

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM  
BIOENERGIA – NÍVEL DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE CAPIM ELEFANTE  
(*Pennisetum purpureum*) POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

ALINE PELENZ

**TOLEDO – PR - BRASIL**

**Novembro de 2018**

**ALINE PELENZ**

**PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE CAPIM ELEFANTE  
(*Pennisetum purpureum*) POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioenergia em cumprimento parcial  
aos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Bioenergia, área de  
concentração em Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Salah Din  
Mahmud Hasan

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Luiza  
Fernandes Rodrigues

**TOLEDO – PR - BRASIL**

**Novembro de 2018**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Pelenz, Aline  
PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE CAPIM ELEFANTE  
(Pennisetum purpureum) POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO /  
Aline Pelenz; orientador(a), Salah Din Mahmud Hasan;  
coorientador(a), Maria Luiza Fernandes Rodrigues, 2018.  
90 f.

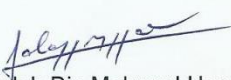
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e  
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia,  
2018.

1. Celulases. 2. Trichoderma viride. 3. Hidrólise  
enzimática. I. Hasan, Salah Din Mahmud. II. Rodrigues,  
Maria Luiza Fernandes. III. Título.

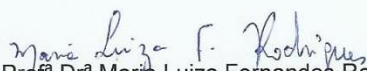
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por ALINE PELENZ  
perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 28 de  
novembro de 2018

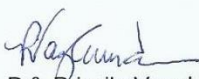
COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

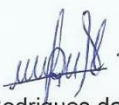
Orientador

  
Profª Drª Maria Luiza Fernandes Rodrigues

Coorientadora

  
Profª. Drª. Priscila Vaz de Arruda

Membro

  
Profª. Drª. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Eriberto e Marlene pelo amor e por todos os ensinamentos.

À minha irmã Marizane pelo incentivo, paciência e carinho.

Ao meu marido José Joacy pelo incentivo, compreensão, companheirismo, dedicação e amor.

Ao Professor Dr. Salah D. M. Hasan, pela orientação durante esse período.

À professora Dra Maria Luiza, pela co-orientação deste trabalho.

À professora Dra Cleide Viviane, pelo fornecimento das espécies fúngicas utilizadas neste trabalho.

Aos colegas Emmanuel, Franciele e Lucas pelo auxílio.

À todos os outros professores e funcionários da UNIOESTE, que de maneira direta ou indireta participaram e auxiliaram na execução desse projeto.

À família Mees, proprietários da Fazenda Brizhanta, por ceder o capim elefante utilizado no presente estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

## SUMÁRIO

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                         | v         |
| LISTA DE TABELAS.....                                         | vii       |
| LISTA DE ABREVIACÕES.....                                     | ix        |
| RESUMO.....                                                   | x         |
| ABSTRACT.....                                                 | xii       |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                     | <b>14</b> |
| 1.1 Objetivo geral.....                                       | 16        |
| 1.1.1 Objetivos específicos.....                              | 16        |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                          | <b>17</b> |
| 2.1 Materiais lignocelulósicos.....                           | 17        |
| 2.2 Capim elefante.....                                       | 18        |
| 2.3 Bioconversão de materiais lignocelulósicos.....           | 19        |
| 2.4 Enzimas .....                                             | 21        |
| 2.5 Microrganismos.....                                       | 23        |
| 2.6 Processos fermentativos.....                              | 25        |
| 2.7 Hidrólise enzimática.....                                 | 28        |
| 2.8 Modelagem matemática da hidrólise.....                    | 29        |
| Considerações finais sobre a revisão bibliográfica.....       | 30        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                             | <b>31</b> |
| 3.1 Microorganismos.....                                      | 31        |
| 3.1.1 Conservação e manutenção dos microrganismos.....        | 31        |
| 3.1.2 <i>Screening</i> de fungos.....                         | 32        |
| 3.1.3 Preparo da solução de esporos (inóculo).....            | 33        |
| 3.2 Pré-tratamento alcalino oxidativos do capim elefante..... | 33        |
| 3.3 Fermentação em estado sólido (FES).....                   | 34        |
| 3.3.1 Planejamento experimental da FES.....                   | 35        |
| 3.4 Extração das enzimas.....                                 | 36        |
| 3.5 Hidrólise enzimática.....                                 | 37        |
| 3.6 Métodos analíticos.....                                   | 37        |
| 3.6.1 Determinação da atividade enzimática.....               | 37        |
| 3.6.2 Determinação de açúcares redutores (AR).....            | 38        |
| 3.6.3 Determinação da celulose.....                           | 38        |

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7 Desenvolvimento do modelo matemático.....                                        | 39        |
| 3.7.1 Determinação da velocidade inicial da hidrólise ( $v_0$ ).....                 | 41        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                | <b>43</b> |
| 4.1 <i>Screening</i> de fungos.....                                                  | 43        |
| 4.2 Produção de celulases por FES.....                                               | 44        |
| 4.2.1 Planejamento DCCR da FES para o fungo <i>Trichoderma viride</i> .....          | 45        |
| 4.2.2 Planejamento DCCR da FES para o fungo <i>Trichoderma asperellum</i> .....      | 50        |
| 4.2.3 Planejamento DCCR da FES para o fungo <i>Aspergillus niger</i> l.....          | 55        |
| 4.3 Cinética da produção das enzimas na condição ótima.....                          | 60        |
| 4.4 Hidrólise enzimática do capim elefante pré-tratado.....                          | 64        |
| 4.5 Modelagem e simulação da cinética de hidrólise enzimática do capim elefante..... | 67        |
| 4.5.1. Dados experimentais da hidrólise enzimática.....                              | 67        |
| 4.5.2 Simulação do modelo matemático.....                                            | 69        |
| 4.5.3 determinação da velocidade inicial da hidrólise ( $v_0$ ).....                 | 72        |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                                                             | <b>74</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS .....</b>                                                          | <b>75</b> |
| <b>ANEXO.....</b>                                                                    | <b>89</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 2.1.</b> Capim elefante.....                                                                                                                                                                              | 18 |
| <b>Figura 2.2.</b> Efeito do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.....                                                                                                                                   | 20 |
| <b>Figura 2.3.</b> Atuação das enzimas celulasas sobre a matriz celulósica.....                                                                                                                                     | 22 |
| <b>Figura 2.4.</b> Aspecto da espécie <i>A. niger</i> : (A) camurça branca e (B) cabeças conidiais negras.....                                                                                                      | 24 |
| <b>Figura 2.5</b> Gêneros: (A) <i>Penicillium sumatrense</i> . (B) <i>Trichoderma cremeum</i> , <i>T. longipile</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. atroviride</i> e <i>T. citrinoviride</i> ..... | 24 |
| <b>Figura 3.1.</b> Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados no presente trabalho.....                                                                                                                  | 31 |
| <b>Figura 4.1.</b> Espécies fúngicas produtoras das enzimas celulasas.....                                                                                                                                          | 43 |
| <b>Figura 4.2.</b> Superfície de resposta da FPase e CMCase do planejamento DCCR para a FES com o <i>Trichoderma viride</i> .....                                                                                   | 49 |
| <b>Figura 4.3.</b> Perfis de valores preditos da FPase e CMCase e desejabilidade do DCCR para a FES com o <i>Trichoderma viride</i> ( $\alpha = 0,10$ ).....                                                        | 50 |
| <b>Figura 4.4.</b> Superfície de resposta da FPase e CMCase do planejamento DCCR para a FES com o <i>Trichoderma asperellum</i> .....                                                                               | 54 |
| <b>Figura 4.5.</b> Perfis de valores preditos da FPase e CMCase e desejabilidade do DCCR para a FES com o <i>Trichoderma asperellum</i> ( $\alpha = 0,10$ ).....                                                    | 55 |
| <b>Figura 4.6.</b> Superfície de resposta da FPase e CMCase do DCCR para a FES com o <i>A. niger</i> I.....                                                                                                         | 59 |
| <b>Figura 4.7.</b> Perfis de valores preditos da FPase e CMCase e desejabilidade do DCCR para a FES com o <i>A. niger</i> I( $\alpha = 0,10$ ).....                                                                 | 60 |
| <b>Figura 4.8.</b> Cinética da FES do fungo <i>T. viride</i> . Perfis de produção de FPase e CMCase.....                                                                                                            | 61 |
| <b>Figura 4.9.</b> Cinética da FES do fungo <i>T. asperellum</i> . Perfis de produção de FPase e CMCase.....                                                                                                        | 62 |
| <b>Figura 4.10.</b> Cinética da FES do fungo <i>A. niger</i> I. Perfis de produção de FPase e CMCase.....                                                                                                           | 62 |
| <b>Figura 4.11.</b> Cinética da hidrólise enzimática do capim elefante pré-tratado. Perfis de produção de AR para os extratos enzimáticos das três espécies fúngicas.....                                           | 64 |

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 4.12.</b> Simulação do modelo matemático utilizando 20 g/L de concentração inicial de enzima comercial.....               | 69 |
| <b>Figura 4.13.</b> Simulação do modelo matemático utilizando 10 g/L de concentração inicial de enzima comercial.....               | 69 |
| <b>Figura 4.14.</b> Simulação do modelo matemático utilizando 5 g/L de concentração inicial de enzima comercial.....                | 70 |
| <b>Figura 4.15.</b> Simulação do modelo matemático utilizando 30 g/L de concentração inicial de enzima obtida a partir da FES.....  | 70 |
| <b>Figura 4.16.</b> Simulação do modelo matemático utilizando 20 g/L de concentração inicial de enzima obtida a partir da FES.....  | 71 |
| <b>Figura 4.17.</b> Simulação do modelo matemático utilizando 10 g/L de concentração inicial de enzima obtida a partir da FES ..... | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 3.1.</b> Composição do meio de cultura para <i>screening</i> .....                                                                                                       | 33 |
| <b>Tabela 3.2.</b> Composição da solução nutriente.....                                                                                                                            | 35 |
| <b>Tabela 3.3.</b> Variáveis do DCCR (níveis codificados e reais) da FES .....                                                                                                     | 36 |
| <b>Tabela 4.1.</b> Matriz de dados do DCCR para o <i>Trichoderma viride</i> . Resultados de FPase e CMCase no tempo de 48h da FES.....                                             | 45 |
| <b>Tabela 4.2.</b> Estimativa de efeitos e coeficientes da regressão quadrática do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o <i>Trichoderma viride</i> ( $\alpha = 0,10$ ).....    | 47 |
| <b>Tabela 4.3.</b> Tabela ANOVA do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o <i>Trichoderma viride</i> ( $\alpha = 0,10$ ).....                                                    | 48 |
| <b>Tabela 4.4.</b> Valores críticos para a umidade e pH no ponto de máximo predito pelo modelo quadrático e valores de atividade obtidos para a FES com <i>T. viride</i> .....     | 49 |
| <b>Tabela 4.5.</b> Matriz de dados do DCCR para a FES com o <i>Trichoderma asperellum</i> . Resultados de FPase e CMCase no tempo de 48h da FES.....                               | 51 |
| <b>Tabela 4.6.</b> Tabela de efeitos e coeficientes da regressão quadrática do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o <i>Trichoderma asperellum</i> ( $\alpha = 0,10$ ).....    | 52 |
| <b>Tabela 4.7.</b> ANOVA do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o <i>Trichoderma asperellum</i> ( $\alpha = 0,10$ ).....                                                       | 53 |
| <b>Tabela 4.8.</b> Valores críticos para a umidade e pH no ponto de máximo predito pelo modelo quadrático e valores de atividade obtidos para a FES com <i>T. asperellum</i> ..... | 54 |
| <b>Tabela 4.9.</b> Matriz de dados do DCCR para a FES com o <i>A. niger</i> . Resultados de FPase e CMCase no tempo de 48h da FES.....                                             | 56 |
| <b>Tabela 4.10.</b> Tabela de efeitos e coeficientes da regressão quadrática do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o <i>A. niger</i> I ( $\alpha = 0,10$ ).....               | 57 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 4.11.</b> ANOVA do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o <i>A. niger</i> I ( $\alpha = 0,10$ ).....                                                                                                                                                                                        | 52 |
| <b>Tabela 4.12.</b> Valores críticos para a umidade e pH no ponto de máximo predito pelo modelo quadrático e valores de atividade obtidos para a FES com <i>A. niger</i> I.....                                                                                                                          | 59 |
| <b>Tabela 4.13.</b> Valores ótimos de operação (umidade e pH inicial) determinados nos planejamentos DCCR para os tres fungos.....                                                                                                                                                                       | 61 |
| <b>Tabela 4.14.</b> Resultados de atividade enzimática da cinética de ambas as enzimas para os três fungos na FES no tempo de 48h.....                                                                                                                                                                   | 61 |
| <b>Tabela 4.15.</b> Valores máximos de AE observados na FES em 48h e cálculo da produtividade e fator de conversão produto/substrato $Y_{P/S}$ .....                                                                                                                                                     | 63 |
| <b>Tabela 4.16.</b> Comparação com enzimas lignocelulolíticas produzidas por FES.....                                                                                                                                                                                                                    | 63 |
| <b>Tabela 4.17.</b> Cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima obtida a partir da fermentação em estado sólido.....                                                                                                                                                             | 68 |
| <b>Tabela 4.18.</b> Cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima comercial. ....                                                                                                                                                                                                  | 68 |
| <b>Tabela 4.19.</b> Valores determinados para os parâmetros cinéticos $K_e$ , $k_{de2}$ , $k_2$ e coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) para diferentes concentrações iniciais de enzima. Valores obtidos para a enzima comercial e para a solução de enzima bruta obtida a partir da FES..... | 72 |
| <b>Tabela 4.20.</b> Valores determinados para os parâmetros cinéticos $V_{emax}$ e $v_0$ para diferentes concentrações iniciais de enzima. Valores obtidos para a enzima comercial e enzima obtida a partir da FES.....                                                                                  | 72 |

