macacaporanga, apresentando concentrações diferentes dos nutrientes contendo as fontes de nitrogênio (NH₄NO₃) e de fósforo (KH₂PO₄). Estas soluções foram adicionadas, com volumes diferentes, ao substrato sólido, a fim de atingir a umidade desejada, conforme a matriz do planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4).

Tabela 12 - Soluções estoque adicionadas aos diferentes ensaios do planejamento fatorial completo 2³, com seus respectivos volumes e concentrações de NH₄NO₃ e KH₂PO₄ para 100 mL de água destilada, em função da umidade desejada.

| Ensaio | Solução | Volume (mL) | Concentração de nutrientes | | Umidade (%) |
|--------|---------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| | | | NH ₄ NO ₃ (%) | KH ₂ PO ₄ (%) | |
| 1 | A | 5,49 | 0,5 | 1,0 | 85 |
| 2 | A | 6,19 | 0,5 | 1,0 | 95 |
| 3 | B | 5,49 | 1,5 | 1,0 | 85 |
| 4 | B | 6,19 | 1,5 | 1,0 | 95 |
| 5 | C | 5,49 | 0,5 | 3,0 | 85 |
| 6 | C | 6,19 | 0,5 | 3,0 | 95 |
| 7 | D | 5,49 | 1,5 | 3,0 | 85 |
| 8 | D | 6,19 | 1,5 | 3,0 | 95 |

Os resultados das atividades enzimáticas celulolítica (AEC), xilanolítica (AEX) e pectinolítica (AEP) do fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM e SE no resíduo de macacaporanga, obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2³ estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Atividades enzimáticas de celulase, xilanase e pectinase, obtidas a partir do planejamento experimental fatorial completo 2^3 para os ensaios de fermentação sólida utilizando o resíduo de macacaporanga e o fungo *Aspergillus brasiliensis* inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| ENSAIO | VARIÁVEIS | | | AEC (U/gbs) | | AEX (U/gbs) | | AEP (U/gbs) | |
|--------|-----------|---------|--------|-------------|------|-------------|------|-------------|-------|
| | N (%) | P (%) | U (%) | DM | SE | DM | SE | DM | SE |
| 1 | 0,5(-1) | 1,0(-1) | 85(-1) | 4,54 | 2,29 | 12,38 | 0,42 | 16,35 | 11,64 |
| 2 | 0,5(-1) | 1,0(-1) | 95(+1) | 7,95 | 7,03 | 32,29 | 2,68 | 51,55 | 39,88 |
| 3 | 1,5(+1) | 1,0(-1) | 85(-1) | 3,37 | 2,12 | 7,81 | 0,79 | 15,17 | 14,20 |
| 4 | 1,5(+1) | 1,0(-1) | 95(+1) | 11,75 | 7,90 | 30,00 | 4,74 | 51,93 | 43,06 |
| 5 | 0,5(-1) | 3,0(+1) | 85(-1) | 3,28 | 3,34 | 11,54 | 0,46 | 16,49 | 14,33 |
| 6 | 0,5(-1) | 3,0(+1) | 95(+1) | 15,00 | 4,86 | 29,78 | 5,66 | 46,76 | 47,93 |
| 7 | 1,5(+1) | 3,0(+1) | 85(-1) | 3,20 | 2,08 | 8,23 | 2,08 | 15,91 | 14,94 |
| 8 | 1,5(+1) | 3,0(+1) | 95(+1) | 8,35 | 6,41 | 24,41 | 7,48 | 48,22 | 42,97 |

N = nitrogênio; P = fósforo; U = umidade; DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; AEC = atividade enzimática celulolítica; AEX = atividade enzimática xilanolítica; AEP = atividade enzimática pectinolítica

Observa-se na Tabela 13 que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios em que se utilizou a forma de inóculo DM para a produção das três enzimas (celulase, xilanase e pectinase), com o maior nível de umidade, 95%.

A continuação da discussão dos resultados demonstrados na Tabela 13 está apresentada a seguir, considerando cada uma das enzimas de interesse e as variáveis de estudo.

5.3.2.1 Celulase

Observa-se na Tabela 13 que o melhor resultado para a AEC (15,00 U/gbs = 1,31 U/mL) foi obtido no ensaio 6, quando utilizados níveis máximos de umidade (95%) e fósforo (3,0%) e nível mínimo de nitrogênio (0,5%), com o inóculo na forma de DM. Comparando o resultado deste experimento com o do planejamento experimental 2^{5-1} , pode-se observar que o aumento na AEC foi pequeno, ou seja, o uso do planejamento 2^3 não foi eficiente para a obtenção de maiores valores de AEC.

No trabalho de Santos e colaboradores (2011) verifica-se que a maior atividade de CMCase encontrada (7,26 U/g) foi praticamente a metade do valor obtido no presente trabalho. Os autores utilizaram o fungo *A. niger* inoculado no resíduo do beneficiamento da manga, na temperatura de 35°C, em um tempo de aproximadamente 75 horas de fermentação, avaliando a influência da atividade de água na produção enzimática. Reportam que a

quantidade de água é um fator que interfere na excreção de enzimas pelos microrganismos e que na FS a umidade promove o crescimento do fungo por meio da transferência de oxigênio, difusão de nutrientes no substrato sólido, assim como no controle da temperatura. Verificou-se no presente trabalho que as maiores quantidades de água foram, assim como observado nos experimentos do planejamento 2^{5-1} , determinantes para as maiores atividades de celulase.

Em outro estudo, Singh e colaboradores (2009) otimizaram a produção de celulase por meio da metodologia de superfície de resposta, obtendo a maior atividade (13,05 U/mL) utilizando o fungo termofílico *A. heteromorphus* cultivado na palha de arroz na temperatura de 60°C. Este resultado foi cerca de 10 vezes maior que a AEC obtida no presente trabalho.

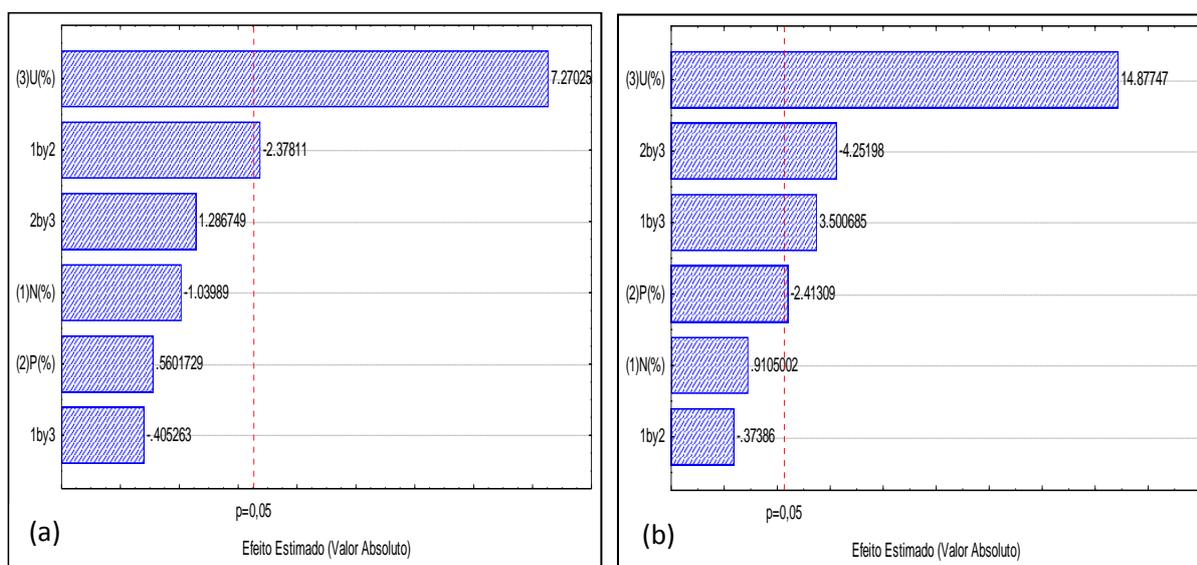
Por sua vez, Rocha (2010) conseguiu a melhor atividade de celulase (5,98 U/g) utilizando somente a casca do maracujá na FS, sem suplementação de nutrientes, realizada em temperatura ambiente, durante 4 dias com o fungo *A. niger* ATCC 16404. Após a otimização das condições de cultivo, o autor conseguiu aumentar a atividade de celulase em cerca de 2,4 vezes, obtendo 14,10 U/g na temperatura de 45°C e tempo de cultivo de 12 dias. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente trabalho a partir do planejamento experimental 2^3 , onde observou-se uma AEC de 15,00 U/gbs para o fungo *A. brasiliensis* cultivado durante 9 dias a 24°C. O fato de Rocha (2010) não ter suplementado o meio de cultivo composto por casca de maracujá e mesmo assim, ter obtido bons valores de AEC, sugere que o resíduo de macacaporanga apresenta menores concentrações de nutrientes necessários para a produção enzimática fúngica.

De modo semelhante ao observado no presente trabalho, Soni, Nazir e Chadha (2010), verificaram a necessidade de suplementar a palha de arroz com fonte de fósforo (0,4% de KH_2PO_4) e de nitrogênio (0,45% de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ e 1,3% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) para se obter níveis ótimos de atividade de celulase por *A. fumigatus* em FS. O mesmo foi observado no trabalho de Vu, Pham e Kim (2011), onde a maior produção da enzima celulase foi obtida utilizando pelo fungo *Aspergillus* sp. SU14-M15 quando o substrato (farelo de trigo) da FS foi suplementado com 1% de uréia ou NH_4Cl , 1% de amido de arroz, 2,5 mM MgCl_2 e 0,05% de Tween 80.

A Figura 33 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEC do fungo *A. brasiliensis*. De acordo com a Figura 33a, para a atividade de celulase, o efeito umidade foi novamente significativo e positivo para o nível de confiança de 95%, utilizando o inóculo na forma de DM. Os efeitos da fonte de nitrogênio e fósforo, isoladamente não foram estatisticamente

significativos, mas a interação entre estes dois fatores apresentou influência sobre a AEC. Verifica-se na Tabela 13 que para as maiores concentrações de fósforo, as baixas concentrações de nitrogênio favorecem as maiores AEC, assim como as baixas concentrações de fósforo associadas às altas concentrações de nitrogênio.

Figura 33 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática celulolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b).



Na Figura 33b, para a AEC, nota-se que além da umidade, a concentração de fósforo também foi estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%, utilizando o inóculo na forma de SE. O efeito da concentração de nitrogênio aparece na sequência, e não foi estatisticamente significativo. Entretanto, a interação entre o fósforo e a umidade, bem como entre a adição de nitrogênio e a umidade foram estatisticamente significativas. Verifica-se na Tabela 13 que os maiores valores de umidade associados às baixas concentrações de fósforo e às altas concentrações de nitrogênio promovem as maiores atividades celulolíticas.

Analisando os Diagramas de Pareto da AEC para o fungo *A. brasiliensis* (Figura 33), pode-se afirmar que a variável umidade continua sendo a mais importante para a FS de resíduos de Lauráceas, afetando a produção de celulase de forma positiva, ou seja, observaram-se maiores valores de atividade enzimática quando as concentrações de umidade do meio eram maiores.

Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a AEC obtidos com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga e inoculado na forma de DM e SE estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática celulolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| | DM | | SE | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Efeito | p | Efeito | p |
| Média | 7,17807 | 0,000000 | 4,50490 | 0,000000 |
| (X ₁)Nitrogênio | -1,02428 | 0,325519 | 0,25053 | 0,386295 |
| (X ₂)Fósforo | 0,55176 | 0,589031 | -0,66398 | 0,039050 |
| (X ₃)Umidade | 7,16109 | 0,000047 | 4,09367 | 0,000000 |
| X ₁ .X ₂ | -2,34240 | 0,041356 | -0,10287 | 0,717164 |
| X ₁ .X ₃ | -0,34918 | 0,694748 | 0,96324 | 0,006716 |
| X ₂ .X ₃ | 1,26743 | 0,230291 | -1,16997 | 0,002136 |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; p≤0,05.

