



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**MICAELA LOPES DE ARAÚJO**

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS**

**Maceió**  
**2013**

**MICAELA LOPES DE ARAÚJO**

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Federal de Alagoas como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Karla de Souza  
Abud

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Maria  
Rosas Garcia Almeida

Maceió

2013

**Catálogo na fonte  
Universidade Federal de Alagoas  
Biblioteca Central  
Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

A663u    Araújo, Micaela Lopes de.  
          Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas / Micaela  
Lopes de Araújo. – 2013.  
          98 f. : il.

          Orientadora: Ana Karla de Souza Abud.  
          Co-orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.  
          Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de  
Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2013.

          Bibliografia: f. 86-98.

          1. Resíduos agroindustriais – Aproveitamento. 2. Enzimas – Produção. 3.  
Fermentação. I. Título.

CDU: 66.098:663

MICAELA LOPES DE ARAÚJO

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Alagoas, como requisito parcial para  
a obtenção do Título de Mestre em Engenharia  
Química

Aprovada em: Maceió, 27 de Março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

*Ana Karla de Souza Abud*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Karla de Souza Abud  
(PPGEQ/UFAL – Orientadora)

*Renata Maria Rosas Garcia Almeida*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Maria Rosas Garcia Almeida  
(PPGEQ/UFAL - Coorientadora)

*João Nunes de Vasconcelos*

Prof. Dr. João Nunes de Vasconcelos  
(PPGEQ/UFAL)

*Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque  
(UFBA - Membro Externo)

*A todos, pelo apoio dado durante a elaboração deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, a Deus, por me guiar e sempre iluminar meu caminho;

Aos meus pais, Sr. Marcondes Maranhão de Araújo e Sra. Maria Auxiliadora Lopes de Araújo (*in memoriam*), responsáveis pela minha educação, agradeço pelos incentivos e conselhos;

Ao meu noivo, Gustavo, pelo carinho e por me fazer acreditar que tudo daria certo;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ana Karla de Souza Abud, pela orientação, ensinamentos, paciência, compreensão e, principalmente, apoio constante em todos os momentos na execução deste trabalho. Muito obrigada.

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Renata Maria Rosas Garcia Almeida, pela co-orientação;

Aos meus professores do PPGEQ/UFAL que contribuíram para o meu aprendizado durante o curso;

Aos amigos do Grupo de Qualidade, Meio Ambiente e Energia (GQMAE) pela amizade, horas de aprendizado e conversas durante esse período que nos conhecemos;

Aos meus colegas, Cadu, Lívia e José Henrique, pela troca de experiências, apoio, companheirismo e disposição em ajudar durante esta trajetória;

À CAPES e à UFAL pelo apoio financeiro, possibilitando assim a realização desse trabalho.

## RESUMO

O Brasil, em especial a região Nordeste, possui uma economia baseada na produção agrícola, o que resulta na geração de grandes volumes de resíduos. Tais resíduos, quando não adequadamente dispostos, geram problemas de impacto ambiental devido ao volume e à dificuldade de decomposição, levando também à perda de recursos, com significativa contribuição para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Em função disto, os processos biotecnológicos vêm se apresentando como uma alternativa de utilizar esses materiais, agregando alto valor a produtos de descarte com a formação de produtos de interesse comercial, como enzimas e ácidos orgânicos, cumprindo, assim, uma função ambiental e social. A aplicação da fermentação semi-sólida (FSS) é uma destas alternativas, destacando-se por ser um processo simples e de baixo custo. Avaliou-se, neste trabalho, o uso de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas hidrolíticas por fermentação semi-sólida a partir do fungo *Aspergillus niger*, conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL suplementados com meio mineral, de forma a se ter um conteúdo final de umidade em torno de 60%. A cinética de crescimento foi acompanhada através de medida das atividades enzimáticas, acidez, pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART). Foram utilizados como substratos nas fermentações casca de coco verde, bagaço de laranja lima, polpa de abacaxi e sabugo de milho. Em função da queda do pH ao longo da fermentação, estudou-se a influência do mesmo no resíduo de casca de coco verde, alterando o pH do meio mineral. A mistura das farinhas de casca de coco e de sabugo de milho, por apresentarem as maiores atividades enzimáticas em relação aos demais resíduos, foi utilizada num estudo em que se realizou um planejamento experimental  $2^2$ , avaliando-se a influência da umidade e da proporção da mistura dos resíduos na produção das enzimas de interesse. Observou-se que a produção enzimática foi maior que as obtidas em experimentos prévios e encontradas nas condições de 48h de cultivo, teor de umidade em 90% e proporção de farinha de casca de coco e de sabugo de milho 0,5:1,5, respectivamente. A análise de componentes principais (ACP) permitiu entender de forma mais clara a influência das variáveis com o passar do tempo de fermentação, 24 para 48h, sendo representadas por duas componentes principais, que nas duas fermentações conseguiram explicar mais de 80% das variâncias dos resultados obtidos.

**Palavras-chave:** Fermentação. Enzimas. Resíduos. Aproveitamento.

## ABSTRACT

Brazil, especially the Northeast, has an economy based on agricultural production, which results in the generation of large volumes of waste. Such waste, if not disposed properly, generate problems of environmental impact due to the volume and difficulty of decomposition, leading to the loss of resources, with significant contribution to the problem of recycling and conservation of biomass. Because of this, the biotechnological processes have been presented as an alternative to use these materials, aggregating high-value products from disposal with the formation of products of commercial interest, such as enzymes and organic acids, thus fulfilling an environmental and social. The application of solid-state fermentation (SSF) is one of these alternatives, especially because it is a simple process and low cost. It was evaluated in this work, the use of agro-industrial wastes as substrate for the production of hydrolytic enzymes by solid state fermentation from the fungus *Aspergillus niger* conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks with medium supplemented mineral in order to have a final moisture content of around 60%. The kinetics of growth was accompanied by measurement of enzyme activities, acidity, pH, reducing sugars (RS) and total reducing sugars (TRS). Were used as substrates in fermentations green coconut husk, bagasse lime orange, pineapple pulp and corn cob. Due to the decrease in pH during the fermentation, we studied the influence of the same residue of green coconut shell, changing the pH of the mineral. A mixture of flour, coconut husk and corncob for presenting the greatest enzymatic activity in relation to other waste was used in a study in which there was a 2<sup>2</sup> factorial design, evaluating the influence of humidity and proportion mixing the waste in the production of enzymes of interest. It was observed that the enzyme production was greater than those obtained in earlier experiments and found the conditions for 48h of cultivation, moisture content and proportion of 90% coconut shell flour, corncob and 0,5:1,5, respectively. The principal components analysis (PCA) allowed us to understand more clearly the influence of variables over time of fermentation, 24 to 48h, being represented by two major components in the two fermentations could explain more than 80% of the variance of the results obtained.

**Keywords:** Fermentation. Enzymes. Residues. Utilization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avanço do cultivo de coqueiros nos estados brasileiros em 1990 e 2010.....	17
Figura 2 - Corte longitudinal do coco, com as suas partes.....	18
Figura 3 - Corte transversal de uma laranja.....	22
Figura 4 - Principais Estados produtores de abacaxi no Brasil em 2010.....	25
Figura 5 - Cadeia produtiva do milho.....	27
Figura 6 - Principais Estados produtores de milho do país.....	28
Figura 7 - Esquema das etapas de um processo de fermentação semi-sólida.....	30
Figura 8 - Hifas penetrativas e aéreas.....	36
Figura 9 - Aspecto visual dos esporos do fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	37
Figura 10 - Ação das pectinaesterases.....	39
Figura 11 - Ação das poligalacturonases.....	39
Figura 12 - Sequência do procedimento experimental.....	43
Figura 13 - Ressuspensão dos fungos em solução de Tween 80 0,01%.....	45
Figura 14 - Contagem em Câmara de Neubauer.....	46
Figura 15 - Etapas da fermentação semi-sólida.....	48
Figura 16 - Consumo de açúcares na forma de glicose para os diferentes resíduos.....	53
Figura 17 - Cinética do consumo de ART para os diferentes resíduos.....	53
Figura 18 - Acompanhamento da acidez para extratos dos diferentes resíduos.....	54
Figura 19 - Valores de pH para os extratos fermentados nos diferentes resíduo.....	54
Figura 20 - Cinética de ação da pectinase para os diferentes resíduos.....	55
Figura 21 - Atividade de poligalacturonase para os diferentes resíduos.....	56
Figura 22 - Atividade de avicelase para os diferentes resíduos.....	57
Figura 23 - Atividade de carboximetilcelulase para os diferentes resíduos.....	58
Figura 24 - Atividade de xilanase para os diferentes resíduos.....	58
Figura 25 - Consumo de AR ao longo da fermentação dos resíduos.....	59

Figura 26 - Consumo de ART ao longo da fermentação dos resíduos.....	60
Figura 27 - Comportamento da acidez dos extratos obtidos a partir dos resíduos.....	60
Figura 28 - Comportamento do pH dos extratos obtidos a partir dos resíduos.....	60
Figura 29 - Consumo de AR ao longo da fermentação dos resíduos.....	61
Figura 30 - Atividade de pectinase para diferentes valores de pH.....	61
Figura 31 - Consumo de ART ao longo da fermentação dos resíduos.....	62
Figura 32 - Comportamento da acidez dos extratos obtidos a partir dos resíduos.....	62
Figura 33 - Comportamento do pH dos extratos obtidos a partir dos resíduos.....	63
Figura 34 - Atividade de pectinase para diferentes os diferentes resíduos.....	63
Figura 35 - Atividade de poligalacturonase para diferentes valores de pH.....	64
Figura 36 - Atividade de avicelase para diferentes valores de pH.....	64
Figura 37 - Atividade de xilanase para diferentes valores de pH.....	65
Figura 38 - Consumo de AR para diferentes valores de pH.....	66
Figura 39 - Consumo de ART para diferentes valores de pH.....	66
Figura 40 - Atividade enzimática e consumo de açúcares nos tempos 24h e 48h de fermentação.....	68
Figura 41 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis umidade e proporção no tempo 24h de fermentação.....	70
Figura 42 - Gráficos de superfícies de resposta obtidas para as atividades enzimáticas e consumo de açúcares em função da umidade.....	71
Figura 43 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis umidade e proporção no tempo 48h de fermentação.....	74
Figura 44 - Gráficos de superfícies de resposta obtidas para as atividades enzimáticas e consumo de açúcares em função da umidade e da proporção em 48h de cultivo.....	75
Figura 45 - Projeção dos experimentos em função dos fatores 1 e 2 (24 horas).....	78
Figura 46 - Projeção das variáveis em função dos fatores 1 e 2 (24 horas).....	78
Figura 47 - Diagrama em árvore para 8 variáveis (24 horas).....	79
Figura 48 - Projeção dos experimentos em função dos fatores 1 e 2 (48 horas).....	80
Figura 49 - Projeção das variáveis em função dos fatores 1 e 2 (48 horas).....	80

Figura 50 - Diagrama em árvore para 8 variáveis (48 horas)..... 81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área plantada com coqueiro e produção de coco nas regiões do Brasil, em 2009.....	17
Tabela 2 - Produção brasileira de laranja em 2010.....	21
Tabela 3 - Aplicações da FSS em diferentes setores econômicos.....	31
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental $2^2 + 3$ repetições no ponto central.....	51
Tabela 5 - Caracterização físico-química dos resíduos.....	52
Tabela 6 - Análise de variância para as atividades em 24h de fermentação.....	69
Tabela 7 - Análise de variância para as atividades em 48h de fermentação.....	73

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>2.1 Resíduos agroindustriais</b> .....	15
2.1.1 Coco verde.....	16
2.1.1.1 Produção de coco verde em Alagoas.....	19
2.1.2 Laranja.....	20
2.1.2.1 Produção de laranja lima no Vale do Mundaú.....	23
2.1.3 Abacaxi.....	24
2.1.4 Milho.....	26
<b>2.2 Fermentação semi-sólida</b> .....	29
2.2.1 Fatores que influenciam a fermentação semi-sólida.....	32
2.2.1.1 Umidade.....	32
2.2.1.2 pH.....	33
2.2.1.3 Aeração.....	34
2.2.1.4 Mistura de resíduos.....	34
<b>2.3 Microrganismo</b> .....	35
<b>2.4 Enzimas</b> .....	38
2.4.1 Pectinases.....	38
2.4.2 Celulases.....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	42
<b>3.1 Gerais</b> .....	42
<b>3.2 Específicos</b> .....	42
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	43
<b>4.1 Obtenção, secagem e moagem dos resíduos</b> .....	43

<b>4.2 Caracterização físico-química.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Fermentação semi-sólida.....</b>	<b>45</b>
4.3.1 Microrganismo.....	45
4.3.2 Preparo da solução de esporos.....	45
4.3.3 Contagem dos esporos.....	46
4.3.4 Solução nutriente.....	47
4.3.5 Preparo do resíduo e inoculação.....	47
4.3.6 Neutralização do resíduo.....	47
4.3.7 Fermentação e extração.....	48
4.3.8 Determinação das atividades enzimáticas.....	48
4.3.9 Determinação de acidez em ácido orgânico.....	50
<b>4.4 Planejamento experimental.....</b>	<b>51</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Caracterização físico-química dos resíduos.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Cinética das fermentações.....</b>	<b>52</b>
5.2.1 Utilização de casca de coco, bagaço de laranja lima e mistura dos dois resíduos como substratos.....	52
5.2.2 Utilização de polpa de abacaxi e sabugo de milho como substratos.....	59
<b>5.3 Estudo da influência do pH na atividade enzimática.....</b>	<b>63</b>
<b>5.4 Avaliação das condições de fermentação.....</b>	<b>67</b>
<b>5.5 Análise de componentes principais (ACP).....</b>	<b>76</b>
5.5.1 Fermentação com 24 horas.....	77
5.5.2 Fermentação com 48 horas.....	80
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento agroindustrial, embora favoreça o desenvolvimento, contribui para o aumento da geração de resíduos sólidos, compostos de casca, caroços, entre outros, criando um impacto para o meio ambiente e com isso, a necessidade de alternativas de uso e aproveitamento integral dos recursos agrícolas (PANDEY et al., 2000, LAUFENBERG et al., 2003, UENOJO; PASTORE, 2007).

Os progressos em biotecnologia têm se tornado uma destas alternativas, levando à utilização de quantidades significativas de resíduos agroindustriais desperdiçadas anualmente no país como fonte de matéria orgânica para a obtenção de compostos de alto valor agregado para uso nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica.

Há uma grande quantidade de resíduos da agroindústria produzida no país, tais como bagaço de cana (subproduto da indústria de açúcar e álcool), farelo de trigo, de arroz, mandioca, de cacau e cascas de frutas em geral. Estes resíduos, além de possuírem baixo custo, apresentam boa disponibilidade, despertando assim, o interesse dos pesquisadores na busca de produtos com um alto valor comercial e baixo custo, como proteínas, enzimas, biofertilizantes, biosurfactantes dentre outros metabólitos microbianos. Desta forma, diferentemente do que acontecia no passado, quando os resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, tem-se difundido cada vez mais os conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos (LAUFENBERG et al., 2003).

O umbu, por exemplo, é um fruto bastante comercializado no Nordeste brasileiro, sendo muito consumido tanto na forma fresca como industrializada. Porém, tem-se um grande percentual de resíduos gerado durante a safra, correspondendo a cerca de 22% de casca do peso total do fruto (SANTIAGO et al., 2011).

Quantidades expressivas também de resíduos de laranja, casca de coco, palha e sabugo de milho e casca e polpa de abacaxi são descartadas, decorrentes da grande vocação do país para a produção agrícola.

O Brasil é líder mundial na produção de coco verde e o aumento crescente no seu consumo vem despontando como um produto bastante promissor no mercado brasileiro (SEBRAE, 2012). O problema, no entanto, é que o aumento na produção e no consumo da água de coco gera uma grande quantidade de resíduos, transformando-se em um sério problema ambiental.

A laranja e o abacaxi também estão entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, o que gera grandes quantidades de resíduos. A cultura da laranja lima no interior de Alagoas é referência no Nordeste do país, ainda que apresente altos índices de desperdício no processo de comercialização, pois se trata de uma matéria-prima facilmente suscetível à degradação. Tem-se ainda uma grande produção nacional de abacaxi, que em 2008 permitiu ao Brasil ocupar o 1º lugar no ranking mundial. Como decorrência, há um descarte de grandes quantidades de resíduos destas frutas (RANKBRASIL, 2013; VILELA et al., 2011).

No ramo dos grãos, destaca-se o milho, cuja produção nacional tem mostrado um crescimento expressivo nas grandes propriedades e aponta a possibilidade desta cultura desbancar o reinado da soja no país, gerando aumento de resíduos, como o sabugo (NASCIMENTO, 2012).

A utilização de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos é economicamente viável e ajuda a resolver problemas ambientais causados por seu acúmulo na natureza. Uma aplicação em potencial desses resíduos é a obtenção de produtos de maior valor agregado, como enzimas.

Para esta produção, a fermentação semi-sólida tem sido aplicada, destacando-se por ser um processo simples e de baixo custo (energia, água, mão-de-obra e manutenção), ocupar pouco espaço operacional, possuir menor índice de contaminação devido ao baixo teor de umidade, maior concentração de produtos formados e facilidade de extração dos seus produtos, podendo ser feita com água, dispensando o uso de solventes. Além disto, nos últimos anos tem recebido especial interesse em países com abundância de biomassa e de resíduos agroindustriais, celulósicos ou amiláceos, levando à menor produção de resíduos indesejáveis (PANDEY, 2003).

Devido à grande disponibilidade destes resíduos na região Nordeste, bem como a possibilidade de agregar valor a tais resíduos, propõe-se nesta dissertação o uso dos pós da casca de coco verde, do bagaço de laranja lima, do sabugo de milho cozido e da polpa de abacaxi como substrato na produção de enzimas hidrolíticas (pectinase, poligalacturonase, avicelase, carboximetilcelulase e xilanase).

Para isto, foram desenvolvidos estudos de fermentação semi-sólida na presença do fungo *Aspergillus niger*, verificando-se as condições de maior produção de cada enzima e a influência de fatores como pH, umidade e mistura de resíduos na melhoria do processo fermentativo.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental. Tal preocupação surge em função do aumento da população mundial, de possíveis impactos ambientais e do elevado índice de perdas e desperdícios, criando a necessidade do uso eficiente e aproveitamento integral dos recursos agroindustriais (PANDEY et al., 2000).

O bom uso de recursos naturais também representa grande importância na atividade econômica de países em desenvolvimento, em especial nas atividades industrial e agrícola, com inúmeros estudos e investimentos em tecnologias limpas, economia de recursos, reciclagem e reaproveitamento de resíduos (UENOJO; PASTORE, 2007). Entre os processos desenvolvidos, destaca-se a transformação em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. (COELHO et al., 2001, COUTO; SANROMÁN, 2006, ABUD; NARAIN, 2010).

Por serem materiais ricos em macro e micronutrientes, os resíduos, se não adequadamente tratados, podem proporcionar sérios problemas de poluição no solo e em águas superficiais e subterrâneas. Além da contaminação direta, os maiores impactos são decorrentes da fermentação do material, com geração de maus odores e redução do oxigênio dissolvido em águas superficiais, cuja magnitude depende da concentração de carga orgânica e da quantidade lançada. A degradação da matéria orgânica é, também, habitat para a proliferação de microrganismos e de moscas, mosquitos, baratas e ratos (MATOS, 2005).

### **2.1 Resíduos agroindustriais**

O termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando não somente materiais sólidos como também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas (TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000).

Quanto aos resíduos sólidos, estes se diferenciam do termo lixo porque, enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que apenas deve ser descartado, os resíduos possuem valor econômico agregado, por possibilitarem reaproveitamento no próprio processo produtivo (DEMAJORIVIC, 1995).

Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição (PELIZER et al., 2007).

O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A disposição dos resíduos no meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de energia lançados na atmosfera, nas águas ou no solo deve ocorrer após os resíduos sofrerem tratamento e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (AQUARONE, 1990 apud PELIZER et al., 2007).

De acordo com Pelizer et al. (2007), a crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza.

Os resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (LAUFENBERG, 2003).

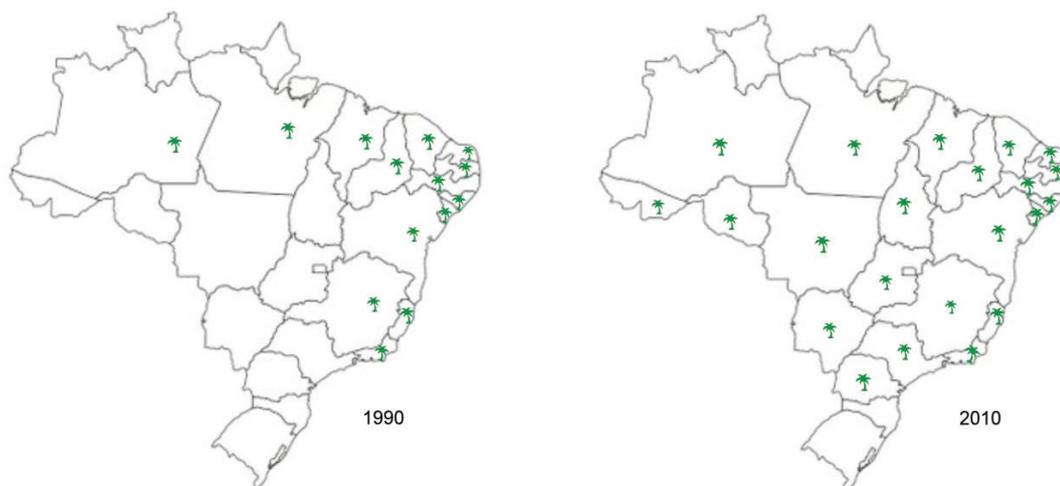
### 2.1.1 Coco verde

Em 1990, o Brasil ocupava o 10º lugar mundial na produção de coco, com uma produção ao redor de 477 mil toneladas. Atualmente, o país é o quarto maior produtor mundial, atrás apenas da Indonésia, Filipinas e Índia, com uma produção de cerca de 2,8 milhões de toneladas, em uma área colhida de 287 mil ha de coqueiros. A condição de destaque do Brasil acentua-se quando comparado aos demais países da América do Sul, pois a produção brasileira é responsável por mais de 80% (SEBRAE, 2012).

O aumento de produtividade, responsável por esta posição de liderança do país, é resultado de incremento tecnológico em quesitos como adubação, sistemas intensivos de cultivos e variedades melhoradas.

A partir da Bahia, o coqueiro disseminou-se pelo litoral nordestino, especialmente por ser uma frutífera típica de clima tropical, onde encontrou condições favoráveis para cultivo e, posteriormente acabou se adaptando em outras regiões do país. Em 1990, o cultivo de coqueiro restringia-se às regiões Norte e Nordeste. Nos dias atuais, o que se constata a partir da Figura 1 é o cultivo de coqueiros em quase todas as unidades da federação brasileira (MARTINS; JÚNIOR, 2011).

**Figura 1 - Avanço do cultivo de coqueiros nos estados brasileiros em 1990 e 2010.**



Fonte: MARTINS; JÚNIOR, 2011.

Devido às condições de tropicalidade climática, as maiores plantações e produções se concentram na faixa litorânea do Nordeste e parte da região Norte do Brasil, como indica a Tabela 1.

O Brasil apresenta uma peculiaridade com relação ao fruto do coqueiro. Enquanto mundialmente o coco é conhecido como uma oleaginosa, sendo processado majoritariamente em seu estágio final de maturação para a produção de óleo e outros produtos, no país, o coco é consumido também imaturo, para o aproveitamento da água rica em sais minerais, acumulada no seu interior (ROSA et al., 2001).

**Tabela 1 - Área plantada com coqueiro e produção de coco nas regiões do Brasil, em 2011.**

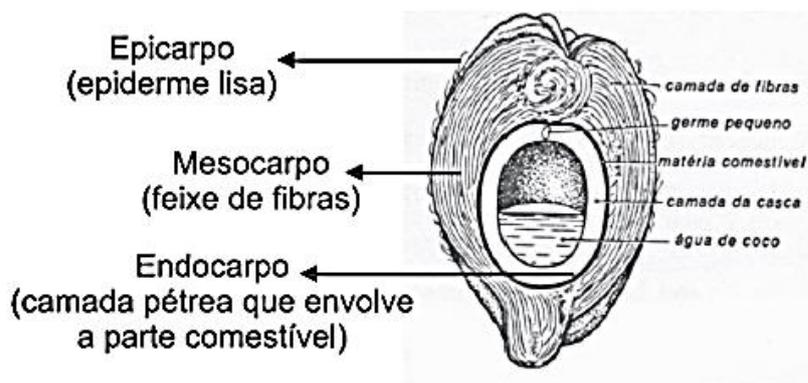
Regiões do Brasil	Área plantada (ha)	Produção (t)
Nordeste	219.472	1.373.598
Norte	27.955	252.436
Sudeste	21.209	298.014
Centro oeste	2.801	36.246
Sul	196	2.140

Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2011.