## LISTA DE ABREVIATÖES

AE – Atividade enzimática ( $\text{U g}^{-1}$  em base seca)

AR – Açúcares redutores ( $\text{g glicose g}^{-1}$ )

BDA– Batata dextrose ágar

CMC – Carboximetilcelulose

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

$F_{\text{calc}}$  – F calculado (teste “F”)

FES – Fermentação em estado sólido

FPase - Atividade enzimática total (Papel Filtro)

$F_{\text{tab}}$  – F tabelado (teste “F”)

GL – Graus de liberdade

MQ – Média quadrática

SQ – Soma quadrática

**PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE CAPIM ELEFANTE  
(*PENNISETUM PURPUREUM*) POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

**AUTORA: ALINE PELENZ**

**ORIENTADOR: PROF. DR. SALAH DIN MAHMUD HASAN**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 28 de novembro de 2018. 90 p.

**RESUMO**

A possibilidade da escassez de combustíveis fósseis e preocupações com o meio ambiente, fizeram com que surgisse a necessidade de fontes alternativas para a produção de combustíveis. Uma das alternativas é a produção de Etanol de Segunda Geração (2G) utilizando biomassa lignocelulósica, como a do capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Nesse processo há utilização de enzimas que fazem a degradação da biomassa, deixando o processo muito caro, então uma solução seria a produção dessas enzimas a partir de fungos. O objetivo deste trabalho foi a produção de enzimas celulasas fúngicas a partir de capim elefante por fermentação em estado sólido (FES). Inicialmente foi realizado o *screening* de fungos que selecionou as espécies *Aspergillus niger* I, *Trichoderma viride* e *Trichoderma asperellum* para a FES. Mediante uso de planejamento experimental, verificou-se a influência de fatores como a umidade e pH iniciais. A partir da condição ótima da FES obteve-se o extrato enzimático que por sua vez foi utilizado na hidrólise do capim elefante pré-tratado para a geração dos açúcares fermentescíveis. Foi também elaborada a modelagem matemática para o estudo da cinética da hidrólise enzimática. O fungo que se destacou na produção das enzimas celulasas totais (FPase) e endoglicanases (CMCase) foi o *T. viride*, obtendo 35 U g<sup>-1</sup> e 39 U g<sup>-1</sup>, respectivamente, com umidade inicial

na FES de 80% e pH de 5,0. Nos ensaios de hidrólise foi usada a concentração de 40 g L<sup>-1</sup> de substrato (capim elefante pré-tratado) onde foram avaliados os perfis cinéticos de produção de açúcares redutores (AR) gerados. A espécie que mais se destacou na hidrólise enzimática foi o *T. viride* obtendo em 12h de hidrólise 8,4 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores. Na modelagem matemática da hidrólise foi possível observar que tanto para a enzima obtida a partir da FES como para a enzima comercial, usada para fins de comparação, que quanto maior a concentração inicial de enzima, maior a velocidade inicial de reação.

**Palavra-chave:** celulasas, *Trichoderma viride*, hidrólise enzimática

# **PRODUCTION OF CELLULASES FROM ELEPHANT GRASS (*PENNISETUM PURPUREUM*) BY SOLID STATE FERMENTATION**

**AUTHOR: ALINE PELENZ**

**ADVISOR: PROF. DR. SALAH DIN MAHMUD HASAN**

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on October, 20th 2008. 90 p.

## **ABSTRACT**

The possibility of a shortage of fossil fuels and concerns about the environment has led to the need for alternative sources for fuel production. One of the alternatives is the production of the Second Generation Ethanol (2G) using lignocellulosic biomass, such as elephant grass (*Pennisetum purpureum*). In this process there is use of enzymes that make the degradation of the biomass, leaving the process very expensive, then a solution would be the production of these enzymes from fungi. The objective of this work was the production of fungal cellulase enzymes from elephant grass by solid state fermentation (FES). The fungi screening was performed to select the species *Aspergillus niger* I, *Trichoderma viride* and *Trichoderma asperellum* for FES. Using experimental planning, the influence of factors such as initial moisture and pH were verified. From the FES optimal condition the enzymatic extract was obtained, which in turn was used in the hydrolysis of pre-treated elephant grass to generate the fermentable sugars. Mathematical modeling was also developed to study the kinetics of enzymatic hydrolysis. The fungus that stood out in the production of the total cellulases (FPase) and endoglicanases

(CMCase) was *T. viride*, obtaining 35 U g<sup>-1</sup> and 39 U g<sup>-1</sup>, respectively, with initial moisture in the FES of 80% and pH 5.0. In the hydrolysis assays, the concentration of 40 g L<sup>-1</sup> substrate (pre-treated elephant grass) was used to evaluate the kinetic profiles of the production of reducing sugars (RS). The specie that most stood out in the enzymatic hydrolysis was the *T. viride* obtaining in 12h of hydrolysis 8,4 g L<sup>-1</sup> of reducing sugars. In the mathematical modeling of the hydrolysis it was possible to observe that for the enzyme obtained from the FES and for the commercial enzyme used for comparison, that the higher the initial enzyme concentration, the higher is the initial reaction rate.

**Key words:** cellulases, *Trichoderma viride*, enzymatic hydrolysis



## 1. INTRODUÇÃO

Fatores como a possibilidade de escassez de reservas fósseis, preocupações com questões ambientais, crescente demanda de combustíveis e também o aumento do preço do petróleo, intensificaram as pesquisas na busca de fontes renováveis, tendo como consequência o aumento nos estudos utilizando biomassa para a produção de etanol de segunda geração (2G) (ROSA, 2014). Uma das alternativas para a produção de biocombustíveis são as chamadas biomassa residual, que são resíduos provenientes da agroindústria, entre elas indústrias de grãos, madeira, papel, entre outras. A utilização de biomassa residual pode aumentar expressivamente a produção de bioetanol em litros por hectare sem aumentar a área (ROCHA *et al.*, 2017).

Outra alternativa para produção de etanol 2G é a utilização de biomassas vegetais, que são definidas como toda matéria orgânica vegetal que pode ser convertida em energia. A biomassa vegetal é utilizada na produção de biocombustíveis como o etanol, sendo produzido a partir da cana-de-açúcar e do milho (SANTOS *et al.*, 2012). A biomassa vegetal é constituída basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. Esses componentes fazem parte da parede celular de todas as plantas. A hemicelulose e a lignina fazem a proteção da celulose. A lignina é muito resistente, esse composto que dificulta a hidrólise enzimática. Assim, por ser fonte de energia renovável, não competir com a agricultura voltada à alimentação, ser encontrado em abundância e possuir baixo custo, o capim elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma biomassa vegetal ideal para a produção de etanol 2G.

São necessárias quatro etapas para ocorrer a produção de etanol 2G: pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa para liberação dos açúcares, fermentação alcoólica e destilação. Há vários tipos de pré-tratamento, entre eles pode ser citado o alcalino oxidativo, que utiliza peróxido de hidrogênio que faz a remoção da lignina.

Na hidrólise enzimática as enzimas celulasas são aquelas capazes de degradar materiais lignocelulósicos, como o capim elefante. As celulasas são um complexo enzimático, sendo constituídas primordialmente de

endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -Glicosidases. Essa classificação se deve ao local onde ocorre a ação no polímero da celulose. Essas enzimas fazem a degradação da biomassa vegetal e convertem a celulose em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G.

Na produção de etanol 2G podem ser utilizadas enzimas comerciais ou então pode-se produzir as enzimas com a utilização de microrganismos, preferencialmente os fungos. Industrialmente, na produção das enzimas celúlicas, são utilizados dois processos, a Fermentação Submersa (FSm) e a Fermentação em Estado Sólido (FES). Segundo Singhania *et al.* (2010), a FES apresenta algumas vantagens como, simplicidade no processo, menor espaço, baixos custos operacionais, menores chances de contaminação, maior produtividade e maior estabilidade das enzimas em relação a temperatura e pH.

Há vários microrganismos que podem ser utilizados na FES para produzir celúlicas. Os mais utilizados são os fungos, dentre eles os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Na FES, o capim elefante poderá servir como nutriente (substrato) e suporte para o crescimento dos fungos filamentosos, que secretam as enzimas celúlicas.

A enzima celulase produzida por FES com fungos tendo como substrato o capim elefante pré-tratado, foi usada para a hidrólise do mesmo substrato pré-tratado, liberando os açúcares fermentescíveis necessários para posterior produção de etanol de segunda geração. Alternativamente pode-se, ao invés de produzir a enzima com fungos, utilizar uma enzima comercial para realizar a hidrólise do capim. Entretanto, o fato de produzir a enzima por FES usando o mesmo capim pré-tratado, que será posteriormente hidrolisado, tem a vantagem de se obter uma enzima celulase mais seletiva e apresentar maior especificidade enzima/substrato, podendo com isso apresentar maiores rendimentos de hidrólise.

## **1.1. Objetivo geral**

Produção de enzimas celúlases fúngicas por FES tendo como substrato o capim elefante (*Pennisetum purpureum*) pré-tratado.

### **1.1.1. Objetivos específicos**

- *Screening* de fungos;
- Produção das enzimas celúlases por FES usando planejamento experimental com foco na otimização do processo para três espécies fúngicas selecionadas;
- Avaliação da cinética da FES com validação do ponto ótimo para os três fungos selecionados;
- Hidrólise enzimática do capim elefante pré-tratado;
- Modelagem matemática e simulação da cinética de hidrólise enzimática do capim elefante.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos ou biomassas vegetais são fontes ricas de compostos orgânicos, com grande potencial como matéria prima para produção de combustíveis, alimentos, enzimas e outros diversos bens de consumo (LATIF & RAJOKA, 2001). A biomassa é constituída de celulose, hemicelulose e lignina, onde, a celulose é um polímero hidrofílico glucano que consiste em uma cadeia linear de unidades de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ), contendo grupos de hidroxila alcoólicos e resulta em um feixe coeso e com elevada resistência à tração (MOHANTY *et al.*, 2005). A hemicelulose é um polímero semelhante à celulose em termos de estrutura química, porém, possui menor peso molecular e tem estrutura amorfa (DITTENBER & GANGARAO, 2012). Segundo Muensri *et al.* (2011), a lignina é um complexo polimérico fenólico, formada pela união covalente de vários monômeros fenólicos com ligações do tipo éter. Constitui-se de uma molécula tridimensional amorfa polifenólica, com unidades principais guaiacil, sirigil e  $\beta$ -hidroxifenil. Sua função é ocupar os espaços em torno do feixe de fibras que estão se formando, cimentando-as e blindando a estrutura física.

Zhang *et al.* (2006), citam a celulose como a fonte de recursos renováveis mais abundante produzida na biosfera, sendo produto primário da fotossíntese nos ambientes terrestres. Segundo Martins (2005), a celulose é o constituinte básico da parede celular, sendo encontrado em vegetais primitivos e em plantas evoluídas. Basso (2010) afirma que a hemicelulose é a estrutura que oferece resistência e flexibilidade a parede celular, sendo muito hidratada, nesse local ficam imersas as microfibrilas de celulose. De acordo com Sipos (2010) a hemicelulose comporta-se como um adesivo, formando ligações entre a celulose e a lignina.