Para se obter a influência individual de cada um dos fatores e também a influência de dois ou mais tomados conjuntamente, levando em conta as interações existentes entre eles, utiliza-se a análise de variância (ANOVA), a qual fornece parâmetros que permitem determinar a significância estatística de determinado fator. A partir da análise de variância são determinados os coeficientes do modelo matemático que melhor descreve a resposta (atividade enzimática) do sistema à variação dos parâmetros no intervalo dos níveis analisados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A Tabela 15 apresenta a ANOVA do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para AEC obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 inoculado na forma de DM e SE. O parâmetro F desta tabela permite determinar se a relação entre a AEC e determinada variável é estatisticamente significativa. Sendo o valor de F maior que 1,0 existirá relação significativa entre as variáveis dependente e independente, e para que o modelo matemático seja útil para fins preditivos o parâmetro F deverá ser superior a 4,0 (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

Os valores dos efeitos dos parâmetros estudados sobre a AEC (Tabela 14) representam os coeficientes da equação do modelo matemático, o qual contempla as interações entre as variáveis significativas, combinadas duas a duas, sendo classificado, portanto, como não linear. A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da AEC à

variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de DM é apresentada a seguir.

$$Y = 7,17807 + 7,16109 \cdot X_3 - 2,34240 \cdot X_1X_2 \quad (3)$$

Tabela 15 - Análise de variância do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para atividade enzimática celulolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| ANOVA – atividade enzimática celulolítica | | | | | | | | | | |
|---|---------------|----------|---------------|--------------|-------------|--------------|----------|--------------|---------------|-------------|
| Fator | DM | | | | | SE | | | | |
| | SQ | GL | QM | F | p | SQ | GL | QM | F | p |
| (X ₁)Nitrogênio | 4,20 | 1 | 4,20 | 1,08 | 0,32 | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,83 | 0,39 |
| (X ₂)Fósforo | 1,22 | 1 | 1,22 | 0,31 | 0,59 | 1,76 | 1 | 1,76 | 5,82 | 0,03 |
| (X ₃)Umidade | 205,12 | 1 | 205,12 | 52,86 | 0,00 | 67,03 | 1 | 67,03 | 221,34 | 0,00 |
| X ₁ .X ₂ | 21,95 | 1 | 21,95 | 5,65 | 0,04 | 0,04 | 1 | 0,04 | 0,14 | 0,72 |
| X ₁ .X ₃ | 0,64 | 1 | 0,64 | 0,16 | 0,69 | 3,71 | 1 | 3,71 | 12,25 | 0,01 |
| X ₂ .X ₃ | 6,42 | 1 | 6,42 | 1,66 | 0,23 | 5,47 | 1 | 5,47 | 18,08 | 0,00 |
| Erro | 34,93 | 9 | 3,88 | - | - | 2,72 | 9 | 0,30 | - | - |
| Total | 274,48 | 15 | - | - | - | 81,00 | 15 | - | - | - |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F_{calculado}; p ≤ 0,05.

A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da AEC à variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de SE é apresentada a seguir.

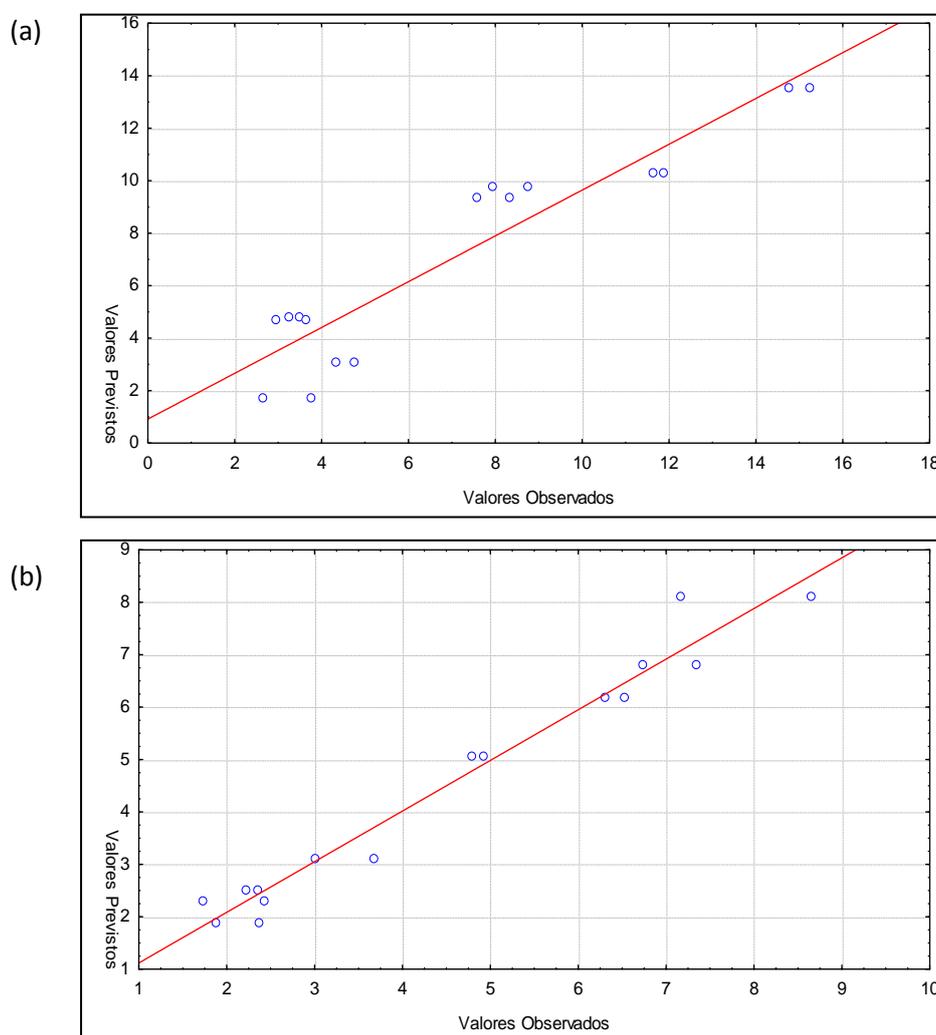
$$Y = 4,50490 - 0,66398 \cdot X_2 + 4,09367 \cdot X_3 + 0,96324 \cdot X_1X_3 - 1,16997 \cdot X_2X_3 \quad (4)$$

Devido aos valores do parâmetro F (>4,0) associado a cada fator, o modelo é capaz não só de descrever, mas também de prever a resposta do sistema dentro das faixas de valores das condições analisadas (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

A correlação entre os valores previstos e os valores observados efetivamente para a AEC do fungo *A. brasiliensis* inoculado nas formas de DM e SE, está visível na Figura 34. Observa-se que tanto o fungo inoculado na forma de DM, apresentado na Figura 34a, quanto para o inoculado na forma de SE, apresentado na Figura 34b, as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentam valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

O coeficiente de correlação R^2 associado à equação (3) vale 0,8728 e o valor ajustado deste coeficiente é de 0,7879. Isto significa que o modelo deduzido é capaz de explicar 87,28% do comportamento da variável de resposta (atividade celulolítica) dentro do intervalo de variação dos fatores adotados. Para a equação (4), o R^2 é de 0,9664 e valor ajustado deste coeficiente é 0,9439, ou seja, o modelo é capaz de explicar 96,64% do comportamento da AEC.

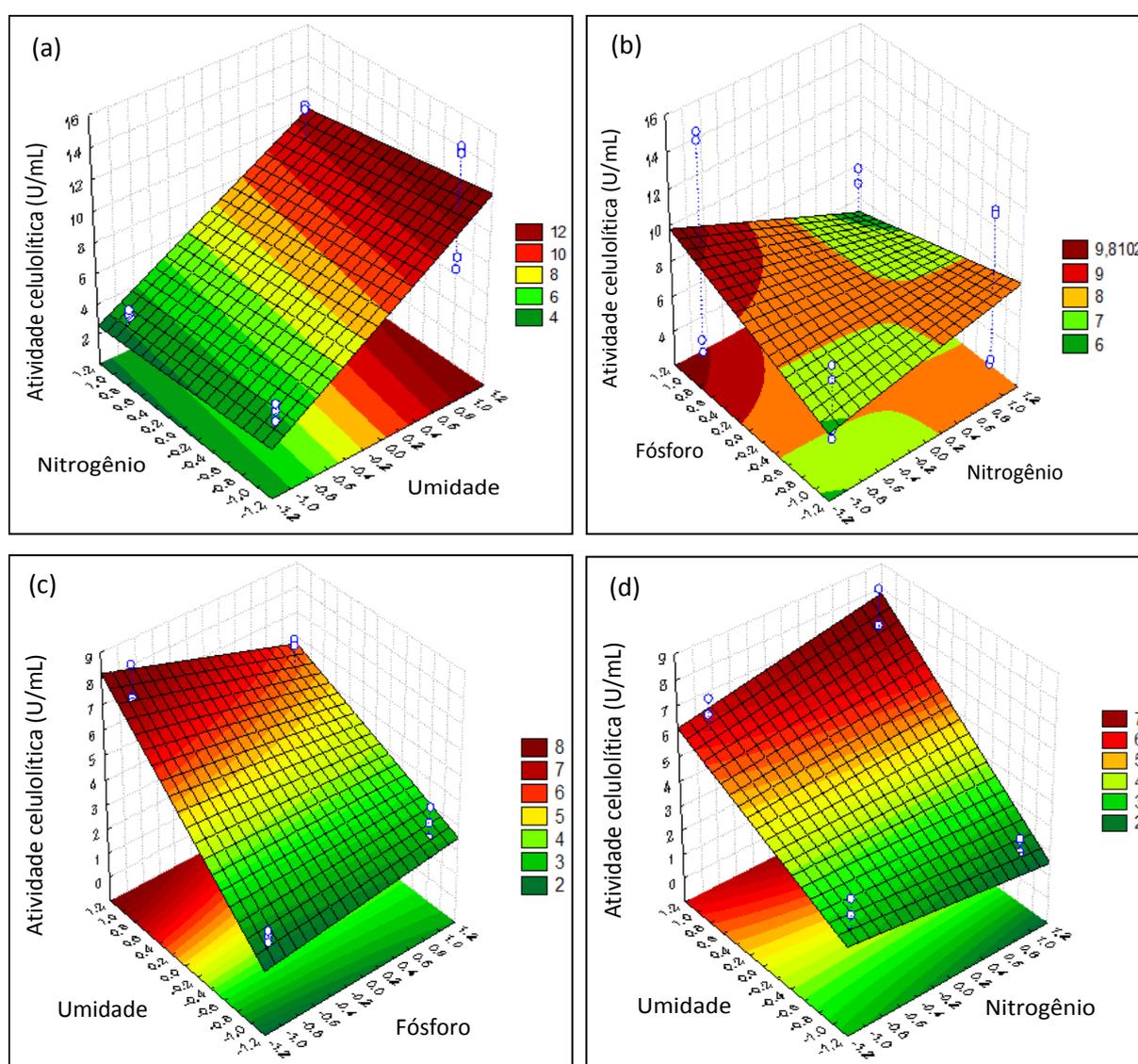
Figura 34 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática celulolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b).



As superfícies de resposta constituem representações gráficas do modelo matemático deduzido, e facilitam tanto a interpretação dos resultados quanto a determinação das condições ótimas do processo correspondente. Na realização do planejamento experimental

fatorial completo 2^3 foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a AEC com o uso do inóculo nas formas de DM e SE através da análise das superfícies de resposta (Figura 35). As variáveis apresentadas nas superfícies de resposta da Figura 35 foram escolhidas de acordo com sua influência sobre a resposta avaliada (AEC). Dessa forma, os dois fatores mais relevantes (e não necessariamente estatisticamente significativos) foram utilizados para a visualização dos efeitos.

Figura 35 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática celulolítica inoculado na forma de disco micelial como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (a), como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio (b); e inoculado na forma de suspensão de esporos como uma função da umidade e da concentração de fósforo (c) e como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (d).



Nas Figuras 35a e 35d observam-se os gráficos de superfícies de resposta para a AEC, inoculados na forma de DM e SE, respectivamente, como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio, demonstrando de forma clara a maior significância da variável umidade sobre a resposta AEC, pois o aumento da umidade leva a um significativo aumento na atividade enzimática, e este efeito é ainda mais pronunciado com baixas concentrações de nitrogênio.

Nas Figuras 35b e 35c observam-se os gráficos de superfícies de resposta para a AEC, inoculados na forma de DM e SE, respectivamente, como uma função da umidade e da concentração de fósforo, demonstrando de forma clara a maior significância da variável umidade sobre a resposta AEC, pois o aumento da umidade leva a um significativo aumento na atividade enzimática, e este efeito é ainda mais pronunciado com baixas concentrações de fósforo.