A Figura 2 ilustra fruto do coqueiro, constituído pela casca (epicarpo e mesocarpo), albúmen líquido ou água, albúmen sólido ou copra e endocarpo conhecido popularmente como “quenga”. A casca representa em torno de 57% do peso do fruto, sendo composta pelo

mesocarpo (fibra e pó) e epicarpo. O volume e o peso da casca variam com as condições de clima e solo da região de plantio, da adubação utilizada, dos tratos culturais e fitossanitários aplicados e da variedade cultivada (NUNES; SANTOS, 2009).

**Figura 2 - Corte longitudinal do coco, com as suas partes.**



Fonte: FERREIRA et al., 1998.

O mesocarpo é formado por fibras e pó, na proporção aproximada de 30% e 70%, respectivamente. As fibras são, basicamente, constituídas de lignina, de lenta decomposição, e levam de oito a dez anos para se decomporem na natureza. O pó, originado da trituração da casca, é hidrofílico, retendo de oito a dez vezes o seu peso em água, reidratando rapidamente e apresentando alta porosidade (NUNES; SANTOS, 2009).

Atualmente, a maioria das cascas de coco é descartada de forma inadequada, servindo como poluidor do meio ambiente e fonte de risco para a saúde, pois constitui um meio adequado para multiplicação de animais peçonhentos e insetos vetores de doenças.

Esses resíduos também constituem excelentes matérias-primas para a produção de adubos orgânicos, de grande importância agrônômica, social e econômica, sem desvantagens ecológicas. As cascas inteiras podem ser utilizadas na fabricação de adubo orgânico, pelo processo de compostagem. Também, na cobertura do solo, na fabricação manual de vasos, no cultivo de plantas e na formação de briquetes ou blocos prensados, em substituição ao carvão de madeira, com grandes vantagens ecológicas e rendendo um valor calórico entre 3000 e 4000 kcal/kg (NUNES; SANTOS, 2009).

Existem muitas formas de aproveitamento do resíduo do coco, dentre as quais se destacam as fibras do mesocarpo que, com os seus diferentes comprimentos, servem para a produção de uma gama de produtos, como vestuário, escovas, pincéis, cordas marítimas, cortiça isolante e xaxim (coxim), para o cultivo de plantas, entre outros. O pó pode ser

utilizado na fabricação de substratos agrícolas. O endocarpo, por sua vez, é amplamente usado na fabricação de bijuterias, bolsas, botões e artesanatos em geral (NUNES; SANTOS, 2009).

A fermentação semi-sólida é outra importante alternativa nos estudos e avanços obtidos no aproveitamento destes resíduos, destacando-se seu uso para a produção de enzimas (COELHO et al., 2001), uma vez que, no campo da comercialização de enzimas, o Brasil é basicamente consumidor de produtos importados, o que transforma o resíduo de coco verde num importante instrumento para alavancar o desenvolvimento de uma indústria nacional de enzimas (ROSA et al., 2001).

#### 2.1.1.1 Produção de coco verde em Alagoas

Em Alagoas, a maioria dos produtores de coco são agricultores familiares que precisam do apoio do governo e de instituições de pesquisa para revitalizar a cultura, que é tão importante para o Estado (BARROS, 2011).

Atualmente, existem cerca de 12 mil hectares cultivados com coco no Estado, a maior parte da variedade gigante, cuja produção possibilita tanto o uso *in natura* quanto na industrialização, na obtenção de produtos como coco ralado, leite de coco, doce, farinha, fibras, entre outros produtos e subprodutos. Outra variedade introduzida no Estado é o coco anão, que leva 3,5 anos para começar a produzir e destina-se a produção de coco verde (água de coco) (MUNICÍPIOS ALAGOANOS, 2011; MARTINS; JÚNIOR, 2011).

A Prococo é uma associação que representa os produtores de coco em Alagoas, tendo sido fundada há 21 anos e possuindo atualmente 400 membros. Vendo a necessidade da revitalização da cultura do coco no Estado e da criação de um programa para dinamização, a Prococo vem tentando estabelecer uma cadeia produtiva para o produto e, com isso, melhorar as condições de produção, obter mais assistência técnica e acesso ao mercado, com a inclusão do produto na merenda escolar. Contudo, a associação encontra ainda com o impasse em algumas condições como baixa produtividade, falta de linhas de financiamento e pragas e doenças que atingem os coqueirais. Deste último, consta que já foram identificadas 23 pragas e doenças nos coqueirais alagoanos, o que acarreta prejuízos aos produtores (BARROS, 2011; MUNICÍPIOS ALAGOANOS, 2011).

A baixa produção do coco é expressa pela média de produção de cada árvore, 47 frutos/ano. A maior parte da produção alagoana vai para São Paulo, sendo comprada por R\$ 0,45 a unidade, o que não remunera o produtor familiar (MUNICÍPIOS ALAGOANOS, 2011).

A instalação de unidade de beneficiamento pode vir a abrir mercado para os produtores de coco do Estado. No município de União dos Palmares, na Zona da Mata alagoana, uma multinacional do ramo de bebidas, que já possui uma fábrica de achocolatado na região, abriu uma franquia e pretende fazer o envase da água de coco verde, com uma previsão de que as mudas que poderão ser distribuídas produzirão até 200 cocos por pé a cada ano. Alagoas foi escolhida para instalação da unidade por já possuir tradição na produção de coco e, se houvesse uma produção suficiente de coco verde, ela já estaria sendo comprada (ALAGOAS, 2011).

O mercado de água de coco, oriunda de coco anão, é muito promissor. Porém, a maior parte das propriedades ainda cultiva o coco gigante, que não serve para produção de água, mas de polpa, que é aproveitada na produção de alimentos (ALAGOAS, 2011).

### 2.1.2 Laranja

A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, com produção ultrapassando 80 milhões de toneladas/ano (CORAZZA et al., 2001). Brasil e Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de citros, com 45% do total, em que ainda se destacam África do Sul, Espanha e Israel (JUNIOR et al., 2005).

Atualmente, o Brasil é líder no ranking mundial, de acordo com dados da Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR) e responsável por aproximadamente 30% da produção de laranja *in natura* e por 60% da produção de suco de laranja de todo o planeta (RANKBRASIL, 2013).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em informações disponibilizadas através do censo Agropecuário de 2010, o Estado de São Paulo é responsável pela maior parte da produção nacional de laranja, com mais de 75%.

Os dados ilustrados na Tabela 2 mostram o Estado de São Paulo como principal produtor da fruta, seguido dos Estados da Bahia e de Minas Gerais, tradicionais exportadores do suco concentrado. Pode-se observar que em 2010 a produção nacional de laranja foi de 17.618.450 t. No entanto, em 2012, a produção aumentou em 10,54%, chegando a 19.476.428 t (IBGE, 2012).

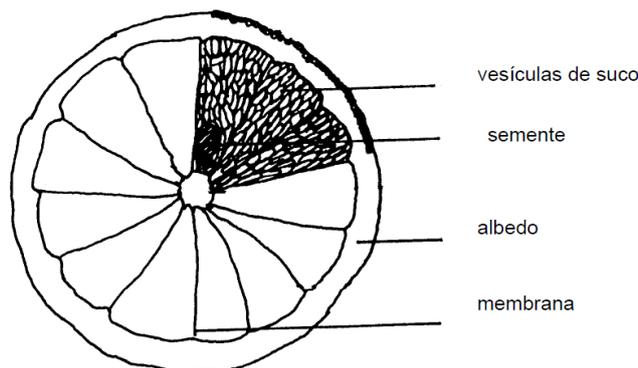
**Tabela 2 - Produção brasileira de laranja em 2010.**

<b>Colocação</b>	<b>Estado</b>	<b>Quantidade produzida (t)</b>
1°.	São Paulo	13.866.536
2°.	Bahia	987.813
3°.	Minas Gerais	816.875
4°.	Sergipe	805.962
5°.	Paraná	587.740
6°.	Rio Grande do Sul	371.209
7°.	Pará	200.694
8°.	Goiás	135.485
9°.	Santa Catarina	96.031
10°.	Rio de Janeiro	59.386

Fonte: IBGE (2010) apud RANKBRASIL (2012). Consultado em 15/02/2013.

Em média, 34% da produção é transformada em suco. Todavia, em grandes países produtores como o Brasil e Estados Unidos, esta porcentagem chega a 96%, gerando grande quantidade de resíduos, os quais equivalem a 50% do peso da fruta e têm uma umidade aproximada de 82% (CORAZZA et al., 2001).

O epicarpo, que consiste na porção colorida da casca, é também conhecido como flavedo. Nele, estão localizadas as células que contêm os carotenóides, os quais dão a cor característica dos frutos cítricos. As glândulas de óleos, também encontradas no flavedo, são as estruturas que contêm os óleos essenciais característicos de cada cultivar. Imediatamente sob o epicarpo está localizado o mesocarpo ou albedo, que é uma camada tipicamente espessa, branca e esponjosa, composta de células parenquimatosas ricas em substâncias pécnicas e hemicelulose. Envolve completamente o endocarpo, que é a porção comestível da fruta. Juntos, como ilustra a Figura 3, o flavedo (epicarpo) e albedo (mesocarpo) recebem o nome de pericarpo (TING; ROUSEFF, 1986).

**Figura 3 - Corte transversal de uma laranja.**

Fonte: TING & ROUSEFF, 1986.

O endocarpo, parte comestível do fruto, é composto de carpelos ou tegumentos, onde, dentro de cada tegumento, estão localizadas as vesículas de suco. Muitos constituintes químicos estão distribuídos entre os vários tecidos, sendo alguns mais concentrados em um tecido do que em outro. A limonina, composto amargo, possui maiores teores nas sementes e nas membranas. Os açúcares, por sua vez, são bem distribuídos nas células de todos os tecidos, mas estocam a maior quantidade nos vacúolos, os quais possuem também a maior acidez titulável (TING; ROUSEFF, 1986).

Após a extração do suco, os resíduos sólidos da indústria da laranja, representados pelas cascas, sementes e polpas, são muitas vezes transformados em farelo peletizado, para uso em ração animal. Dentre os despejos líquidos, a “água amarela”, formada por proteínas, óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais, é o que mais preocupa, pelos seus altos índices de matéria orgânica, o que a torna um agente de alto potencial poluidor (TAVARES et al., 1998).

Atualmente, o uso principal dos resíduos da laranja é como complemento para a ração animal, tendo boa aceitação por bovinos e caprinos. Algumas limitações fazem com que estes resíduos tenham uma utilização restrita, entre elas a grande quantidade de água que contêm, o que acarreta problemas de coleta, transporte e armazenamento. Devido ao elevado custo de secagem, há interesse das empresas em desenvolver mercados para o bagaço cítrico úmido. Este interesse é maior, particularmente, para pequenas esmagadoras de laranja, que produzem suco natural engarrafado, ou para grandes empresas que não pretendem, em suas futuras fábricas, despender o alto investimento necessário à secagem do bagaço de laranja (ALEXANDRINO et al., 2007).

Vários estudos têm proposto outros usos para os resíduos de laranja, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos antioxidantes e como substratos para a produção de diversos compostos com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. Essas são excelentes alternativas para evitar a poluição do meio ambiente e agregar valor a essas substâncias até então tratadas como resíduos da indústria de processamento da laranja (ABECITRUS, 2008).

#### 2.1.2.1 Produção de laranja lima no Vale do Mundaú

A introdução da laranja lima, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, em pequenas propriedades do município de Santana do Mundaú no final da década de 50 levou ao desenvolvimento da citricultura no Estado de Alagoas, porém não de forma acelerada.

As características do fruto, como laranjas grandes, doces, de menor acidez, polpa muito suculenta e de coloração amarelada, o fizeram ser reconhecido tanto por consumidores alagoanos como de outros Estados brasileiros. As condições da região como o solo e o clima favoráveis contribuem para a produção de frutos de qualidade. Além disso, a laranja lima apresenta muitas propriedades nutritivas, pois, é rica em vitamina C, vitaminas do complexo B, ácido fólico e fibras, possuindo também quantidades significativas de minerais, como o potássio e o fósforo (COELHO, 2004 apud ARAÚJO et al., 2012; SEPLANDE, 2012).

A laranja lima além de fonte de vitamina C, oferece muitos benefícios, como papel oxidante, ajuda a combater o envelhecimento precoce das células, fortalece as defesas do organismo, tornando-o mais resistente às infecções, e auxilia o corpo a absorver o ferro de outros alimentos, enquanto as fibras contribuem para a diminuição das taxas de colesterol e atuam no funcionamento regular do intestino (SEPLANDE, 2012).

Entre as décadas de 70 e 80 ocorreu a expansão dos cultivos de laranja lima em Santana do Mundaú, devido principalmente à crise nos cultivos de banana, que era, até então, o principal produto agrícola da região, sobretudo das variedades maçã (*Musa acuminata*) e prata (*Musa balbisiana*) que foram acometidos por um severo ataque à cultura pelo mal do Panamá, também conhecido como murcha de *Fusarium* (FERREIRA et al., 2012).

Atualmente, o município de Santana do Mundaú, juntamente com os municípios de Branquinha, Iateguara, São José da Laje e União dos Palmares, compõe o parque citrícola denominado “Vale do Mundaú”, formando o maior pólo citrícola produtor de laranja lima do Estado de Alagoas, com uma área cultivada estimada em 13 mil hectares e responsável pela

terceira maior produção de laranja do Nordeste e a maior produção nacional de laranja lima *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (ALMEIDA et al., 2011; SEBRAE/AL, 2011 apud FERREIRA et al., 2012).

O Vale é o maior centro de produção cítrica, com cerca de 90% da produção estadual. A Cooperativa dos Produtores de Laranja Lima do Vale do Mundaú (COOPLAL), que fica em Santana do Mundaú, vem se destacando não só em Alagoas, mas em nível nacional como um dos maiores produtores de laranja lima (SEPLANDE, 2012).

A COOPLAL foi criada em junho de 2002 e hoje conta com 53 cooperados e mais de 100 associados. O objetivo inicial era comercializar o produto de Santana do Mundaú, mas os cooperados acabaram descobrindo o mercado dos sucos congelados que é novidade, já que o normal não é fazer sucos com esse tipo de laranja. Atualmente, a Cooperativa tem capacidade para produzir 600 litros do produto por hora (SEPLANDE, 2012).

Na região do Vale do Mundaú, também existe o APL da Laranja no Vale do Mundaú, que é coordenado pela Secretaria de Estado do Planejamento e do Orçamento (SEPLANDE) em parceria com o SEBRAE/AL, e abrange cinco municípios localizados na Zona da Mata Alagoana. Com uma estratégia de atuação voltada a mobilizar ações coletivas e integradoras para gerar renda e emprego, direcionadas para a promoção do desenvolvimento dos micros e pequenos negócios, o Arranjo Produtivo Local da Laranja Vale do Mundaú ostenta uma produção de 220 mil toneladas por ano, com uma renda anual de R\$ 139 milhões, ocupando o primeiro lugar do país, batendo o próprio recorde (SEPLANDE, 2012).

### 2.1.3 Abacaxi

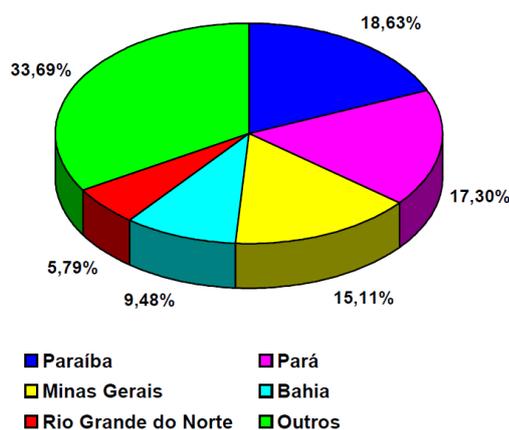
O abacaxi, *Ananás comosus* (L), consiste em uma infrutescência, onde cada gomo é um fruto independente que se junta durante o processo de crescimento. Sendo originário das Américas tropical e subtropical e, muito provavelmente, do Brasil, foi levado à Europa após o descobrimento da América, tendo grande aceitação por parte dos consumidores o que disseminou seu cultivo em um grande número de países (SEAGRI, 2005; GADELHA, 1996).

O abacaxizeiro é uma planta perene, pertencente à família bromileaceae, que compreende aproximadamente 46 gêneros e cerca de 1700 espécies de plantas herbáceas, epíferas e terrestres. São classificadas em quatro grupos principais: Cayenne, Queen, Spanish e Pérola, sendo esta última a mais cultivada no Brasil e as variedades Cayenne e Pérola as mais comercializadas (FREIMAN, 1996; GRANADA, 2002).

O sabor e o aroma característico do abacaxi são atribuídos à presença e aos teores de diversos constituintes químicos, ressaltando entre eles os açúcares (glicose e frutose), os ácidos orgânicos (cítrico e málico), responsáveis pelo sabor e compostos voláteis associados ao aroma. Os carotenóides são responsáveis pela coloração amarela da polpa de algumas cultivares. O abacaxi é uma fruta rica em vitamina C e sais minerais como cálcio, ferro, fósforo e potássio, além de conter a enzima bromelina (enzima proteolítica) (GONÇALVES, 2000; SEAGRI, 2005).

A produção mundial de abacaxi em 2008 foi de 20 milhões de toneladas, permitindo que o Brasil ocupasse o 1º lugar no ranking mundial (EMBRAPA, 2010). Como mostrado na Figura 4, os Estados brasileiros que mais se destacaram foram a Paraíba, seguida por Minas Gerais e Pará.

**Figura 4 - Principais Estados produtores de abacaxi no Brasil em 2010.**



Fonte: EMBRAPA, 2010.

Segundo dados do IBGE (2011), em Alagoas, a área plantada foi correspondente a 398 ha com uma produção equivalente a 8.188 t. No Estado, a produção é significativa nos municípios de Taquarana e Coité do Nóia, sendo responsável pela geração de emprego e renda de centenas de famílias que residem na zona rural destas localidades. O abacaxi da região é considerado o melhor de Alagoas abastecendo boa parte do Estado e uma pequena parte da produção começou a ser exportada para outros Estados do Brasil, apesar da falta de políticas públicas voltadas ao incentivo da cultura (CUSTÓDIO, 2012).

Da produção nacional de abacaxi, 5% são exportados na forma *in natura*, exigindo cuidados especiais na fase de colheita e pós-colheita, grande parte é destinada à industrialização. Do processo industrial, como, por exemplo, enlatamento, fabricação de

conservas e sucos do fruto de abacaxi, há um grande acúmulo de cascas, ramas, centros, aparas e outros resíduos que correspondem em volume a 40% da matéria-prima e que poderiam ser utilizados de alguma forma. A maior parte desse material é destinada à alimentação de animais, sem beneficiamento ou gera custos industriais para serem descartados (CRUESS, 1973; SUHET; FIOREZE, 2011).

Esses resíduos, embora possuam teores protéicos baixos, têm potencial energético, devido aos carboidratos solúveis, principalmente açúcares, que os levam a poderem ser aproveitados na alimentação de bovinos, acompanhado de suplementação protéica (MARIN et al., 2002).

Geralmente, o destino desses resíduos é o descarte e envio para o lixo. Contudo, pesquisas mostram que estes resíduos poderiam ser aproveitados de forma a aumentar o rendimento do fruto, diminuindo o custo do produto processado. Entre as possibilidades de aproveitamento das cascas e centros de abacaxi nas indústrias citam-se a elaboração de caldas, empregadas em conservas em lata, o processamento de vinagre, a produção de combustível e a obtenção de celulose (SOLER, 1998; BOBBIO, 1992; BORGES et al., 2004).

Os resíduos também podem ser utilizados como substitutos da silagem para animais, e para a obtenção de fibras, sucos, álcool e enzimas (FREIMAN, 1999; BOTELHO, 2002; BORGES et al., 2004; PRADO, 2003).

#### 2.1.4 Milho

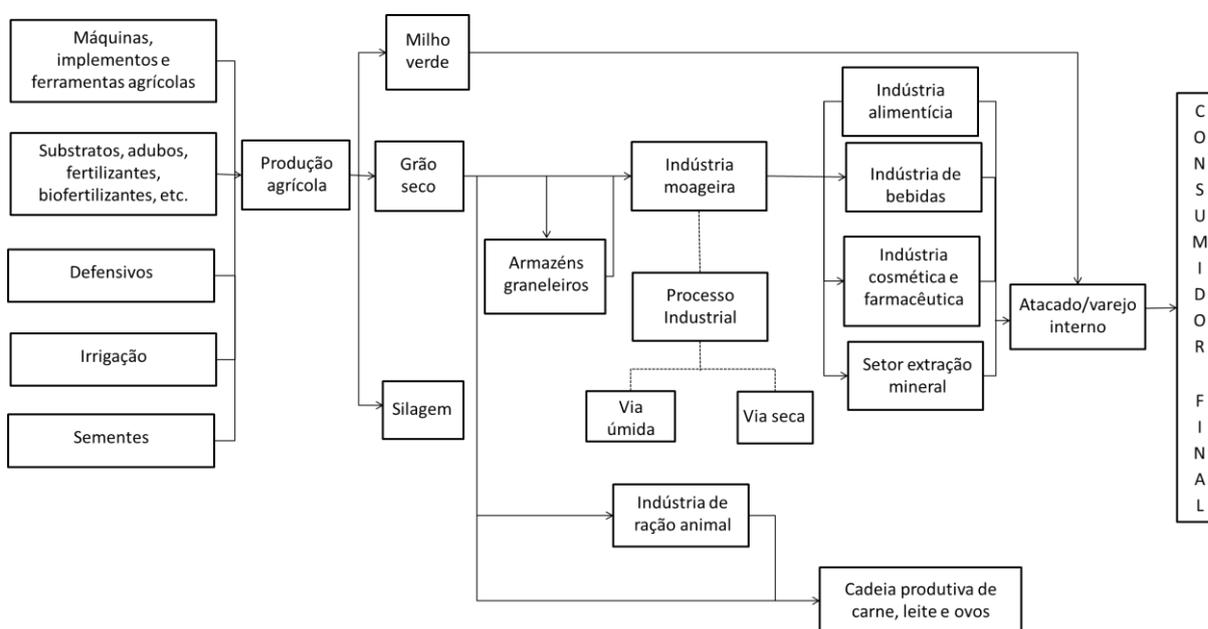
O milho é um produto agrícola com inúmeras aplicações, que vão desde um simples legume, quando consumido ainda verde, até uma fonte de combustível na geração do etanol (CARDOSO et al., 2011).

A fácil adaptação a diferentes condições ambientais favoreceu o amplo cultivo desse cereal, que atualmente ocorre em todos os continentes, desde pequenas lavouras de subsistência até grandes fazendas especializadas em monocultura. No mundo, é a terceira espécie vegetal mais cultivada pelo homem, sendo superada em produção apenas pelo trigo e pelo arroz, sendo muito utilizada na alimentação humana e animal, principalmente por suas propriedades nutricionais (SILVEIRA, 2010).

No Brasil, o milho é aproveitado ainda imaturo para colheita, como no caso do milho verde, geralmente consumido cozido, assado ou em conservas, e utilizado na fabricação de inúmeros pratos doces e salgados, como cuscuz, pães, bolos, polentas, pamonhas, curau, creme de milho, óleo, xarope e farinha. A partir do milho, obtêm-se centenas de derivados,

empregados em várias indústrias, a exemplo das de bebidas (licores, refrigerantes, vinhos, cerveja, entre outros), de fermentação (enzimas, acetonas e outros), química e mecânica (fundição de metais, plásticos, entre outros). A Figura 5 ilustra a cadeia produtiva e tecnológica do milho, onde se utiliza tanto a alta tecnologia, em grandes multinacionais, quanto à venda direta, sem processamento, realizada por pequenos produtores (CARDOSO et al., 2011).

**Figura 5 - Cadeia produtiva do milho.**



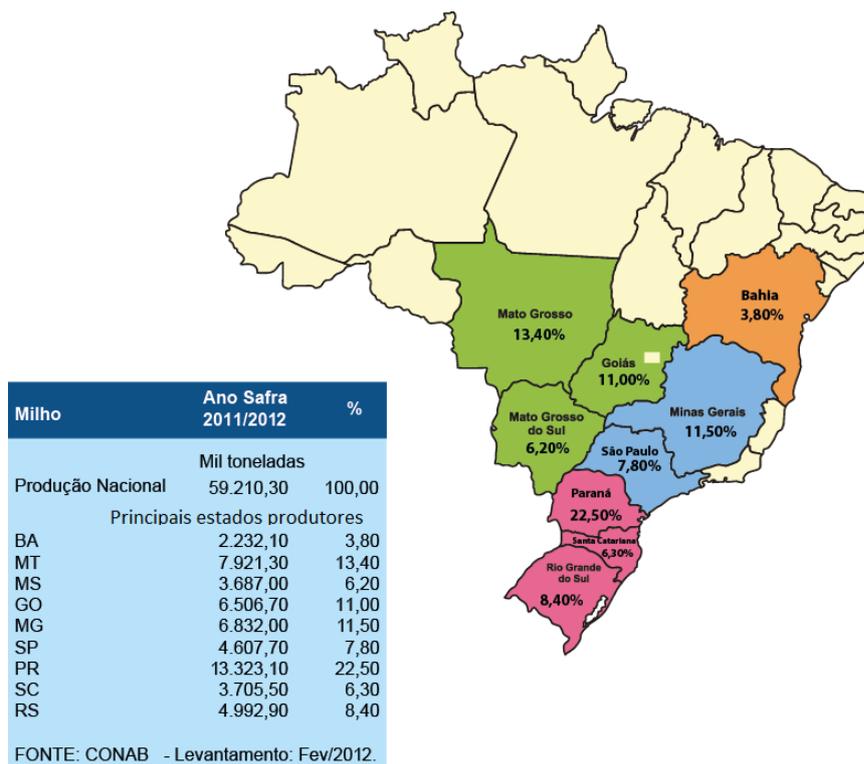
Fonte: CODEAGRO apud CARDOSO et al., 2011.