A lignina tem função de suporte estrutural, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos e oxidativos (SÁNCHEZ, 2009). A lignina reduz a digestibilidade do material vegetal pelos animais, isso dificulta o

processo de hidrólise, pois o material lignocelulósico é recalcitrante para a hidrólise (BASSO, 2010).

## 2.2. Capim elefante

Uma potencial fonte de biomassa é o capim elefante (*Pennisetum purpureum*), uma gramínea perene nativa da África, trazida para o Brasil em 1920, que apresenta rápido crescimento, é resistente a doenças, de fácil adaptabilidade, necessitando o mínimo de gerenciamento e de propagação fácil (AROEIRA *et al.*, 1999).



**Figura 2.1.** Capim elefante. Fonte: Embrapa (2015).

O capim elefante possui estrutura morfológica semelhante ao bagaço de cana-de-açúcar, sendo sua composição 37% de celulose, 30% de hemicelulose, 5% de lignina e 10% de carboidratos não estruturais, esses valores correspondem a 105 dias de maturação (CAMPOS *et al.*, 2002).

O capim elefante tem sido pesquisado para produção de bioetanol, mas apresenta poucas referências a respeito. Para sua utilização há a necessidade de otimizar as condições de operação para melhorar a eficiência da produção, principalmente na etapa de pré-tratamento da biomassa (CARDONA *et al.*, 2013; MENEGOL *et al.*, 2014a).

Desde 2009 são realizados testes na Embrapa com capim elefante para produção de etanol 2G, os experimentos iniciaram com intuito de identificar fontes alternativas de biomassa para produção de biocombustíveis (EMBRAPA, 2015). Segundo Van Zyl *et al.* (2011), a biomassa do capim elefante possui vantagem econômica na produção de etanol 2G sobre outras culturas, como milho, cana de açúcar e soja, além de período curto de produção e baixo custo, já citado anteriormente, seu cultivo não interfere na produção de alimentos. Outra vantagem, citada por Fontoura *et al.* (2015), é o grande aproveitamento da biomassa, pois o capim elefante se desenvolve em condições e solos adversos.

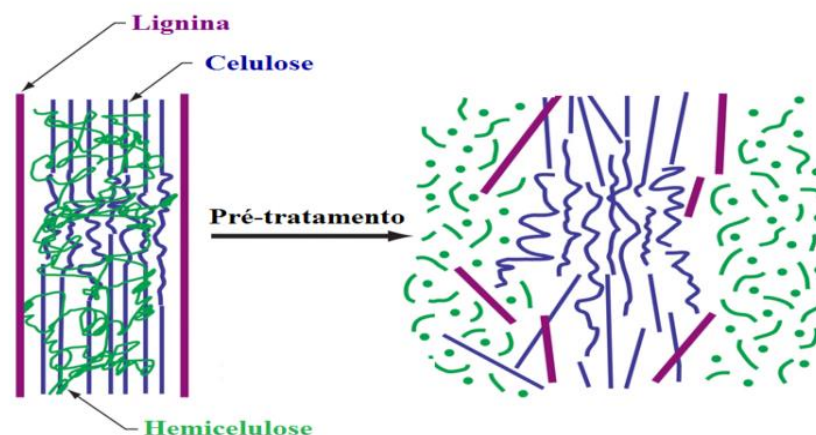
A maior produção de capim elefante ocorre no Rio Grande do Sul, onde pode ser realizada até quatro colheitas anuais, utilizando-se poucos insumos para seu ciclo de produção (MENEGOL *et al.*, 2014a; SCHOLL *et al.*, 2015a; FONTOURA *et al.*, 2015). Para a utilização do capim elefante para a produção de etanol 2G é necessária a bioconversão da celulose em açúcares fermentescíveis.

### **2.3. Bioconversão de materiais lignocelulósicos**

O processo de degradação de materiais lignocelulósicos na natureza ocorre com auxílio de microrganismos como os fungos filamentosos, que crescem sobre esse resíduo, produzem celulasas e hidrolisam os polissacarídeos estruturais (KHAN *et al.*, 2007). Esse processo ocorre de maneira lenta e segundo Arantes & Saddler (2010) é devido a grande resistência da celulose e da lignina. Assim para a utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de bioetanol é necessário a realização de uma etapa chamada de pré-tratamento, tornando a hidrólise mais eficiente (SILVA, 2012).

Segundo Silva (2011) o pré-tratamento é a principal etapa do processo, devido ao seu custo e influência nos processos seguintes. Nessa etapa ocorre a alteração da estrutura da biomassa facilitando a ação da enzima. Os objetivos do pré-tratamento são diminuir a cristalinidade da celulose, aumentar a área superficial da celulose e diminuir a interação lignina-carboidrato

(MOISER *et al.*, 2005; JÖNSSON *et al.*, 2013). Segundo Spier (2005), o pré-tratamento faz a quebra da lignina, conforme Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Efeito do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico. Fonte: Pena (2011).

De acordo com Rabelo *et al.* (2008), os métodos de pré-tratamentos possuem diferentes rendimentos e efeitos sobre a biomassa, sendo classificados em quatro categorias: físico, químico, biológico e combinado. Os métodos físicos convertem a biomassa em pós finos, aumentando a superfície específica da celulose, facilitando a hidrólise. O tratamento químico consiste em remover a lignina e a hemicelulose sem degradar a cadeia celulósica (MOISER *et al.*, 2005). Já no pré-tratamento biológico, utiliza-se da tecnologia envolvendo microrganismos como fungos e bactérias, na produção de enzimas que removem a lignina da matriz lignocelulósica, permitindo uma maior eficiência no processo de hidrólise (LORENCINI, 2013). Um pré-tratamento com alta eficiência visa reduzir os custos e aumentar a produtividade do bioetanol (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; SILVA, 2011).

Uma das alternativas de pré-tratamento é o alcalino oxidativo que utiliza agentes oxidantes na forma alcalina, entre eles o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ozônio e ácido paracético ( $C_2H_4O_3$ ). O peróxido de hidrogênio, através da oxidação remove a lignina sem formar resíduos sólidos. O peróxido de hidrogênio atua em substâncias ácidas e básicas, é seletivo quando submetido a condições de temperatura, concentração, tempo reacional, ou seja, em condições específicas. Essas condições o torna agente de redutor com ação

em diferentes espécies. Fatores como pH e temperatura podem acelerar sua ação, segundo Mattos *et al.* (2013), a temperatura é um fator muito importante, pois aumenta a decomposição cerca de 2,5 vezes para cada 10°C.

A enzima que faz a degradação da celulose são as celulasas, que hidrolisam ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre unidades de glicose. As celulasas podem romper as ligações glicosídicas da celulose, liberando oligossacarídeos e glicose (SILVA, 2010), que por sua vez são açúcares fermentescíveis podendo ser usados para produção do etanol 2G.

## **2.4. Enzimas**

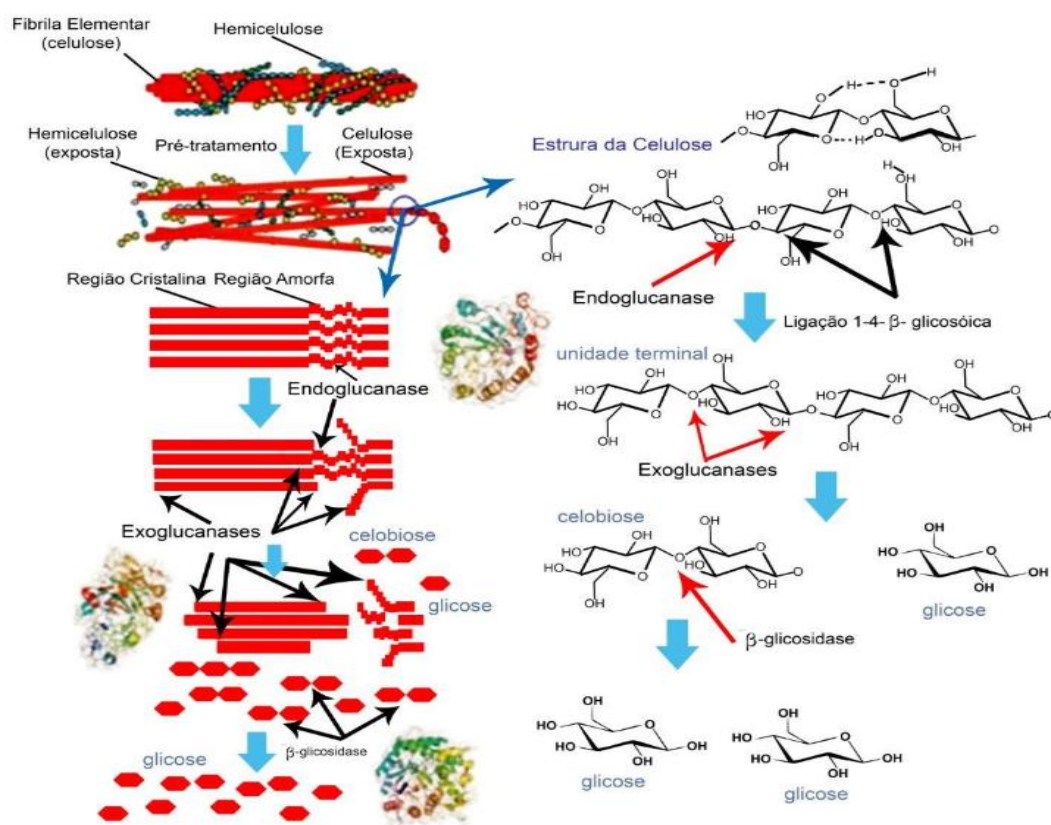
As enzimas são catalisadores biológicos que participam de várias reações bioquímicas, tendo como fator fundamental o controle metabólico (COELHO *et al.*, 2008). São utilizadas em processos industriais devido a sua especificidade, aumento na qualidade do produto utilizando processos que reduzem o impacto ambiental e devido a redução do custo final do processo (BON *et al.*, 2008).

A produção das enzimas celulasas em escala industrial deu início na década de 80, tendo diversas aplicações na indústria de alimentos e indústria têxtil. As enzimas celulasas são utilizadas na liberação de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos para posterior produção de etanol (CASTRO & PEREIRA JR, 2010).

O alto custo é uma das grandes dificuldades encontradas na produção das enzimas. Segundo Xing *et al.* (2013) o investimento com a produção de enzimas no processo de produção de etanol são de 10 a 20%. Esse custo se torna alto devido a vários fatores, como a dificuldade na purificação enzimática e o preço elevado do substrato (BOMTEMPO *et al.*, 2017).

A partir disso muitos estudos vêm sendo realizados com intuito de reduzir esses custos. As alternativas são a produção de enzima, a utilização de fungos filamentosos (FAHEINA JÚNIOR *et al.*, 2015) e a utilização de biomassa vegetal, por ser um recurso abundante, renovável e rico em componentes como celulose, lignina e hemicelulose (CAVALCANTE *et al.*, 2018).

As enzimas que fazem parte do complexo celulolítico são as endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidasases, que também são conhecidas como celulases totais ou enzimas do papel filtro- FPase (ZHANG *et al.*, 2006). A atuação de cada uma delas pode ser observada na Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Atuação das enzimas celulases sobre a matriz celulósica. Fonte: TOSCAN (2013).

A degradação da celulose envolve as três classes de enzimas: as endoglucanases iniciam a hidrólise da celulose, diminuindo o comprimento e gerando novas extremidades livres, as exoglucanases são constituídas de celobiohidrolases e glucano hidrolase, essas enzimas liberam glicose diretamente da fibra celulósica (WEIZMANN, 2010). As  $\beta$ -glicosidasases hidrolisam a celobiase em glicose (HORN *et al.*, 2012).