5.3.2.2 Xilanase

Observa-se na Tabela 13 que o melhor resultado para a AEX ($32,29 \text{ U/gbs} = 2,83 \text{ U/mL}$) foi o obtido no ensaio 2, quando utilizado o inóculo na forma de DM, nível máximo de umidade (95%) e níveis mínimos de nitrogênio (0,5%) e fósforo (1,0%). De forma geral, nota-se que os valores de AEX para o fungo inoculado na forma de SE foram muito inferiores aos obtidos com o inóculo na forma de DM.

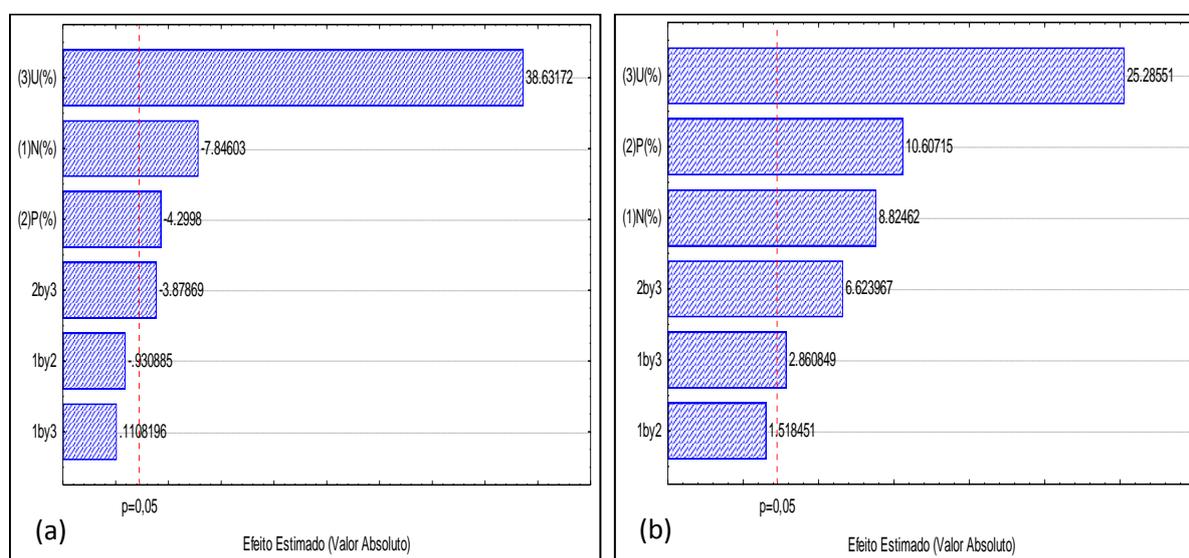
Comparando o resultado deste experimento com o do planejamento experimental 2^{5-1} , pode-se observar que ocorreu uma pequena diminuição na AEX, ou seja, mesmo utilizando os níveis das variáveis na região mais favorável à atividade xilanolítica, não foi possível melhorar esses resultados.

Os valores reportados na literatura para a atividade xilanolítica são, em geral, maiores do que os obtidos no presente trabalho. Pal e Khanum (2010) obtiveram a maior atividade de xilanase (aproximadamente 1.680 UI/gbs) utilizando o fungo *A. niger* DFR-5 inoculado no meio contendo farelo de trigo com umidade inicial de 70%, mantendo a fermentação a 40°C por 6 dias. Os autores reportam que para a produção de xilanase fúngica, o conteúdo de umidade requerido está entre 43% e 83%. Entretanto, no presente trabalho verifica-se que maiores valores de umidade foram necessários para a produção desta enzima.

Em outro estudo, Lakshmi e colaboradores (2009) verificaram a melhor atividade de xilanase (115,279 U/g) em FS utilizando fibra da palmeira suplementada com 0,7% de nitrato após 60 horas a uma temperatura de 35°C. Os autores reportam que neste estudo, o fator que mostrou-se mais significativo sobre a AEX foi o tempo de incubação, sendo que maiores tempos de fermentação foram mais eficientes. Além disso, os autores verificaram que os menores tamanhos de partícula de substrato (0,3 a 0,7 mm) dificultaram a produção enzimática, quando comparado a partículas maiores do resíduo (2.0 a 2.8 mm), o que pode ser explicado pela limitação de transferência de massa no meio de cultivo. No presente trabalho, foi utilizado o tamanho de partícula de 3 mm, considerado adequado para a FS, conforme verificado por Lakshmi e colaboradores (2009).

A Figura 36 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEX do fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga. De acordo com as Figuras 36a (fungo inoculado na forma de DM) e 36b (inoculado na forma de SE), para a AEX, os três efeitos, umidade, nitrogênio e fósforo, são estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%.

Figura 36 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b).



Analisando os Diagramas de Pareto da AEX para o fungo *A. brasiliensis* (Figura 36), pode-se afirmar novamente que a variável umidade é a mais importante para a FS de resíduos de Lauráceas, afetando a produção de xilanase de forma positiva. As outras variáveis, fósforo e nitrogênio também apresentam-se estatisticamente significativas.

Verifica-se na Figura 36a que, para o inóculo na forma de DM, além dos fatores individuais umidade, nitrogênio e fósforo, a interação conjunta fósforo-umidade também foi significativa. Observando a Tabela 13, nota-se que os maiores valores de umidade, associados às baixas concentrações de fósforo, promoveram as maiores AEX;

Para o inóculo na forma de SE (Figura 36b), além dos fatores individuais, as interações conjuntas nitrogênio-umidade e fósforo-umidade apresentaram significância estatística em um intervalo de 95% de confiança. Nota-se na Tabela 13 que maiores níveis de umidade, associados aos maiores níveis de nitrogênio e fósforo favoreceram a produção de xilanase.

Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a AEX obtidos com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga e inoculado na forma de DM e SE estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática xilanolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| | DM | | SE | |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Efeito | p | Efeito | p |
| Média | 19,55594 | 0,000000 | 3,039841 | 0,000000 |
| (X₁)Nitrogênio | -3,88485 | 0,000026 | 1,466879 | 0,000010 |
| (X₂)Fósforo | -2,12899 | 0,001991 | 1,763181 | 0,000002 |
| (X₃)Umidade | 19,12795 | 0,000000 | 4,203101 | 0,000000 |
| X ₁ . X ₂ | -0,46091 | 0,376208 | 0,252406 | 0,163216 |
| X ₁ . X ₃ | 0,05487 | 0,914191 | 0,475547 | 0,018754 |
| X ₂ . X ₃ | -1,92048 | 0,003739 | 1,101073 | 0,000097 |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; $p \leq 0,05$.

Observa-se na Tabela 16 que a umidade apresentou efeito significativo e positivo sobre a AEX ($p \leq 0,05$). As variáveis nitrogênio e fósforo foram estatisticamente significativas. Para os experimentos onde o fungo foi inoculado com DM, estes dois nutrientes (N e P) apresentaram efeito negativo, ou seja, um aumento em suas concentrações leva à diminuição da atividade enzimática. Entretanto, para os experimentos onde o fungo foi inoculado com SE, a concentração de N e P apresentaram efeito positivo sobre a AEX.

A Tabela 17 apresenta a ANOVA do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para AEX obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 inoculado na forma de DM e SE. Os valores dos efeitos dos parâmetros estudados sobre a AEX (Tabela 16) representam os coeficientes da equação do modelo matemático, o qual contempla as

interações entre as variáveis significativas, combinadas duas a duas, sendo classificado, portanto, como não linear. A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da AEX à variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de DM é apresentada a seguir.

$$Y = 19,55594 - 3,88485 \cdot X_1 - 2,12899 \cdot X_2 + 19,12795 \cdot X_3 - 1,92048 \cdot X_2 X_3 \quad (5)$$

Tabela 17 - Análise de variância do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para atividade enzimática xilanolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| ANOVA – atividade enzimática xilanolítica | | | | | | | | | | |
|---|----------------|----------|----------------|----------------|-------------|--------------|----------|--------------|---------------|-------------|
| Fator | DM | | | | | SE | | | | |
| | SQ | GL | QM | F | p | SQ | GL | QM | F | p |
| (X₁)Nitrogênio | 60,37 | 1 | 60,37 | 61,56 | 0,00 | 8,61 | 1 | 8,61 | 77,87 | 0,00 |
| (X₂)Fósforo | 18,13 | 1 | 18,13 | 18,49 | 0,00 | 12,43 | 1 | 12,43 | 112,51 | 0,00 |
| (X₃)Umidade | 1463,51 | 1 | 1463,51 | 1492,41 | 0,00 | 70,66 | 1 | 70,66 | 639,36 | 0,00 |
| X ₁ .X ₂ | 0,85 | 1 | 0,85 | 0,87 | 0,38 | 0,25 | 1 | 0,25 | 2,30 | 0,16 |
| X₁.X₃ | 0,01 | 1 | 0,01 | 0,01 | 0,91 | 0,90 | 1 | 0,90 | 8,18 | 0,02 |
| X₂.X₃ | 14,75 | 1 | 14,75 | 15,04 | 0,00 | 4,85 | 1 | 4,85 | 43,88 | 0,00 |
| Erro | 8,83 | 9 | 60,37 | | | 0,99 | 9 | 0,11 | | |
| Total | 1566,45 | 15 | | | | 98,71 | 15 | | | |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F_{calculado}; p ≤ 0,05.

A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da AEX à variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de SE é apresentada a seguir.

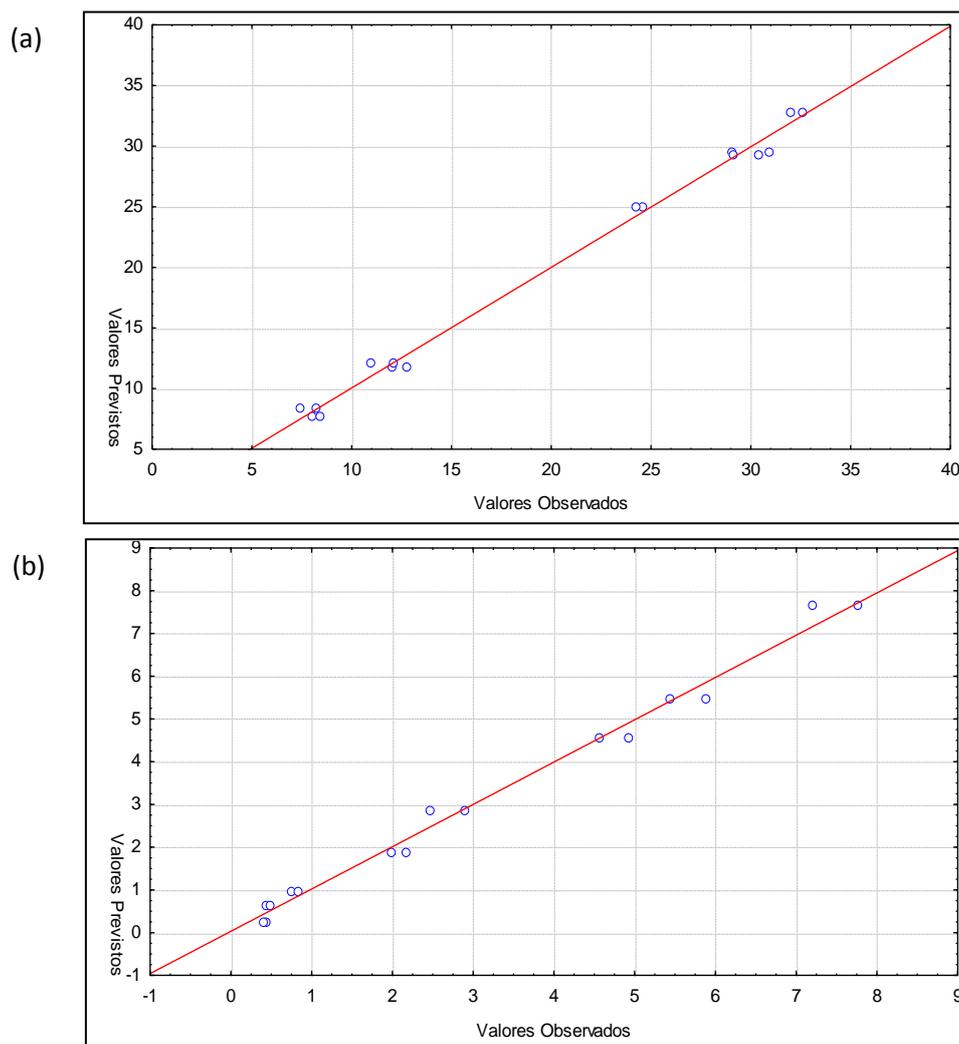
$$Y = 3,03984 + 1,46688 \cdot X_1 + 1,76318 \cdot X_2 + 4,20310 \cdot X_3 + 0,47555 \cdot X_1 X_3 + 1,10107 \cdot X_2 X_3 \quad (6)$$