O milho ganhou espaço nas grandes propriedades com o recente avanço da avicultura, sendo, além disso, muitas vezes uma opção para os produtores de soja na entressafra. Assim, ao lado do algodão e da soja, a cultura do milho tornou-se uma das responsáveis pela expansão agrícola brasileira (SILVEIRA, 2010).

Segundo Nascimento (2012), a produção de milho na safra 2011/12 superou os 66,37 milhões de toneladas de soja colhidas no período, com um volume de milho correspondente a safra de verão mais a segunda safra, representando 43,8% da safra total de grãos projetada no Brasil para 2011/12. Esses dados mostram também o crescimento expressivo da safra de milho e apontam a possibilidade desta cultura desbancar o reinado da soja em Mato Grosso, que é o maior produtor brasileiro de soja do país, com mais de 21,3 milhões de toneladas (NASCIMENTO, 2012).

A atual produção nacional do milho coloca o Brasil na 3ª posição mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China. Este cultivo é relativamente disperso no país, porém as maiores regiões produtoras são o Sul, com 37,2% da produção nacional e o Centro Oeste com 30,6%. No Sul a liderança é do Paraná e, no Centro Oeste, Mato Grosso, como pode ser observado na Figura 6 (MAPA, 2012).

**Figura 6 - Principais Estados produtores de milho do país.**



Fonte: CARDOSO et al., 2011.

A cultura do milho no Estado de Alagoas mostra-se importante em diferentes segmentos como sob o ponto de vista alimentar, como opção econômica de exploração agrícola em pequenas propriedades familiares e como atividade de ocupação (CUENCA et al., 2005).

A produção de grãos de milho no Estado é uma das mais baixas do País, girando em torno de 33.393 t (IBGE, 2011). Essa baixa produção do milho no Estado ocorre especialmente devido a alguns fatores como plantios em locais e épocas inapropriados, utilização de cultivares com baixo potencial produtivo e baixa adaptabilidade quanto ao solo e clima, utilização de densidades de plantio (30 a 35 mil plantas por hectare) e distribuições inadequadas (plantio consorciado), manejo do solo que facilita a erosão e perdas de água por

evaporação, ausência de calagem e adubação e ausência de controle fitossanitário (MADALENA, 2003).

As projeções de produção de milho no Brasil indicam um aumento de 16,3 milhões de toneladas entre as safras 2011/2012 e 2021/2022. Em 2021/2022 a produção deverá situar-se em 70,4 milhões de toneladas, e o consumo em 58,8 milhões (MAPA, 2012), o que, conseqüentemente, acarretará no aumento da geração de resíduos, como o sabugo de milho.

Segundo Silveira (2010), estes resíduos são na maioria das vezes descartados ou subutilizados e estudos de seus potenciais biotecnológicos são ainda incipientes. Silveira (2010) ainda ressalta que para cada 100 Kg de espigas de milho, aproximadamente 18 Kg são formados pelo sabugo.

A RASUL – Indústria e Comércio de Rações LTDA, apresenta o sabugo de milho como o mais versátil e especial produto do mundo, podendo, quando seco e moído, ser aplicado como abrasivo para sabão removedor, absorvente e removedor de manchas de óleo, absorvente e secador de resíduos industriais, composto para produção de cogumelos, polimento com grãos de sabugo, filtragem industrial, química, veterinária e farmacêutica, fabricação de tijolos de rejeitos, madeira compensada e produção de papelão, entre outros.

Recentemente, outras utilidades foram designadas ao sabugo, como no ramo alimentício. Vieira et al. (2012) verificaram que é possível a fabricação de alimentos ricos em fibras a partir dos resíduos do milho. O sabugo, após ser cortado, seco e triturado é transformado em farinha não apresentando grande solubilidade em água ou leite, podendo ser usado na fabricação de massas, pães e pizzas (ZIGLIO et al., 2007).

## **2.2 Fermentação semi-sólida**

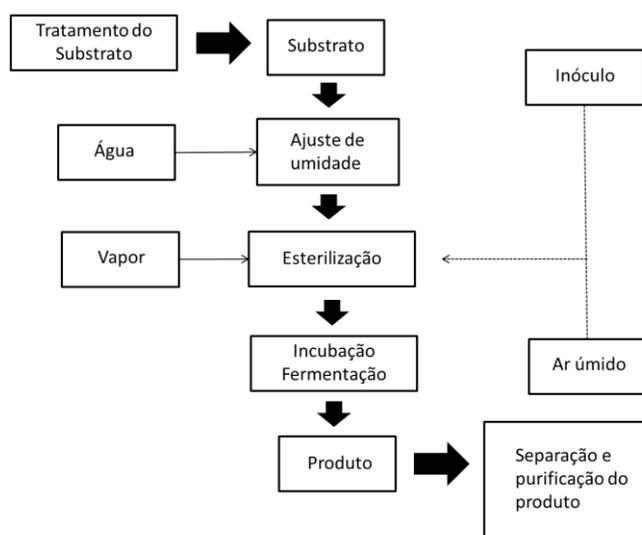
A utilização da fermentação semi-sólida para a produção de compostos de interesse comercial (enzimas, aromas, biossurfactantes, biopesticidas, ácidos orgânicos, alimentos fermentados, biorremediação de compostos e detoxificação biológica de resíduos) é conseqüência da demanda por insumos de menor custo, sendo o mercado mundial para enzimas de uso industrial estimado em 625 milhões de dólares, cerca do qual 62% das enzimas produzidas são utilizadas por indústrias alimentícias (SANTOS et al., 2005).

A fermentação semi-sólida (FSS), também chamada de fermentação sólida ou em estado sólido (FES), tem se destacado nos estudos e avanços obtidos no aproveitamento dos resíduos agroindustriais. De um modo geral, é um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos, biodegradáveis ou não, que apresentam a propriedade de

absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Para a FSS, é necessário que os microrganismos cresçam com nutrientes difusíveis sob ou sobre a interface líquido-sólido (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997).

Todos os processos de fermentação semi-sólida (FSS) compreendem, essencialmente, as mesmas operações unitárias (Figura 7), fazendo-se necessário uma seleção cuidadosa das matérias-primas a utilizar, um ou vários tratamentos prévios do substrato (ZADRAZIL; PUNIA, 1995), preparo de um inóculo específico, fermentação propriamente dita e controle da mesma, separação e, em alguns casos, purificação dos produtos que se deseja (SANTOS et al., 2006).

**Figura 7 - Esquema das etapas de um processo de fermentação semi-sólida.**



Fonte: SANTOS et al., 2006.

O uso da fermentação semi-sólida geralmente leva a uma comparação com a fermentação submersa (FSm) (MUDGETT, 1986; HESSELTINE, 1987; LONSANE et al., 1985). De acordo com Murthy et al. (1993), a diferença entre os dois bioprocessos refere-se à utilização. Na FSS, emprega-se o substrato sólido úmido, insolúvel em água e não suspenso no líquido, ao contrário da FSm, onde se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido.

Os principais microrganismos cultivados em meio sólido são os fungos filamentosos, pois os meios sólidos se assemelham aos meios naturais (solos) de desenvolvimento desses fungos e suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas (SANTOS et al., 2006).

A escolha por um substrato específico para o cultivo em estado semi-sólido, leva em consideração uma série de fatores, principalmente ligados ao custo e à viabilidade. O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais (PANDEY, 2003).

A FSS apresenta diversas vantagens devido a seus aspectos físico-químicos, especialmente sua reduzida atividade de água e a formação de nutrientes e produtos. Difere-se bastante da FSm quanto à esporulação e produção de enzimas, assim como de metabólitos secundários no modo de mistura e difusão. O reduzido teor de água gera um processo industrial limpo, levando à economia energética e facilidade no processo de recuperação, também chamado “downstream” (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997).

Os processos de fermentação no estado sólido têm um potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola (PANDEY; RADHAKRISHNAN, 1992). Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (CASTILHO et al., 2000). A Tabela 3 mostra a grande utilização desse processo em vários setores.

**Tabela 3 - Aplicações da FSS em diferentes setores econômicos.**

SETOR	APLICAÇÃO	EXEMPLOS
<b>Indústria agro-alimentar</b>	Produção de alimentos fermentados	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos fermentados
	Produção de cogumelos	<i>Agaricus, Pleurotus, Shiitaki</i>
	Bioconversão de resíduos	Compostagem, detoxificação, ensilagem
	Aditivos alimentares	Aromas, gorduras essenciais, ácidos orgânicos
<b>Agricultura</b>	Biocontrole, bioinseticidas	<i>Beauveria, Metarrhizium, Trichoderma</i>
	Crescimento de plantas	Giberilinas, <i>Rhizobium, Trichoderma</i>
	Micorrização	Inóculo de plantas
<b>Fermentação industrial</b>	Enzimas	Amilases, celulasas, pectinases, proteases, xilanases
	Antibióticos	Penicilina, probióticos
	Ácidos orgânicos	Ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico
	Metabólitos fúngicos	Hormônios, alcalóides

Fonte: RAIMBAULT, 1998 apud MACIEL, 2006.

Apesar das inúmeras vantagens, a FSS também apresenta desvantagens, como risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade para as fermentações mais longas), difícil regulação dos parâmetros cinéticos, como pH e umidade, pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático), alta taxa de inoculação quando não se utiliza a microflora natural, estimação precisa de biomassa e papel essencial da umidade e da atividade de água (SPIER, 2005).

### 2.2.1 Fatores que influenciam a fermentação semi-sólida

Alguns fatores no processo de fermentação semi-sólida podem afetar de forma significativa tanto o crescimento celular quanto a formação de produtos. Estes fatores correspondem às condições ambientais, como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes, fazendo-se, portanto, necessário o controle dessas variáveis para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Assim, a observação desses fatores e o trato correto em relação a cada um deles trará um melhor resultado ao processo de fermentativo (DEL BIANCHI et al., 2001; PANDEY, 2003).

#### 2.2.1.1 Umidade

Gutierrez-Rojas et al. (1998) afirmam que todos os processos de fermentação semi-sólida, necessitam, como etapas a serem seguidas, da seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, da escolha de um microrganismo específico, do controle dos parâmetros da fermentação, da separação e, em alguns casos, da purificação dos produtos.

Segundo Maciel (2006), elevadas umidades do substrato provocam uma diminuição da porosidade da matriz sólida, uma fraca difusão de oxigênio e aumentam o risco de contaminações bacterianas, enquanto que baixas umidades levam a um crescimento limitado e diminuem a acessibilidade do substrato.

De acordo com Rocha (2010), existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular em espécie de microrganismo utilizado, não necessariamente coincidindo com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, enzimas.

A umidade nos processos de FSS geralmente varia entre 30 e 85%. Porém, a umidade ótima para o cultivo do microrganismo neste processo fermentativo depende da capacidade do substrato em reter água. Cita-se o nível de umidade ótimo para o cultivo de *Aspergillus niger*

em arroz de 40%, enquanto que para polpa de café de 80%, o que revela a insegurança de se utilizar a umidade como parâmetro do crescimento do microrganismo (DOELLE et al., 1992).

Por tanto, o preparo e a seleção do substrato devem levar em conta os níveis de atividade de água e umidade ideais, sendo a adição de água ou solução de nutrientes ao meio uma forma utilizada de se alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo (CORREIA, 2004).

#### 2.2.1.2 pH

O pH do meio de crescimento está entre os parâmetros físicos mais importantes, pois, induz à mudanças morfológicas no organismo, à secreção enzimática e sua variação, que pode ser observada durante o crescimento de um organismo, afetando a estabilidade do produto no meio (PANDEY, 2003).

Em qualquer processo biológico, existem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos apresentam preferência a valores de pH baixos (4,5 – 6,0) e as bactérias pH próximos à neutralidade (6,5 – 7,0). Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro durante a FSS, não é fácil de ser realizado (PERAZZO NETO, 1999; PANDEY, 2003).

As variações de pH no processo fermentativo são respostas às atividades metabólicas dos microrganismos, que ocorrem tanto pela produção de ácidos durante a fermentação, causando o decréscimo do pH, quanto pelo consumo destes ácidos e a formação de compostos como uréia, que tendem a elevar o pH (BRAND, 2000).

Embora alguns eletrodos tenham sido utilizados para realizar as medidas do pH diretamente na superfície do substrato sólido, o procedimento mais comum é a medida na suspensão aquosa ou no extrato, preparado a partir da amostra sólida. Contudo, a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH, que passa a ser realizada na maioria dos casos após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Mesmo sendo possível medir o pH global, este não é totalmente representativo dos valores de pH nos microambientes, localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos, é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (PALMA, 2003).

Desta forma, para se ajustar ao ótimo o pH inicial de um cultivo, faz-se a adição de uma solução (mineral, tampão, ácido-básica) que impregna o substrato. Porém, a determinação exata do pH só poderá ser efetuada novamente no final do processo de FSS. Em alguns casos, o pH do próprio substrato pode ser ideal para o cultivo, sem necessidade de ajuste (MACIEL, 2006).

#### 2.2.1.3 Aeração

O sistema de aeração na fermentação semi-sólida é simples, desde que o projeto do reator seja apropriado para permitir livre acesso do oxigênio atmosférico até o substrato. Neste tipo de fermentação, há formação de um filme de água sobre o substrato insolúvel, tornando a difusão do oxigênio para água mais rápida do que no processo submerso, uma vez que, a solubilidade do oxigênio em água é muito baixa (0,0283%, a 25°C). Assim, faz-se necessário um nível menor de oxigênio para a fermentação semi-sólida (HAN, 1987).

Contudo, independente da forma de transporte de oxigênio, tem-se a velocidade de transferência na fermentação semi-sólida maior que na fermentação submersa. A aeração tem como função principal o fornecimento de oxigênio, sendo também responsável pela remoção de calor, CO<sub>2</sub> e outros compostos voláteis. A aeração é necessária na fermentação semi-sólida devido a fatores como a manutenção das condições aeróbias, pois a pressão parcial do oxigênio e do CO<sub>2</sub> no gás são fatores críticos para o crescimento celular e formação do produto, controle da temperatura do substrato, pois em baixas condições de umidade há dificuldades para transferência de calor e, como consequência, de controle de temperatura e, pode ainda, regular o conteúdo de água do substrato, influenciando o crescimento celular e o metabolismo do cultivo sólido durante o processo (DURAND et al., 1988).

#### 2.2.1.4 Mistura de resíduos

Os resíduos descartados inadequadamente podem gerar graves consequências ao meio ambiente devido à elevada carga orgânica presente. Uma alternativa para a minimização do problema consiste no aproveitamento destes resíduos em processos fermentativos, uma vez que estes podem ser usados como substrato sólido para o crescimento do microrganismo, pois a matéria orgânica que os constitui é utilizada como fonte de energia para o crescimento e carbono para síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano (MAHMOOD et al., 1998; DANIEL et al. 1996) .

A seleção do substrato adequado para FSS depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de uso, os microrganismos necessitam, além de carbono, nitrogênio, minerais, água, eventualmente fatores de crescimento e, caso seja aeróbio, oxigênio para formar biomassa e impulsionar reações de biossíntese e manutenção celular. Os substratos ricos em carboidratos apresentam-se como os melhores e as mais baratas fontes de carbono, podendo ser adquiridos a baixo custo como resíduo da indústria alimentícia ou de atividades agrícolas (PANDEY et al., 2000; SANTOS, 2007).

A presença de constituintes como celulose e hemicelulose na biomassa a ser utilizada permite inúmeras possibilidades de aproveitamento destes resíduos, sendo considerados substratos ideais, fornecendo todos os nutrientes necessários ao crescimento celular. Porém, muitas vezes, alguns nutrientes importantes para o processo encontram-se em concentrações muito baixas, fazendo-se necessária a suplementação do meio (NIGAM & SINGH, 1994; PANDEY et al., 2000).

A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte que possua a capacidade de absorver os nutrientes que se encontram em solução. Os níveis de umidade relativa variam possuindo uma relação com o tipo de substrato ou o suporte utilizado e o nível máximo de retenção de água proporcionado por essas matérias primas (LONSANE, et al. 1985).

Desta forma, a mistura de resíduos, muitas vezes, mostra-se favorável no processo fermentativo, visto que pode beneficiar a atividade enzimática, levando a um maior incremento nos resultados. Isto foi observado por Menezes et al. (2005), que utilizaram resíduos de maracujá como suplemento e farelo de trigo como suporte e fonte de carbono para produção de poligalacturonase em FSS por *Aspergillus niger*. No estudo de diferentes proporções destes dois resíduos, os autores alcançaram um aumento na produção de poligalacturonase de 4,08 U/mL para 5,77 U/mL quando os resíduos de maracujá estavam presentes no meio em proporção de 25% para 75% de farelo de trigo.

### **2.3 Microrganismo**

Vários grupos microbianos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. Contudo, são os fungos filamentosos os microrganismos mais adaptáveis a este tipo de processo, sendo os mais utilizados em função de suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (SOCCOL et al., 1994; PINTO, 2003).

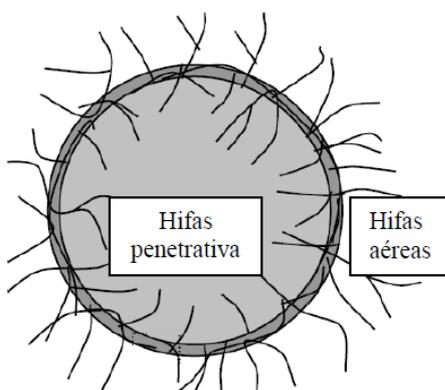
Algumas vantagens são apresentadas na utilização desses fungos, como a semelhança dos meios sólidos aos meios naturais (solos) de desenvolvimento do próprio microrganismo, a variedade de produtos de seu metabolismo e o desenvolvimento das hifas que permite aos mesmos maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima. (SPIER, 2005; RODRIGUES et al., 2009).

De forma coordenada ao crescimento, os metabólitos excretados pelo microrganismo permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, aumentando o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes (PINTO, 2003).

Segundo Conney (1981), o crescimento de um micro-organismo, assim como a formação de um produto, ocorre como resposta às condições ambientais e, deste modo, é essencial a compreensão da relação que existe entre a regulação do metabolismo microbiano e seu ambiente físico e químico.

Santana (2012) descreve o crescimento dos fungos filamentosos em FSS, afirmando que este se apresenta por dois tipos de hifas (Figura 8), aéreas e penetrativas. As hifas aéreas surgem sobre a interface ar-líquido enquanto as hifas penetrativas estão em contato direto com o substrato. As hifas penetrativas podem desempenhar um importante papel na disponibilidade do substrato, pois, na maioria das vezes, correspondem a polímeros insolúveis em água que precisam ser degradados em frações monoméricas, solúveis em água, para serem consumidos pelos fungos. Assim, a degradação enzimática do substrato pela fração penetrativa das hifas é um fator determinante para o processo, pois, a partir daí, os fragmentos difundem-se até a superfície das partículas, sendo transformados, pela ação de outras enzimas, em compostos metabolizáveis.

**Figura 8 - Hifas penetrativas e aéreas.**

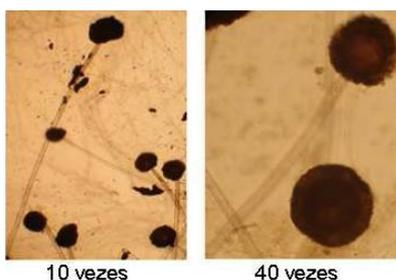


Fonte: MITCHELL et al. (2006) apud SANTANA (2012).

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentoso negro, comumente denominado “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com UCSF (2000) citado por Prado (2002), o *A. niger* apresenta colônias brancas a amarelo pálido características, formando rapidamente milhares de esporos pretos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5  $\mu\text{m}$  e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. Este fungo filamentoso apresenta hifas finas, septadas, e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (UCSF, 2000 apud SPIER, 2005).

A importância do gênero *Aspergillus* tem sido demonstrada com a presença de linhagens em processos industriais de produção de alimentos e bebidas fermentadas, produção de ácidos orgânicos e enzimas com aplicações industriais (SILVA, 2008). Na Figura 9 é possível observar a microscopia com aumento de 10 e de 40 vezes dos esporos.

**Figura 9 - Aspecto visual dos esporos do fungo *Aspergillus niger*.**



Fonte: ABUD, 2007.

O uso do *A. niger* apresenta ainda outras vantagens, como facilidade de manipulação, habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo, produção de elevados rendimentos de bioprodutos, a grande variedade de produtos que é capaz de produzir e o fato de ser considerado um micro-organismo GRAS (reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos (SPIER, 2005; RODRIGUES et al., 2009).

Outros fungos, a exemplo do gênero *Rhizopus sp.*, pertencente ao filo *Eumycophyta*, também podem ser utilizados para obtenção de enzimas. Estudos demonstraram que este gênero pode ser utilizado para a produção de amiloglucosidase, proteases ácidas, pectinases, lipases, ácido L(+) láctico e ácido fumárico (SOCCOL, 1992; WAINWRIGHT, 1995; COSTA, 1996).

## 2.4 Enzimas

As enzimas são compostos orgânicos, basicamente proteínas, produzidos por células vivas, capazes de catalisar as reações químicas nos processos vitais. Ao ser sintetizada por uma célula, poderá atuar de forma independente, se condições apropriadas forem mantidas. Entre as principais características das enzimas tem-se a sua especificidade sobre o substrato, agindo sobre um número muito limitado de compostos e sem efeito sobre os outros. Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam, oxidoredutases (catalisam reações de óxido-reduções), transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra), hidrolases (catalisam reações de hidrólise), liases (catalisam reações de quebra de ligações), isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (SANT'ANA JR, 2001).

Atualmente, as hidrolases estão entre os principais interesses da pesquisa biotecnológica pela enorme aplicabilidade no setor industrial. Entre os grupos de enzimas hidrolíticas com grande demanda e potencial encontram-se as pectinases e as celulases.

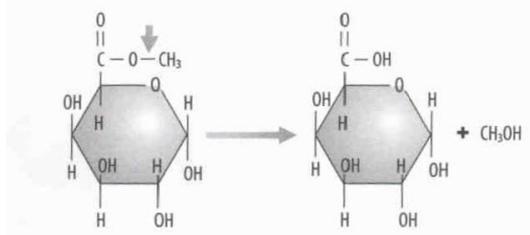
### 2.4.1 Pectinases

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. (UENOJO; PASTORE, 2007).

A classificação das enzimas pécticas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica ou terminal (ALKORTA et al., 1998).

As enzimas desmetoxilantes agem removendo grupos metil da cadeia principal, enquanto as enzimas despolimerizantes rompem as ligações  $\alpha$ , 1-4 entre monômeros de ácido galacturônico, tanto por hidrólise (hidrolases) quanto por transeliminação (liases) (SANTI, 2005).

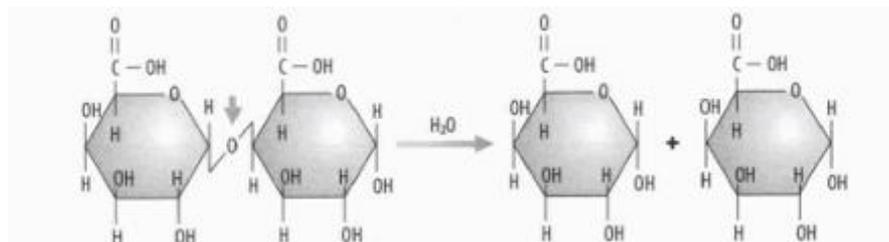
Enzimas desmetoxilantes, também conhecidas como pectinaesterases, são hidrolases que atacam a ligação éster, desmetoxilando ácidos galacturônicos esterificados com metanol e resultando em pectinas com baixo teor de metoxilação ou ácido péctico, além do metanol (KOBBLITZ, 2008). A Figura 10 exemplifica esta ação.

**Figura 10 - Ação das pectinaesterases.**

Fonte: KOBLITZ, 2008.

Enzimas despolimerizantes atacam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre as unidades constituintes das substâncias pécnicas, podendo agir como hidrolases ou como liase (KOBLITZ, 2008).

As enzimas integrantes do grupo de pectinases despolimerizantes têm como função degradar o polímero de pectina ou ácido pécnico via hidrólise ou transeliminção. Compõem este grupo de enzimas as hidrolases polimetilgalacturonase (PMG), que têm como substrato preferencial a pectina e poligalacturonases (PG), que atuam preferencialmente sobre ácidos pécnicos. Deste grupo, ainda fazem parte as liases pectina liase (PL), que tem preferência por pectina e pectato liase (PGL), que tem preferência por ácido pécnico (SANTI, 2005). A Figura 11 ilustra a ação das poligalacturonases.

**Figura 11. Ação das poligalacturonases.**

Fonte: KOBLITZ, 2008.