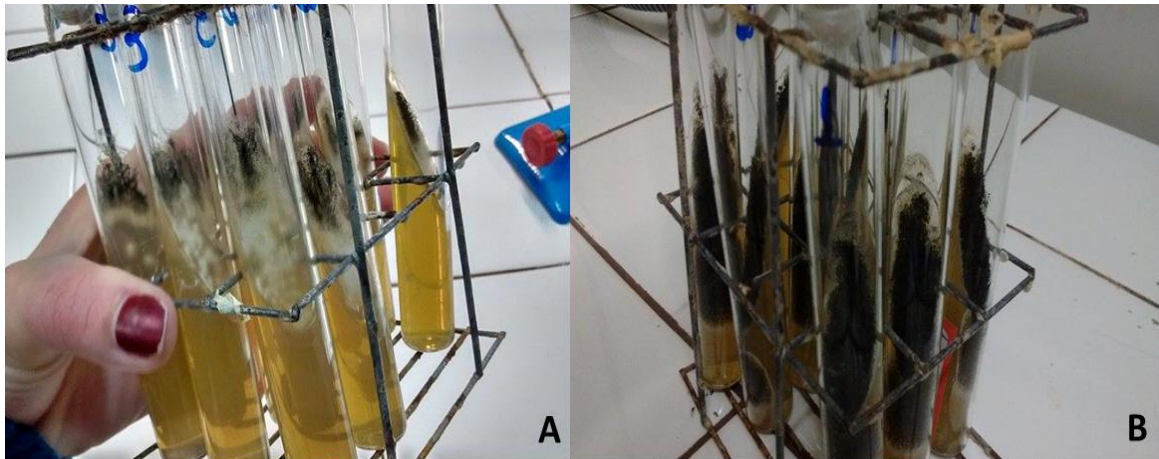
As  $\beta$ -glicosidasases são um grupo de grande expressão dentre as enzimas hidrolíticas (WEIZMANN, 2010). Esse grupo possui papel essencial para completar a hidrólise da celulose em glicose e para evitar acúmulo de celobiose, que inibe as celulases (SOCCOL *et al.*, 2010).

Por volta de 1920 a 1930 foi descoberto o primeiro derivado da celulose, carboximetilcelulose (CMC), conhecida como goma de celulose. É insolúvel em solventes orgânicos como metanol, etanol, propanol, acetona entre outros. Possui diversas aplicações, como em alimentos, indústrias têxteis e de papel, indústrias de cosméticos, farmacêuticas e de detergentes, além de aplicações agroindustriais (BARBA *et al.*, 2002; MANSOURI *et al.*, 2015). A CMC purificada, em forma de pó apresenta cor branca a creme, insípida, inodora (MARIO *et al.*, 2005).

## **2.5. Microrganismos**

A celulase é uma classe de enzimas que são produzidas essencialmente por fungos, bactérias e protozoários que catalisam a hidrólise da celulose (RIBEIRO, 2010). Os fungos filamentosos que mais se destacam na produção dessa enzima são os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (SINGHANIA *et al.*, 2010)

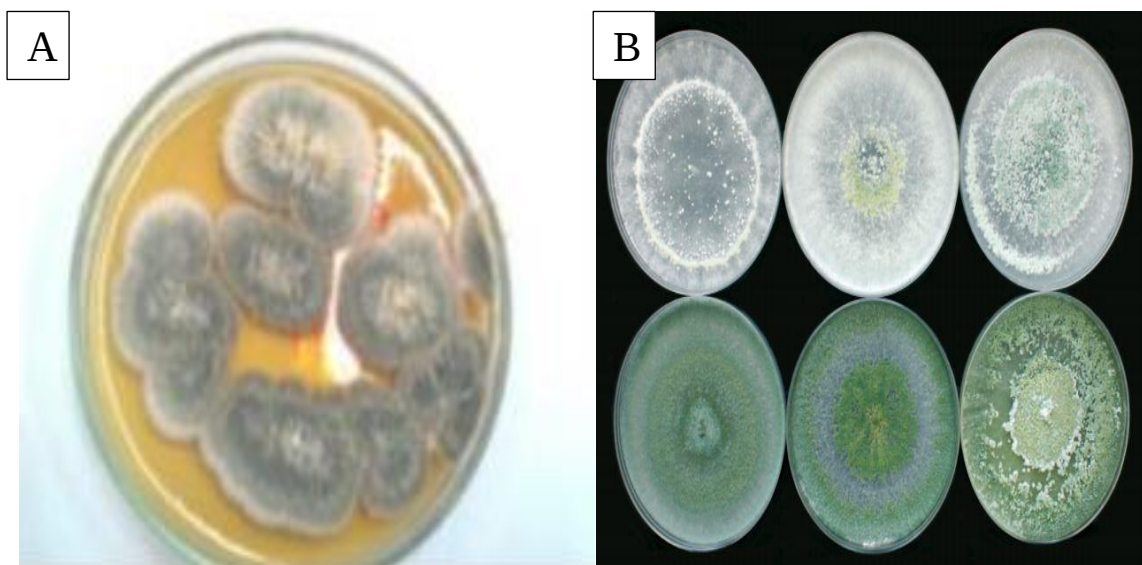
O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez por Van Tieghen em 1867, sendo o mais comum dos fungos filamentosos, tendo colônias de crescimento rápido (SANTOS, 2007). De acordo com Martins *et al.* (2005), suas colônias se desenvolvem em menos de sete dias, no início tendo aspecto de camurça branca, como pode ser observado na Figura 3 A, que em pouco tempo ficam cobertas de uma camada de cabeças conidiais negras, sendo observadas na Figura 3 B. Sua distribuição é abundante, estando presente no ar, na água, em organismos vegetais e animais, sendo caracterizado como decompositores de matéria orgânica e bons produtores de enzimas.



**Figura 2.4.** Aspecto da espécie *A. niger*: (A) camurça branca e (B) cabeças conidiais negras. Fonte: Da Autora

O gênero *Penicillium* (Figura 2.5 (A)) possui ampla distribuição geográfica, sendo sempre encontrados em solos no mundo todo, onde são também caracterizados como decompositores de matéria orgânica e bons produtores de enzimas (LIAO *et al.*, 2015).

O fungo do gênero *Trichoderma* (Figura 2.5(B)) pertence ao Filo Ascomycota, são de vida livre, com reprodução assexuada, estão presentes em solos de clima temperado e tropical, colonizam madeira e sua diversidade genética é alta (HARMAN *et al.*, 2004).



**Figura 2.5.** Gêneros: (A) *Penicillium sumatrense*. Fonte: Rodrigues *et al.* (2015). (B) *Trichoderma cremeum*, *T. longipile*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. citrinoviride*. Fonte: Błaszczuk *et al.* 2014.

## 2.6. Processos fermentativos

Para produção da celulase pode ser utilizada a técnica de fermentação em estado sólido (FES), sendo a que mais se aproxima do que acontece no ambiente de forma natural (VINIEGRA GONZALES *et al.*, 2003). Sua principal característica é ausência de água no meio, sendo necessária somente a umidade, para que crescimento e desenvolvimento do microrganismo (PANDEY & RADHAKRISHNAN, 1992). Segundo Zuniga (2010), os microrganismos utilizados nessa técnica devem possuir porosidade e tamanho adequados, com grande área superficial por unidade de volume. Tais características facilitarão a acessibilidade e a penetração do organismo no substrato. Segundo Castilho *et al.* (2000), essa técnica de produção de enzimas é de interesse econômico em especial para países com abundância em resíduos agroindustriais e biomassa, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo.

Os autores Gawande & Kamat (1999), afirmam que a FES possui as seguintes vantagens: economia de espaço, maior rendimento de produção e baixo nível de contaminação. Já Castro & Pereira Jr. (2010) apontaram as desvantagens da técnica: menor gama de produtos e microrganismos aptos a crescer na condição que a técnica oferece, dificuldades no controle do processo, dificuldade na adição de soluções e menor disponibilidade de informações na literatura.

Maciel (2006) afirma que, apesar das desvantagens a FES é utilizada em muitos setores da indústria devido ao seu conjunto de vantagens, tornando-se de interesse econômico o desenvolvimento de novos processos que utilizem este sistema, assim como a otimização dos processos já existentes. Rutz *et al.* (2008) afirma que a maior vantagem da FES é a produção de um complexo natural de enzimas e não somente uma enzima específica.

Quando comparada com a fermentação submersa (FSm), a FES requer menos energia e produz menos resíduo líquido (PANDEY, 2003). A diferença entre a FES e a FSm está na presença ou ausência de água livre no meio reacional, então é necessário observar que em um bioprocessos a água possui muitas funções, dentre elas a difusão de nutrientes no meio e a absorção destes pelos microrganismos (RAIMBAULT, 1998).

Há muitos fatores que interferem na FES, como umidade, temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio, concentração de nutrientes e vários outros, mas o que mais se destaca é a água, sendo relacionada a outros dois parâmetros: a umidade e a atividade de água. A umidade é a porcentagem de água na massa total do meio e atividade de água ( $A_w$ ) é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou quantidade de moléculas disponíveis (PINTO *et al.*, 2005).

Nos processos de FES a água possui várias funções como: influência na constituição do microrganismo, transporte de enzimas, nutrientes e metabólitos e intervenção na solubilização do gás oxigênio (ORIOL *et al.*, 1988). Segundo Pandey (2003) a umidade alta resulta em diminuição da porosidade do substrato impedindo a penetração do oxigênio, podendo causar contaminação bacteriana, já com a umidade baixa ocorre um baixo crescimento microbiano, pois a acessibilidade aos nutrientes se torna menor, resultando numa baixa quantidade de enzimas produzidas no final do processo.

Farinas (2015) afirma que o teor ideal de umidade nos processos de FES estão relacionados ao tipo de substrato, microrganismo, sistema de biorreatores e outras condições utilizadas no processo, sendo então necessário um estudo integrado de todas as variáveis.

Pinto (2003) afirma que a temperatura é um fator importante, devido ao acúmulo de calor metabólito gerado e também porque a temperatura influencia diretamente no crescimento dos fungos filamentosos.

Assim como outros fatores, o pH também possui grande influência no processo de FES para produção de enzimas celulasas. Diferente dos outros fatores que não se alteram durante o processo, o pH muda em resposta às atividades metabólicas que ocorrem durante o processo (RAIMBAULT, 1998). Palma (2003) afirma que o pH é um parâmetro difícil de ser controlado na FES, podendo ser verificado com precisão somente no início da fermentação e após seu término.

Mesmo que os fungos filamentosos desenvolvem-se bem numa faixa distante de pH (2,0 a 9,0), com crescimento ótimo entre 3,8 e 6,0 (BANSAL *et al.*, 2012), porém Maurya *et al.* (2012) afirma que a variação muito longe do pH ótimo pode causar desnaturação das enzimas e diminuir a capacidade de síntese enzimática pelo fungo. Del Bianchi *et al.* (2001) apresenta como

solução a escolha de um substrato com boa capacidade tamponante ou a utilização de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato.

Segundo Segel (1993), o pH influencia na atividade enzimática devido aos sítios ativos das enzimas, que dependem da presença de espécies iônicas para manter as conformações, permitindo uma ligação eficiente ao substrato.

O capim elefante vem sendo utilizado na FES como substrato para produção de enzimas celulasas. Scholl *et al.* (2015a) avaliaram a produção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido utilizando capim elefante pré-tratado por explosão a vapor em diferentes temperaturas e tempos de residência. Os autores utilizaram 100% de capim elefante pré-tratado por meio de explosão a vapor ou em combinação com farelo de trigo (50%). Verificou-se as atividades máximas de 32,93 IU g<sup>-1</sup> de FPA, 205,83 IU g<sup>-1</sup> para endoglucanase e 148,96 IU g<sup>-1</sup> para as  $\beta$ -glucosidases. Os autores concluíram que há possibilidade do uso de capim elefante pré-tratado por explosão a vapor como substrato para a produção de celulasas.

Menegol *et al.* (2016) avaliaram o potencial do capim elefante para produção de celulase e xilanase pelo mutante celulolítico *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivo submerso. Os autores utilizaram o capim elefante não tratado, pré-tratado com diferentes concentrações de NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NH<sub>4</sub>OH, ou pré-tratado com H<sub>2</sub>O a 121 °C. Para a atividade de papel filtro, todo o cultivo realizado com capim elefante pré-tratado nas condições avaliadas mostrou atividade superior quando comparado ao controle (capim elefante não tratado). As atividades de endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases foram maiores no cultivo preparado a partir de amostras pré-tratadas do que o controle feito com celulose (Celuflok<sup>®</sup>). Sem o pré-tratamento, o capim elefante pode ser utilizado para a produção de xilanase, possibilitando atividades semelhantes às obtidas no cultivo com celulose, reduzindo o custo de produção da enzima. Estes resultados indicam que o pré-tratamento do capim-elefante, especialmente quando pré-tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pode ser usado como uma substituição parcial ou total da celulose para a produção de celulase, e capim elefante não tratado pode ser usado para a produção de xilanase.