Assim como observado para os modelos descritos para a celulase, devido aos valores do parâmetro F (>4,0) associado a cada fator, o modelo é capaz não só de descrever, mas também de prever a resposta do sistema dentro das faixas de valores das condições analisadas (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

A correlação entre os valores previstos e os valores observados efetivamente para a AEX do fungo *A. brasiliensis* inoculado nas formas de DM e SE, está visível na Figura 37. Observa-se que tanto o fungo inoculado na forma DM, apresentado na Figura 37a, quanto

para o inoculado na forma de SE, apresentado na Figura 37b, as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentam valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

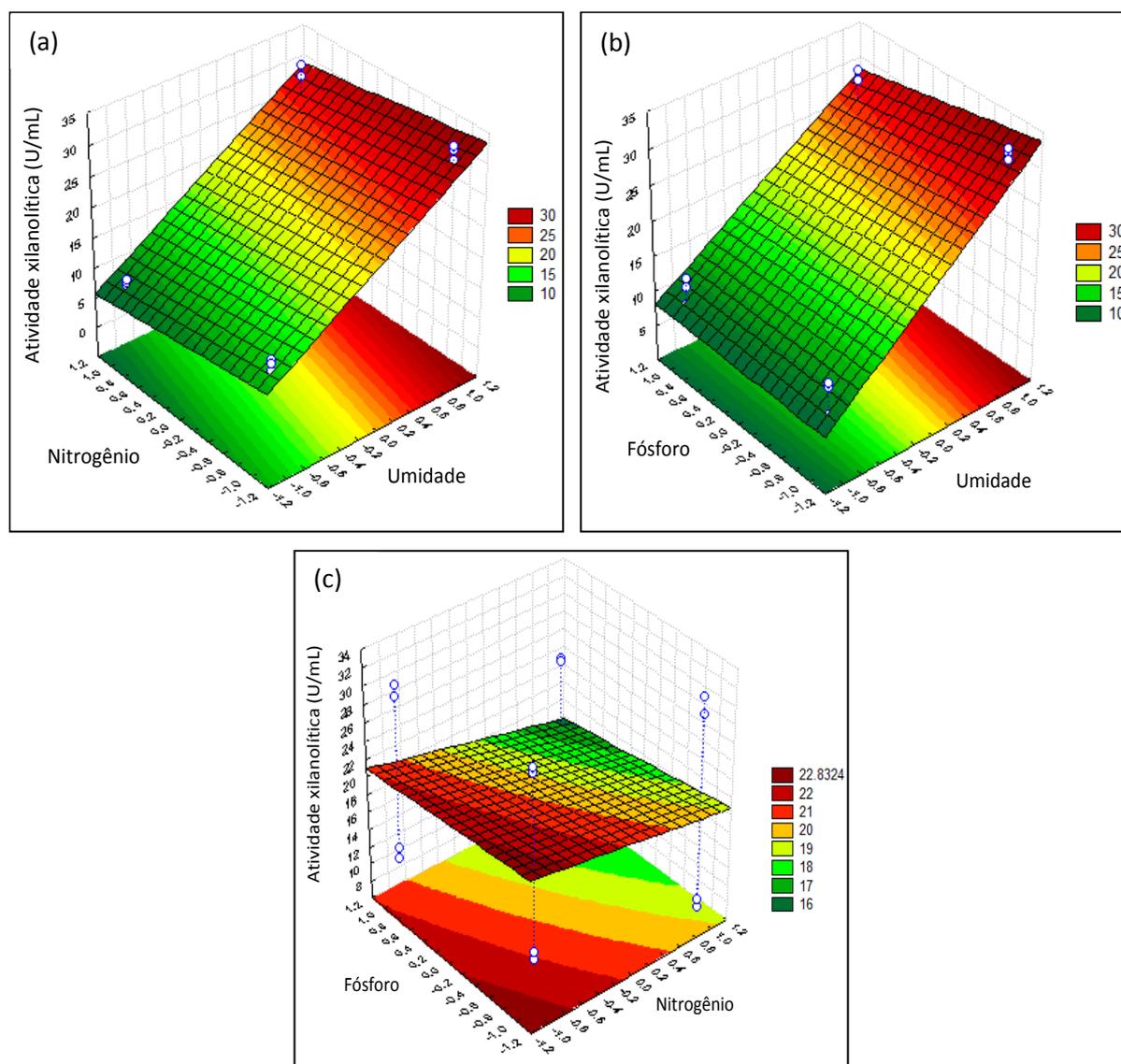
Figura 37 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b).



O coeficiente de correlação R^2 associado à equação (5) vale 0,9944 e o valor ajustado deste coeficiente é de 0,9906. Isto significa que o modelo deduzido é capaz de explicar 99,44% do comportamento da variável de resposta (atividade xilanolítica) dentro do intervalo de variação dos fatores adotados, o que pode ser considerado um resultado excelente. Para a equação (6), o R^2 é de 0,9899 e valor ajustado deste coeficiente é 0,9832, ou seja, o modelo é capaz de explicar 98,99% do comportamento da AEX.

Na realização do planejamento experimental fatorial completo 2^3 foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a AEX com o uso do inóculo nas formas de DM e SE através da análise das superfícies de resposta (Figuras 38 e 39, respectivamente). As variáveis apresentadas nas superfícies de resposta das Figuras 38 e 39 foram escolhidas de acordo com sua influência sobre a resposta avaliada (AEX). Dessa forma, os dois fatores mais relevantes (e não necessariamente estatisticamente significativos) foram utilizados para a visualização dos efeitos.

Figura 38 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (a), como uma função da umidade e da concentração de fósforo (b) e como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio (c).



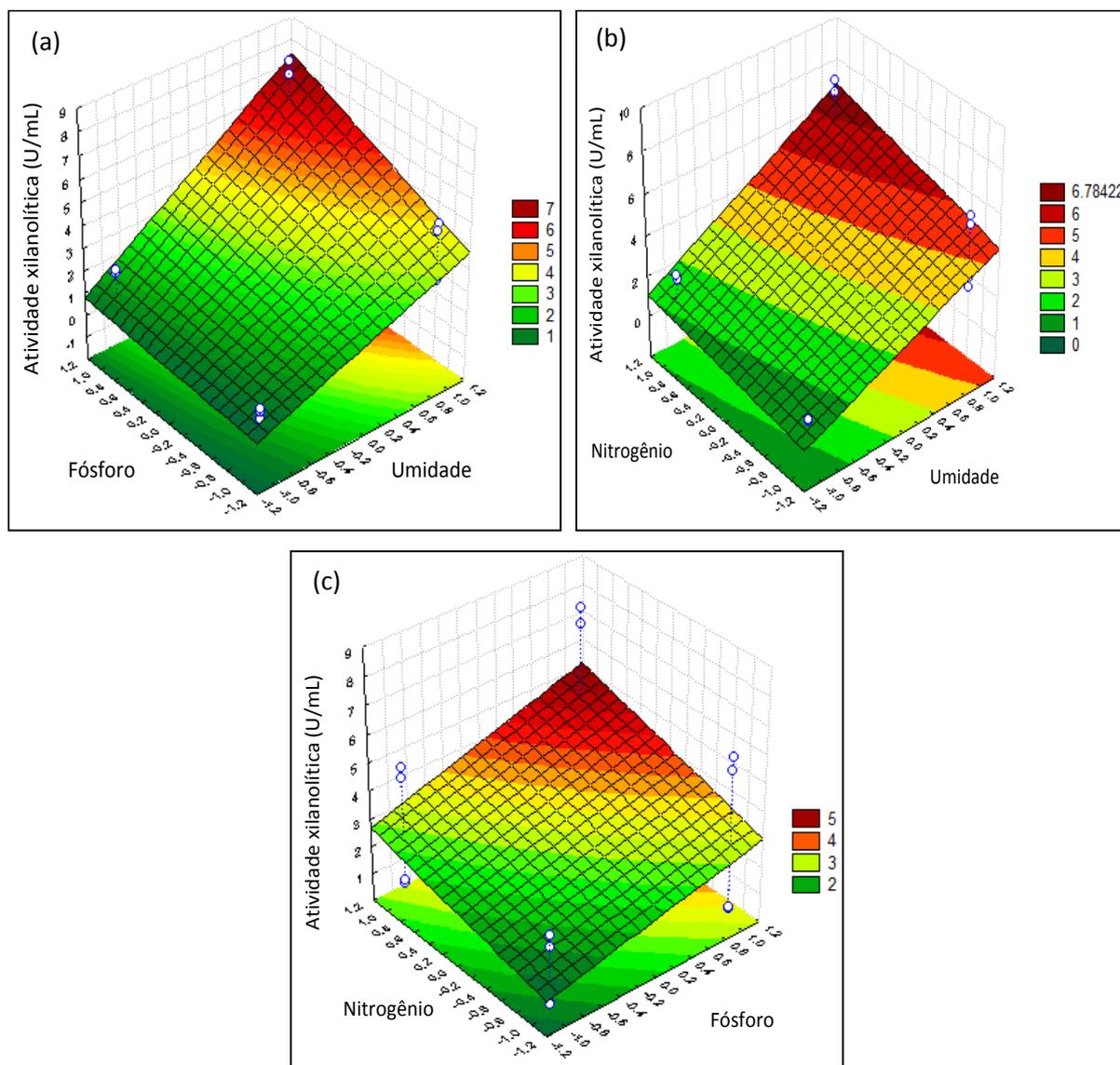
Nas Figuras 38a e 38b observam-se os gráficos de superfícies de resposta para a AEX, com o fungo inoculado na forma de DM, como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio, demonstrando de forma clara a maior significância da variável umidade sobre a resposta AEX, pois o aumento da umidade leva a um significativo aumento na atividade enzimática, e este efeito é ainda mais pronunciado com baixas concentrações de nitrogênio.

Na Figura 38c, observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEX, com o fungo inoculado na forma de DM, como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio. Nota-se a alteração nos valores de AEX quando se altera a concentração de nitrogênio do meio, sendo que menores valores de nitrogênio promovem o aumento da produção enzimática e este efeito é mais pronunciado com a diminuição da concentração de fósforo.

Nas Figuras 39a e 39b, observam-se os gráficos de superfícies de resposta para a AEX, com o fungo inoculado na forma de SE, como uma função da umidade e da concentração de fósforo e como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio, respectivamente. Nota-se que com o aumento da concentração dos nutrientes no meio de cultivo, a AEX aumenta consideravelmente e este aumento é incrementado com a alta umidade.

Na Figura 39c, observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEX, com o fungo inoculado na forma de SE, como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio. Nota-se uma pequena alteração nos valores de AEX quando se altera a concentração de nitrogênio do meio, sendo que menores valores de nitrogênio promovem o aumento da produção enzimática e este efeito é mais pronunciado com a diminuição da concentração de fósforo.

Figura 39 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática xilanolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de suspensão de esporos como uma função da umidade e da concentração de fósforo (a), como uma função da umidade e da concentração de nitrogênio (b) e como uma função da concentração de fósforo e da concentração de nitrogênio (c).



5.3.2.3 Pectinase

Observa-se na Tabela 13 que o melhor resultado para a AEP ($51,93 \text{ U/gbs} = 4,54 \text{ U/mL}$) foi obtido no ensaio 4, quando utilizado o inóculo na forma de DM, níveis máximos de umidade (95%) e nitrogênio (1,5%) e nível mínimo de fósforo (1,0%). Os resultados de atividade de pectinase foram incrementados de forma significativa. Após o planejamento

experimental 2³, obteve-se um valor de AEX igual ao dobro do obtido no planejamento 2⁵⁻¹. Dessa forma, verifica-se que para esta enzima hidrolítica, a estratégia experimental utilizada foi bem sucedida, uma vez que deslocando as variáveis que influenciam significativamente a AEX para os níveis ao redor da região de maiores atividades, conseguiu-se, de fato, aumentar a produção da enzima.