As pectinases comerciais são preparados enzimáticos que contêm uma variedade de enzimas fúngicas (em geral de *Aspergillus sp.*) e que apresentam atividade de pectinaesterases, poligalacturonase e pectinaliase, além de atividade celulolítica (pela presença de  $\beta$ -endoglicanases) e hemicelulolítica, todas enzimas produzidas pelo mesmo microrganismo (KOBLITZ, 2008).

Algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas,

tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxteis e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO; PASTORE, 2007).

#### 2.4.2 Celulases

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos, atuando em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases, que clivam ligações oligosídicas, sendo classificadas pela Enzyme Commission (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (ANAND; VITHAYATHIL, 1989).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e  $\beta$ -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

As celulases são produzidas apenas por microrganismos, como bactérias anaeróbias do trato digestivo de ruminantes e de outros herbívoros e fungos filamentosos isolados do solo, degradadores de madeira ou fitopatogênicos. Os principais organismos produtores são *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma viridae* (KOBBLITZ, 2008).

Esses microrganismos são extremamente eficientes na degradação da celulose, quando na natureza, embora não haja a mesma eficiência nos seus extratos enzimáticos produzidos *in vitro*. Portanto, é necessário um pré-tratamento da celulose, com choque ácido ou alcalino, ou por moagem, para destruição das porções cristalinas do polímero, elevando o custo do processo e tornando-o antieconômico. Devido a isso, utilizam-se as celulases, em conjunto com enzimas pectinolíticas e com hemicelulases, na extração de sucos e no tratamento do café (KOBBLITZ, 2008).

De acordo com Castro (2010), alguns avanços significativos e grandes investimentos na produção de celulases no início do século XXI focaram sua aplicação especialmente na obtenção de etanol combustível, iniciando em 2000, parcerias com o USDOE (United States

Department of Energy) para acelerar o desenvolvimento tecnológico e tornar viável economicamente a produção de etanol a partir de resíduos do milho (sabugo, palha e bráctea).

As hemicelulases são um grupo de enzimas com a capacidade de hidrolisar os polissacarídeos classificados como hemiceluloses. Destas, destacam-se as xilanases, que hidrolisam ligações do tipo  $\beta$ -1,4 entre unidades de xilose, as arabanases e as  $\beta$ -glicanases, sendo produzidas em conjunto com as pectinases por diversos fungos filamentosos, aplicados na sua produção comercial como, por exemplo, *Aspergillus niger* (KOBBLITZ, 2008).

Essas enzimas hidrolíticas são utilizadas nas indústrias de alimentos, fármacos, cosméticos, detergentes e tecidos. Dentre suas aplicações nas indústrias têxteis, destacando-se a bioestonagem e o biopolimento por modificação das fibras celulolíticas, melhorando a qualidade do tecido (JURGEN, 2001).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Gerais**

O trabalho de pesquisa visa à utilização de resíduos sólidos agroindustriais na produção de enzimas a partir da fermentação semi-sólida. Para tal, pretende-se secar, moer e caracterizar os resíduos, obtendo granulometria uniforme para fácil acesso do microrganismo na fermentação, e realizar planejamentos experimentais  $2^2$  para avaliar a influência das variáveis umidade e mistura dos resíduos.

#### **3.2 Específicos**

Para o alcance dos objetivos, algumas metas devem ser desenvolvidas:

- Obtenção, secagem e moagem do resíduo sólido agroindustrial;
- Caracterização físico-química dos resíduos;
- Fermentação semi-sólida para a produção de enzimas hidrolíticas;
- Avaliação da influência da umidade e da mistura de resíduos nas atividades enzimáticas.

## 4 METODOLOGIA

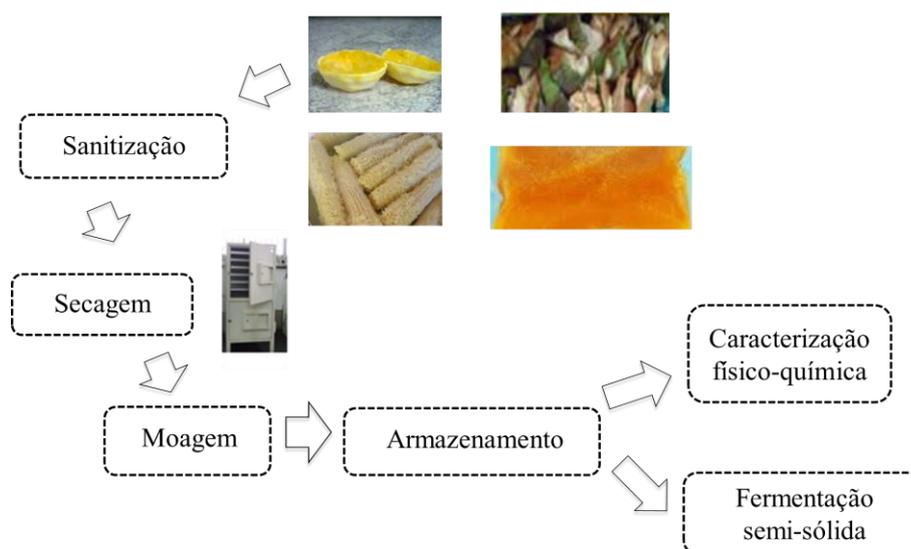
### 4.1 Obtenção, secagem e moagem dos resíduos

Os resíduos empregados foram o bagaço de laranja lima, a casca de coco verde, o sabugo de milho e a polpa de abacaxi. O coco verde foi obtido em quiosque da UFAL e a laranja lima foi cedida pela COOPLAL (Cooperativa dos Produtores de Laranja Lima de Santana do Mundaú). Os resíduos de abacaxi foram cedidos pela COOPEAGRO (Cooperativa dos Pequenos Agricultores Organizados) e o milho foi comprado em feira livre na cidade de Maceió.

Após a seleção dos cocos, o material foi dilacerado com facão. O bagaço de laranja lima era constituído de albedo e tanto o bagaço quanto a polpa de abacaxi foram obtidos após a extração do suco. Assim como o bagaço de laranja, o sabugo de milho foi cortado em pequenos pedaços.

Os resíduos passaram por processos de lavagem e sanitização em hipoclorito de sódio a 100 ppm por 15 min para, então, ser realizada a secagem a 50°C, até se obter peso constante, sendo moídos em moinho de facas tipo Willye, em peneira de 30 mesh, e acondicionados em embalagens plásticas herméticas. A sequência ilustrada na Figura 12 apresenta uma síntese do procedimento realizado.

**Figura 12 - Sequência do procedimento experimental.**



Fonte: Autora, 2013.

## 4.2 Caracterização físico-química

O teor de umidade foi baseado na determinação da perda de peso do produto submetido ao aquecimento a 105°C, até peso constante (IAL, 2005). O teor de cinzas ou resíduo mineral fixo correspondeu ao resíduo obtido por incineração a 550°C até a obtenção de cinzas claras (IAL, 2005).

O pH foi medido em potenciômetro, previamente aferido nas soluções tampão 4,0 e 7,0. Cerca de 2,0 g da amostra foram suspensas em 20 mL de água destilada e esta solução foi agitada por cerca de 15 min. Em seguida, a solução foi filtrada e o sobrenadante utilizado para a verificação do pH.

Os açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART) foram determinados por espectrofotometria, pelo método do DNS, a partir da reação do ácido 3,5-dinitrossalicílico, proposta por Miller (1959).

Para o preparo do reagente de DNS, dissolveu-se à temperatura ambiente 1 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 20 mL de NaOH 2 N e 50 mL de água destilada. Adicionou-se 30 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio –  $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ) somente quando o DNS estava totalmente dissolvido, completando o volume para 100 mL com água destilada.

Para os açúcares redutores, a amostra foi filtrada e submetida a uma reação em presença de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS).

Para a determinação de açúcares redutores totais, foi necessária a hidrólise e neutralização da amostra. Um volume de amostra (1 mL) foi transferido para um tubo e adicionados 5 mL de  $H_2SO_4$  1,5M, levando a banho fervente por 30 min, sob agitação ocasional, para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores (ao menos a cada 5 min). O tubo foi resfriado, adicionado 2 gotas de fenolftaleína e neutralizado com NaOH 10%. A amostra hidrolisada foi filtrada em papel qualitativo e completado o volume para 25 mL. Deste sobrenadante se realizou a reação com o DNS.

A reação de DNS foi feita com a transferência de 0,25 mL da amostra para um tubo de ensaio com tampa e adicionado 0,5 mL de água destilada. Colocou-se 0,25 mL do reagente de DNS e levou a amostra para banho fervente por 5min, permitindo que ocorresse a reação entre a glicose e o DNS. O tubo foi retirado e colocado em banho de gelo, ajustando-se o volume com água destilada para 5 mL e lendo-se a absorbância a 540nm, tendo como padrão concentrações conhecidas de glicose. A partir da curva padrão de concentrações conhecidas de glicose, teve-se a equação da reta, que permitiu calcular a concentração de glicose em cada

amostra. Para “zerar” o espectrofotômetro e ler as absorvâncias, foi necessário fazer um branco, substituindo-se na reação de DNS a amostra por água destilada.

As Equações 1 e 2 apresentam os cálculos para a determinação de açúcares redutores e redutores totais a partir da curva de calibração com concentrações conhecidas de glicose.

$$AR \text{ (g/L)} = \text{Fator da curva padrão} \cdot \text{Diluição} \cdot \text{Absorbância} \quad (1)$$

$$ART \text{ (g/L)} = \text{Diluição de hidrólise} \cdot \text{Absorbância} \cdot \text{Fator da curva padrão} \quad (2)$$

### 4.3 Fermentação semi-sólida

#### 4.3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosso *Aspergillus niger*, proveniente da coleção de culturas do BIOSE, da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e cultivado em Potato Dextrose Ágar (PDA) ou simplesmente ágar batata dextrose. É um fungo muito utilizado na produção de diversos tipos de enzimas e ácidos orgânicos.

#### 4.3.2 Preparo da solução de esporos

Em um frasco contendo meio ágar batata dextrose inclinado e crescido com o microrganismo, colocou-se 50mL de solução de Tween 80 a 0,01% estéril, com algumas pérolas de vidro, e procedeu-se à extração do fungo, por agitação e raspagem da superfície do fungo com alça de níquel e cromo, para a liberação dos esporos, como mostra a Figura 13. Em seguida, passou-se a solução para outro frasco estéril, armazenando-o em geladeira a 4°C. O Tween 80 a 0,01% é utilizado para facilitar a extração e separação dos esporos.

**Figura 13 - Ressuspensão dos fungos em solução de Tween 80 a 0,01%.**



Fonte: ABUD, 2007.

### 4.3.3 Contagem dos esporos

A contagem de esporos foi efetuada em câmara de Neubauer, em cinco quadrantes, sendo quatro periféricos e um central. O valor foi obtido pela soma dos esporos de cada quadrante em relação à superfície da câmara, como mostram as Equações 3 e 4.

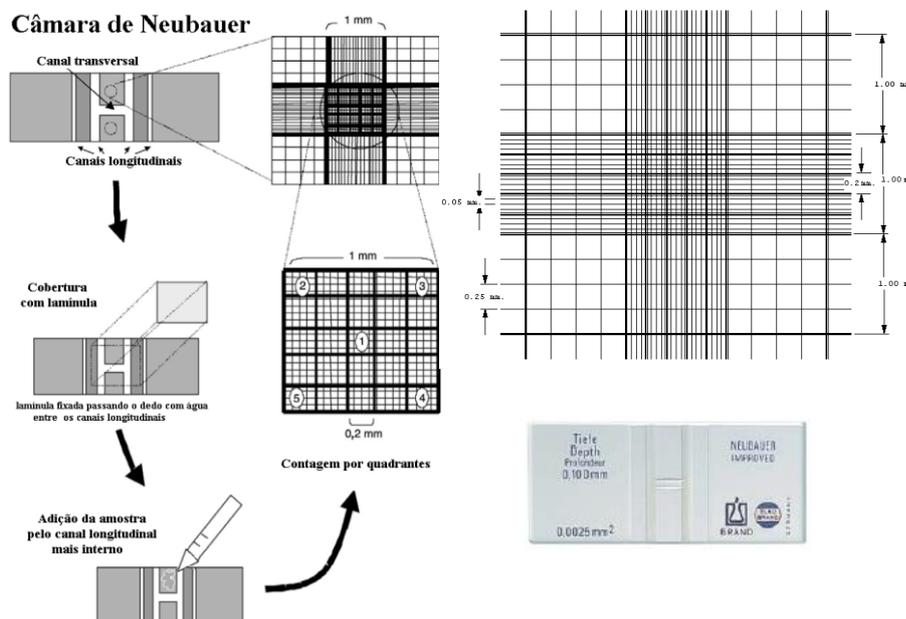
$$\frac{\text{esporos}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{esporos contados} \cdot \text{diluição}}{\text{superfície contada (mm}^2\text{)} \cdot \text{profundidade da câmara (mm)}} \quad (3)$$

Sabendo-se que a superfície contada é composta de 5 quadrantes e que há 16 quadrados/quadrante, cada um com  $0,0025 \text{ mm}^2$ , e 1 mL equivale a  $1000 \text{ mm}^3$ :

$$\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} = \frac{1000 \text{ mm}^3 \cdot \text{esporos contados} \cdot \text{diluição}}{1 \text{ mL} \cdot 0,2 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm}} \quad (4)$$

O esquema mostrado na Figura 14 resume todo o procedimento.

**Figura 14 - Ilustração do processo de preparo e contagem em Câmara de Neubauer.**



Fonte: <http://producaobiocombustivel.blogspot.com/>

Como na câmara há dois campos, fez-se a contagem nos dois campos e após o cálculo de esporos/mL fez-se uma média.

#### 4.3.4 Solução nutriente

Tem a finalidade de fornecer complementação nutricional de nitrogênio e sais minerais, que tornam o crescimento do microrganismo, bem como sua eficiência de produção de compostos, mais efetivo. A solução foi composta de 10 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,005 g/L  $\text{MnSO}_4$ ; 1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,005 g/L  $\text{ZnSO}_4$ ; 0,5 g/L  $\text{CaCl}_2$ .

#### 4.3.5 Preparo do resíduo e inoculação

Foram realizadas fermentações com o substrato (resíduo) e com a mistura dos mesmos.

Para os resíduos simples, foram colocados em erlenmeyer de 250 mL 7,5 g da farinha e 9 mL de solução nutriente. Em seguida, os frascos foram tampados com bonecas de gaze e algodão, cobertos com papel de alumínio e esterilizados em autoclave por 15 min a  $121^\circ\text{C}$  e  $1\text{kgf/cm}^2$ . Para os ensaios com a mistura dos resíduos, utilizou-se 5,0 g de farinha de bagaço de laranja e 2,5 g de casca de coco e mesmo volume de solução nutriente.

Através da Equação 5 pôde-se calcular qual o volume que deveria ser pego da solução de esporos inocular, cerca de  $10^7$  esporos/g<sub>resíduo</sub>.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (5)$$

onde:

$C_1$  = concentração desejada ( $10^7$  esporos/mL)

$V_1$  = volume desejado (mL)

$C_2$  = concentração obtida na contagem (esporos/mL)

$V_2$  = 1 mL

#### 4.3.6 Neutralização do resíduo

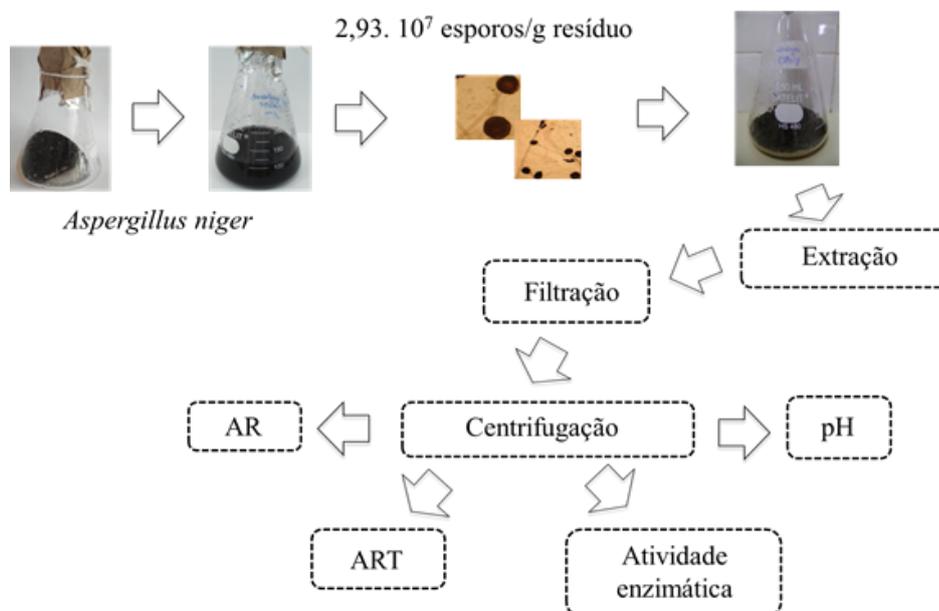
O resíduo foi umedecido com um volume de água na proporção de 1 g de amostra:10 mL de água. Em seguida, verificou-se o pH da suspensão com auxílio de fita indicadora de pH e realizou-se a neutralização da mesma com a adição de NaOH 10%. Após a decantação do resíduo, este foi colocado numa bandeja, encaminhado à estufa de secagem a  $50^\circ\text{C}$  e posteriormente, armazenado em embalagem plástica hermética.

#### 4.3.7 Fermentação e extração

Após a inoculação os erlenmeyers foram encaminhados à estufa bacteriológica a 30°C. As coletas foram feitas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, procedendo-se à extração do material.

A extração consistiu em adicionar 50 mL de água destilada gelada ao meio sólido fermentado, levando-o a agitação por 30 minutos para a ressuspensão e filtrando-o em gaze. O filtrado foi conduzido à centrifugação a 3000 rpm por 10 min, filtrando o sobrenadante (extrato) em papel de filtro qualitativo e armazenando-o em freezer até o momento de análise. As etapas realizadas no processo de fermentação podem ser observadas na Figura 15.

**Figura 15 - Etapas da fermentação semi-sólida.**



Fonte: Autora, 2013.

#### 4.3.8 Determinação das atividades enzimáticas

A atividade pectinásica (EC 3.1.1.11) foi realizada conforme procedimento descrito por Gieze et al. (2005) apud Abud (2007), que consistiu em adicionar 0,8 mL de amostra (extrato) a 0,2 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 contendo 1% de pectina cítrica, incubando em banho-maria a 50°C por 15 min. A determinação da atividade da amostra foi realizada por DNS, tendo como padrão uma curva com concentrações conhecidas de ácido galacturônico. Uma unidade de pectinase (PE) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de ensaio.

A atividade poligalacturonásica (exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67)) foi realizada conforme procedimento descrito por Silva et al. (2002) apud Abud (2007), adicionando-se 0,2 mL de amostra (extrato) a 0,8 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 contendo 1% de pectina cítrica e incubando em banho-maria a 60°C por 10 min. A determinação da atividade da amostra foi realizada por DNS, tendo como padrão uma curva com concentrações conhecidas de ácido galacturônico. Uma unidade de poligalacturonase (PG) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de ensaio.

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consistiu na adição de 1mL da amostra (extrato) em 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel) preparada em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. A determinação da atividade da amostra foi realizada por DNS, tendo como padrão uma curva com concentrações conhecidas de glicose. Uma unidade de avicelase (AV) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio (MENEZES et al., 2009).

Segundo esse método, os açúcares liberados durante a hidrólise do substrato (Avicel) pelo extrato enzimático reduzem o DNS, gerando complexos de coloração marrom-alaranjada, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria a 540 nm (RIBEIRO, 1997).

A atividade de carboximetilcelulase (CMCase, EC 3.2.1.4 ) consistiu na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução de carboximetilcelulose 1% em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. A determinação da atividade da amostra foi realizada por DNS, tendo como padrão uma curva com concentrações conhecidas de glicose. Uma unidade de carboximetilcelulase (CMCase) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio (MENEZES et al., 2009).

A atividade xilanásica (endo-1,4- $\beta$ -xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada segundo Miller (1959). A reação consistiu na adição de 1 mL da amostra (extrato) em 1 mL de tampão acetato 0,05 M pH 5,0 contendo 1% de xilana (Sigma) e 2 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e incubado em banho-maria a 50° C por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a xilana em suspensão. Os

tubos contendo as reações foram lidas em espectrofotômetro em 550 nm. Uma unidade de xilanase foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de xilose por minuto, nas condições de ensaio (MENEZES et al., 2009).

Para a determinação da atividade foi necessária a inativação de uma parte da amostra a fim de eliminar os açúcares e enzimas pré-existentes atuarem como interferentes. Para isto, uma parte da amostra foi colocada em ebulição por 5 min e resfriada em banho de gelo.

Assim, as análises de atividade constaram de duas amostras, uma ativa e outra inativa, sendo a atividade determinada pela diferença entre as mesmas.

#### 4.3.9 Determinação de acidez em ácido orgânico

Este método se baseia na titulação de neutralização de ácidos com solução padronizada de álcali (solução de NaOH 0,1 N) e com o uso de indicador fenolftaleína. O procedimento consistiu na transferência de 1 mL da amostra para um frasco erlenmeyer de 250 mL, adição de 20 mL de água destilada e 2 a 3 gotas de fenolftaleína. Esta amostra foi titulada com solução de hidróxido de sódio até coloração rósea persistente.

A reação de neutralização para ácido cítrico é apresentada na Equação 6 e o cálculo de acidez determinado pela Equação 7.



$$\text{Acidez (g ác cítrico/100g)} = \frac{v \cdot N \cdot f \cdot MM}{10 \cdot V \cdot n} \quad (7)$$

onde:

$v$  = volume gasto na titulação da solução de NaOH (mL)

$N$  = normalidade da solução de NaOH

$f$  = fator de correção da solução de NaOH

$V$  = volume total da amostra (mL)

$MM$  = massa molecular do ácido cítrico (192g/mol)

$n$  = número de hidrogênios ionizáveis no ácido cítrico (3)

#### 4.4 Planejamento experimental

Para o estudo da influência da umidade e da mistura de resíduos na produção das enzimas pectinase, poligalacturonase, avicelase e xilanase, realizou-se um planejamento experimental  $2^2$ , para que os principais efeitos das variáveis umidade e proporção massa de casca de coco/massa de sabugo de milho pudessem ser avaliados.

Para fazer o planejamento  $2^2$  foram realizados 3 repetições no ponto central e observadas as respostas em todas as possíveis combinações de níveis. A lista dessas combinações, que é chamada de matriz de planejamento é apresentada pela Tabela 4 com os valores reais, codificados.

**Tabela 4 - Matriz do planejamento  $2^2$  + 3 repetições no ponto central.**

<b>Experimentos</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Proporção massa de casca de coco/massa de sabugo de milho</b>
1	60 (-1)	0,5:1,5 (-1)
2	60 (-1)	1,5:0,5 (+1)
3	90 (+1)	0,5:1,5 (-1)
4	90 (+1)	1,5:0,5 (+1)
5	75 (0)	1:1 (0)
6	75 (0)	1:1 (0)
7	75 (0)	1:1 (0)

Fonte: Autora, 2013.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização físico-química dos resíduos

Para reduzir e uniformizar as partículas dos resíduos, oferecendo maior área superficial ao ataque microbiano e tendendo a se compactar facilmente numa fermentação semi-sólida, após a secagem os resíduos foram triturados em liquidificador, peneirados, acondicionados em recipiente plástico hermético e mantidos à temperatura ambiente, conforme descrito por Gama (2010). Desta forma, a menor partícula permite uma maior área superficial e, conseqüentemente, um bom crescimento. E, em partículas maiores, tem-se melhor aeração, mas há limitação para o ataque microbiano.

As análises físico-químicas das farinhas de casca de coco verde, bagaço de laranja lima, polpa de abacaxi e sabugo de milho estão dispostas na Tabela 5.

**Tabela 5 - Caracterização físico-química dos resíduos.**

Análise	Casca de coco verde	Albedo da laranja lima	Polpa de abacaxi	Sabugo de milho
pH	2,40 ± 0,02	3,22 ± 0,01	3,85 ± 0,04	4,7 ± 0,07
Umidade (g/100 g)	5,62 ± 0,25	10,05 ± 0,10	8,68 ± 0,38	7,94 ± 0,17
ART ( g/100 g )	3,72 ± 0,25	3,38 ± 0,09	17,74	7,12

Fonte: Autora, 2013.

Os resultados mostraram que todos os resíduos apresentam uma boa quantidade de açúcares, permitindo o desenvolvimento do processo fermentativo. Os resíduos, por apresentarem um pH ácido mostram a necessidade de corrigí-lo de modo a se obter no processo um pH próximo ao ótimo para o microrganismo.

Os teores de umidade encontrados para os resíduos indicam também a necessidade de se fazer um ajuste do mesmo para favorecer o cultivo.