## 2.7. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é a etapa mais importante na conversão da biomassa, onde ocorre produção de açúcares a partir de biomassas lignocelulósicas. Há dois tipos de hidrólises, a ácida e a enzimática. Segundo Castro (2006), a hidrólise ácida é realizada com utilização de ácido diluído ou concentrado, enquanto a enzimática é realizada com a ação das enzimas celulasas. Uma das alternativas mais adequadas é a hidrólise enzimática, pois utiliza condições suaves durante o processo, levando a uma menor quantidade de subprodutos tóxicos (ácidos orgânicos como o ácido acético, derivados de furano como o furfural e monômeros fenólicos como a vanilina) na fermentação e produzindo maiores rendimentos em glicose (BASSO, 2010). De acordo com Lynd *et al.* (2002), necessita de equipamentos menos resistentes a corrosão e altas temperaturas quando comparada com a hidrólise ácida.

A hidrólise enzimática é afetada por diferentes fatores, tais como: temperatura, tempo, pH, carga enzimática, concentração de substrato, concentração de produtos e características estruturais da biomassa (FUENTES, 2009). De acordo com Modenback & Nokes (2013) um dos fatores que mais influenciam na hidrólise enzimática é a concentração do substrato, manter alta concentração de substrato permite a obtenção de uma solução concentrada de açúcares, que são extremamente importantes na fermentação.

O custo da hidrólise enzimática é um grande problema para produção de etanol de 2G quando se utiliza materiais lignocelulósicos, uma das formas de reduzir esse custo é a produção do extrato enzimático no mesmo local onde o processo fermentativo será realizado (Xin *et al.*, 2013).

As três classes de enzimas que compõem as celulasas, agem de maneiras diferentes durante a hidrólise enzimática. As endoglucanases fazem a degradação das ligações internas do polímero, que são as regiões da celulase que possuem menos cristalinidade. Essas enzimas são capazes de fazer a hidrólise de forma aleatória nas ligações  $\beta$ -(1-4)-glicosídicas nas regiões amorfas da celulose (SUN & CHENG, 2002).

As exoglucanases atuam fazendo despolimerização removendo as unidades de celobioses terminais. Essas enzimas fazem a hidrólise das unidades de celobiose das extremidades redutoras e não redutoras da cadeia

(HEIKINHEIMO, 2002). Segundo Zhao *et al.* (2004), as exoglucanases são as principais enzimas do complexo celulolítico, sendo componente chave na degradação da celulose. Enquanto as  $\beta$ -glicosidases fazem a hidrólise de celobiose em glicose, fazendo diminuir o efeito da celobiose sobre as endoglucanases e exoglucanases.

## **2.8. Modelagem matemática da hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática que utiliza material celulósico para produzir açúcares redutores, vem sendo bastante utilizada por apresentar um grande potencial para produzir recursos alimentícios e energéticos (Bhat, 2000). Por outro lado, o alto custo das enzimas, a velocidade de reação lenta e o não aproveitamento total do complexo enzimático são fatores que devem ser avaliados para obter o rendimento máximo do processo de hidrólise enzimática.

Assim sendo, muitos modelos cinéticos, incluindo modelos empíricos e mecanísticos têm sido propostos extensivamente nas últimas décadas. Modelos empíricos como os de rede neural artificial e os modelos de metodologia de superfície de resposta poderiam prever a reação enzimática, e as condições de reação poderiam ser otimizadas usando esses modelos. No entanto, esses modelos não fornecem uma visão sobre os detalhes mecanísticos do processo a ser aplicado fora das condições sob as quais eles são desenvolvidos. Por outro lado, modelos mecanísticos baseados em certos princípios, teorias e suposições poderiam superar algumas desvantagens. Esses modelos sempre contêm muitas equações diferenciais e seus parâmetros são frequentemente difíceis de serem determinados. Além disso, a maioria deles não fornece informação sobre os ajustes da concentração enzimática e o tempo de hidrólise. Fatores estes que são críticos quantos aos aspectos econômicos da utilização das enzimas celulases na indústria (Zhang *et al.*, 2010).

Tem sido geralmente aceito que a desativação da celulase durante o processo hidrolítico enzimático resulta em alguma taxa de desaceleração hidrolítica. A celulase pode ser desativada por muitos fatores, incluindo forças de cisalhamento, temperatura, força iônica, inibição do produto e adsorção

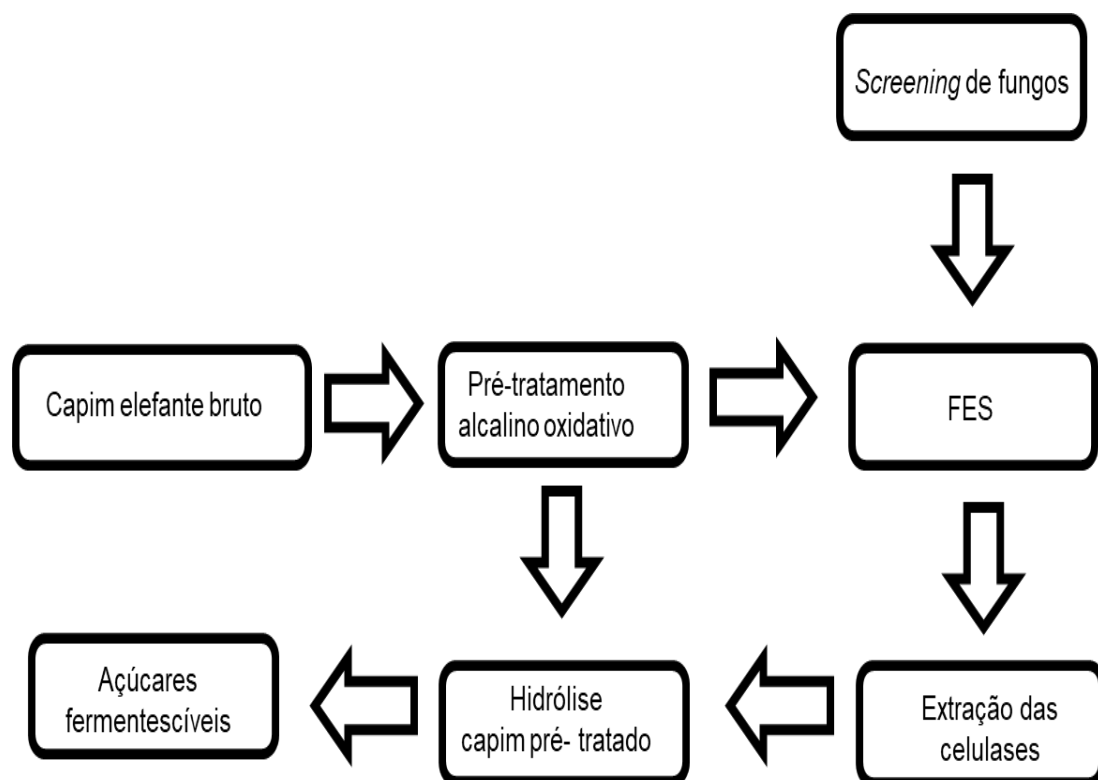
ineficaz da celulase. Muitos modelos já foram propostos, porém sem considerar a desativação da celulase (Zhang *et al.*, 2010).

### **Considerações finais referentes à revisão bibliográfica**

A utilização da biomassa do capim elefante possui vantagens como baixo custo de produção e grande disponibilidade da biomassa na região. Além disso, um fator relevante em utilizar o capim elefante como substrato para os fungos para produção de enzimas celulasas, as quais seriam usadas na hidrólise dessa biomassa e posterior produção de etanol 2G seria a especificidade da enzima produzida. Neste trabalho, inicialmente o capim elefante pré-tratado foi utilizado como substrato, nutriente e suporte na FES para produzir as enzimas celulasas. Na etapa seguinte, fêz-se a hidrólise enzimática do capim elefante pré-tratado utilizando a enzima produzida. Nessa etapa ocorreu a conversão da celulose do capim elefante, resultando em açúcares fermentescíveis para posterior fermentação com leveduras com produção de etanol 2G. Assim, a utilização do capim elefante pré-tratado como substrato na FES (para produção da celulase) e na hidrólise enzimática do mesmo capim resultaria na maior especificidade da enzima obtida. Nessa abordagem da especificidade, poucas referências foram encontradas no tocante ao uso do capim elefante e nenhuma referência relacionando a modelagem matemática da hidrólise enzimática do capim elefante.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A sequência dos procedimentos experimentais utilizados está representada conforme fluxograma na Figura 3.1, com foco principal na obtenção das celulasas na FES e dos açúcares na hidrólise.



**Figura 3.1.** Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados no presente trabalho. Fonte: Da autora.

#### 3.1. Microrganismos

##### 3.1.1. Conservação e manutenção dos microrganismos

As espécies de fungos utilizadas neste trabalho foram conservadas conforme a metodologia de Castellani (1967), que consiste em inserir pequenos blocos de ágar com fungos já crescidos em tubos de ensaio contendo água destilada estéril e armazenados em geladeira por período de

até dois anos. A manutenção dos fungos foi realizada através de repiques semestrais em tubos de ensaio contendo meio batata dextrose ágar (BDA).

### **3.1.2. Screening de fungos**

Nesta etapa foram selecionadas espécies fúngicas produtoras das enzimas celulasas através de testes em placa de Petri contendo meio base (saís e extrato de levedura) e como fonte de carbono foi adicionado CMC (Carboximetilcelulose). Para a realização do *screening* de fungos, foram utilizadas as seguintes espécies:

- *Aspergillus niger* I (IA-Isolado Ambiental), *Trichoderma stromaticum*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* disponíveis na Coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia ICB/UFMG;
- *Aspergillus niger* II (MH- Monumento Histórico) e *Aspergillus niger* III (IC- Isolamento Clínico), disponíveis na Coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia ICB/UFMG;
- *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma virens* TNH<sub>2</sub> e *Trichoderma virens* TM<sub>4</sub>, disponíveis na Coleção de microrganismos do Grupo de Pesquisa Controles Biológico e Alternativo em Fitossanidade - COBALFI Unioeste/ Marechal Candido Rondon;
- *Penicillium sumatrense*, disponível no Laboratório de Microbiologia Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

Foi realizada a inoculação dos esporos em placas de Petri contendo meio ágar bacteriológico, saís nutrientes e substrato específico para indução de enzimas celulasas (CMC, carboximetilcelulose), conforme a Tabela 1. As placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 27°C por 72h para crescimento dos fungos e observação da formação de possíveis halos contendo a enzima celulase que por sua vez seriam identificados por corante específico (vermelho congo à 1%).

**Tabela 3.1.** Composição do meio de cultura para *screening*

| Sais nutrientes                  | Quantidade (g L <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------|---------------------------------|
| MgSO <sub>4</sub>                | 0,2                             |
| NaCl                             | 0,1                             |
| Extrato de levedura              | 0,4                             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,4                             |
| KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,1                             |
| Ágar bacteriológico              | 15                              |
| CMC                              | 1                               |

Fonte: Rodrigues *et al.* (2015)

### 3.1.3. Preparo da solução de esporos (inóculo)

O preparo do inóculo foi realizado em câmara de fluxo laminar. Em Erlenmeyers de 1L foram preparados 250 mL de meio BDA inclinado, onde foram adicionadas as espécies mencionadas no item 3.1.2. O crescimento dos fungos ocorreu em estufa bacteriológica 28°C por 15 dias e a raspagem dos esporos foi realizada após adição de 100 ml de água deionizada. As soluções de esporos foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e preservados em geladeira.

### 3.2. Pré-tratamento alcalino oxidativo do capim elefante

O capim elefante utilizado tem como nome científico *Pennisetum purpureum* Schum., cultivar BRS Capiáçu, produzido no campo da Fazenda Brizhanta, distrito de São Miguel localizado no município de Toledo, PR, Brasil (24°81'26.0"S 53°86'12.1"W, a 417m de altitude), em julho de 2016, em sulcos de 0,20 m de profundidade e com adubação de plantio realizada de acordo com a análise de solo e recomendações para a cultura de capim elefante. Segundo o produtor e fornecedor das amostras, esse capim elefante foi colhido com 365 dias após o plantio. Após a colheita, o capim elefante foi encaminhado ao laboratório, lavado, e seco em estufa de secagem por 7 dias a 50°C. Após,

foi triturado no liquidificador e acondicionado em pacotes plásticos sendo mantidos em geladeira.