Os maiores valores de AEX obtidos no presente trabalho utilizando o fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de DM e SE foram maiores que alguns valores reportados na literatura. Patil e Dayanand (2006) obtiveram a melhor atividade de exo-pectinase (34,2 U/g) com o fungo *A. niger* DMF 45 cultivado por FS a 34°C em meio contendo resíduos de girassol com umidade inicial de 65%. Os autores verificaram que a temperatura de cultivo foi o fator mais importante para a produção de pectinase, e que tamanhos de partícula em torno de 0,5 mm favoreceram a produção da enzima.

Rocha (2010) conseguiu a melhor atividade de pectinase (5,24 U/g) utilizando somente a casca do maracujá na FS, sem suplementação do meio com nutrientes, realizada em temperatura ambiente, durante 4 dias com o fungo *A. niger* ATCC 16404. Após a otimização encontrou o melhor resultado para a atividade de pectinase (10,80 U/g) na temperatura de 45°C, após 12 dias de cultivo.

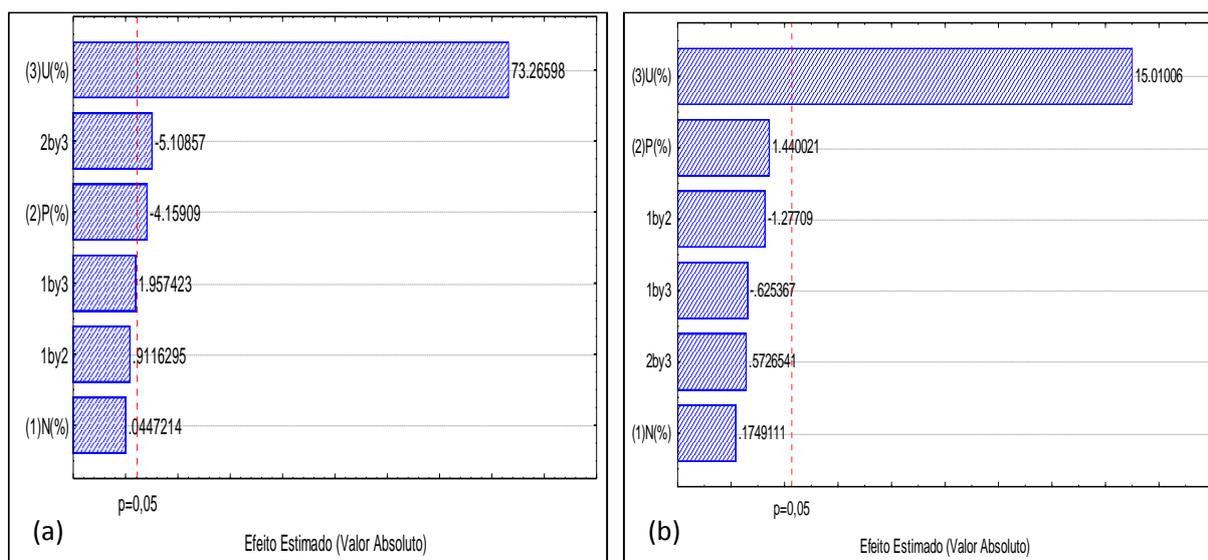
Pinto e colaboradores (2005) verificaram que a maior atividade de poligalacturonase (21,85 U/g) foi obtida utilizando como substrato a casca de maracujá triturada com umidade inicial entre 96% e 97%, semelhante à umidade inicial do presente trabalho (95%) em 24 horas de cultivo com *A. niger* CNPAT 001.

A Figura 40 apresenta os Diagramas de Pareto para a AEP do fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo da macacaporanga. De acordo com a Figuras 40a (fungo inoculado na forma de DM), para a AEP, os fatores individuais umidade e fósforo foram estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%, sendo o efeito da umidade positivo e o efeito do fósforo negativo. O efeito da adição de nitrogênio não foi estatisticamente significativo. Observa-se ainda que a interação entre a umidade e a concentração fósforo também foi significativa. Observando os valores de AEP na Tabela 13, verifica-se que os ensaios realizados com o maior valor de umidade (95%) e menor concentração de fósforo (1,0%) são aqueles onde se obtiveram os maiores valores de AEP.

Importante salientar que no estudo de Santos e colaboradores (2008) as condições otimizadas para a produção de poligalacturonase foram obtidas na ausência de fósforo, ao

contrário do observado neste estudo, em que foi utilizado 1,0% de fósforo. Considerando que estes autores obtiveram 16,0 U/g em apenas 30 horas de cultivo, a diminuição da concentração de fósforo poderia ser avaliada em estudos posteriores na FS do resíduo de macacaporanga, na tentativa de diminuir o tempo de cultivo.

Figura 40 - Diagramas de Pareto para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b).



Nota-se na Figura 40b que a umidade é a única variável com efeito estatisticamente significativo para o nível de confiança de 95% sobre a produção da pectinase, utilizando o inóculo na forma de SE. Os efeitos da adição de fósforo e nitrogênio aparecem na sequência e não apresentaram significância estatística, assim como nenhuma interação entre as variáveis estudadas.

Analisando os Diagramas de Pareto da AEP para o fungo *A. brasiliensis* (Figura 40), pode-se afirmar mais uma vez que a variável umidade é a mais importante para a FS de resíduos de Lauráceas, afetando a produção de pectinase de forma positiva, ou seja, observaram-se maiores valores de atividade enzimática quando as concentrações de umidade do meio foram maiores.

Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a AEP obtidos com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga e inoculado na forma de DM e SE estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| | DM | | SE | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Efeito | p | Efeito | p |
| Média | 32,79695 | 0,000000 | 28,61996 | 0,000000 |
| (X ₁)Nitrogênio | 0,02053 | 0,965306 | 0,34585 | 0,865021 |
| (X₂)Fósforo | -1,90925 | 0,002451 | 2,84730 | 0,183725 |
| (X₃)Umidade | 33,63314 | 0,000000 | 29,67882 | 0,000000 |
| X ₁ . X ₂ | 0,41849 | 0,385731 | -2,52514 | 0,233532 |
| X ₁ . X ₃ | 0,89857 | 0,081983 | -1,23651 | 0,547258 |
| X₂. X₃ | -2,34511 | 0,000638 | 1,13229 | 0,580901 |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; $p \leq 0,05$.

A Tabela 19 apresenta a ANOVA do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para AEP obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 inoculado na forma de DM e SE. Os valores dos efeitos dos parâmetros estudados sobre a AEP (Tabela 18) representam os coeficientes da equação do modelo matemático, o qual contempla as interações entre as variáveis significativas, combinadas duas a duas, sendo classificado, portanto, como não linear.

Tabela 19 - Análise de variância do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de disco micelial e suspensão de esporos.

| Fator | ANOVA – atividade enzimática pectinolítica | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|----------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------|----------------|---------------|-------------|
| | DM | | | | | SE | | | | |
| | SQ | GL | QM | F | p | SQ | GL | QM | F | p |
| (X ₁)Nitrogênio | 0,00 | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,96 | 0,48 | 1 | 0,48 | 0,03 | 0,86 |
| (X₂)Fósforo | 14,58 | 1 | 14,58 | 17,30 | 0,00 | 32,43 | 1 | 32,43 | 2,07 | 0,18 |
| (X₃)Umidade | 4524,75 | 1 | 4524,75 | 5367,90 | 0,00 | 3523,33 | 1 | 3523,33 | 225,30 | 0,00 |
| X ₁ .X ₂ | 0,70 | 1 | 0,70 | 0,83 | 0,38 | 25,50 | 1 | 25,50 | 1,63 | 0,23 |
| X ₁ .X ₃ | 3,23 | 1 | 3,23 | 3,83 | 0,08 | 6,12 | 1 | 6,12 | 0,39 | 0,55 |
| X₂.X₃ | 22,00 | 1 | 22,00 | 26,10 | 0,00 | 5,13 | 1 | 5,13 | 0,33 | 0,58 |
| Erro | 7,59 | 9 | 0,84 | - | - | 140,74 | 9 | - | - | - |
| Total | 4572,85 | 15 | - | - | - | 3733,73 | 15 | - | - | - |

DM = disco micelial; SE = suspensão de esporos; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = $F_{\text{calculado}}$; $p \leq 0,05$.

A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da AEP à variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de DM é apresentada a seguir.

$$Y = 32,79695 - 1,90925 \cdot X_2 + 33,63314 \cdot X_3 - 2,34511 \cdot X_2 X_3 \quad (7)$$

A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da AEP à variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de SE é apresentada a seguir.

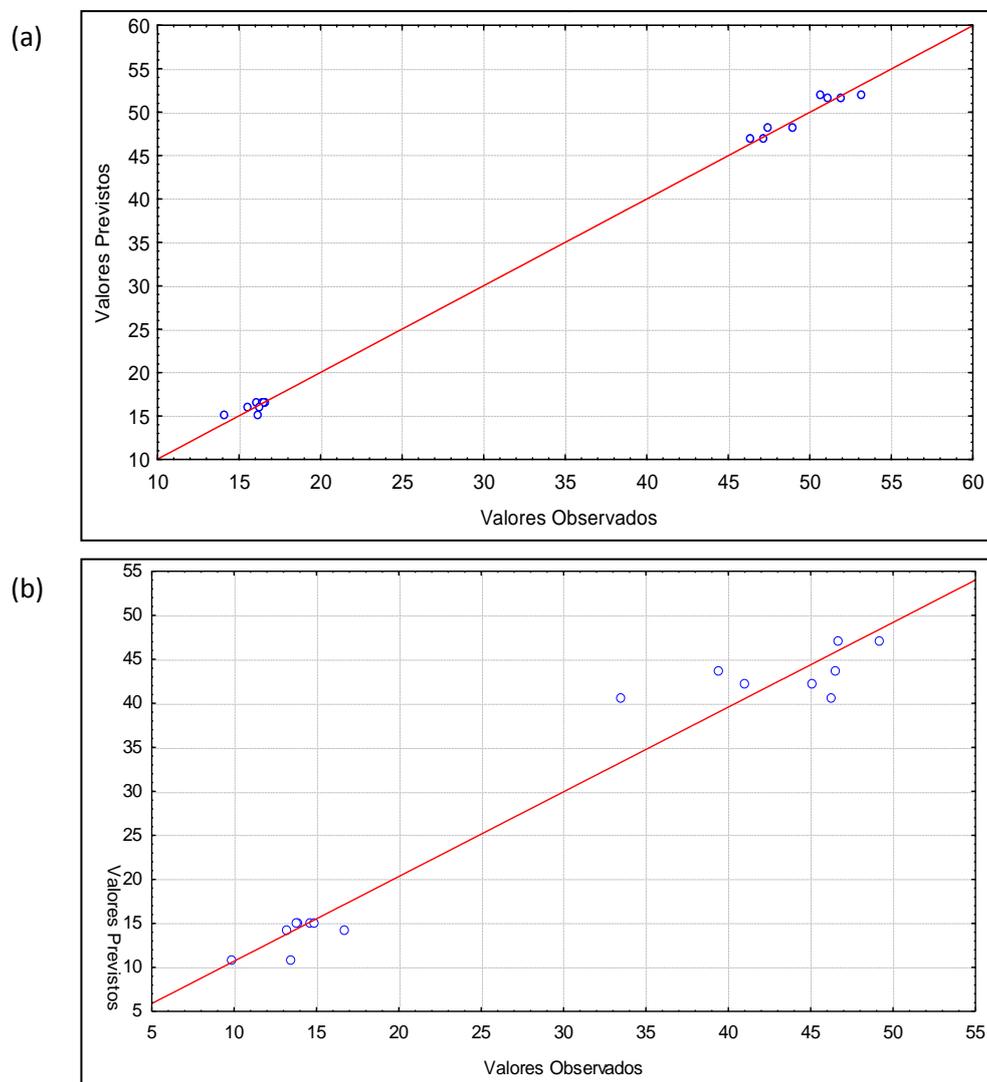
$$Y = 28,61996 + 29,67882 \cdot X_3 \quad (8)$$

Assim como observado para os modelos descritos para a celulase e xilanase, devido aos valores do parâmetro F (>4,0) associado a cada fator, o modelo é capaz não só de descrever, mas também de prever a resposta do sistema dentro das faixas de valores das condições analisadas (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