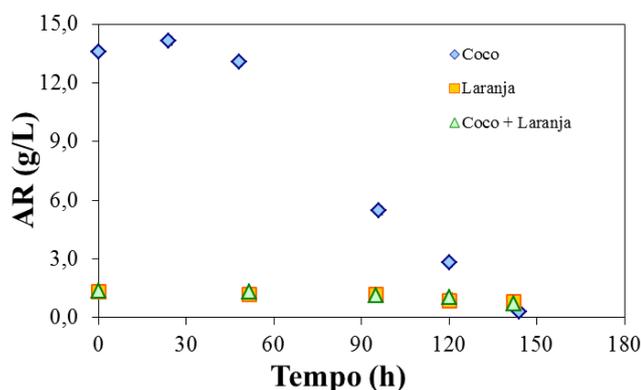
Outro fato observado foi a alta capacidade de retenção de água na casca de coco verde.

### 5.2 Cinética das fermentações

5.2.1 Utilização de casca de coco, bagaço de laranja lima e mistura dos dois resíduos como substratos

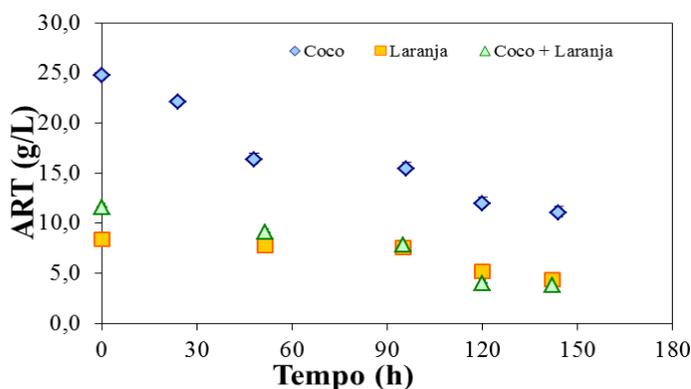
Para os resíduos simples, foram utilizados 7,5 g da farinha e para os ensaios com a mistura dos resíduos, utilizou-se 5,0 g de farinha de bagaço de laranja e 2,5 g de casca de coco. As Figuras 16 e 17 ilustram as cinéticas de consumo de açúcares.

**Figura 16 - Cinética do consumo de glicose para os diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 17 - Cinética do consumo de ART para os diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

Ao longo das primeiras 48 horas não foi observado consumo de monossacarídeos, exaurindo-se esta fonte de carbono nas horas sequenciais, indicando um crescimento celular e queda da atividade enzimática. Portanto, pode-se dizer que o microrganismo consumiu açúcares redutores preferencialmente para o seu crescimento.

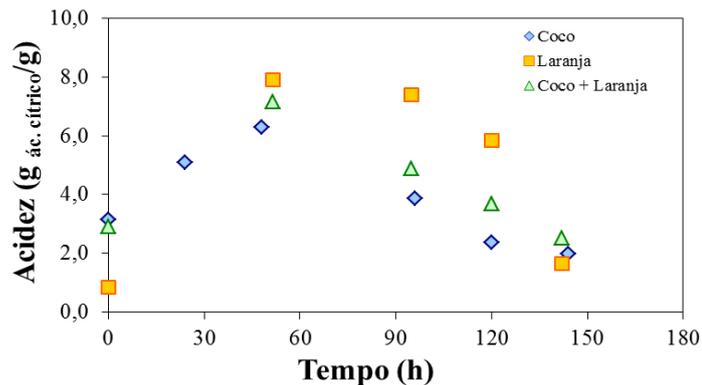
Os resultados apresentados mostraram que a casca de coco teve um consumo de açúcares redutores totais (ART) de 55,3% e consumo de 93,4% dos açúcares em forma de glicose. A utilização do bagaço de laranja mostrou um consumo de 47,8% nos açúcares redutores totais, enquanto que a adição da casca de coco verde à fermentação com o bagaço

de laranja lima melhorou o processo fermentativo, com o aumento do consumo de açúcares redutores totais (ART) de 47,8 para 67%.

As Figuras 18 e 19 apresentam a acidez em ácido cítrico e o pH ao longo do processo fermentativo.

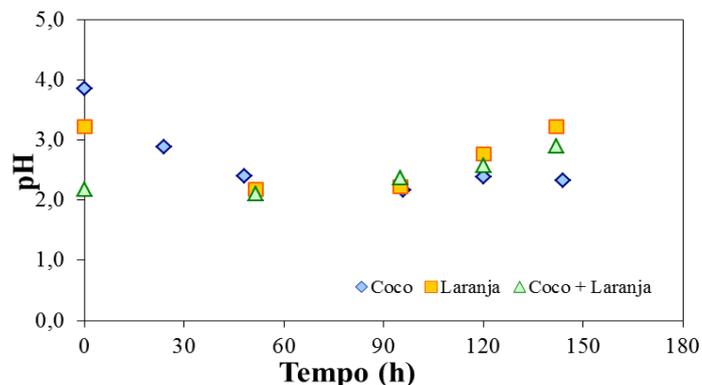
Conforme pode ser observado na Figura 18, à medida que a acidez aumenta, os valores do pH diminuem. Botella et al. (2007) observaram o mesmo, associando o decréscimo do pH à produção de ácidos orgânicos pelo microrganismo. Essa diminuição no pH do meio de fermentação a partir do 2º dia ocorre devido ao início do acúmulo de ácido cítrico no meio de fermentação, sendo que os menores valores de pH (2,17 e 2,33) foram encontrados nos dias de maior aumento na produção de ácido cítrico. O 3º dia de fermentação apresentou a maior produção de ácido cítrico (6,32 g de ác. cítrico/g de resíduo).

**Figura 18 - Acompanhamento da acidez para extratos dos diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 19 - Valores de pH para os extratos fermentados nos diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

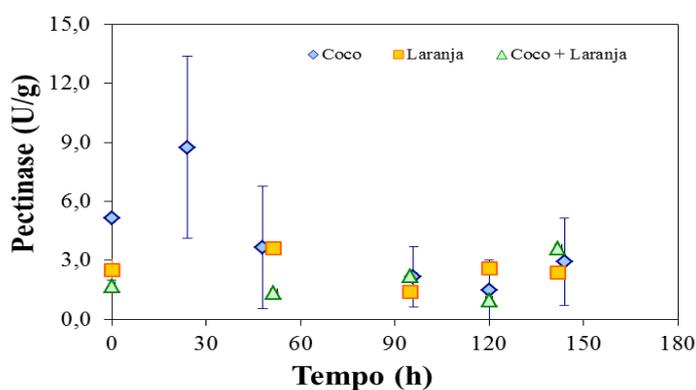
Pode-se perceber um estágio de adaptação do fungo ao meio de fermentação nas primeiras 24 horas, quando então se inicia o consumo de açúcares e produção de ácido cítrico. A formação micelial foi observada em 48 horas, o que acarreta o consumo de açúcares presentes no meio. Apesar de *Aspergillus niger* não ser capaz de hidrolisar a sacarose no início de seu crescimento, a formação dos micélios e da enzima invertase extracelular, o torna capaz de hidrolisar sacarose em meio ácido. Assim, a maior produção de ácido cítrico se deu em 48 horas (0,95 g ác. cítrico/mL de resíduo) quando já havia sido formada biomassa suficiente e todo o açúcar necessário estava disponível ao metabolismo e produção do ácido cítrico.

Para o bagaço de laranja, a maior produção de ácido cítrico ocorreu no 2º dia de fermentação (7,95 g de ác. cítrico/g de resíduo). A partir deste ponto, os valores de pH subiram um pouco devido ao abaixamento na quantidade de ácido presente no meio.

Para a produção de ácido cítrico, em relação à mistura de bagaço de laranja e casca de coco, percebeu-se que a adição do suporte causa diminuição da quantidade produzida, possivelmente devido ao fato de que a quantidade de bagaço de laranja ter sido diminuída de um ensaio para o outro, sendo substituída pela casca de coco que possuiu uma via de degradação mais lenta, devido à quantidade lignocelulósica de sua composição, diminuindo, conseqüentemente, a formação do ácido. Estes resultados podem ser observados na Figura 16, onde se percebeu uma maior produção de ácido cítrico em 51,5 horas de fermentação para o ensaio com bagaço de laranja lima.

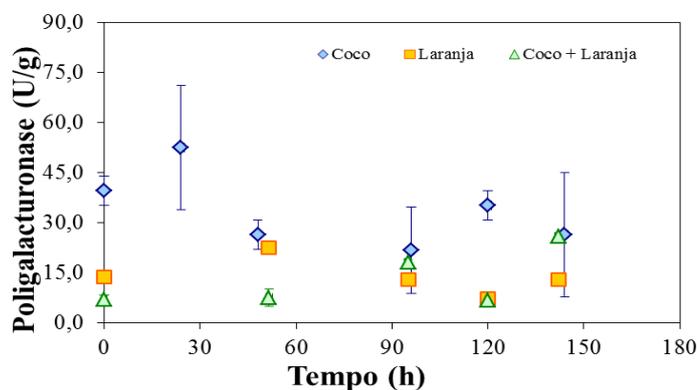
As Figuras 20 e 21 apresentam as cinéticas de formação e degradação das enzimas pectinase e poligalacturonase, respectivamente.

**Figura 20 - Cinética de ação da pectinase para os diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 21 - Atividade de poligalacturonase para os diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

Observou-se a maior formação de poligalacturonase no processo com apenas casca de coco (52,48 U/g, equivalente a 7,92 U/mL), bem como de pectinase (8,75 U/g, equivalente a 1,32 U/mL), ambas em 24 horas de fermentação. Contudo, nas duas determinações, o resultado de atividade apresentou, em seguida, uma tendência de decréscimo.

A maior atividade para o bagaço de laranja de poligalacturonase (PG) foi 22,5 U/g (3,36 U/mL) e de pectinase foi de 3,63 U/g (0,54 U/mL), ambas em 51 horas de fermentação.

Souza et al. (2010) observaram a produção de poligalacturonase utilizando resíduo de maracujá como substrato a partir de 7 h de fermentação e um pico de atividade igual a 20,9 U/g em 66 h de processo. Santos et al. (2008a) alcançaram, estudando a produção de poligalacturonase por fermentação semi-sólida com pedúnculo de caju como substrato, 10,1 U/g para uma umidade inicial de 40% e a concentração da fonte de nitrogênio igual a 1%. Botella et al. (2007) observaram o efeito da umidade inicial e a suplementação com uma fonte de carbono na produção de pectinase e xilanase por *Aspergillus awamori*, com polpa de uva como substrato. A máxima produção foi de aproximadamente 40 U/mL em 48 h de cultivo. Santos et al. (2008b) destacam que a umidade inicial do meio é a variável mais importante para o processo de produção de pectinases.

Após 90 horas de cultivo, os efeitos da indução começaram a ser observados. As maiores atividades de poligalacturonase (22,52 U/g) e de pectinase (3,63 U/g) no bagaço de laranja lima foram atingidas em 24 horas de fermentação, enquanto que na presença do indutor (bagaço de laranja + casca de coco) as maiores expressões de poligalacturonase (38,68 U/g) e de pectinase (5,42 U/g) ocorreram em 142 horas de fermentação. O maior incremento dos resultados ressaltou a importância de se utilizar um suporte de imobilização como a casca

de coco, ainda mais quando se compara com resultados da literatura, a exemplo de Souza et al. (2010), que obtiveram produção máxima de 20,9 U/g de poligalacturonase em resíduo de maracujá.

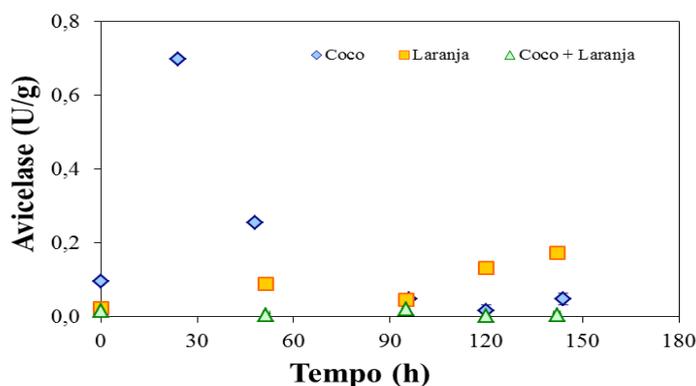
De acordo com Castro (2010), as celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0). Durante esse cultivo em casca de coco, os valores de pH variaram de 2,3 a 3,8. Pode-se observar que a partir das 48 h de fermentação a atividade de carboximetilcelulase é mínima. Logo, a baixa atividade celulolítica detectada provavelmente ocorreu em função do baixo pH, comprovando a importância desse parâmetro físico-químico na atividade enzimática. Consequentemente, torna-se necessário à produção de celulases o controle do pH do meio de produção (SAID & PIETRO, 2004).

Oliveira et al. (2009), em estudos com casca de coco verde e avicel como substrato da fermentação, encontraram atividades de 0,32 e 1,51 U/mL, respectivamente, sem que nenhum pré-tratamento para diminuir a recalcitrância, fator limitante para a assimilação da fonte de carbono pelo microrganismo agente da fermentação, fosse realizado. Tais resultados mostram-se superiores ao obtido neste estudo.

Silva (2008) mostra a necessidade do pré-tratamento para promover maior indução enzimática, ao testar seis fungos na presença de casca da acácia tratada e não tratada e observou que, quando não ocorreu o tratamento alcalino da casca, a atividade celulásica foi baixa.

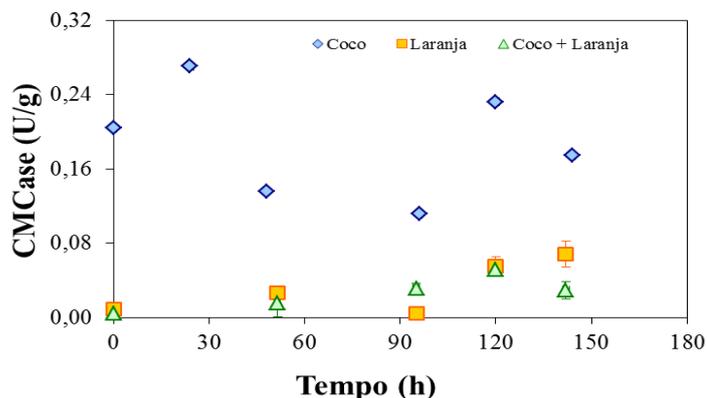
As cinéticas de formação e degradação das enzimas avicelase, carboximetilcelulase e xilanase são mostradas nas Figuras 22 a 24.

**Figura 22 - Atividade de avicelase para os diferentes resíduos.**



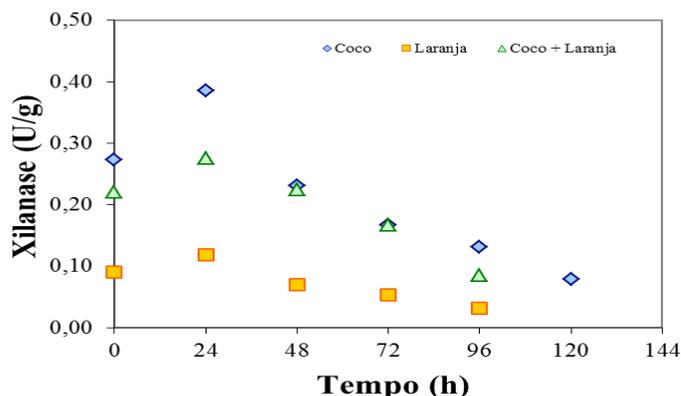
Fonte: Autora, 2013.

**Figura 23 - Atividade de carboximetilcelulase para os diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 24 - Atividade de xilanase para os diferentes resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

A produção de avicelase e de carboximetilcelulase para o bagaço de laranja foi maior em 142h de fermentação, gerando 0,17 U/g (0,05 U/mL) e 0,07 U/g (0,02 U/mL), respectivamente. Durante esse cultivo, os valores de pH variaram de 2,2 a 3,2. Logo, a baixa atividade celulolítica detectada provavelmente ocorreu também em função do baixo pH.

A cinética de produção de enzimas lignolíticas, mostra que a presença do indutor não foi satisfatória na expressão destas enzimas.

Os resultados de Menezes et al. (2009) também não demonstraram grandes valores ao utilizar bagaço de cana e fungos do gênero *Pleurotus* (*P. sp* BCCB068, *P. Tailândia* e *P. sajor-caju*). A maior atividade foi alcançada com a linhagem *Pleurotus sajor-caju* nos 20° e 25° dias de incubação (0,08 U/mL) e apresentou a maior atividade de carboximetilcelulase produzida pela linhagem *Pleurotus tailandia*, 0,06 U/mL, no 10° dia de incubação.

Reddy et al. (2003), estudaram a atividade enzimática celulolítica de fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, utilizando substrato de resíduos lignocelulósicos de banana em fermentação semi-sólida, obtendo também baixa atividade celulolítica.

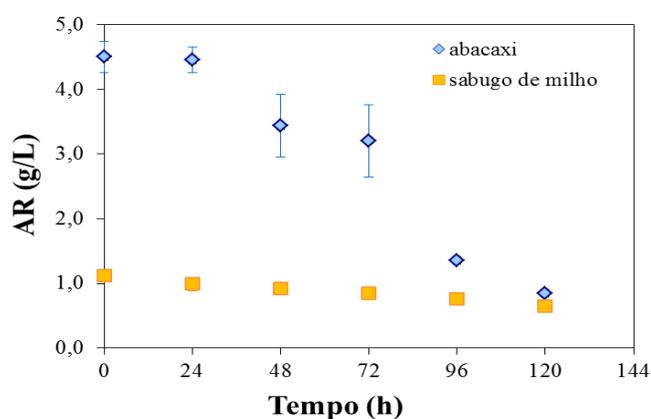
As maiores atividades de xilanase foram encontradas em 24h de fermentação para todos dos resíduos. Para o resíduo de coco, houve a maior produção da enzima 0,39 U/g (0,12 U/mL), seguido pela mistura dos resíduos, que apresentou uma produção de 0,28 U/g (0,08 U/mL) e o resíduo de laranja, que teve 0,12 U/g (0,04 U/mL). As atividades para a casca de coco e para a mistura dos resíduos foram maiores que as encontradas por Menezes et al. (2009), que utilizando bagaço de cana e a linhagem *Pleurotus thailandia* e *Pleurotus sajor-caju* obtiveram maiores atividades com 0,11 U/mL nos 10º e 20º dias de incubação. Assim como os resultados apresentados por Menezes et al. (2009) , os resultados deste estudo também não foram significativos.

### 5.2.2 Utilização de polpa de abacaxi e sabugo de milho como substratos

Neste ensaio, foram utilizados 7,5 g da farinha dos resíduos simples. Realizou-se as análises para ser feito um comparativo com as produções enzimáticas obtidas entre os diferentes resíduos com o objetivo de selecionar os dois que apresentarem as maiores atividades enzimáticas para efetuar, posteriormente, um planejamento experimental.

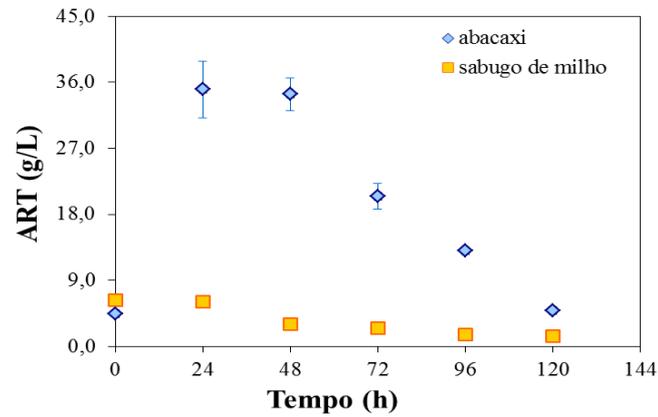
As Figuras 25 a 28 apresentam as cinéticas do consumo de açúcares, o comportamento do pH e a acidez em ácido cítrico, respectivamente.

**Figura 25 - Consumo de AR ao longo da fermentação dos resíduos.**



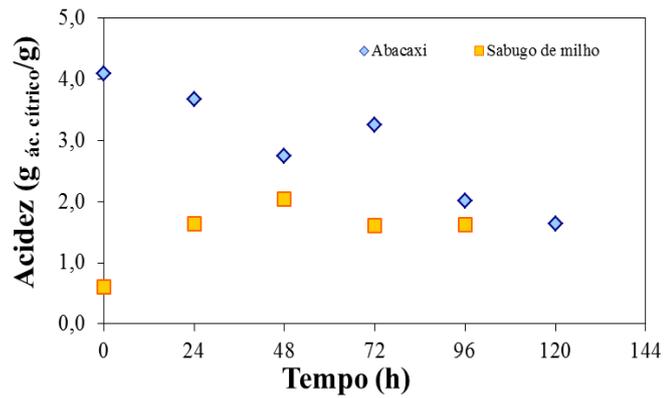
Fonte: Autora, 2013.

**Figura 26 - Consumo de ART ao longo da fermentação dos resíduos.**



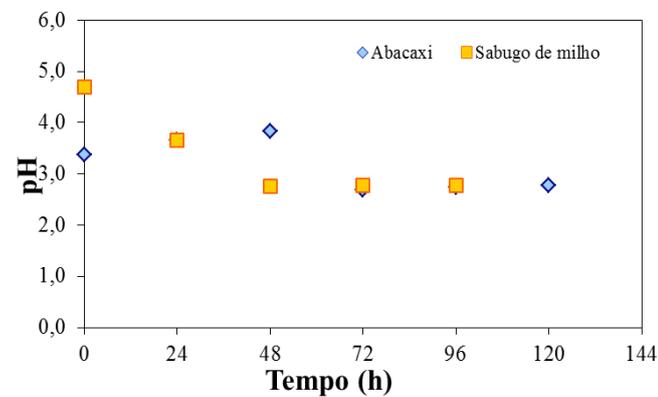
Fonte: Autora, 2013.

**Figura 27 - Comportamento da acidez dos extratos obtidos a partir dos resíduos.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 28 - Comportamento do pH dos extratos obtidos a partir dos resíduos.**



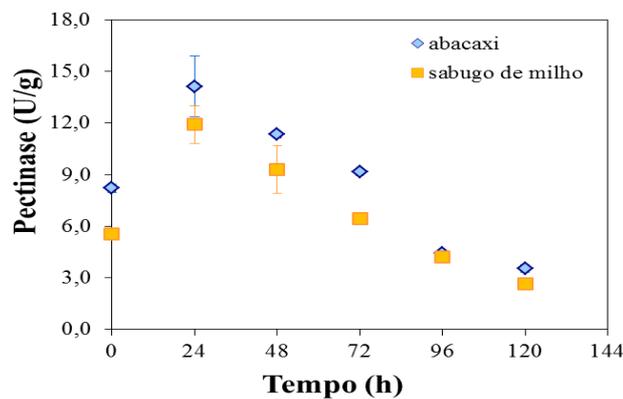
Fonte: autora, 2013.

O resíduo de abacaxi e o sabugo de milho apresentaram um consumo de AR no valor de 81,3% e 94,3%, respectivamente. O consumo de ART correspondeu a 94,4% para a polpa de abacaxi e 96,9% para o sabugo de milho.

Observa-se na Figura 26 que pH inicial do meio com polpa de abacaxi é de aproximadamente 3,38 e durante o cultivo cai para 2,77 e para o sabugo de milho, o pH inicial é 4,7, caindo para 2,87 devido a produção de ácido cítrico pelo microrganismo como pode ser observado na Figura 26.

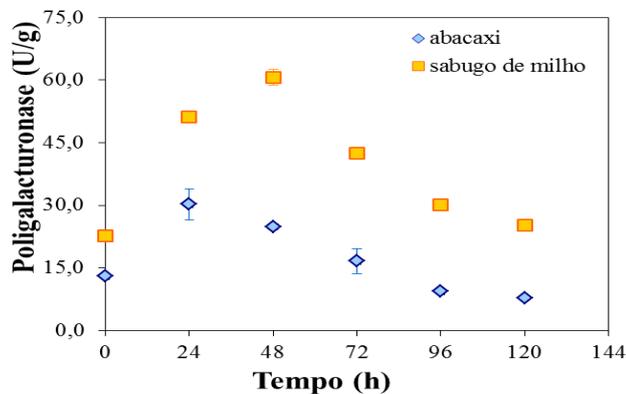
As Figuras 29 a 32 ilustram as cinéticas enzimáticas de produção das enzimas. Verificou-se maior produção de pectinase em 24 horas de fermentação para a polpa de abacaxi e sabugo de milho, obtendo-se 14,14 U/g e 11,92 U/g, respectivamente.

**Figura 29 - Atividade de pectinase para diferentes os diferentes resíduos.**



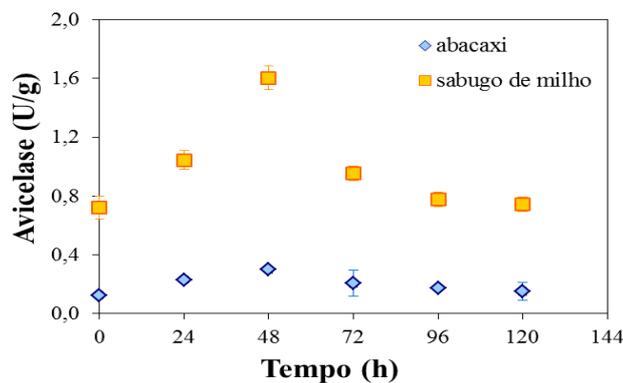
Fonte: Autora, 2013.