O pré-tratamento alcalino oxidativo foi adaptado da metodologia de Krishna *et al.*, (2000), onde para cada grama de capim elefante foi adicionado 50mL de Peróxido de Hidrogênio 1%. Foram utilizados Erlenmeyers de 2L, contendo 25g de capim com 1250 mL de peróxido de hidrogênio 1%. O pH foi ajustado para 11,5 com NaOH e os erlenmeyers colocados em incubadora Shaker por 16h com agitação de 100 rpm. Após esse período a solução foi filtrada à vácuo e o Capim elefante lavado com água destilada. O sólido resultante foi colocado em um béquer de 5L com água destilada e ajustado o pH para 7,0 com adição de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Após filtração, o capim elefante foi colocado em recipiente de alumínio, levado à estufa de secagem por 48 h a 50°C. O sólido foi acondicionado em papel alumínio e congelado.

### **3.3. Fermentação em Estado Sólido (FES)**

Na etapa de *screening* foram selecionadas as espécies *T. viride*, *A. niger* I e *T. asperellum*, as quais foram submetidas aos ensaios da FES em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Em cada frasco foi adicionado 2,0 g de capim elefante pré-tratado, em seguida os frascos foram levados à autoclave (Phoenix AV75) e esterilizados por 20min a 121°C. Após resfriar, foi adicionada a solução de nutrientes em volume determinado conforme a umidade inicial do meio fermentativo a ser trabalhada como variável do planejamento experimental. A solução nutriente foi esterilizada em autoclave e a composição utilizada está descrita na Tabela 3.2. Ajustou-se o pH inicial que também foi trabalhada como variável do planejamento experimental. Foram adicionados 0,5 mL de solução de esporos do fungo.

Para o planejamento experimental, foram retiradas amostras após 48h até 120h de fermentação para análise das atividades enzimáticas. Para os experimentos da cinética de produção das enzimas foram retiradas amostras de 24 em 24h de fermentação para análise das atividades enzimáticas. As amostras contendo material fermentado foram armazenadas em freezer.

Finalizado o processo de fermentação, as amostras foram submetidas ao processo de extração.

**Tabela 3.2.** Composição da solução nutriente

| Nutriente                                       | Quantidade (g L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 4,0                             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2,6                             |
| Uréia                                           | 0,6                             |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,6                             |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,6                             |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,1                             |
| MnSO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O            | 0,03                            |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,029                           |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O            | 0,004                           |

Fonte: Mandels & Reese, 1957

### 3.3.1. Planejamento experimental da FES

Para cada um dos três fungos selecionados foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) de duas variáveis (pH inicial e umidade inicial do meio de fermentação) cujos níveis estudados estão descritos na Tabela 3.3. As condições utilizadas para a realização destes ensaios foram: umidade inicial de 60 à 100% para todas as espécies e pH 4,0 à 6,0 para *T. viride*, 4,0 à 8,0 para *A. niger* e 5,0 à 9,0 para *T. asperellum*.

Com esse tipo de planejamento são gerados 11 ensaios de FES, com triplicata no ponto central, onde é possível gerar modelos empíricos (estatísticos) para cada resposta obtida nos experimentos. As respostas avaliadas foram atividade enzimática da FPase (celulase total) e da CMCase (endocelulase). A resposta obtida pode ser ajustada segundo um modelo quadrático polinomial conforme a equação (3.1).

$$\hat{Y}_1 = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + e \quad (3.1)$$

onde  $Y_1$  é o valor da resposta prevista pelo modelo,  $X_1$  e  $X_2$  as variáveis pH e umidade iniciais, respectivamente,  $\beta_0$  a constante (intercepto),  $\beta_1$  e  $\beta_2$  os coeficientes dos termos lineares de  $X_1$  e  $X_2$ , respectivamente,  $\beta_{12}$  o coeficiente do termo de interação linear das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ ,  $\beta_{11}$  e  $\beta_{22}$  os coeficientes dos termos quadráticos de  $X_1$  e  $X_2$ , respectivamente, e “e” o valor do erro experimental aleatório (Montgomery, 2013).

**Tabela 3.3.** Variáveis do DCCR (níveis codificados e reais) da FES

| Fungo                | Variável | -1,414 | -1   | 0    | +1   | +1,414 |
|----------------------|----------|--------|------|------|------|--------|
| <i>T. viride</i>     | pH       | 4,0    | 4,3  | 5,0  | 5,7  | 6,0    |
|                      | U (%)    | 60,0   | 66,0 | 80,0 | 94,0 | 100,0  |
| <i>T. asperellum</i> | pH       | 5,0    | 5,6  | 7,0  | 8,4  | 9,0    |
|                      | U (%)    | 60,0   | 66,0 | 80,0 | 94,0 | 100,0  |
| <i>A. niger</i>      | pH       | 4,0    | 4,6  | 6,0  | 7,4  | 8,0    |
|                      | U (%)    | 60,0   | 66,0 | 80,0 | 94,0 | 100,0  |

A análise estatística do planejamento experimental (DCCR) foi realizada utilizando o software STATISTICA™, v. 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). A metodologia de superfície de resposta utilizada incluiu a análise de resíduos, a análise de variância (ANOVA), avaliação da significância dos efeitos das variáveis sobre as repostas, além dos testes para checagem do ajuste do modelo estatístico aos dados experimentais.

### 3.4. Extração das enzimas

A extração das enzimas celulasas ocorreu adicionando-se uma solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, na proporção 1:17 (g de sólido/mL de solução tampão) em cada Erlenmeyer contendo o material resultante da fermentação em estado sólido e inseridos em incubadora *shaker* por 2 h, a uma temperatura de 35 °C com agitação de 150 rpm. O sólido foi removido por

filtração à vácuo com papel filtro, sendo o filtrado posteriormente centrifugado (centrífuga Parsec CT – 0603) por 20 min em rotação de 3000 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi armazenado em *freezer* em frascos até posterior determinação da atividade enzimática.

### **3.5. Hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática foi realizada seguindo a metodologia de Oliveira (2012), a qual consiste em inserir em Erlenmeyers quantidade necessária da solução tampão citrato de sódio, pH 4,8 (50 mM), juntamente com 2g de capim elefante (4%) pré-tratado e quantidade necessária de extrato enzimático. Após a solução foi colocada em incubadora *Shaker* a 50 °C e 150 rpm. Amostras foram retiradas em tempos distintos até o tempo final de 72h, para análises de açúcares redutores e glicose.

### **3.6. Métodos analíticos**

#### **3.6.1. Determinação da atividade enzimática**

A determinação de atividade enzimática da celulase (FPase), foi adaptada da metodologia de atividade enzimática em papel filtro descrito por GHOSE (1987) a qual consiste em inserir tiras de papel de filtro Whatmann nº 1 (1x6 cm) em tubos de ensaio. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução tampão citrato de sódio pH 4,8. Os tubos foram dispostos em banho-maria ultra termostático à temperatura de 50°C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático obtido a partir da FES e mantidos por 60 min, agitando-se em intervalos de 10 min. Os ensaios foram realizados em triplicata e acompanhados de ensaio em branco onde substituiu-se o caldo enzimático por tampão citrato de sódio pH 4,8. Após o término do tempo de incubação em banho-maria, procedeu-se a determinação dos açúcares redutores (AR) e calculou-se a atividade enzimática (AE). Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1µmol de açúcar redutor por mL de

caldo por min, ou seja,  $U = \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Os resultados de atividade enzimática (AE) foram convertidos para  $U.\text{gms}^{-1}$

Para a determinação da atividade enzimática da CMCase foi usado o mesmo procedimento, com exceção do substrato, que foi o carboximetilcelulose (CMC). Uma unidade de atividade enzimática de CMCase libera  $1\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por mL de caldo por min, ou seja,  $U = \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Os resultados de atividade enzimática foram convertidos para massa seca  $U.\text{g}^{-1}$ .

### **3.6.2. Determinação de açúcares redutores (AR)**

O método de determinação da concentração de açúcares redutores (AR) é baseado no método proposto por MILLER (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A quantificação foi realizada misturando-se 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL do reagente DNS e levando ao banho aquecido a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Resfriou-se em banho de gelo e adicionou-se 5,0 mL de água deionizada. O branco foi preparado pela adição de 0,5 mL de água deionizada substituindo a amostra. A amostra teve absorbância medida em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800) em comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão de glicose, na faixa de 0,1 a  $1,0\text{ g.L}^{-1}$ , foi construída nas mesmas condições da amostra, gerando um modelo de regressão linear e o coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida. O reagente DNS foi preparado obedecendo a seguinte sequência: 16 g de Hidróxido de sódio (NaOH) diluídos em 200 mL de água destilada, 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio diluídos em 500 mL de água destilada. Após as soluções são misturadas e adicionadas 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e o volume final aferido para 1L com água destilada.

### **3.6.3. Determinação da celulose**

O capim-elefante foi analisado de acordo com o método de Siqueira *et al.* (2016), onde pesou-se 1,0 g da amostra de capim-elefante e adicionou-se 16,5 mL de uma solução de reagente ácido, previamente preparado com ácido

acético glacial 72,73%, água destilada 18,18% e ácido nítrico 9,09%, ou seja, 12 mL de ácido acético glacial 3 mL de água destilada e 1,5 mL de ácido nítrico. Posteriormente foi realizada a etapa de digestão da celulose, onde a amostra foi colocada em banho-maria, em ebulição, por 30 min. Após a digestão foi adicionado 20 mL de álcool etílico PA em seguida, todo o material foi filtrado, adicionando 20 mL de benzeno e 20 mL de éter sulfúrico e lavado com 20 mL de álcool etílico. O conteúdo filtrado foi levado à estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  até peso constante. O teor de celulose (em %) foi calculado utilizando a Equação 3.2:

$$\text{Teor de celulose} = \left( \frac{M_{fc} - M_f}{M_a} \right) * 100 \quad (3.2)$$

Onde:

$M_{fc}$  = massa funil + celulose (g);

$M_f$  = massa do funil (g);

$M_a$  = Massa da amostra (g);

### 3.7. Desenvolvimento do modelo matemático

A hidrólise enzimática é representada a partir da enzima celulase (E) ( $\text{g L}^{-1}$ ) sendo adsorvida nos sítios ativos do substrato insolúvel (S) ( $\text{g L}^{-1}$ ) que posteriormente forma o complexo (ES) ( $\text{g L}^{-1}$ ), o qual irá produzir glicose (P) ( $\text{g L}^{-1}$ ) e a enzima celulase (E), sendo este procedimento representado pela Equação 3.3 (Shen & Agblevor, 2008):



Em que  $k_1$  ( $\text{L/h.g}$ ) é a constante cinética de adsorção da enzima,  $k_{-1}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) é a constante cinética de desorção da enzima e  $k_2$  é a constante cinética de formação de produto. Aplicando a lei de ação de massa e a teoria de estado semi-estacionário, tem-se as seguintes equações matemáticas deduzidas,

sendo estas representadas pela Equação 3.4 e Equação 3.5 (Shen & Agblevor, 2008):

$$[P] = [So] \cdot \left[ 1 - \exp \left( -k_2 \int_0^t \frac{[E]}{[E]dt + K_e} \right) \right] \quad (3.4)$$

$$K_e = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.5)$$

Em que  $K_e$  é a constante cinética de equilíbrio,  $[So]$  é a concentração inicial de substrato,  $[P]$  é a concentração de produto e  $[E]$  é a concentração de enzima. A Equação 3.4 expressa a relação entre a concentração de produto (glicose) e tempo de hidrólise o qual indica que a concentração de produto aumenta com o tempo e a máxima concentração de produto é  $[So]$ .

Para obter a relação entre concentração de glicose e tempo, é necessário conhecer a atividade da enzima celulase durante o processo de hidrólise enzimática e a fase de desativação da celulase. Portanto, considerando a desativação da celulase uma reação de segunda ordem, a taxa de desativação pode ser expressa pela Equação 3.6:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{de2} \cdot [E]^2 \quad (3.6)$$

Em que  $k_{de2}$  (L/h.g) é a constante cinética de ordem 2 de desativação da celulose. A partir da Equação 3.6, considerando a condição inicial ( $[E] = [Eo]$ ) em  $t = 0$ , se obtém a Equação 3.7:

$$[E] = \frac{[Eo]}{1 + [Eo] \cdot k_{de2} \cdot t} \quad (3.7)$$

Substituindo a Equação 3.7 na Equação 3.4 e integrando com a condição inicial ( $[P] = 0$  em  $t=0$ ), obtém-se a Equação 3.8:

$$[P] = [So] \cdot \left[ 1 - \left[ 1 + \frac{K_e \cdot [Eo]}{K_e + [Eo]} \cdot k_{de2} \cdot t \right]^{\frac{k_2}{K_e \cdot k_{de2}}} \right] \quad (3.8)$$

A Equação 3.8 representa o modelo matemático obtido, explicitando a relação entre a concentração de produto  $[P]$  e o tempo de hidrólise  $t$  para uma contração inicial de enzima  $[Eo]$ . Na Equação 3.8,  $t$  e  $[Eo]$  são as variáveis independentes e  $[P]$  é a variável dependente. Ao utilizar este modelo matemático, ajustando a concentração enzimática e o tempo de hidrólise, é possível obter o máximo aproveitamento da celulase para aplicações industriais.