A correlação entre os valores previstos e os valores observados efetivamente para a AEP do fungo *A. brasiliensis* inoculado nas formas de DM e SE, está visível na Figura 41. Observa-se que tanto o fungo inoculado na forma DM, apresentado na Figura 41a, quanto para o inoculado na forma de SE, apresentado na Figura 41b, as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentam valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

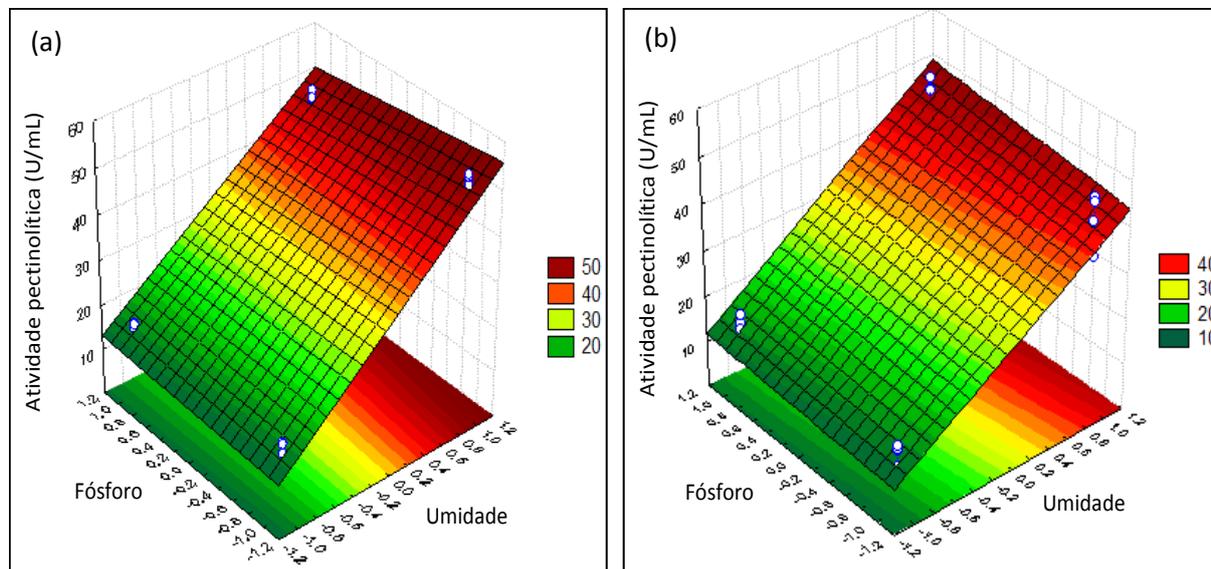
O coeficiente de correlação R^2 associado à equação (7) vale 0,9983 e o valor ajustado deste coeficiente é de 0,9972. Isto significa que o modelo deduzido é capaz de explicar 99,83% do comportamento da variável de resposta (atividade pectinolítica) dentro do intervalo de variação dos fatores adotados, o que pode ser considerado um resultado excelente. Para a equação (8), o R^2 é de 0,9623 e valor ajustado deste coeficiente é 0,9372, ou seja, o modelo é capaz de explicar 96,23% do comportamento da AEP.

Figura 41 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b).



Na realização do planejamento experimental fatorial completo 2^3 foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a AEP com o uso do inóculo na forma de DM e SE através da análise das superfícies de resposta, apresentadas nas Figuras 42a e 42b, respectivamente, como uma função da umidade e da concentração de fósforo. As variáveis apresentadas nas superfícies de resposta da Figura 42 foram escolhidas de acordo com sua influência sobre a resposta avaliada (AEP). Dessa forma, os dois fatores mais relevantes (e não necessariamente estatisticamente significativos) foram utilizados para a visualização dos efeitos.

Figura 42 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de disco micelial (a) e suspensão de esporos (b) como uma função da umidade e da concentração de fósforo.



Nota-se nas Figuras 42a e 43b que com a diminuição da concentração do nutriente fósforo no meio de cultivo, a AEP aumenta consideravelmente e este aumento é ainda mais incrementado com a alta umidade.

Considerando que a partir do planejamento fatorial completo 2^3 os resultados de produção de pectinase do fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga inoculado na forma de DM aumentaram consideravelmente em relação aos resultados obtidos nas mesmas condições a partir do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , o que não foi observado para as enzimas celulase e xilanase, definiu-se que somente para a pectinase seria promissor continuar com o estudo da otimização por meio de mais um planejamento experimental completo.

5.3.3 Estudo das Melhores Condições de Cultivo Utilizando o Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2

Após a análise dos melhores resultados de AEP obtidos com o planejamento fatorial completo 2^3 , um planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado, onde utilizou-se como substrato o resíduo da macacaporanga e o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM. Para este estudo, a temperatura, o tempo de cultivo e a concentração de nitrogênio foram

fixados nos valores mínimos, 24°C, 9 dias e 0,5%, respectivamente. A umidade e a concentração do nutriente fósforo foram as únicas variáveis que foram avaliadas neste planejamento, tendo em vista que estas foram estatisticamente significativas no planejamento 2³ para a AEP.

Dessa forma, tendo em vista que a umidade apresentou efeito significativo e positivo sobre a AEP, os níveis a serem estudados para esta variável no planejamento experimental 2² devem estar acima de 95%. Para a concentração de fósforo, que apresentou resultado significativo e negativo sobre a AEP, os níveis desta variável a serem estudados neste planejamento devem estar abaixo de 1,0%.

Inicialmente, para o estudo das melhores condições de cultivo do fungo *A. brasiliensis* para a produção de pectinase foram calculadas e preparadas duas soluções estoque (Tabela 20) a partir do valor da umidade do resíduo da macacaporanga, apresentando concentrações diferentes dos nutrientes contendo as fontes de nitrogênio (NH₄NO₃) e de fósforo (KH₂PO₄). Estas soluções foram adicionadas, com volumes diferentes, ao substrato sólido, a fim de atingir a umidade desejada, conforme a matriz do planejamento fatorial completo 2² (Tabela 5).

Tabela 20 - Soluções estoque adicionadas aos diferentes ensaios do planejamento fatorial completo 2², com seus respectivos volumes e concentrações de KH₂PO₄ para 100 mL de água destilada, em função da umidade desejada.

| Ensaio | Solução | Volume (mL) | KH ₂ PO ₄ (%) | Umidade (%) |
|--------|---------|-------------|-------------------------------------|-------------|
| 1 | A | 6,19 | 0,1 | 95 |
| 2 | A | 6,47 | 0,1 | 99 |
| 3 | B | 6,19 | 1,0 | 95 |
| 4 | B | 6,47 | 1,0 | 99 |

Os resultados da atividade enzimática pectinolítica (AEP) do fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM, obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2², para o resíduo da macacaporanga estão apresentados na Tabela 21.

Observa-se na Tabela 21 que o melhor resultado para a AEP (211,14 U/gbs = 3,69 U/mL) foi obtido no ensaio 4, quando utilizados os níveis máximos de umidade (99%) e fósforo (0,1%). Este resultado apresenta-se melhor que o apresentado trabalho de Kumar, Sharma e Sarkar (2011), onde foi obtida uma AEP de 179,83 U/g após a otimização das condições de cultivo da FS (umidade inicial do substrato de 65%, tempo de cultivo de 126 horas, fungo *A. niger* NCIM 548).

Tabela 21 - Atividade enzimática pectinolítica obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 utilizando o resíduo de macacaporanga e o fungo *Aspergillus brasiliensis* inoculado na forma de disco micelial.

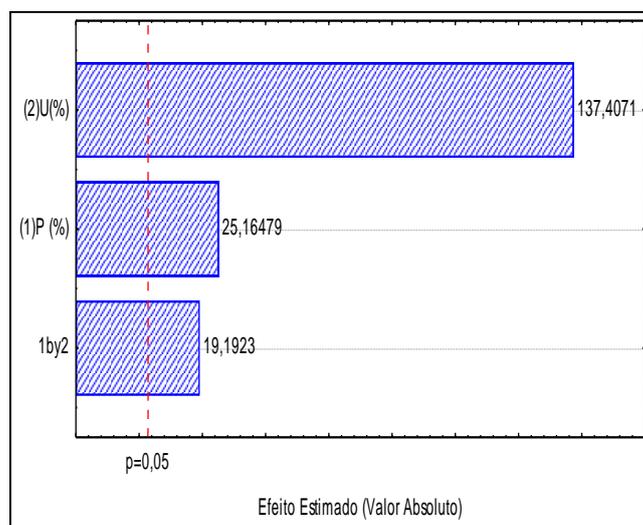
| ENSAIO | VARIÁVEIS | | AEP (U/gbs) |
|--------|-----------|---------|-------------|
| | P (%) | U (%) | |
| 1 | 0,1 (-1) | 95 (-1) | 34,72 |
| 2 | 0,1 (-1) | 99 (+1) | 163,00 |
| 3 | 1,0 (+1) | 95 (-1) | 41,20 |
| 4 | 1,0 (+1) | 99 (+1) | 211,14 |

P = fósforo; U = umidade; AEP = atividade enzimática pectinolítica.

Assim, a partir da Tabela 21, pode-se verificar que os fatores que proporcionaram a melhor AEP foi a maior umidade (99%) e o menor nível da fonte de fósforo (0,1%), utilizando o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de DM no resíduo de macacaporanga a 24°C, com 9 dias de cultivo e 0,5% de nitrogênio.

A Figura 43 apresenta o Diagrama de Pareto para a AEP do fungo *A. brasiliensis* inoculado no resíduo da macacaporanga na forma de DM. De acordo com a Figura 43, para a atividade de pectinase percebe-se que os efeitos umidade e fósforo permanecem sendo estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%. Observa-se que os dois efeitos tem influência positiva na produção de pectinase, e que a interação entre U e P também é estatisticamente significativa e positiva, ou seja, os maiores valores de umidade associados aos maiores valores de fósforo favorecem a produção da enzima.

Figura 43 - Diagrama de Pareto para atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 .



Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a AEP obtidos com o planejamento fatorial completo 2^2 utilizando o fungo *A. brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga e inoculado na forma de DM estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Estimativa dos efeitos para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga.

| | Efeito | p |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Média | 36,04843 | 0,000005 |
| (X₁)Umidade | 1,26166 | 0,000000 |
| (X₂)Fósforo | 0,06754 | 0,010549 |
| X₁.X₂ | 0,00400 | 0,000043 |

p≤0,05.

A Tabela 23 apresenta a ANOVA do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para AEP obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 . Os valores dos efeitos dos parâmetros estudados sobre a AEP (Tabela 22) representam os coeficientes da equação do modelo matemático, o qual contempla as interações entre as variáveis significativas, combinadas duas a duas, sendo classificado, portanto, como não linear.

Tabela 23 - Análise de variância para atividade enzimática pectinolítica obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga.

| ANOVA – atividade enzimática pectinolítica | | | | | |
|--|-----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fator | SQ | GL | QM | F | p |
| (X₁)Umidade | 44465,91 | 1 | 44465,91 | 18880,70 | 0,000000 |
| (X₂)Fósforo | 1491,40 | 1 | 1491,40 | 633,27 | 0,000015 |
| X₁.X₂ | 867,49 | 1 | 867,49 | 368,34 | 0,000043 |
| Erro | 9,42 | 4 | 2,36 | - | - |
| Total | 46834,22 | 7 | - | - | - |

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F_{calculado}; p≤0,05.