**Figura 30 - Atividade de poligalacturonase para diferentes valores de pH.**



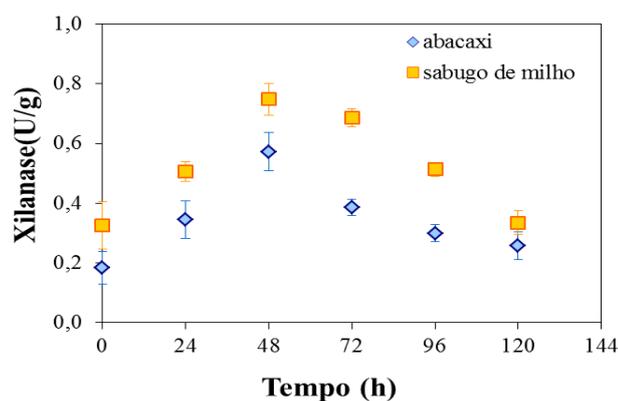
Fonte: Autora, 2013.

**Figura 31 - Atividade de avicelase para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 32 - Atividade de xilanase para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

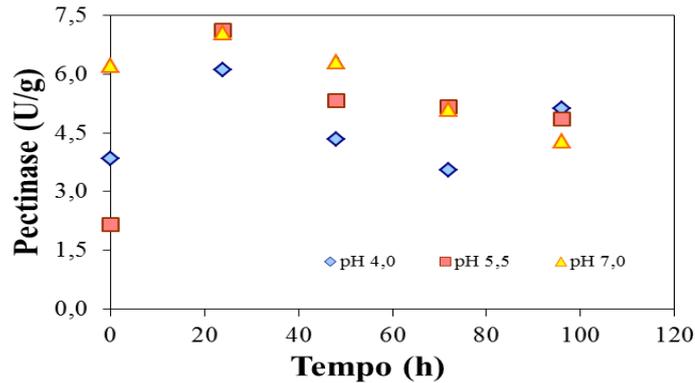
A maior atividade de poligalacturonase alcançada pelo resíduo de abacaxi, 30,23 U/g ocorreu no tempo de 24h e para o sabugo de milho, 60,66 U/g em 48h. Os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por Padma et al. (2011), que obtiveram 21,7 U/g em casca de manga e 30 U/g em casca de banana.

As atividades de avicelase e xilanase para a polpa de abacaxi e sabugo de milho encontradas foram maiores que os valores obtidos nesse estudo ao serem utilizados na fermentação a casca de coco e o bagaço de laranja, inclusive maiores que as atividades resultantes da mistura destes dois últimos resíduos.

### 5.3 Estudo da influência do pH na atividade enzimática

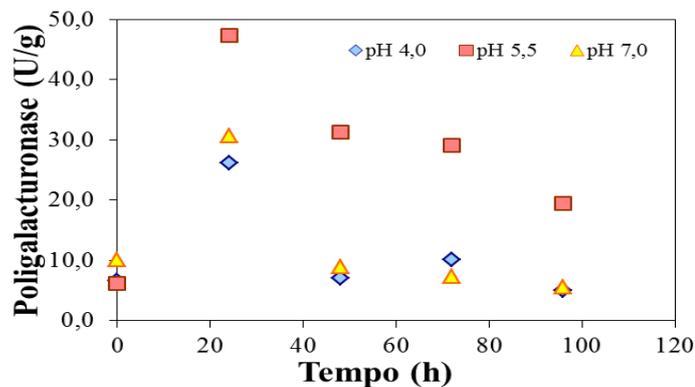
Em função do baixo pH da casca de coco verde, que pode induzir à mudanças morfológicas no microrganismo e comprometer a secreção enzimática (PANDEY, 2003), realizou-se um estudo sobre diferentes pH's adicionados à casca de coco.

**Figura 33 - Atividade de pectinase para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

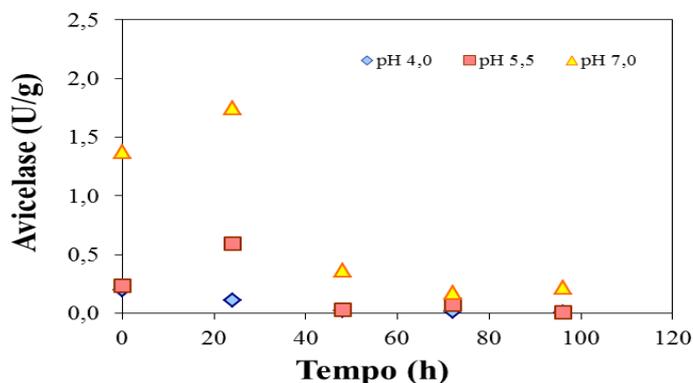
**Figura 34 - Atividade de poligalacturonase para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

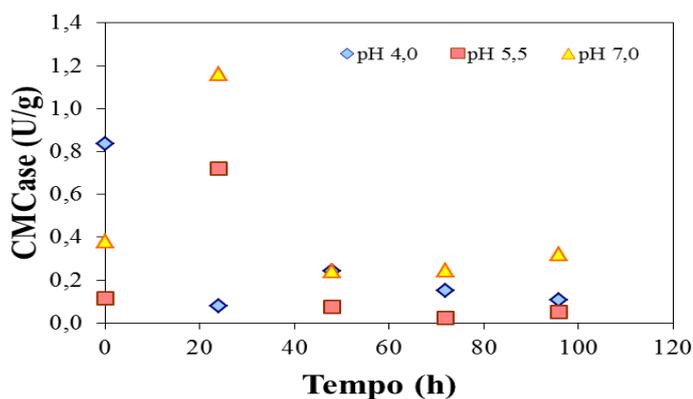
A avaliação do efeito do pH nas atividades enzimáticas pode ser observado nas Figuras 33 a 37. Verificou-se que a assimilação de cada enzima é diferenciada e que o menor pH estudado (4,0) tem efeito negativo no processo de síntese, uma vez que se distancia da condição ótima de atividade, corroborando a importância do pH no controle do processo fermentativo.

**Figura 35 - Atividade de avicelase para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

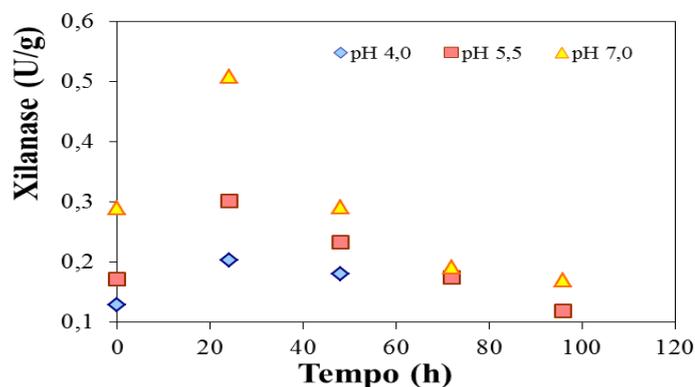
**Figura 36 - Atividade de carboximetilcelulase para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

As maiores atividades enzimáticas de pectinase (7,11 U/g, equivalente a 1,07 U/mL) e poligalacturonase (47,31 U/g, equivalente a 7,10 U/mL) foram obtidas em pH 5,5, ambas em 24 h de fermentação. Zheng & Shetty (2000) determinaram que o pH 5,0 foi considerado ótimo para a produção de PG, por *Lentinus edodes*. Bueno et al. (2005) sugeriram a condição de pH 4,5 para a produção de poligalacturonase pelas linhagens de *Aspergillus sp* CFCF-0492, *Aspergillus sp* CFCF-HC1 e *Aspergillus sp* CFCF-CC1, isoladas do solo. Malvessi & Silveira (2004), estudando meios com pH inicial variando de 2,0 a 7,0, observaram máxima atividade de poligalacturonase em pH 4,0, utilizando *Aspergillus oryzae*.

**Figura 37 - Atividade de xilanase para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

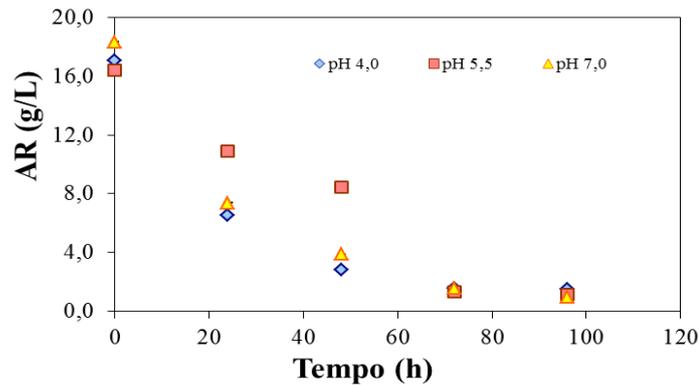
A máxima atividade enzimática de avicelase (0,87 U/g, equivalente a 0,26 U/mL) e de carboximetilcelulase (0,58 U/g, equivalente a 0,17 U/mL) foram obtidas em pH 7,0, ambas em 24 h de fermentação. Este valor de pH foi próximo ao encontrado por Oliveira (2010), que encontrou a máxima atividade de celulase na faixa compreendida em  $6,0 < \text{pH} < 6,5$ . Segundo o autor, celulasas obtidas em pH próximo à neutralidade favorecem o processo industrial, pois os efluentes provenientes das indústrias não precisam de onerosos tratamentos de correção de pH. Também ressalta que a grande maioria das celulasas reportadas na literatura científica são obtidas em pH ácido. De acordo com Aguiar et al. (2008), a máxima produção de celulasas a partir de resíduos lignocelulósicos utilizando *Aspergillus niger*, foi obtida em pH 5,0 e temperatura de 50°C. Fonteles et al. (2009) encontraram condições ótimas para a atividade enzimática de celulasas em pH 5,7 e temperatura de 61°C.

As maior produção de xilanase, 0,51 U/g (0,15 U/mL) foi em obtida em pH 7,0, no tempo de 24h. Este resultado ficou bem abaixo do obtidos por Qinnghé et al. (2004), que alcançaram 24,98 U/mL de atividade de xilanase, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia utilizando fungo *Pleurotus ostreatus*- CY012 em fermentação submersa, sob condições otimizadas. Para todos os valores de pH, as produções de xilanase foram pequenas, abaixo até dos valores obtidos por Ximenes et al. (1997) apud Menezes et al. (2009), que obteve 1,2 U/mL, utilizando o microrganismo *Fumigatus frassenius* utilizando farelo de trigo.

As Figuras 38 e 39 apresentam o perfil do consumo de açúcares ao longo da fermentação. Os resultados mostram, em pH 4,0, consumo de açúcares redutores totais em

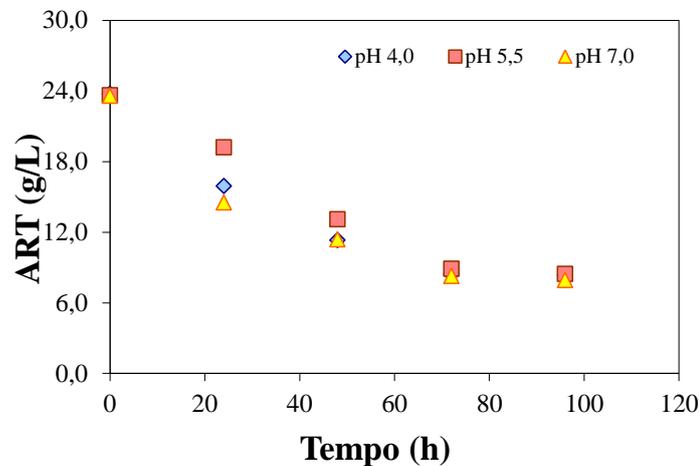
torno de 64,9% e menor aproveitamento da glicose (91,2%). Para o pH 5,5, estes resultados foram 64,2 e 93,2%, respectivamente. Em pH 7,0, obtiveram-se os maiores consumos de açúcares redutores totais (66,4%) e de glicose (94,9%).

**Figura 38 - Consumo de AR para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 39 - Consumo de ART para diferentes valores de pH.**



Fonte: Autora, 2013.

Em todos os casos, a cinética de consumo de substrato foi decrescente, indicando melhor assimilação dos nutrientes em relação ao estudo sem controle inicial do pH. Para o ART, a assimilação do substrato em pH 5,5 mostrou-se, inicialmente, mais lenta, equiparando-se às demais condições após 72 horas de fermentação.

#### 5.4 Avaliação das condições de fermentação

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre uma dada resposta, é necessário fazê-la variar de nível e observar o resultado que essa variação produz sobre a resposta. Para isto, o planejamento experimental pode ser utilizado como forma de avaliar simultaneamente a influência de uma ou mais variáveis sobre um determinado sistema em estudo. Este é estabelecido a partir de fatores e níveis pré-determinados pelo experimentador, atribuindo  $k$  fatores e  $n$  níveis e fazendo-se experimentos cujo número total deve contemplar todas as combinações possíveis entre os níveis e fatores (BARRETOS-NETO et al., 2003; RIBEIRO, 1999).

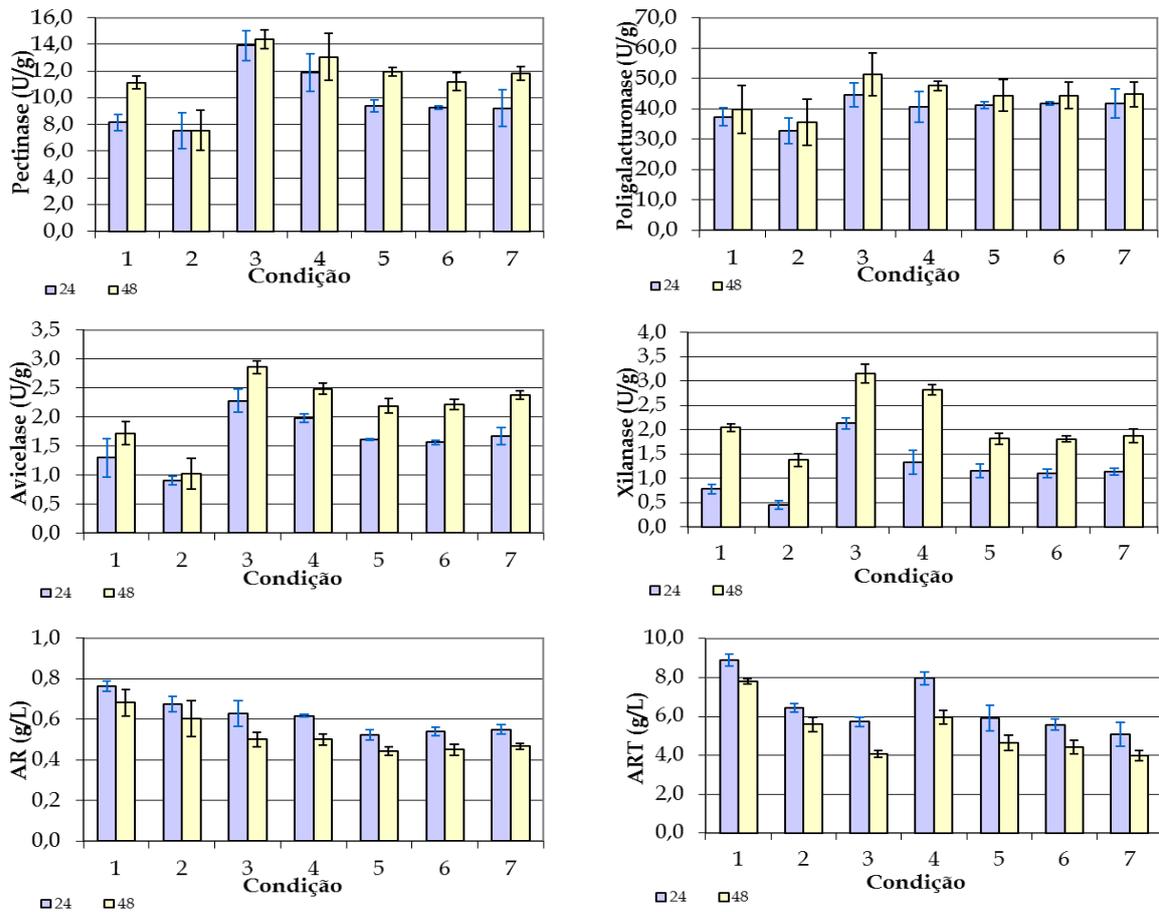
A metodologia de superfície de resposta (MSR), introduzida por G. E. P. Box na década de 1950, é uma técnica de otimização que se baseia em planejamentos e possui duas etapas distintas, modelagem e deslocamento, que são repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de alcançar uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. 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 mais pronunciadamente (BARROS-NETO et al., 2003).

Entre as vantagens da utilização da MSR, que tem sido usada com grande sucesso na modelagem de processos industriais, está a economia de recursos financeiros e tempo, proporcionada pelo delineamento gerando curvas “iso-resposta”, possibilitando a obtenção do mesmo resultado com diferentes proporções entre as variáveis, sem necessidade de repetição exaustiva dos ensaios experimentais (BARROS-NETO et al., 2003).

Nesse estudo, foram selecionados como resíduos a casca de coco e o sabugo de milho por apresentarem as maiores atividades enzimáticas nos experimentos anteriores e realizado um tratamento prévio da casca de coco para tentar neutralizar o pH do resíduo, a fim de impedir que se atinjam valores muito baixos de pH ao longo da fermentação.

A produção enzimática foi medida apenas nos tempos de 24h e 48h de cultivo, por apresentarem a produção máxima das enzimas de interesse. Na Figura 40 estão apresentados os resultados das atividades enzimáticas para os tempos 24 e 48h de fermentação.

**Figura 40 - Atividade enzimática e consumo de açúcares nos tempos 24h e 48h de fermentação.**



Fonte: Autora, 2013.

Nota-se na Figura 40 que para os dois tempos estudados, houve produção crescente das enzimas de interesse. Pode-se observar ainda, que as maiores atividades estão expressas na condição 3, com um aumento de 3,2, 13,01, 20,2 e 32,5% para as atividades pectinase, poligalacturonase, avicelase e xilanase, respectivamente, em relação às atividades das enzimas no tempo de 24h.

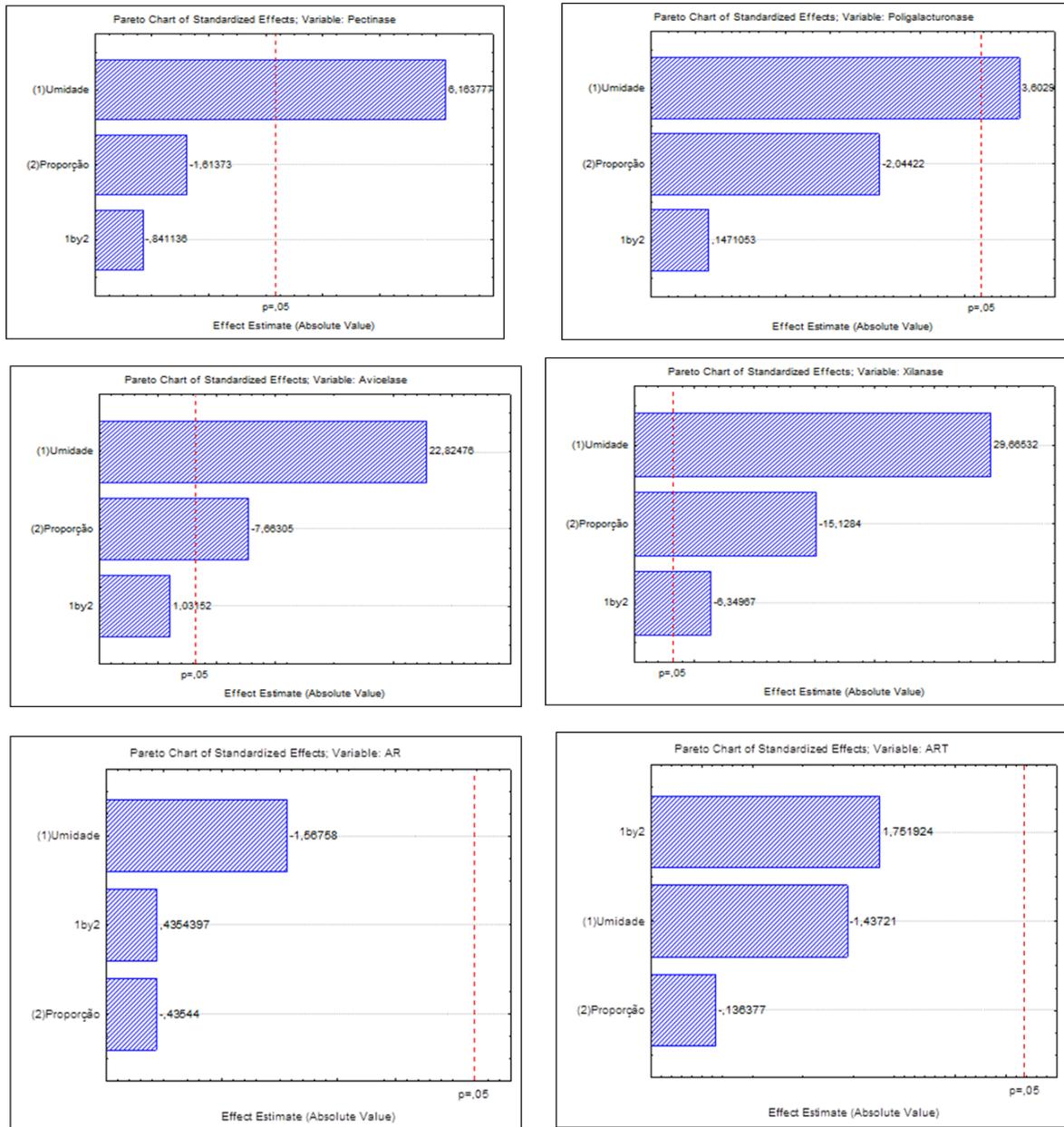
O consumo de ART foi maior, também, na condição 3, no tempo de 48h, correspondendo a 28,8%, indicando, assim, uma melhora no processo fermentativo. O considerável consumo dos açúcares ocorreu na condição em que houve maior atividade enzimática. Este fato comprova que o produto formado está diretamente ligado a decomposição do substrato (BORZANI, 2011). A influência das variáveis umidade ( $X_1$ ) e proporção ( $X_2$ ) para as atividades enzimáticas em 24h de cultivo pode ser observadas na Tabela 6 e na Figura 41.

Tabela 6 - Análise de variância para as atividades em 24h de fermentação.

		Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	F calculado
<b>Pectinase</b>	(1) Umidade	5,06	0,82	6,16	0,01	25,57	1	37,99
	(2) Proporção	-1,32	0,82	-1,61	0,20	1,75	1	2,60
	<b>1 x 2</b>	-0,69	0,82	-0,84	0,46	0,48	1	0,71
<b>Poligalacturonase</b>	(1) Umidade	7,63	2,12	3,60	0,04	58,53	1	12,98
	(2) Proporção	-4,33	2,12	-2,04	0,13	18,76	1	4,18
	<b>1 x 2</b>	0,31	2,12	0,15	0,89	0,10	1	0,02
<b>Avicelase</b>	(1) Umidade	1,03	0,05	22,82	0,00	1,06	1	520,97
	(2) Proporção	-0,35	0,05	-7,66	0,00	0,12	1	58,72
	<b>1 x 2</b>	0,05	0,05	1,03	0,00	0,00	1	1,06
<b>Xilanase</b>	(1) Umidade	1,11	0,04	29,67	0,00	1,24	1	880,03
	(2) Proporção	-0,57	0,04	-15,13	0,00	0,32	1	228,87
	<b>1 x 2</b>	-0,24	0,04	-6,35	0,01	0,06	1	40,32

Fonte: Autora, 2013.