### 3.7.1. Determinação da velocidade inicial da hidrólise ( $v_o$ )

Foi possível também determinar a velocidade inicial da hidrólise enzimática ( $v_o$ ) (g/L·h), um parâmetro bastante importante para estudar a cinética das enzimas. Para o modelo matemático estabelecido, sabe-se que  $v_o$  é igual a variação da concentração de produto com o tempo, sendo assim, diferenciando a Equação 3.4, tem-se:

$$v_o = \left[ \frac{d[P]}{dt} \right]_{t=0} = \frac{k_2 \cdot [So] \cdot [Eo]}{K_e + Eo} \quad (3.9)$$

A Equação 3.9 representa um modelo que se relaciona com a concentração de substrato, assim como Henri-Michaelis-Menten (Zhang *et al.*, 2010). Porém, para o presente trabalho, se torna mais adequado relacionar  $v_o$  de acordo com a concentração inicial de enzima  $[Eo]$  representando a Equação 3.10 (Bailey, 1989; Zhang *et al.*, 2010):

$$v_o = \frac{V_{emax} \cdot [Eo]}{K_m + [Eo]} \quad (3.10)$$

Em que  $V_{emax}$  (g/L·h) é a máxima velocidade inicial de hidrólise enzimática e  $K_m$  é a constante cinética de meia saturação. Ao comparar as Equações 3.9 e 3.10, é possível deduzir que:

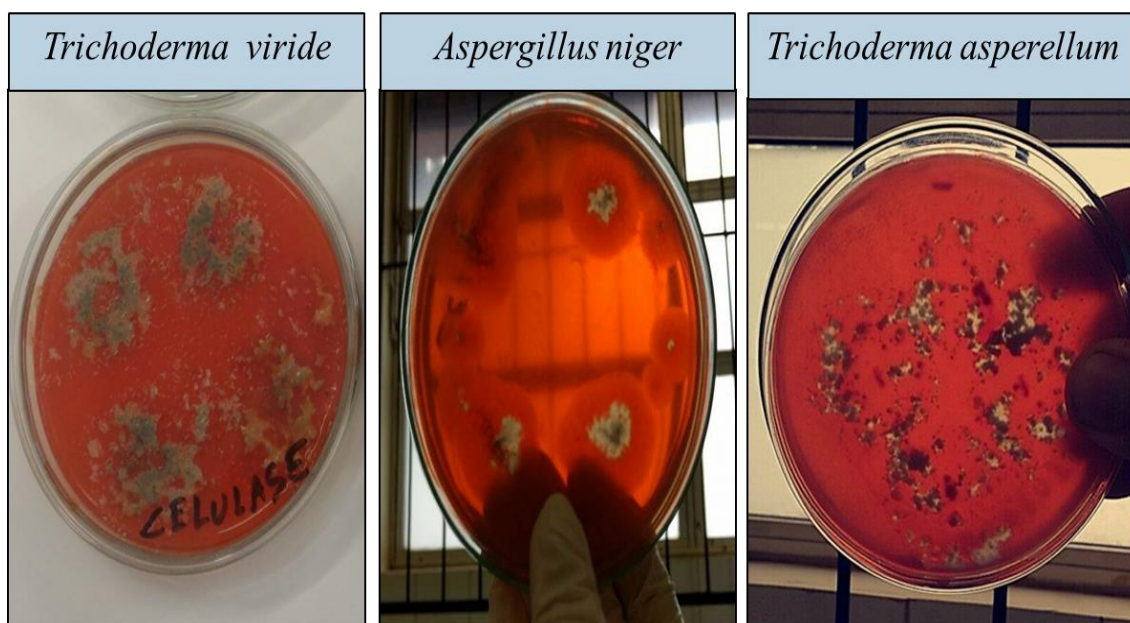
$$K_m = Ke \quad (3.11)$$

$$V_{emax} = k_2 \cdot [So] \quad (3.12)$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Screening de fungos

Foram avaliados três gêneros de fungos por meio de crescimento em placa e por observação nos halos formados da produção de enzima celulase por meio de coloração característica. Foram testadas três espécies de *Aspergillus niger*, sete fungos do gênero *Trichoderma*, além do *Penicillium sumatrense*, conforme descrição no item 3.1.2. A análise realizada foi qualitativa, verificando a presença de halos e a corrosão do meio contido nas placas de Petri. Portanto, através da Figura 4.1 é possível verificar a presença das enzimas celulases quando utilizadas as espécies *T. viride*, *A. niger* I e *T. asperellum*.



**Figura 4.1.** Espécies fúngicas produtoras das enzimas celulases. Fonte: Da autora.

Resultado semelhante ao presente estudo foi relatado por Florencio (2011), em seu estudo sobre microrganismos produtores de celulases, onde concluiu que a linhagem *Trichoderma* sp CG 104NH foi a melhor produtora de celulases, sendo a que mais se destacou entre as 78 linhagens nos processos quantitativos, coincidindo com a espécie utilizada no presente estudo. A autora

ainda conclui que o método *screening* pode ser utilizado para selecionar linhagens dentro de um grande banco de dados.

Scheufele (2012) em seu estudo sobre a Bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos do Bioma Amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas, concluiu que a espécie que mais se destacou na produção das enzimas celulasas foi a *Trichoderma* sp., coincidindo com a espécie utilizada no presente *screening* de fungos.

No presente estudo não houve a realização da medida dos halos, somente foi verificado sua presença ou ausência nas placas, mas revelou espécie *A. niger* I como sendo potencial produtora da enzima celulase, sendo semelhante ao estudo de Griebeler *et al.* (2015) que por meio de seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases, dos 180 isolados, 39 produziram as enzimas celulasas e o destaque na medição dos halos foi para *Aspergillus* sp, tendo 17,4 mm de halo,

Outro estudo que revela a espécie *Aspergillus* sp. como produtor enzimático é de Rosa *et al.* (2017). Os autores verificaram a produção de celulasas e formação de açúcares fermentescíveis pela degradação do bagaço de cana-de-açúcar e chegaram a conclusão que das seis espécies de fungos isoladas do bagaço de cana-de-açúcar a que obteve melhores resultados foi *Aspergillus* sp.

Estudo com resultados semelhantes ao presente trabalho foi de Sarsaiya *et al.* (2018) que estudaram a dinâmica da atividade de celulasas de fungos que habitam resíduos sólidos urbanos orgânicos, sendo isolados 82 espécies, as quais foram submetidas aos testes em placas com revelação em Vermelho Congo. As espécies que se destacaram como produtoras de celulasas foram *T. viride*, *A. niger*, *A. fumigatus* e *Fusarium oxysporum*.

#### **4.2. Produção de celulasas por FES**

Foram realizadas fermentações em estado sólido para a produção de enzimas celulasas utilizando capim elefante pré-tratado como substrato e cada um dos três fungos pré-selecionados. Essas fermentações foram feitas utilizando um planejamento experimental DCCR para cada fungo onde foram

avaliadas as condições de pH inicial e umidade inicial (U) da FES. Cada DCCR apresenta 11 ensaios e tendo como respostas as atividades de FPase e CMCase. As análises estatísticas dos planejamentos serão apresentadas separadamente para cada fungo.

#### 4.2.1. Planejamento DCCR da FES para o *Trichoderma viride*

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de atividade enzimática de FPase e CMCase produzidas por FES, no tempo de 48h, para o *T. viride* para o planejamento DCCR tendo como variáveis a umidade (U) e o pH.

Observa-se que as maiores atividades enzimáticas para ambas as enzimas ocorreram nos ensaios de triplicata do ponto central (ensaios 5, 6 e 7), tendo 80% de umidade inicial e pH inicial 5,0. Os valores variaram de 34,1 a 37,4 U g<sup>-1</sup> para FPase e 36,9 a 42,2 U g<sup>-1</sup> para CMCase.

**Tabela 4.1.** Matriz de dados do DCCR para o *Trichoderma viride*. Resultados de FPase e CMCase no tempo de 48h da FES

| Ensaio | U (%) | pH  | FPase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | CMCase<br>(U g <sup>-1</sup> ) |
|--------|-------|-----|-------------------------------|--------------------------------|
| 1      | 66    | 4,3 | 16,9                          | 5,0                            |
| 2      | 94    | 4,3 | 19,1                          | 3,4                            |
| 3      | 66    | 5,7 | 22,6                          | 14,9                           |
| 4      | 94    | 5,7 | 11,5                          | 19,8                           |
| 5      | 80    | 5   | 34,6                          | 42,2                           |
| 6      | 80    | 5   | 34,1                          | 36,9                           |
| 7      | 80    | 5   | 37,4                          | 38,5                           |
| 8      | 80    | 4   | 18,9                          | 9,8                            |
| 9      | 80    | 6   | 18,0                          | 12,5                           |
| 10     | 60    | 5   | 11,3                          | 3,3                            |
| 11     | 100   | 5   | 12,9                          | 9,8                            |

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram descritos por Xin *et al.* (2013), que estudaram a produção de bioetanol a partir de resíduos de hortaliças usando, para a hidrólise, misturas de enzimas fúngicas brutas produzidas por FES e obtiveram os melhores resultados utilizando 80% de umidade e pH 5,0 com a espécie fúngica *T. reesei*. Os autores obtiveram

menor atividade enzimática de Fpase ( $15 \text{ U g}^{-1}$ ) e maiores atividades de CMCase ( $90,5 \text{ U g}^{-1}$ ).

Segundo Scheufele (2012) estudando a bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas, chegou a conclusão que altos teores de umidade, em torno de 80%, proporcionaram maiores resultados na produção de celulasas na FES utilizando o gênero *Trichoderma* sp.

Florencio (2011) estudou microrganismos produtores de celulase por meio de seleção de isolados de *Trichoderma* sp. e concluiu que a linhagem, produz a maior quantidade de enzima na FES com umidade 80%, equivalendo com o resultado da presente pesquisa. Quando a fermentação foi submetida a umidade de 85% a autora observou uma queda significativa na produção da enzima CMCase. Nesse mesmo estudo a autora avaliou a atividade enzimática das enzimas FPase e CMCase utilizando o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, onde obteve resultados inferiores ao presente trabalho, obtendo FPase  $1,87 \text{ U g}^{-1}$  e CMCase  $25,93 \text{ U g}^{-1}$ .

Resultados semelhantes em relação a atividade enzimática da Fpase foram relatados por Scholl *et al.* (2015a) em seu estudo sobre Capim elefante pré-tratado por explosão a vapor para induzir a excreção de celulasas e xilanases pelo cultivo em estado sólido de *Penicillium echinulatum* S1M29, onde obteve para Fpase  $32,93 \text{ U g}^{-1}$ , sendo inferior ao encontrado no presente estudo que foi de  $35,36 \text{ U g}^{-1}$ . Nesse mesmo estudo a atividade enzimática da CMCase obtida foi de  $205,83 \text{ U g}^{-1}$  sendo superior ao presente trabalho que teve como em média no ponto central  $39,2 \text{ U g}^{-1}$ .

Juhász *et al.* (2004) avaliaram estratégias de controle de pH utilizando o fungo *T. reesei* e o melhor resultado para produção de celulase foi com pH 5,0, tendo os mesmos pH e fungo utilizados no presente estudo.

Segundo Astolfi *et al.* (2014), em seu estudo sobre a obtenção de CMCase por *T. reesei* por FES usando como substrato a casca de soja, concluíram que o pH ótimo para a enzima foi 4,6 e obtiveram uma quantidade de  $0,31 \text{ U mL}^{-1}$ . Tendo pH bem próximo ao verificado no presente estudo.