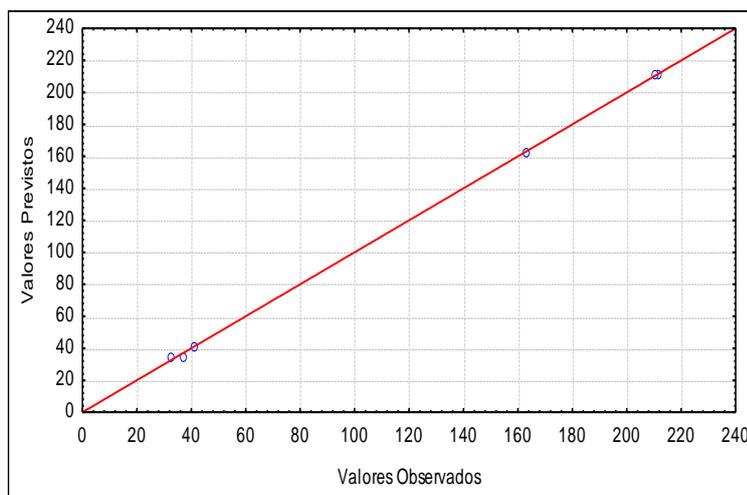
A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da AEP à variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados no planejamento 2^2 , para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* no resíduo de macacaporanga, inoculado na forma de DM é apresentada a seguir.

$$Y = 36,04843 + 1,26166 \cdot X_1 + 0,06754 \cdot X_2 + 0,00400 \cdot X_1 X_2 \quad (9)$$

A correlação entre os valores previstos e os valores observados efetivamente para a AEP do fungo *A. brasiliensis* está visível na Figura 44. Observa-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentam valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

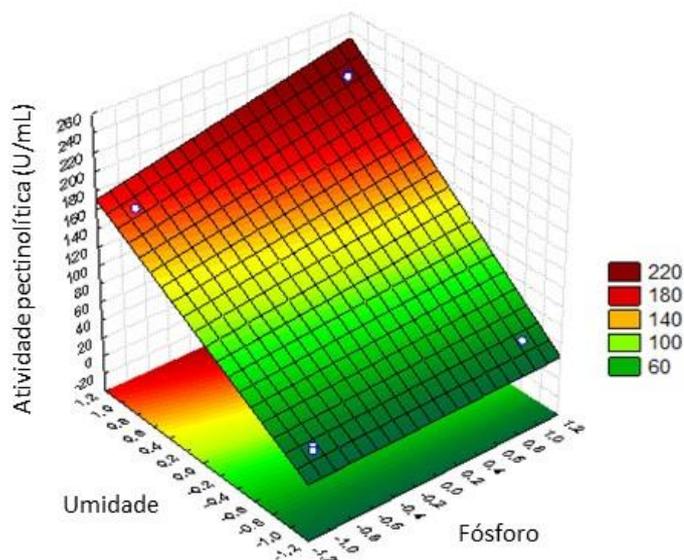
O coeficiente de correlação R^2 associado à equação (9) vale 0,9998 e o valor ajustado deste coeficiente é de 0,9997. Isto significa que o modelo deduzido é capaz de explicar 99,98% do comportamento da variável de resposta (atividade pectinolítica) dentro do intervalo de variação dos fatores adotados, o que pode ser considerado um resultado excelente, ainda melhor do que o observado para o modelo obtido a partir do planejamento experimental 2^3 .

Figura 44 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 .



Na realização do planejamento experimental fatorial completo 2^2 foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a AEP com o inóculo na forma de DM através da análise da superfície de resposta. Na Figura 45, observa-se o gráfico de superfície de resposta para a AEP, como uma função da umidade e da concentração de fósforo. Nota-se que com a diminuição da concentração do nutriente no meio de cultivo, a AEP aumenta consideravelmente e este aumento é incrementado com alta umidade.

Figura 45 - Superfície de resposta para a atividade enzimática pectinolítica do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado no resíduo de macacaporanga como uma função da umidade e da concentração do fósforo obtida a partir do planejamento fatorial completo 2^2 .



Verifica ainda na Figura 45 que a região ótima para a produção de pectinase não foi obtida, pois a superfície não apresenta o formato de morro, ou seja, as condições ótimas ainda devem ser investigadas com os níveis da umidade acima de 99% e os de fósforo entre 0,1% e 1,0%.

A maior atividade de pectinase obtida no planejamento experimental completo 2^2 foi 4 vezes maior que a obtida no planejamento 2^3 e 8,4 vezes maior que a obtida no planejamento 2^{5-1} , sendo portanto, resultados satisfatórios para o uso da metodologia de planejamento experimental.

6 CONCLUSÃO

Os resíduos de macacaporanga e pau-rosa, gerados a partir da hidrodestilação de galhos e folhas, podem ser utilizados na FS para o cultivo do fungo *A. brasiliensis*, visando a obtenção de produtos de maior valor agregado, como as enzimas, minimizando assim o impacto ambiental causado pelo descarte dos mesmos ao meio ambiente.

Na triagem das variáveis significativas para o processo fermentativo de produção de enzimas hidrolíticas, o melhor substrato para o cultivo dos fungos *A. brasiliensis* e *T. harzianum* foi o resíduo de macacaporanga com a maior concentração de umidade (90%); sendo que o melhor fungo para a produção das enzimas de interesse foi o *A. brasiliensis*.

As variáveis que se mostraram estatisticamente significativas para a produção de celulase foram umidade e concentração de fósforo; para a xilanase as variáveis significativas foram umidade, concentração de fósforo, de nitrogênio e temperatura; para a pectinase, apenas a umidade mostrou-se significativa.

A partir do planejamento fatorial completo 2^3 verificou-se um aumento de 2 vezes na atividade pectinolítica do fungo *A. brasiliensis*, ao contrário do observado para as atividades de celulase e xilanase, as quais permaneceram com praticamente os mesmos valores obtidos no planejamento 2^{5-1} .

A atividade de pectinase, após o planejamento fatorial completo 2^2 , apresentou um aumento de 8,4 vezes em relação ao valor inicial obtido no planejamento fracionado, chegando a 211,14 U/gbs. As condições para a obtenção deste valor foram: umidade de 99%, resíduo de macacaporanga suplementado com concentrações de 0,5% de nitrogênio e 1,0% de fósforo, temperatura de 24°C e tempo de cultivo de 9 dias, utilizando o fungo *A. brasiliensis* inoculado na forma de disco micelial.

Sendo assim, o presente estudo demonstrou a possibilidade de se utilizar resíduos da indústria de óleos essenciais para a obtenção de produtos de alto valor agregado, por meio do cultivo fúngico em fermentação sólida. Verificou-se ainda a eficiência do uso do planejamento experimental para a obtenção de condições experimentais que promovam melhores resultados em bioprocessos.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, B. K.; MOHANA, S.; JOG, R.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Utilization of anaerobically treated distillery spent wash for production of cellulases under solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 2019-2027, 2010.
- AGUERO, J. M. Z.; BALDINO JR., A. C.; VILAÇA, P. R.; SCHMIDELL, W. Influência da concentração de fosfatos na produção de glicoamilase por *Aspergillus* em cultivo submerso. **Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações**, v. 1, p. 291-296, 1996.
- ALBERTON, L. R. **Produção de xilanase em resíduos agroindustriais por *Streptomyces viridosporus* T7A e aplicação do extrato bruto em veterinária**. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 133p., 2004.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1998.
- ALVES, J. L. H.; PAULA, J. L. **Madeiras Nativas; anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Ed. Gutenberg, Brasília, 541p., 1997.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.
- ANDRADE, A.T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglicosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento de arroz**. Dissertação de Mestrado. Centro de Estudos Ambientais, Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1999.
- ANNIS, S. L.; GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell-wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p.1-14, 1997.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1161-1166, 2006.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia: Tópicos de Microbiologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 1990.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos - Teoria e Prática - Óleos Essenciais**. Ed. Impr. Univ. UFV: Viçosa/MG, 1995.
- ARAUJO, V. C.; CORRÊA, G. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. **Acta Amazonica**, v. 1, p. 44-47, 1971.

ATKINS, P. W. **Physical Chemistry**. Oxford University Press, 5th Edition, 1990.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BARROS, C. F.; CALLADO, C. H.; CUNHA, M. da; COSTA, C. G.; PUGIALLI, H. R. L.; MARQUETE, O.; MACHADO, R. D. Anatomia ecológica e micromorfologia foliar de espécies de floresta montana na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H. C.; GUEDES-BRUNI, R. R. (Eds.) **Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica**. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 275-296, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ª ed., Ed. da Unicamp: Campinas, 1995.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e Sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, Editora UFV, 443 p., 1999.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v. I. 2ª ed., Viçosa, Editora UFV, 309p., 2002.

BCC. **Enzymes for Industrial Applications**. BCC Research, 2005. Disponível em: www.bccresearch.com/chem/C147U.html. Acessada em: 28/09/2011.

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

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Eds.) **Hemicellulose and hemicellulases**. London: Portland Press. p. 29-52, 1993.

BITTENCOURT, A. M.; GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B.; MAGALHÃES, M.T. The Natural occurrence of 6-styryl-2-pyrone and their synthesis. **Tetrahedron**, v. 27, p. 1043-1048, 1971.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 1-9, 1999.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. **Introduction to Biocatalysis**. Biocatalysis and Enzyme Technology, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.

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

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 38-44, jul/set 1999.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, p. 137-152, 2000.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, 1993.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza, Editorial Acribia S. A., 594p., 1991.

CAMARGO, L. A.; DENTILLO, D. B.; CARDELLO, L.; GATTÁS, E. A. de L. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus* sp. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 153-156, abr/jun 2005.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. Tradução da quinta edição norte-americana. São Paulo: Thomson Learning, 845p., 2007.

CARLILE, M.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London. Academic Press, 460p., 1997.

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

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba dukei* Kostermans**. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 125p., 2000.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Minas Gerais: UFMG. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, 206 p., 2006.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal/RN, 2004.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1031p., 1994.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSATA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255-261, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: Ed. EUFC, 210p., 1981.

CRONQUIST, A. **The Evolution and classification of flowering plants**. 2^a ed. New York, New York Botanical Garden, 517p., 1988.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

DANTAS, É. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 89-94, 2002.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coords.). **Biotecnologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 541 p., 2001.

DIETENBERGER, M. A.; IBACH, R. E.; KRETSCHMANN, D. E.; WHITE, R. H. **Wood handbook: wood as an engineering material**. Forest Products Laboratory. General technical report FPL; GTR-113, 1999.

DOELLE, H. W; MITCHELL, D. A; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1225-1229, 2003.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 5^a ed. Springer: Berlin, 2004.

FARINAS, C. S.; VITCOSQUE, G. L.; FONSECA, R. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1186-1192, 2011.

FONSECA, M. J. V.; SAID, S. The pectinase producer by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectic or orange-pulp pellets as inducer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 28-31, 1994.

FUH, M. R.; PAN, W.H.; HSIEH, I.J.; CHUO, C.-M. Preparative-scale supercritical-fluid extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum* (Clove bud). **International Laboratory**, p. 26, 1996.

GAN, Q.; ALLEN, S. J. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 223-229, 2002.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, p. 85-101, 2003.

GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, S. V.; NIRMALA DEVI, P.; LOSANE, B. K.; ASTHANA, H. N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v.18, p.248-251, 1981.

GILBERT, M.; BREUIL, C.; YAGUCHI, M.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 247-259, 1992.

GOMES, E.; GUEZ, M. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fonte, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; GUILHERME, S. M. J.; MENDES, P. H.; da ROCHA, A. T.; da SILVA, M. L.; WILBERG, V.C. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazônica**, v. 11, p. 143-148, 1981.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W.B. **A química do pau-rosa**. Boletim do Instituto de Química Agrícola, Rio de Janeiro/RJ, v. 53, p.7-20, 1958.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A; GOMES, E. R. S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

GUENTHER, E. **The essential oils**. Malabar, Krieger, 427p., 1972.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987-996, 2003.

GUO, G. L.; CHEN, W. H.; CHEN, W. H.; MEN, L. C.; HWANG, W. S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 14, p. 6046-6053, 2008.

GUTIERREZ, R. M.; FAVELA-TORRES, E.; CORDOVA-LOPES, J. GARCIARIVERO, N. M. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p.103-103, 1998.

HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K. D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.

HERBERT, C.; O'CONNELL, R.; GAULIN, E.; SALESSES, V.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; DUMAS, B. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 2, p. 140-147, 2004.

IBAMA - **Exploração de pau-rosa/Instrução Normativa nº 09, de 25 de agosto de 2011**, Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/publicadas/exploracao-de-pau-rosa-tem-instrucao-normativa>. Acessado em: 13 de dezembro de 2011.

INPA. **Catálogo de madeiras da Amazônia**. Manaus, 163p., 1991.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo/SP). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: O Instituto, 533p., 1985.

JABASINGH, S. A. Utilization of pretreated coir pith for the optimized bioproduction of cellulose by *Aspergillus nidulans*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 1150-1160, 2011.

JARVIS, M. C. Structure and properties of pectin gels in plants cell walls. **Plant Cell and Environment**, Oxford, n. 7, p.153-164, 1984.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastesfor endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1-5, 2000.

JUDD, W. S.; CAMPBEL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Massachusetts, 792p., 1999.