**Figura 41 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis umidade e proporção para as atividades enzimáticas e para o consumo de açúcares no tempo 24h de fermentação.**

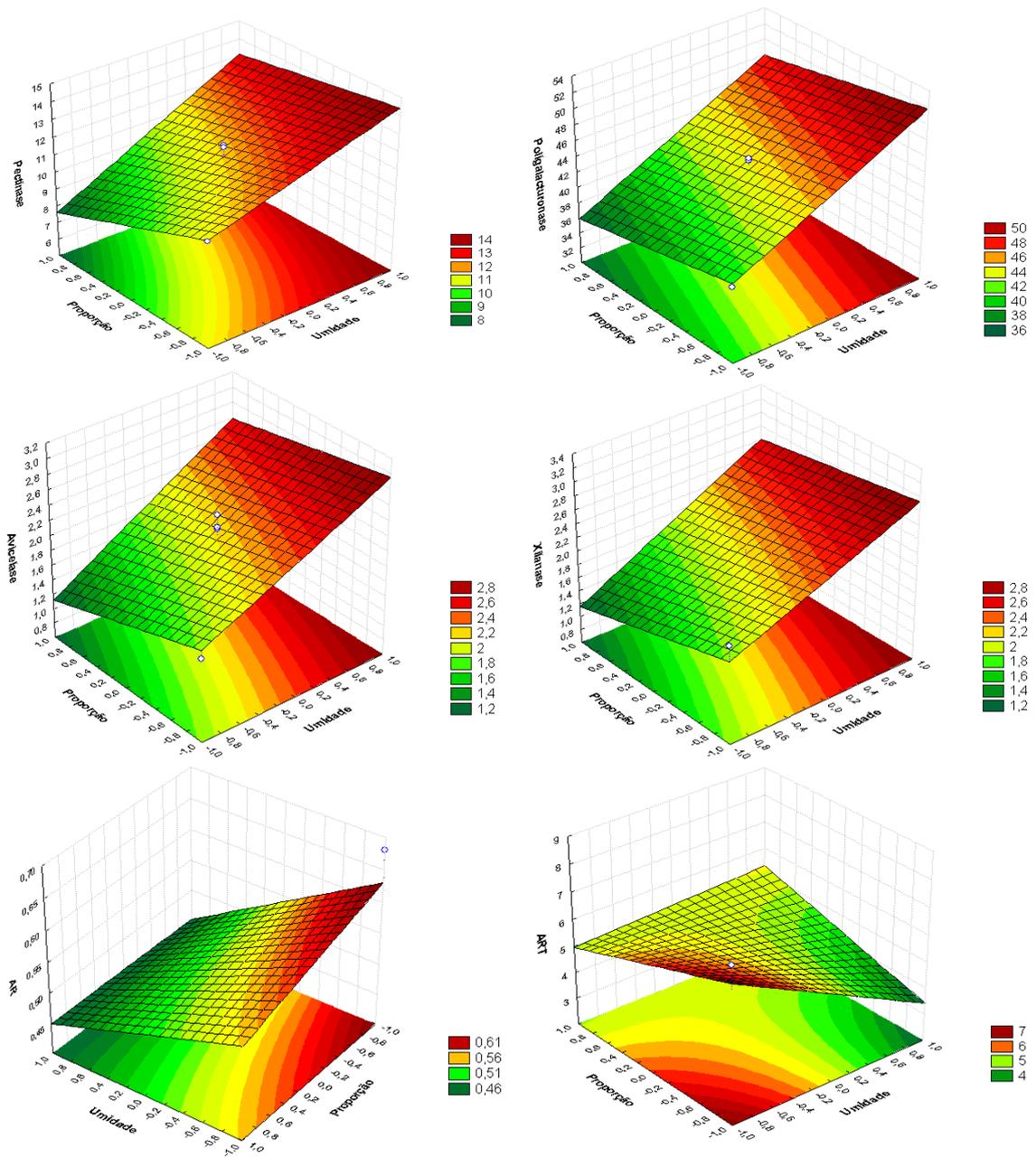


Fonte: Autora, 2013.

A Figura 41 mostra que para todas as atividades enzimáticas, a variável umidade é estatisticamente significativa para o nível de 95% de confiança com efeito positivo, enquanto que, apenas para as atividades de avicelase e xilanase, a variável proporção é estatisticamente significativa e apresenta efeito negativo. Para o consumo de açúcares, tanto AR quanto ART, as variáveis umidade e proporção não apresentaram significância estatística.

Na Figura 42, encontram-se as superfícies de resposta para a avaliação estatística realizada no tempo de cultivo de 24h.

**Figura 42 - Gráficos de superfícies de resposta obtidas para as atividades enzimáticas e consumo de açúcares em função da umidade e da proporção em 24h de cultivo.**



Fonte: Autora, 2013.

Pode-se observar que a proporção não influencia a atividade de pectinase e poligalacturonase e que quanto maior a umidade, maior é a síntese enzimática, sendo, a

umidade no valor de 90% a melhor condição de umidade para o desenvolvimento destas enzimas.

Mamma et al. (2008), encontraram maior atividade pectinásica utilizando *Aspergillus niger* BTL e laranja livre de sólidos solúveis como substrato nas condições de pH 5,0, 90% de umidade e temperatura de 30°C.

Neste estudo, foi possível confirmar que a umidade é um dos fatores que influenciam a fermentação semi-sólida pela expressão das atividades enzimáticas obtidas com a sua variação, sendo o teor de umidade a ser utilizado na fermentação ser determinado pela natureza do material, das necessidades do microrganismo e da expressão de metabólitos desejados (PANDEY et al., 2000; HÖLKER et al., 2004).

Nas atividades de avicelase e de xilanase foram verificados que, além da umidade, a proporção também influencia a atividade e que quanto menor a proporção da casca de coco, mais favorecida é a síntese destas enzimas. Rodríguez-Zúñiga et al. (2011) também obtiveram as maiores atividades enzimáticas com altos valores de umidade entre 70 e 80%, substrato com 90% de bagaço de cana-de-açúcar e 10% de farelo de soja, e suplementação com o meio indutor Mandels & Weber modificado com a adição de carboximetilcelulose.

Comparando-se os resultados de atividade de celulase da mistura dos resíduos casca de coco e sabugo de milho com a mesma atividade enzimática obtida utilizando apenas casca de coco como substrato, é possível observar que a mistura dos resíduos apresenta um aumento expressivo na síntese da enzima. Este fato pode estar associado ao baixo teor de lignina presente no sabugo de milho, podendo justificar os maiores valores de produção da celulase alcançados pelo fungo em presença deste substrato (LUCARINI et al., 2012).

Os gráficos mostram, ainda, que o consumo de açúcares, AR e ART, não foram influenciados nem pela umidade nem pela proporção.

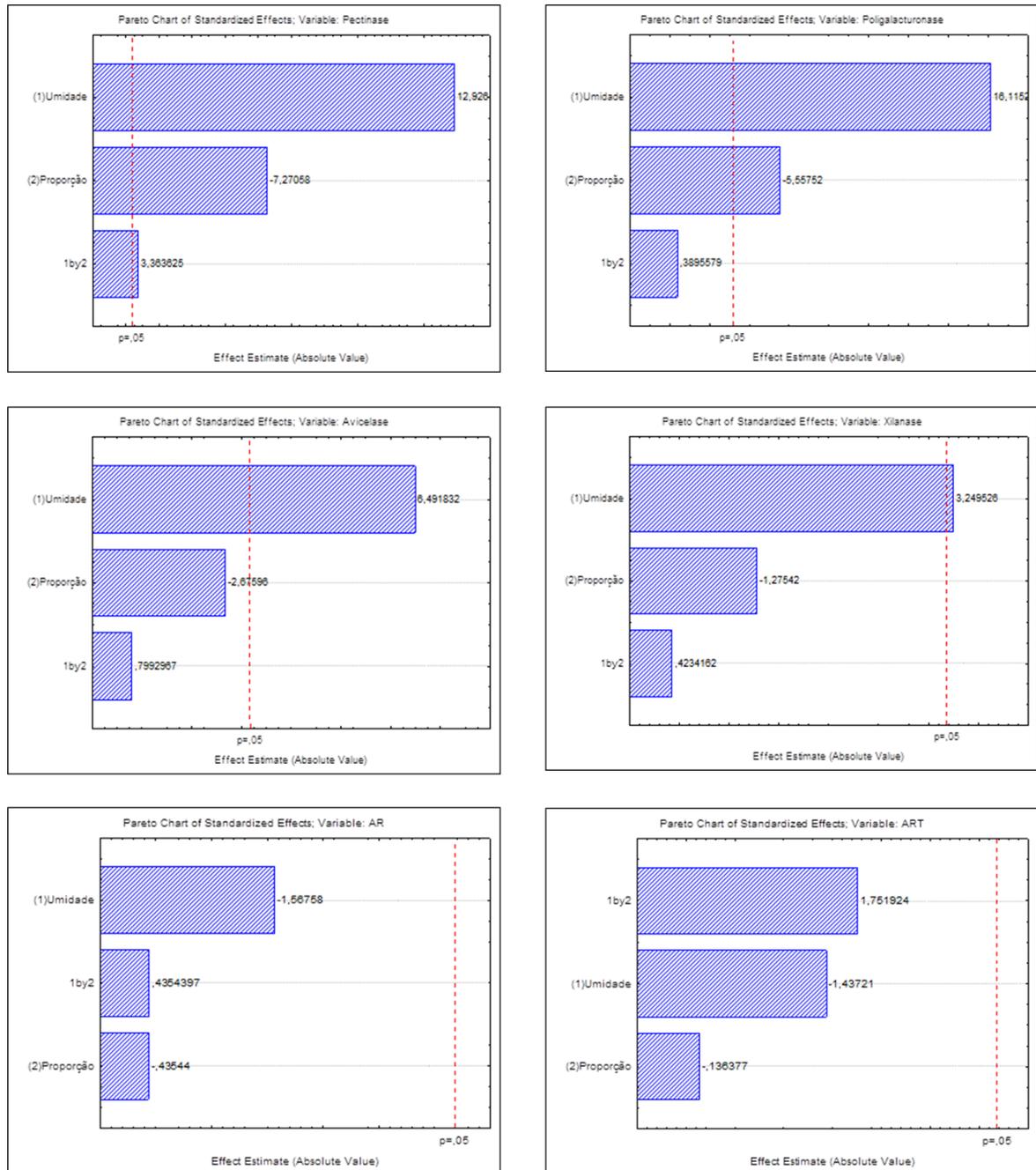
A Tabela 7 e o diagrama de Pareto apresentado na Figura 43 mostram como as variáveis umidade ( $X_1$ ) e proporção ( $X_2$ ) influenciam as atividades enzimáticas em 48h de cultivo.

Tabela 7 - Análise de variância para as atividades em 48h de fermentação.

		Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	F calculado
<b>Pectinase</b>	<b>(1) Umidade</b>	4,35	0,34	12,93	0,00	18,94	1	167,09
	<b>(2) Proporção</b>	-2,45	0,34	-7,27	0,01	5,99	1	52,86
	<b>1 x 2</b>	1,13	0,34	3,36	0,04	1,28	1	11,31
<b>Poligalacturonase</b>	<b>(1) Umidade</b>	11,83	0,73	16,12	0,00	139,98	1	259,70
	<b>(2) Proporção</b>	-4,08	0,73	-5,56	0,01	16,65	1	30,89
	<b>1 x 2</b>	0,29	0,73	0,39	0,72	0,08	1	0,15
<b>Avicelase</b>	<b>(1) Umidade</b>	1,30	0,20	6,49	0,01	1,68	1	42,14
	<b>(2) Proporção</b>	-0,54	0,20	-2,68	0,08	0,29	1	7,16
	<b>1 x 2</b>	0,16	0,20	0,80	0,48	0,03	1	0,64
<b>Xilanase</b>	<b>(1) Umidade</b>	1,28	0,39	3,25	0,05	1,63	1	10,56
	<b>(2) Proporção</b>	-0,50	0,39	-1,28	0,29	0,25	1	1,63
	<b>1 x 2</b>	0,17	0,39	0,42	0,70	0,03	1	0,18

Fonte: Autora, 2013.

**Figura 43 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis umidade e proporção para as atividades enzimáticas e para o consumo de açúcares no tempo 48h de fermentação.**

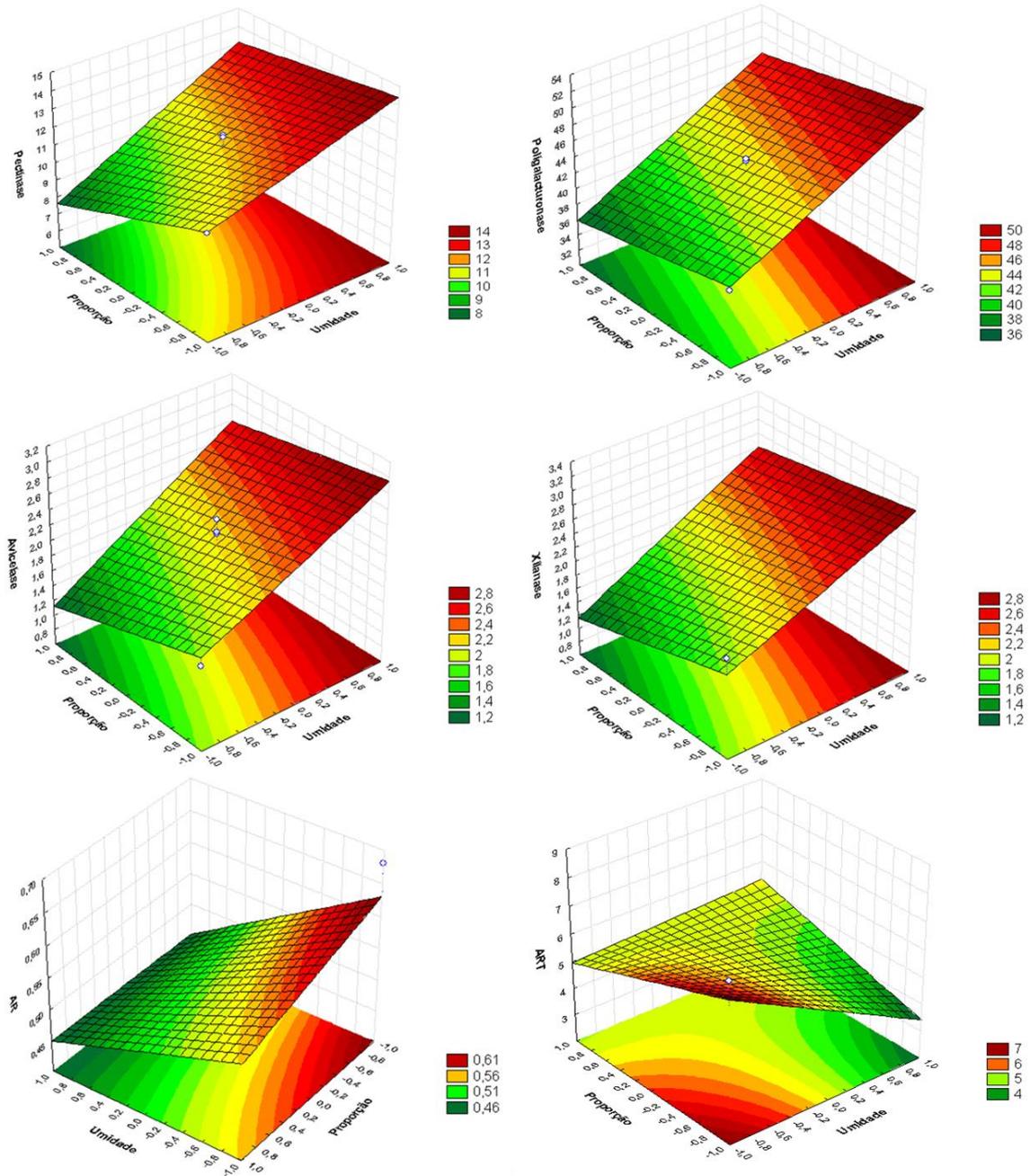


Fonte: Autora, 2013.

A Figura 43 mostra que para a atividade de pectinase, a umidade, a proporção e a interação apresentam efeito estatisticamente significativo para o nível de 95% de confiança, enquanto que, para a atividade de poligalacturonase, as duas variáveis, umidade e proporção, são os efeitos estatisticamente significativos. E, para as atividades de avicelase e xilanase, tem-se, apenas como efeito significativo, a umidade. Em todas as atividades, tem-se a

umidade como efeito positivo. Para o consumo de açúcares, tanto AR quanto ART, assim como no tempo de 24h, as variáveis umidade e proporção não apresentaram significância estatística.

**Figura 44 - Gráficos de superfícies de resposta obtidas para as atividades enzimáticas e consumo de açúcares em função da umidade e da proporção em 48h de cultivo.**



Fonte: Autora, 2013.

Na Figura 44, vê-se que a umidade, a proporção e a interação desses fatores influenciam a atividade de pectinase. A atividade de poligalacturonase é influenciada tanto pela a umidade, quanto pela proporção. Observou-se assim como no experimento realizado com 24h de cultivo, que 90% foi a melhor condição de umidade, assim, maiores valores de umidade favoreceram a síntese enzimática dentro da faixa estudada.

No estudo foi verificado que apenas a umidade influencia a atividade de avicelase e xilanase no tempo de 48h e que neste tempo, já foram alcançadas as atividades máximas para essas enzimas, tempo este, inferior ao de 72h encontrado por Rodríguez-Zúñiga et al. (2011). O tempo de 72 horas de fermentação em estado sólido para o fungo *Aspergillus niger* é interessante para fins comerciais quanto à produção de celulases, em comparação ao tempo de cultivo de outros fungos celulolíticos (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

Sun et al. (2008), observaram maiores valores de atividade celulásica em cultivos com o fungo *Penicillium decumbens*, após cinco dias de fermentação em estado sólido, em farelo de trigo e Umikalsom et al. (1997) apud Rodríguez-Zúñiga et al. (2011), que utilizando *Chaetomium globosum* apresentou maiores produtividades após dez dias de fermentação, tendo como substrato fibra deslignificada do fruto de palma.

Os gráficos mostram que assim como no tempo de 24h de fermentação, o consumo de açúcares, AR e ART, não sofreram influencia da umidade, nem da proporção.

## 5.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A análise de componentes principais (ACP) constitui-se numa técnica da estatística multivariada que transforma um conjunto de variáveis originais em componentes principais, que correspondem a um outro conjunto de variáveis de mesma dimensão. Estes componentes apresentam propriedades importantes por serem uma combinação linear de todas as variáveis originais, serem independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados (VARELLA, 2008).

O uso da ACP permite assim, a redução de massa de dados, com menor perda possível da informação redistribuindo a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados. Esta técnica pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos, pois, agrupa os indivíduos de acordo com suas

variâncias. Sendo, a variação de suas características representada pelo comportamento dentro da população e capaz de definir o indivíduo (VARELLA, 2008).

Os resultados obtidos na avaliação das fermentações compõem um conjunto de dados de características multivariadas, nas quais inclui concentração de AR e ART, acidez, pH e as atividades de pectinase, poligalacturonase, avicelase e xilanase frente aos diferentes tempos de cultivo, 24 e 48h.

Para facilitar a visualização e a interpretação desses resultados frente a estas variáveis, foi utilizada a técnica multivariada de análise de componentes principais (ACP) com o auxílio dos programas STATISTICA versão 10.0 e Excel 2007.

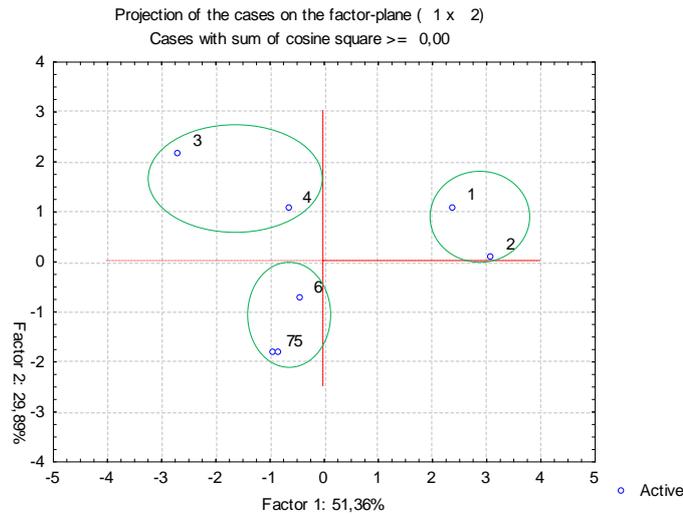
#### 5.5.1 Fermentação com 24 horas

A partir dos resultados obtidos na avaliação da influência da umidade e da proporção da mistura de resíduos no processo fermentativo, foi composto um conjunto de dados de características multivariadas, nas quais inclui concentração de açúcares, acidez, pH e atividades enzimáticas em diferentes condições de umidade e proporção.

As variáveis e variâncias foram calculadas dentro da ACP pelo programa delimitando as que exerciam as maiores variâncias para serem usadas e descreverem o processo estudado. Com isso, a poligalacturonase e pectinase apresentaram-se como as variáveis que mais influenciaram nas componentes principais, possuindo as maiores variâncias, 15,09 e 4,97, respectivamente. As demais variáveis, AR, ART, pH, acidez, xilanase e avicelase não apresentaram influência significativa, pois possuem nível de variância ao redor de 0.

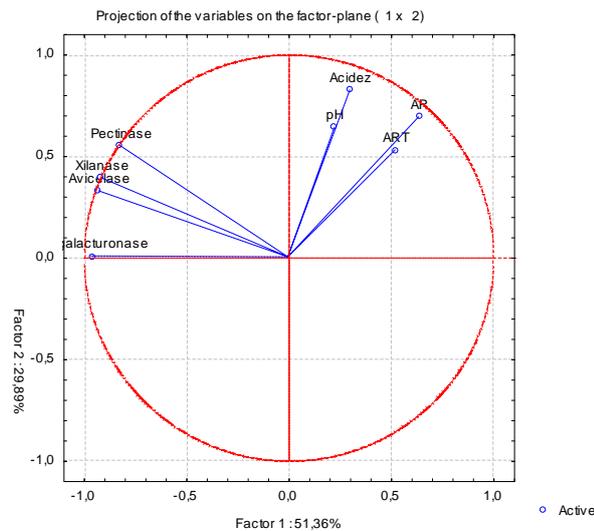
A partir da ACP dos ensaios obteve-se três grupos de dispersões, grupo 1, (ensaios 5, 6 e 7), grupo 2 (ensaios 1 e 2) e grupo 3 (ensaios 3 e 4). Pôde-se observar com os resultados, que a umidade apresentou-se como diferença entre os três grupos mostrando-se assim, como um fator importante para as variáveis poligalacturonase e pectinase. As componentes principais CP1 e CP2 são responsáveis por explicar 81,1% das variâncias da fermentação dada. As Figuras 45 e 46 ilustram a projeção dos experimentos e das variáveis em função dos fatores 1 e 2 para o tempo de 24h de fermentação.

**Figura 45 - Projeção dos experimentos em função dos fatores 1 e 2 (24 horas).**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 46 - Projeção das variáveis em função dos fatores 1 e 2 (24 horas).**



Fonte: Autora, 2013.

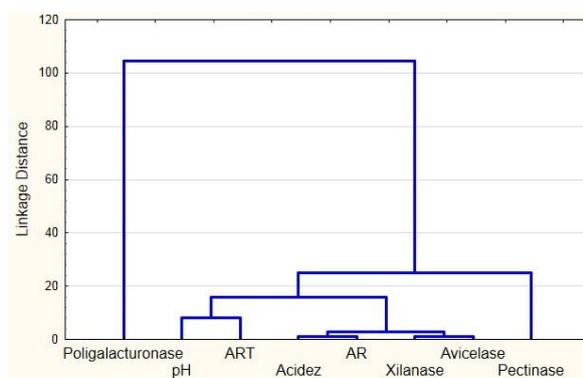
Analisando-se a Figura 46 é possível perceber que as atividades enzimáticas estão localizadas no quadrante em que se obteve os ensaios com maiores teores de umidade, o que evidencia que pode haver uma maior produção enzimática com o aumento da umidade.

As variáveis AR, ART, pH e acidez estão localizados no mesmo quadrante que as amostras com menor teor de umidade, podendo estar relacionadas a baixa produção enzimática. O ART e o pH não forneceram nenhuma informação sobre o processo por não apresentarem variância significativa nem relação entre estes e as componentes pelo programa utilizado.

Os pontos representativos das variáveis mostrados no círculo unitário permitem avaliar com qualidade a representação de uma variável. Vê-se que os pontos referentes às atividades enzimáticas estão bem representadas neste plano, pois encontram-se próximo da circunferência unitária. As atividades enzimáticas e a umidade estão fortemente correlacionadas entre si. Há uma correlação entre a acidez, açúcares e pH, porém, estas variáveis mostraram-se independentes da proporção e da umidade. A partir das variáveis pH e ART, mal representadas neste plano, nada se pode concluir.

A Figura 47 apresenta o diagrama em árvore para 8 variáveis no tempo de 24h de fermentação.

**Figura 47 - Diagrama em árvore para 8 variáveis (24 horas).**



Fonte: Autora, 2013.

As informações obtidas através da análise de agrupamentos são representadas em forma de dendograma ou fenograma, também chamado de gráfico em árvore. Este é capaz de apresentar uma síntese gráfica do trabalho desenvolvido, ocasionando uma pequena perda de informação, apesar disto, mostra-se de grande utilidade para a classificação, comparação e discussão de agrupamentos (VICINI, 2005).

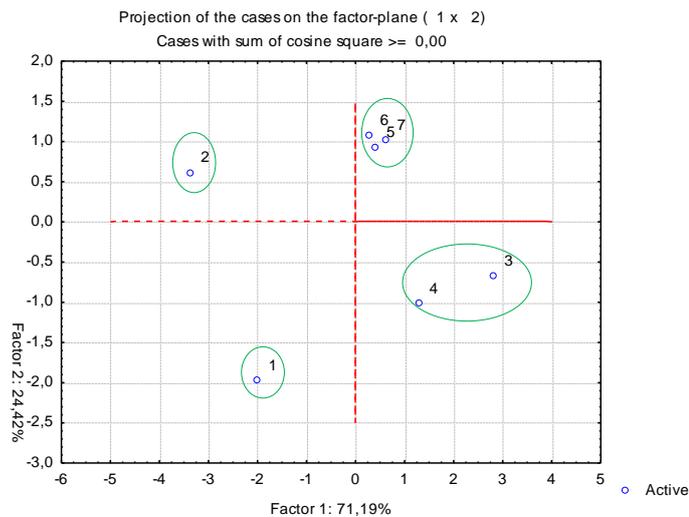
Os dendogramas são muito úteis para uma percepção visual dos resultados que estão expressos em gráfico pela ACP, pois, conseguem mostrar resumidamente a relação entre as variáveis, de modo que quanto mais distantes, mais difíceis são estas de correlacionar.

Pode-se verificar na Figura 47 que as atividades enzimáticas estão mais próximas. No entanto, poligalacturonase e pectinase se descorrelacionaram das outras atividades enzimáticas e é possível observar, ainda, que as demais variáveis se correlacionaram.

### 5.5.2 Fermentação com 48 horas

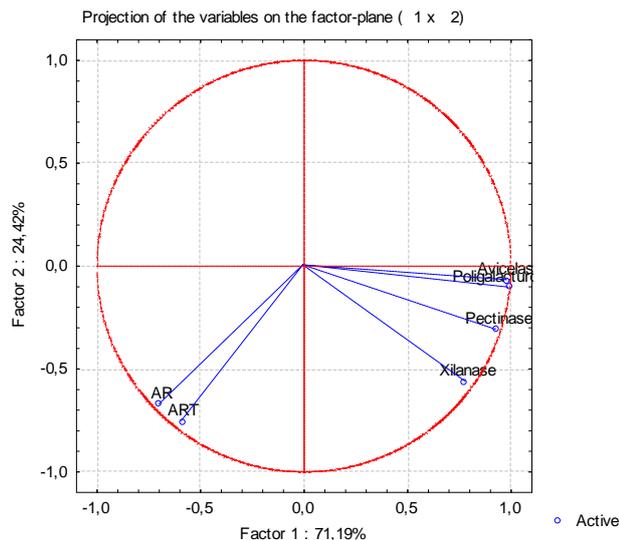
Através da ACP dos ensaios foram encontrados quatro grupos de dispersões, grupo 1 (ensaios 5, 6 e 7), grupo 2 (ensaio 2), grupo 3 (ensaio 1) e grupo 4 (ensaios 3 e 4). As componentes principais CP1 e CP2 são responsáveis por explicar 95,61% das variâncias da fermentação dada como pode ser observado nas Figuras 48 e 49.

**Figura 48 - Projeção dos experimentos em função dos fatores 1 e 2 (48 horas).**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 49 - Projeção das variáveis em função dos fatores 1 e 2 (48 horas).**



Fonte: Autora, 2013.

As variáveis com maiores variâncias foram as mesmas observadas no tempo de 24h de

fermentação, poligalacturonase e pectinase, com variâncias 26,38 e 4,42, respectivamente. Outras semelhanças em relação à fermentação com 24h de cultivo, é o fato da variável ART, além da variável AR, não apresentar influência significativa por possuir nível de variância ao redor de 0 e, as variáveis atividades enzimáticas estarem no mesmo quadrante em que se localizam os ensaios com maiores teores de umidades, ensaios 3 e 4.

Para estas variáveis, observa-se que os grupos 2 e 3 possuem a mesma condição de umidade, o que pode significar que o segundo fator, proporção a baixa umidade seja importante.

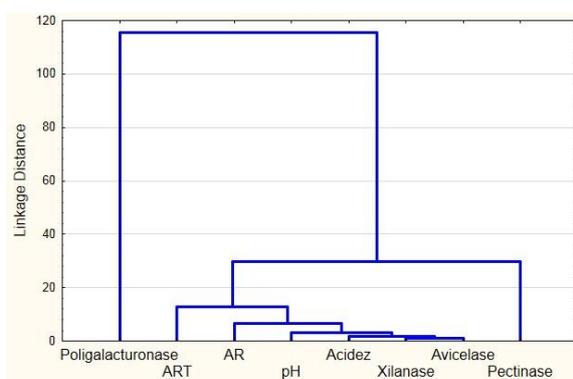
Na Figura 49, percebe-se que as atividades enzimáticas estão localizadas no mesmo quadrante que os ensaios com maiores teores de umidade, o que possibilita associar, novamente, uma boa produção enzimática a uma maior umidade.

As variáveis AR e ART estão localizados no mesmo quadrante que a amostra com menor teor de umidade e menor proporção (ensaio 1), podendo estar relacionadas a baixa produção enzimática.

Observa-se que os pontos correspondentes às atividades enzimáticas e açúcares estão bem representados neste plano, pois encontram-se próximo da circunferência unitária. Assim como verificado no tempo de 24h de fermentação, as atividades enzimáticas e a umidade estão fortemente correlacionadas entre si. Percebe-se também, que diferentemente da fermentação anterior, existe uma correlação apenas entre os açúcares, sendo estes, independentes da proporção e da umidade. As variáveis pH e acidez, mal representadas neste plano, não forneceram nenhuma conclusão.

Através do dendograma visualizado na Figura 50, observa-se que a poligalacturonase se descorrelacionou das outras variáveis dadas, não se entendendo ao certo o motivo.

**Figura 50 - Diagrama em árvore para 8 variáveis (48 horas).**



Fonte: Autora, 2013.

A Figura 50 permitiu verificar que os ensaios, assim como os de 24h de cultivo, são divididos em função da umidade, revelando esse dentre os fatores analisados o de fundamental importância. Semelhante ao que foi observado com a fermentação de 24h, todas as atividades enzimáticas estão fortemente correlacionadas, exceto para pectinase e poligalacturonase, e que houve uma correlação direta entre as demais variáveis.

## 6 CONCLUSÕES

O engenheiro moderno deve não só projetar sistemas mais eficientes, reaproveitando matérias-primas e obtendo uma maior seletividade, mas também ter a preocupação social inserida dentre os objetivos principais.

A estrutura dos resíduos agroindustriais tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, servindo tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano.

Os resultados mostram que a fermentação semi-sólida constitui-se numa alternativa de aproveitamento de resíduos agroindustriais tornando-os produtos de alto valor agregado como enzimas e ácidos orgânicos. A utilização das farinhas da casca de coco verde e de sabugo de milho cozido como substratos mostraram maiores capacidades da produção de enzimas, em relação às farinhas do bagaço de laranja lima, da mistura de bagaço de laranja lima e casca de coco e em relação à farinha de polpa de abacaxi. Obteve-se baixas atividades para enzimas lignolíticas, possivelmente em função do baixo pH no meio e de condições de recalitrância, limitando o desenvolvimento microbiano. Após as primeiras 48 horas de fermentação, onde atingiu-se as maiores expressões das enzimas de interesse, houve uma queda da atividade enzimática em decorrência da exaustão da fonte de carbono nas horas sequenciais.

Para o estudo da influência do pH, os resultados mostraram que para as enzimas pectinolíticas a melhor condição foi a de pH 5,5, enquanto que para as lignolíticas houve melhor atividade em pH 7,0. Por apresentarem as maiores atividades enzimáticas, as farinhas de casca de coco e de sabugo de milho foram posteriormente utilizadas num estudo em que realizou-se um planejamento experimental  $2^2$ , avaliando-se a influência da umidade e da proporção da mistura massa de casca de coco/massa de sabugo de milho na produção das enzimas pectinolíticas e lignolíticas. Observou-se neste estudo que a produção enzimática foi maior que as obtidas nos experimentos anteriores e encontradas nas condições de 48h de cultivo, teor de umidade em 90% e proporção de 0,5:1,5.

A análise de componentes principais (ACP) permitiu perceber que a atividade enzimática estava ligada fortemente ao teor de umidade, aumentando no tempo de 48h. Nesta análise, observou-se ainda que a variável proporção com o passar do tempo de 24h para 48h, exerceu influência em fermentações com a menor umidade dentro do intervalo estudado.

Dentre as variáveis estudadas, a atividade de poligalacturonase e de pectinase estimaram as variâncias encontradas no conjunto de dados, sendo as restantes, não fortemente

significativas a ponto de conseguir organizar o sistema. Foram representadas por duas componentes principais, que nas duas fermentações conseguiram explicar mais de 80% das variâncias dos resultados obtidos. Os dendogramas, além fornecerem de forma clara essas conclusões, ajudaram a perceber a distância entre os ensaios e variáveis estudadas dentro das duas fermentações.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados e dos objetivos alcançados, propõem-se ainda, algumas sugestões para a continuidade deste trabalho, de forma a garantir um melhor desempenho do processo de fermentação. Como recomendações de pesquisa para trabalhos futuros, utilizando resíduos agroindustriais como matérias-primas para produção de enzimas hidrolíticas através da técnica de fermentação semi-sólida, propõe-se:

- Verificar diferentes tipos de resíduos e a influência destes sobre a produção das enzimas hidrolíticas;
- Realizar um pré-tratamento do resíduo a fim de tentar promover uma maior indução enzimática de celulasas;
- Avaliar a influência da aeração do resíduo nas atividades enzimáticas;
- Utilizar o extrato enzimático obtido avaliando sua eficiência através de comparação com enzimas comerciais.

## REFERÊNCIAS

- ABECITRUS. **História da Laranja e Subprodutos da Laranja**. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>. Acessado em: Agosto/2008.
- ABUD, A. K. S. **Desenvolvimento de Tecnologias de Aproveitamento do Resíduo do Processamento de Frutas**. Relatório de Projeto de Pós Doutorado Júnior, Universidade Federal de Sergipe, 2007.
- ABUD, A. K. S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n.4. p. 257-265, 2010.
- ALAGOAS. Secretaria de Agricultura do Estado. **Multinacional vai comprar coco verde de produtores alagoanos**. 2011. Disponível em: < <http://www.agricultura.al.gov.br/sala-de-imprensa/noticias/2011/julho/multinacional-vai-comprar-coco-verde-de-produtores-alagoanos/?searchterm=coco>>. Acesso em: 12 fev.2013.
- AGUIAR, C. M.; MARGONAR M. H. L.; LUCENA S. L. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e efeito do pH e da temperatura na hidrólise enzimáticas de resíduos lignocelulósicos. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 16., 2008, Blumenau - Santa Catarina. **Anais...** Blumenau, 2008.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364-368. Campinas, 2007.
- ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- ALMEIDA, C. O. et al. **Citricultura Brasileira: Em busca de novos rumos, desafios e oportunidades na região Nordeste**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 160 p. 2011.
- ANAND, L.; VITHAYATHIL, P. J. **Journal Fermentation Bioengineering**, v. 67, p. 380, 1989.
- ARAÚJO, L.T.; SILVA, C. E. F.; ABUD, A. K. S. Produção de vinagre de laranja ‘Lima’ em vinagreira artesanal. **Scientia Plena**, v. 8, n. 12, p. 1-7. 2012.

BARRETOS-NETO, B.B. et al. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

BARROS, D. **Governo e produtores discutem revitalização da cultura do coco**. 2011. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=23942&secao=Gest%20Saneamento%20Vegetal>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Varela, 151p., 1992.

BORGES, C. D. et al. Produção de suco de abacaxi obtido a partir dos resíduos da indústria conserveira. **Boletim do Centro de pesquisas e Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 22, n. 1, p. 25-34, 2004.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2011.

BOTELHO, L. et al. Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi “smooth cayenne”. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.26, n.2, p. 362-367, mar./abr. 2002.

BOTELLA, C. et al. Xilanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 43, n.1, p. 98-101, 2007.

BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 127-133, 2000.

BUENO, M. C. et al. Produção de poligalacturonase por três linhagens de *Aspergillus* isolados do solo. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.3, p.253-257, 2005.

CARDOSO, W. S. et al. **Indústria do milho**. 2011. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/889387>>. Acesso em 06 fev. 2013.

CASTILHO, L. R. et al. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.71, n. 1, p. 45-50, 2000.

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

COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n.1, 33-42, 2001.

CONNERY, C. L. Growth of microorganism. In: REHM, H. J.; RED. G (Eds.) **Biotechnology**, 1: Microbial Fundamentals. Florida, v.2, p.73-112, 1981.

CORAZZA, M. et al. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Revista Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

CORREIA, R.T.P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. 2004. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Natal, RN, 2004.

COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. 1996. 203 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 1996.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A., Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p.291-302, 2006.

CRUESS, W. P. **Produtos industriais de frutas e hortaliças**. São Paulo: Ed. Blücher, v. 2, 854 p., 1973.

CUENCA, M. A. G. et al. **Características e evolução da cultura do milho no estado de Alagoas entre 1990 e 2003**. Aracaju: EMBRAPA: Tabuleiros Costeiros. 2005. (Documentos n. 83).

CUSTÓDIO, A. **Produção de abacaxi garante o sustento de centenas de famílias no Agreste**. Disponível em:<  
<http://minutoarapiraca.com.br/index.php/noticia/2012/12/15/producao-de-abacaxi-garante-o-sustento-de-centenas-de-familias-no-agreste>>. Acesso em: 08 mar. 2013.

DANIEL, M. R. et al. Influência do pH na produção de pectinases usando casca de limão como meio semi-sólido. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 5., 1996, Maringá. **Anais...** Disponível em:<[http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20sheb/Oral/Oral\\_11.pdf](http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20sheb/Oral/Oral_11.pdf)>. Acesso em: 08 nov.2011.

DEL BIANCHI, V. L. et al. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, p. 247-276, 2001.

DEMAJORIVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. **Revista de Administração de Empresas**, v. 35, n.3, p. 88-93, 1995.

DOELLE, H. W. et al. Solid substrate cultivation. **Elsevier Science Publishers LTD**, 466 p., 1992.

DURAND, A. et al. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, v.8, p.59-66, 1988.

EMBRAPA. **Produção brasileira de abacaxi em 2010**. Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Abacaxi\\_Brasil\\_2010.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Abacaxi_Brasil_2010.pdf)>. Acesso em: 06 fev. 2013.

FERREIRA, E. P. et al. Citricultura em Santana do Mundaú – AL: Manejo agrícola da laranja lima *citrus sinensis* (L.) Osbeck e os desafios para a sustentabilidade da cultura. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14; p 203-219. 2012.

FERREIRA, J. M. S. et al. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 292 p, 1998.

FONTELES, T. V. et al. Celulases produzidas por *Trichoderma polysporum* através da fermentação do bagaço de caju. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE FORTALEZA, Fortaleza, 9., **Anais...** Fortaleza, Ceará, 2009.

FREIMAN, L. O.; SABAA SRUR, A. U. O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 19, n. 2, 1999.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal**. 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisa>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

\_\_\_\_\_. **Estatística da produção agrícola**. 2012. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201203.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf)>. Acesso em: 13 fev. 2013.

GAMA, B. M. V. et al. **Reaproveitamento da casca de coco verde e do bagaço de cana-de-açúcar**. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, Paraná, 2010.

GADELHA, R. S. S. **A cultura do abacaxi: perspectivas, tecnologias, viabilidade**. Niterói: PESAGRO- RIO, Niterói, 27 p. (Documento 36). 1996.

GONÇALVES, N. B. **Abacaxi. Pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 45 p., 2000.

GRANADA, G. **Geléias de abacaxi com reduzido valor calórico**. 2002. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

GUTIRREZ-ROJAS. et al. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 103-103, 1998.

HAN, Y. W.; Oxygen requirement for growth of *Candida utilis* on Semisolid straw substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.672-674, 1987.

HESSELTINE, C.W. **Solid state fermentation-an overview**. *International Biodeterioration*, v. 23, p. 79-89, 1987.

HÖLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.175-186, 2004.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018 p.

JUNIOR, D. M. et al. **Citros: Principais informações e recomendações de cultivo**. 2005. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>>. Acesso em: 10 de fev. 2012.

JURGEN, A. Aplicação das celulasas em processos de desbotamento. **Química têxtil**, v. 64, p. 5-17, 2001.

KOBLITZ, M. G. B. Carboidrases. In: KOBLITZ, M. G. B (Coord.). **Bioquímica de alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 19-69, 2008.

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

LONSANE, B. K. et al. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LUCARINI, A.C. et al. Avaliação da produção de celulase por fermentação semi-sólida do fungo filamentoso *Aspergillus Niger* em diferentes resíduos lignocelulósicos. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 874., 2012, Búzios. **Anais...** CD. Búzios, 2012.

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.** 2006. 146 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

MADALENA, J. A. S. **Seleção de genótipos de milho (*zea mayz* L.) submetidos a quatro densidades de semeadura no município de Rio Largo-AL.** 2003. 52. f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia: Produção Vegetal, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, AL, 2003.

MAHMOOD, A. U. et al. Orange and potato peel extracts: analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.130-137, 1998.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonase by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p. 693-702, 2004.

MAMMA, D. et al. Fungal multienzyme production on industrial by products of the citrus processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2373-2383, 2008.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2012. **Brasil Projeções do Agronegócio 2011/2012 a 2021/2022.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 06 fev. 2013.

MARIN, C. M. et al. Potencial produtivo e econômico da cultura do abacaxi e o aproveitamento de seus subprodutos na alimentação animal. **Revista ciências Agrárias e da Saúde**, v. 2, n. 1, p.79–82, 2002.

Disponível em: <<http://www.fea.br/revista>>. Acesso em: 03 fev. 2013.

MARTINS, C. R.; JESUS JR, L. A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010**. EMBRAPA, Aracaju, SE. 2011.

MATOS, A. T. Tratamento de resíduos agroindustriais. In: CURSO SOBRE TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, 2005, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 2005, p.1-34.

MENEZES, G. D. G. et al. Efeito da concentração das fontes de nitrogênio e de carbono na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* 3TSB8 em fermentação semi-sólida. In: V CONGRESSO IBEROAMERICANO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS, 2005, Puerto Vallarta. **Anais...** Puerto Vallarta, 2005.

MENEZES, C. R. et al. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p.68-78, 2009.

MUNICÍPIOS ALAGOANOS. **Produtores de coco querem estabelecer cadeia produtiva e criar um selo verde**. 2011. Disponível em: <[http://municipiosalagoanos.com.br/noticia/?id\\_noticia=8546&&contador=ok](http://municipiosalagoanos.com.br/noticia/?id_noticia=8546&&contador=ok)>. Acesso em: 12 fev. 2013.

MUDGETT, R.E. Solid State Fermentation. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A. (Eds.) **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society for Microbiology, Washington, p. 66-83, 1986.

MURTHY, M. V. R.; THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G. Monitoring of biomass in solid state fermentation using light reflectante. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 8, p. 59–63, 1993.

NASCIMENTO, L. J. **Milho tem safra recorde, supera soja em produção e alavanca PIB do setor**. 2012. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mato-grosso/noticia/2012/08/milho-tem-safra-recorde-supera-soja-em-producao-e-alavanca-pib-do-setor.html>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

NIGAM, P., SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology** v. 34: p. 405-414, 1994.

NUNES, M. U. C.; SANTOS, J. R. **Alternativas tecnológicas para o aproveitamento de resíduos de coqueiro gigante para produção de adubo orgânico, compostagem e outras.** 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/427720/1/Urbana0001.pdf>>. Acesso em: 06 fev.2012.

OLIVEIRA, S. L. R. et al. **Produção de celulase por *aspergillus heteromophus* urm 269 utilizando a casca do coco verde (*cocos nucifera* L.) como substrato.** In: IX ENPPG, IX ENICIT, III SIMPIT, 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza , 2009.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases.** 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, CE, 2010.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbiology Technology**, v.18, p. 312-331, 1996.

PADMA, P. N. et al. **Pectinolytic yeast isolates for active polygalacturonase production.** Innovative Food science and Emerging Technologies, v. 12, p. 178-184, 2011.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** 2003. 83 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Florianópolis, SC, 2003.

PANDEY, A., RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 14, p. 486-488, 1992.

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

PANDEY, A. et al. New developments in solid state fermentation: I - Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, p.1153-1169, 2000.

PELIZER, L. H. et al. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, p. 118-127, 2007.

PERAZZO, A. N. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus - indica Mill*) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. 1999. 130 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, RJ, 1999.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 213 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir do Bagaço de Mandioca**. 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2002.

PRADO, I. N. et al. Níveis de Substituição da Silagem de Milho pela Silagem de Resíduo Industrial de Abacaxi sobre o Desempenho de Bovinos Confinados. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, vol. 32, n. 3, p. 737-744, 2003.

QINNGHE, C. et al. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, 39:561-1566, 2004.

RANKBRASIL. **Maior safra de laranja da história do Brasil**. Disponível em: <[http://www.rankbrasil.com.br/Recordes/Materias/04do/Maior\\_Safra\\_De\\_Laranja\\_Da\\_Historia\\_Do\\_Brasil](http://www.rankbrasil.com.br/Recordes/Materias/04do/Maior_Safra_De_Laranja_Da_Historia_Do_Brasil)>. Acesso em 15 fev. 2013.

RASUL. **Indústria e Comércio de Rações e Serviços LTDA**. Disponível em: <<http://www.rasul.com.br/>>. Acesso em 06 fev. 2013.

REDDY, G. V. et al. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus species* (*P.ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1457-1462, 2003.

RIBEIRO, R. R. **Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex – 1X8-50**. 1997. 50 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, São Paulo, SP, 1997.

RIBEIRO, R. L. V. **Uso de etanol como modificador orgânico da fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência.** 1999. p.1-14, 27-30. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 1999.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido.** 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Uberlândia, MG, 2010.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

ROSA, M. F. et al. **Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 6 p. (Comunicado Técnico, 54), 2001.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SANT'ANA JR.; G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, Cap.14. p.351-362, 2001.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido.** 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Itapetinga, BA, 2012.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.** 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, RS, 2005.

SANTIAGO, A. M. et al. Aproveitamento da casca do umbu seco na produção de pectinases por *Aspergillus niger* em cultivo semi-sólido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul/RS, 2011. CD-Rom.

SANTOS, D. T. et al. **Potencialidades e Aplicações da Fermentação Semi-Sólida em Biotecnologia.** Janus: Lorena, ano 3, n. 4, 2006.

SANTOS, S. F. M. et al. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju visando sua utilização como substrato para fermentação semi-sólida. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 2005, Recife. **Anais...** Recife, 2005.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal, RN, 2007.

SANTOS, F. M. et al. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Revista Química Nova**, v.31, n.8, p.1973-1978, 2008a.

SANTOS, F. M. et al. 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**, v.10, n.2, p.101-109, 2008b.

SEAGRI. **Botânica/descrição da planta/variedades**. Disponível em: <<http://www.bahia.ba.gov.br/seagri/Abacaxi>>. Acesso em: 01 fev. 2013.

SEBRAE. **Resíduos do coco verde são matérias primas para outros negócios**. 2012. Disponível em: <[http://www.sebrae2014.com.br/sebrae/Sebrae%202014/Boletins/recife\\_boletim\\_2014\\_setembro-1.pdf](http://www.sebrae2014.com.br/sebrae/Sebrae%202014/Boletins/recife_boletim_2014_setembro-1.pdf)> Acesso em: 07 fev. 2013.

SEPLANDE. **APL Laranja no Vale do Mundaú**. 2012. Disponível em: <<http://www.seplande.al.gov.br>> Acesso em: 07 fev. 2013.

SILVA, L. A. D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS, 2008.

SILVA, A. F. R. **Geléias convencional e light elaboradas a partir do aproveitamento de resíduos gerados na agroindústria do abacaxi (*ananás comosus* (L))**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, RS, 2006.

SILVEIRA, R. F. M. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Natal, RN, 2010.

SOCCOL, C. R. **Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* em Culture Solide et Submergée em Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique**. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, p.218, 1992.

SOCCOL, C. R. et. al. **Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation**. Applied Microbiology Biotechnology, v. 41, p. 330-336, 1994.

SOUZA, R. L. A. et al. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.9, p.987–992, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Curitiba, PR, 2005.

SUHET, M. I.; FIOREZE, R. Fermentação semissólida do resíduo do abacaxi. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.5, n.1, p.47-52, 2011.

SUN, X.N. et al. **The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens***. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.146, p.119-128, 2008.

TAVARES, V. B. et al. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Revista Química Nova**, v.21, n.6, p. 722-725, 1998.

TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de Resíduos na Indústria de Alimentos: Revisão. **Boletim do CEPPA**, v. 18, n. 2, p. 221-236, 2000.

TING, S. V.; ROUSSEFF, R. L. **Citrus fruit and their products**. New York: Marcel Dekker, 293 p. 1986.

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

VARELLA, C. A. A. **Análise multivariada aplicada a Ciências Agrárias – Análise de componentes principais**. 2008. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/varella/Downloads/multivariada%20aplicada%20as%20ciencias%20agrarias/Aulas/An%20E1lise%20de%20vari%20E1veis%20can%20F4nicas.doc>>. Acesso em 02 fev. 2013.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. Santa Maria. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/adriano/livro/Caderno%20dedatico%20multivariada%20-%20LIVRO%20FINAL%201.pdf>>. Acesso em 02 fev. 2013.

VIEIRA, R.C. et al. **Caracterização físico-química da palha e sabugo de milho**. In: **5º Encontro Nacional de Tecnologia Química**. 2012. Maceió. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/entequi/2012/trabalhos/50/50-476-13695.html>>. Acesso em 07 fev. 2013.

VILELA, S. Y. S. et al. Agregação de valor a produtos da laranja lima. In: I SIMPÓSIO NORDESTINO DE BIOPROCESSOS (I SINORBIO), 2011, Aracaju. **Anais...** Aracaju, 2011. CD.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring, p. 5-22. In: ROUSSOUS, S. et al. (Eds.) **Advances in solid-state fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 228 p., 1995.

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

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

ZIGLIO, B. R. et al. Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 1, 2007.