KANG, S. W.; PARK, Y. S; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.

KAR, S.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production of cellulose-free xilanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 462-464, 2006.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KHENG, P. P.; OMAR, I. C. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 325-336, 2005.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, S.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Effect of Substrate and Fermentation Conditions on Pectinase and Cellulase Production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in Submerged (SmF) and Solid State Fermentation (SSF). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1289-1298, 2011.

LAKSHMI, G. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J.; PRAKASHAM, R. S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 51-57, 2009.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Microbiology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LEITÃO, M. C. A.; SILVA, M. L. A.; JANUÁRIO, M. I. N.; AZINHEIRA, H. G. Galacturonic acid in pectin substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 165-169, 1995.

LIMA, E. G.; SILVA, D. A. **Resíduos gerados em indústrias de móveis de madeira situadas no pólo moveleiro de Arapongas-PR**. Floresta, Curitiba, PR, v. 35, n. 1, 2005.

LIU, C.; SUN, Z.; DU, J. Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 703-711, 2008.

LUPE, F. A. **Estudo da Composição Química de Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas da Amazônia**. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 102p., 2007.

MACEDO, G. R. **Estudo dos processos descontínuos e descontínuos com puldo para síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112**. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo/SP, 1998.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 146p., 2006.

MADRIÑÁN, S. Lauraceae. In: N. SMITH; S.A. MORI; A. HENDERSON; D.W. STEVENSON E S.V. HEALD (Eds.). **Flowering plants of the neotropics.** Princeton University Press, Princeton, p. 204-206, 2004.

MAGALHÃES, L. M. S.; ALENCAR, J. C. Fenologia do pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans), Lauraceae, em floresta primária na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 2, p. 227-32, 1979.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; COUTO, H. A. R.; SILVA, A. C. M. da; MARX, F.; HENKE, C. Plant sources of Amazon rosewood oil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1906-1910, 2007.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B; ANDRADE, E. H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e seus Óleos Essenciais.** MPEG, Belém/PA, 2001.

MALDONADO, M. C.; STRASSER DE SAAD, A. M.; CALLIERI, D. Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. **Current Microbiology**, v. 18, p. 303-306, 1989.

MANACHINI, P. L.; PARINI, C.; FORTINA, M. G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 682-685, 1988.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 345-352, 2006.

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

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, Universidade Federal de Viçosa. v. 8, n. 1, p. 195-206, jan./dez. 2001.

MAURYA, D. P.; SINGH, D.; PRATAP, D.; MAURYA, J. P. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p. 5-8, 2012.

MELO, C. T.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L.; LIMA, V. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, F. M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, B. G. S.; SOUSA, F. C. Anxiolyticlike effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyltyramine (apanese III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 451-454, 2006.

METZLER, D. E. **Biochemistry, the Chemical Reactions of Living Cells**. 2^a ed., San Diego: Academic Press, 1976p., 2001.

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

MINAMI, P. S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses**. Barueri: Manole, 199p., 2003.

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

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. (Eds.). Springer, Heidelberg, p.13-32, 2006.

MONTESINOS, J. L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in bath and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 25-37, 1996.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 4. ed. New York: John Wiley, 704p., 1997.

MORAES, A. A.; REZENDE, C. M. A. M.; BÜLOW, M. V. V.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; ROCHA, A. I.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais de espécies do gênero *Aniba*. **Acta Apanese**, v. 2, n 1, p. 41-44, 1972.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Micologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV/FOC, v. 4, 496p., 2010.

MOURA, C. O.; WALTER FILHO, W.; ABSY, M. L. Alergias causadas por algumas espécies madeireiras da Amazônia. In: EFREM, J. G. F.; SANTOS, G. M.; LEÃO, E. L. M.; OLIVEIRA, L. A. (Eds.) **Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia**. Ed. Calderaro, Manaus, v. 2, p. 89-106, 1993.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-23, 2007.

NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; INOUE, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 586-592, 2001.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; VAN RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 118-123, 2012.

NORATIQA, K.; MADIHAH, M. S.; AISYAH, B. S.; EVA, M. S.; SURAINI, A. A.; KAMARULZAMAN, K. Statistical optimization of enzymatic degradation process for oil palm empty fruit bunch (OPEFB) in rotary drum bioreactor using crude cellulase produced from *Aspergillus niger* EFB1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 8-20, 2013.

OHASHI, S. T. Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management. **Perfumer & Flavorist**, v. 22, p. 1-5, 1997.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7563-7569, 2010.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 3636, p. 1-4, 2002.

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

PANDEY, A.; ASHAKUMARY, L.; SELVAKUMAR, P.; VUAYLAKSHMI, K. S. Influence of water activity on growth and activity of *A. niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 485-486, 1994.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech, 221p., 2001.

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Toledo, 115p., 2008.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology** v. 97, p. 2340-2344, 2006.

PEIXOTO, A. B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

PEREIRA, I. C. **Fitoquímica e aspectos morfofisiológicos de *Aniba parviflora* (Lauraceae) cultivadas no município de Santarém – PA.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 92p., 2012.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S. DE B.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais.** Comunicado Técnico, ISSN 1679-6535, Fortaleza/CE, ago/2005.

PYBUS D. H.; SELL C. S. **The Chemistry of Fragrances.** Ed. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. 276p., 1999.

RAGHAYARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 127-135, 2003.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161-179, 2005.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 985-992, 2009.

REVILLA, J. **Plantas Úteis da Bacia Amazônica.** v. II, Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / SEBRAE-AM, 2002.

REZENDE, C. M. A. M.; BÜLOW, O. R. G.; PINHO, S. L. V.; ROCHA, A. I. The 2-pyrone of *Aniba* species. **Phytochemistry**, v. 10, p. 3167-3172, 1971.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ENDO, A. S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 67-72, 2002.

RIBEIRO, J. E. L. DA S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. INPA: Manaus, 816p., 1999.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. 1ª ed., São Paulo, EDUSP, 207p., 1976.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2ª ed., Rio de Janeiro, Âmbito Cultural, 248p., 1995.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residue by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 197-203, 2003.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, 136p., 2010.

RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**, Casa do Pão: Campinas, 326p., 2005.

RODRIGUES, R. M. **A flora da Amazônia**. Belém: CEJUP, 1989.

RODRÍGUEZ-COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.

RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; LEMO, V. Produção de complexos lignocelulíticos em substratos derivados de resíduos agroindustriais por fermentação semi-sólida. **Workshop de Biocatálise e Biotransformação**, São Carlos, v. 4, Livro de Resumos, 2008.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE, A. H. (ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversions**. Academic Press, London, v. 5, p. 227-282, 1980.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. **Symbiosis**, v. 2, p. 79-89, 1986.

RONCERO, M. I. G.; DI PETRO, A.; RUIZ-ROLDÁN, M. C.; HUERTAS-GONZÁLES, M. D.; GARCIA-MACEIRA, F. I.; MÉGLEEZ, E.; JIMÉNEZ, A.; CARACUEL, Z.; SANCHO-ZAPATERO, R.; HERA, C.; GÓMEZ-GÓMEZ, E.; RUIZ-RUBIO, M.; GONZALES-VERDEJO, C. I.; PÁEZ, M. J. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 17, n. 1, p.S47-S53, 2000.

ROSAS, J. **Curso de Biología Molecular y Celular. Enzimas: Aceleradores de las Reacciones Químicas de los Seres Vivos**, 2003. Disponível em: <<http://interbiologia.virtualave.net/molecula/enzimas.html>> Acessada em: 20/11/2011.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: K. KUBITZKI; J.G. ROHWER e V. BITTRICH (eds.). **The families and genera of vascular plants**. Magnoliid, Hamameliid and Caryophyllid families. Berlin, Springer-Verlag, v. 2, p. 336-391, 1993.

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

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*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, 2010.

SAMPAIO, P. T. B.; SANTOS, M. C.; VIEIRA, G.; SPIRONELLO, W.; USECHE, F. L.; BRUNO, F. M. S. Avaliação rebrota da copa das árvores de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em sistema de podas sucessivas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 55-60, 2007.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 21, p. 85-94, 2009.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de Enzimas Microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Eds). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Blucher: São Paulo, v. 3, 593p., 2001.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa: Belém/PA, 2004.

SANTOS, S. F. M., SOUZA, R. L. A.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H., MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 10, n. 2, p.101-109, 2008.

SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2210-2216, 2011.

SCHMIDT, O.; ANGERMANN, H.; FROMMHOLD-TREU, I.; HOPPE, K. Experimental and theoretical investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 424-430, 1995.

SENIOR, D. J.; MAYERS, P. R.; SADDLER, J. N. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 137-142, 1989.

SILVA, L. A. O.; CARMONA, E. C. Production and characterization of cellulase-free xylanase from *Trichoderma inhamatum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 117-125, 2008.

SILVA, L. A. D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 105p., 2008.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Revisão Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 235-241, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ EDUFSC, 821p., 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTEZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS: Porto Alegre, 821p., 1999.

SINGH, R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K.; BISHNOI, N. R. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 28-35, 2009.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PILLAI A.; PREMA P.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Solid state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulose production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 332-336, 2006.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* Fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic

hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 277-283, 2010.

SOUZA, T. D.; VINHA, D. M. N. F.; BISPO, R. S. A.; BOM, S. D. P. E, COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, D. P. R. Produção de xilanases pelo fungo *Aspergillus fumigatus* FBSPE-05, em fermentação semi-sólida (FSS), utilizando diferentes resíduos agroindustriais. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal/RN, Livro de resumos, 2009.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 157p., 2005.

STEFFANI, E. **Modelagem matemática do processo de extração supercrítica de óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Nees & Eberm var. *linaloolífera* Fujita) Utilizando CO₂**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459-465, 2003.

TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA FILHO, J. L.; DURAN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 286-290, 2000.

TEUNISSEN, M. J.; CAMP, H. J. M. O. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 63, n. 1, p. 63-76, 1993.

TOYAMA, N.; OGAWA, K. In: GHOSE, T. K. (Ed.), International Course on Biochemical Engineering Bioconversion. **Biochemical Engineering Research Centre**, IIT, New Delhi (India), p. 182-207, 1977.

TOLAN J. S.; FOODY, B. Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 41-67, 1999.

UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J. Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 4, p. 524-532, 1982.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. John Wiley and Sons; New York, p. 89-95, 454p., 1998.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 2^a ed. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 207p., 1993.

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, p. 419-432, 1996.

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Uri – Campus Erechim, Erechim, 88p., 2004.

VATTIMO, I. O gênero *Ocotea* Aubl. no sul do Brasil - Espécies de Santa Catarina e do Paraná. **Rodriguésia**, v. 18/19, n. 30/31, p. 265-349, 1956.

VELÁZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 201-207, 2002.

VENDRUSCOLO, F.; ALBUQUERQUE, P. M.; STREIT, F.; ESPOSITO, E. NINOW, J. L. Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, p. 15-28, 2008.

VICENTINI, A.; VAN DER WERFF, H.; NICOLAU, S. Lauraceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOLZA, M. A.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F. MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C (Orgs). **Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. INPA, Manaus. p. 150-179, 1999.

VIEIRA, A. M. Pesquisas Florestais. **Boletim do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, v. 14, p. 1-15, 1979.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring. In: ROUSSOUS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M. E VINIEGRAZ-GONZALEZ. G. (Eds.). **Advances in Solid-State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, n. 2, p. 5-22, 1997.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; RATTO, M.; SUNDQUIST, J. Enzymes in pulp and paper processing. In: LEATHAM, G. F.; HIMMEL, M. E. (Eds.). **Enzymes in Biomass Conversion**. v. 2, p. 12-21, 1991.

VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Improvement of Fungal Cellulase Production by Mutation and Optimization of Solid State Fermentation. **Mycobiology**, v. 39, n. 1, p. 20-25, 2011.

WAMMER, K. H.; PETERS, C. A. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation rates: A structure-based study. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 2571-2578, 2005.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/b-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3087-3094, 2005.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 6, n. 8, p. 342-349, 1984.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 5/6, p. 413-435, 1992.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of xylanase in microorganisms: functions, properties and applications. **Microbiology Reviews**, v. 52, n. 13, p. 305-317, 1988.

WOOLF, A. Essential oil poisoning. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 37, p. 721-727, 1999.

ZADRAZIL, F.; PUNIA, A. K. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 85-87, 1995.

ZANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.