A Tabela 4.2 apresenta o cálculo dos efeitos que as variáveis pH e umidade iniciais, com os termos lineares (L) e quadráticos (Q), exercem sobre

as respostas das atividades enzimáticas de FPase e CMCase. O p-valor obtido para cada termo indica a significância ou não do efeito do termo sobre a resposta, sendo que quando o p-valor for menor que o nível de significância estabelecido na estatística (no caso,  $\alpha = 0,10$ ) o termo passa a ser significativo. Tanto para a FPase como para a CMCase, os dois termos quadráticos de pH e umidade são significativos e com efeito negativo, indicando que o aumento dessas variáveis no processo, a partir do ponto central, acarreta a diminuição de ambas as atividades de FPase e CMCase.

**Tabela 4.2.** Estimativa de efeitos e coeficientes da regressão quadrática do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o *Trichoderma viride* ( $\alpha = 0,10$ ).

| Variável            | Efeito |        | p-valor      |              | Coeficiente |        |
|---------------------|--------|--------|--------------|--------------|-------------|--------|
|                     | FPase  | CMCase | FPase        | CMCase       | FPase       | CMCase |
| Média/Intercepto    | 35,42  | 39,22  | 0,001        | 0,002        | 35,42       | 39,22  |
| (1) U (L)           | -1,61  | 3,11   | 0,328        | 0,244        | -0,81       | 1,55   |
| U (Q)               | -21,89 | -31,36 | <b>0,005</b> | <b>0,005</b> | -10,95      | -15,68 |
| (2) pH (L)          | -0,78  | 7,44   | 0,597        | <b>0,060</b> | -0,39       | 3,72   |
| pH (Q)              | -15,69 | -26,82 | <b>0,009</b> | <b>0,007</b> | -7,85       | -13,41 |
| Interação (1) x (2) | -6,62  | 3,21   | <b>0,066</b> | 0,357        | -3,31       | 1,61   |

Na Tabela 4.3 são mostrados os resultados da análise de variância (ANOVA) para ambas as respostas FPase e CMCase. O baixo p-valor da “regressão” ( $< 0,10$ ) e o alto p-valor da “falta de ajuste” ( $> 0,10$ ) indica que o modelo (regressão) estatístico (equações 4.1 e 4.2) gerado ajusta bem os resultados experimentais obtidos. Isso é corroborado pela análise dos resíduos gerados pelo modelo conforme o “gráfico dos resíduos vs valores preditos” (Figura 1 do Anexo) onde se observa a aleatoriedade dos resíduos em torno do zero indicando uma distribuição normal dos mesmos e também pela análise do “gráfico da probabilidade normal dos resíduos” (Figura 2 do Anexo) onde se observa que os resíduos brutos encontram-se dentro do espectro de resíduos padronizados (-1,96 à +1,96) de uma distribuição normal indicando a ausência de pontos influentes (valor extremo) ou valor atípico (*outlier*) (que significa uma observação com "alto" resíduo). Se um valor extremo for influente, ele interferiria sobre a função de regressão ajustada (a inclusão ou não do ponto modificaria substancialmente os valores ajustados).

$$\text{FPase (U g}^{-1}\text{)} = 35,42 - 0,81.U - 10,95.U^2 - 0,39.\text{pH} - 7,85.\text{pH}^2 - 3,31.U.\text{pH} \quad (4.1)$$

$$\text{CMCase (U g}^{-1}\text{)} = 39,22 + 1,55.U - 15,68.U^2 + 3,72.\text{pH} - 13,41.\text{pH}^2 + 1,611.U.\text{pH} \quad (4.2)$$

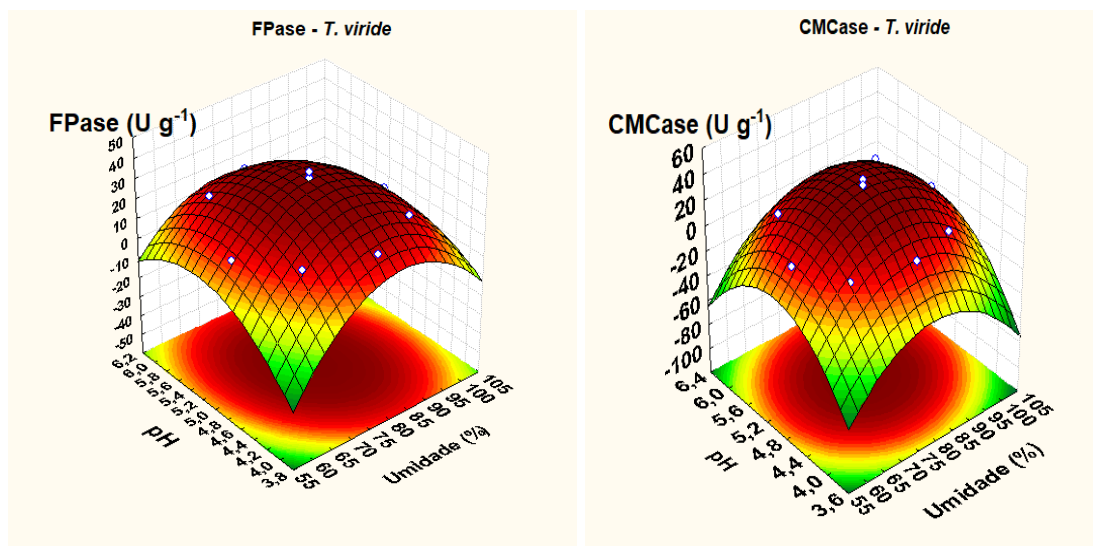
**Tabela 4.3.** Tabela ANOVA do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o *Trichoderma viride* ( $\alpha = 0,10$ ).

| Variável        | SQ      |          | GL | MQ      |          | Fcalc   |         | p-valor      |               |
|-----------------|---------|----------|----|---------|----------|---------|---------|--------------|---------------|
|                 | FPase   | CMCase   |    | FPase   | CMCase   | FPase   | CMCase  | FPase        | CMCase        |
| (1) U (L)       | 5,266   | 19,544   | 1  | 5,266   | 19,544   | 1,651   | 2,667   | 0,328        | 0,244         |
| U (Q)           | 695,799 | 1427,259 | 1  | 695,799 | 1427,259 | 218,171 | 194,797 | 0,005        | 0,005         |
| (2)pH (L)       | 1,240   | 111,899  | 1  | 1,240   | 111,899  | 0,389   | 15,272  | 0,597        | 0,060         |
| pH (Q)          | 357,494 | 1044,068 | 1  | 357,494 | 1044,068 | 112,094 | 142,498 | 0,009        | 0,007         |
| 1L x 2L         | 43,876  | 10,327   | 1  | 43,876  | 10,327   | 13,757  | 1,409   | 0,066        | 0,357         |
| Regressão       | 877,306 | 2048,242 | 5  | 175,461 | 409,648  | 30,211  | 55,910  | <b>0,001</b> | <b>0,0002</b> |
| Falta de ajuste | 22,661  | 71,203   | 3  | 7,554   | 23,734   | 2,369   | 3,239   | <b>0,311</b> | <b>0,245</b>  |
| Erro puro       | 6,378   | 14,654   | 2  | 3,189   | 7,327    |         |         |              |               |
| Resíduos        | 29,040  | 85,857   | 5  | 5,808   | 17,171   |         |         |              |               |
| Total           | 906,345 | 2134,098 | 10 |         |          |         |         |              |               |

FPase:  $R^2 = 0,96796$ ;  $R^2_{\text{Ajust}} = 0,93592$  CMCase:  $R^2 = 0,95977$ ;  $R^2_{\text{Ajust}} = 0,91954$   
 $F_{\text{Tab}}(5;5;0,05)=5,05$  Teste F p/ Regressão: FPase:  $F_{\text{calc}}/F_{\text{Tab}}=5,98$  CMCase:  $F_{\text{calc}}/F_{\text{Tab}}=11,1$

Por outro lado, os elevados valores dos coeficientes de determinação do modelo  $R^2$  e a sua proximidade com o  $R^2$  ajustado ( $R^2_{\text{Ajust}}$ ) indicam um bom ajuste das regressões. Além disso, o teste F para regressão resulta na relação  $F_{\text{calc}}/F_{\text{Tab}}$  de 5,98 para a FPase e 11,1 para CMCase as quais são elevadas atestando a validade de ambos os modelos obtidos (Montgomery, 2013). A Figura 4.2 mostra as respectivas superfícies de resposta onde verificam-se picos de produção das enzimas próximo do ponto central.

Os melhores resultados experimentais obtidos de atividade da FPase (média  $35,4 \pm 1,78$ ) e da CMCase (média  $39,2 \pm 2,72$ ) foram no ponto central (ensaios 5, 6 e 7) com 80% de umidade e pH 5,0. Por meio de dupla integração das equações (4.1) e (4.2) pode-se determinar os pontos de máximo (pontos críticos) previstos pelos modelos (Tabela 4.4), onde se verifica a proximidade com os resultados experimentais.



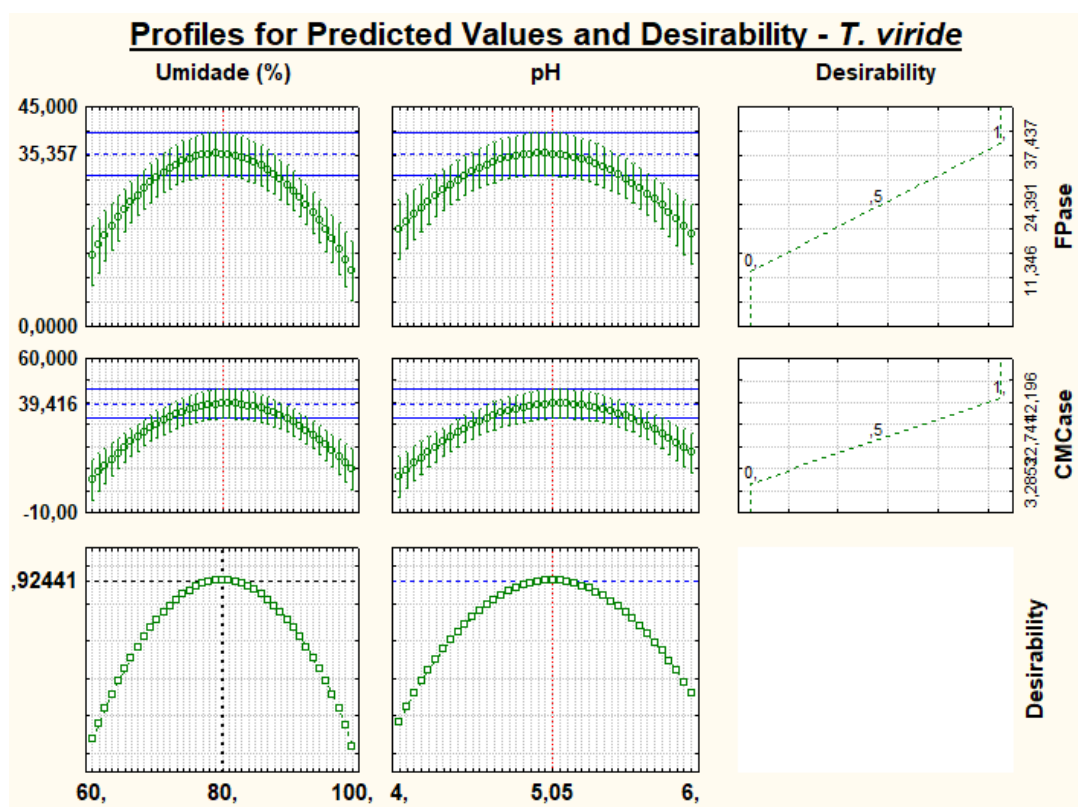
**Figura 4.2.** Superfície de resposta da FPase e CMCase do planejamento DCCR para a FES com o *Trichoderma viride*

**Tabela 4.4.** Valores críticos para a umidade e pH no ponto de máximo predito pelo modelo quadrático e valores de atividade obtidos para a FES com *T. viride*.

| Enzima (máx. predito)             | U (%) | pH   |
|-----------------------------------|-------|------|
| FPase (35,44 U g <sup>-1</sup> )  | 79,52 | 4,98 |
| CMCase (39,53 U g <sup>-1</sup> ) | 80,79 | 5,10 |
| Enzima (obtida FES)               | U (%) | pH   |
| FPase (35,36 U g <sup>-1</sup> )  | 80    | 5,0  |
| CMCase(39,2 U g <sup>-1</sup> )   | 80    | 5,0  |

Um cálculo que permite a determinação do ponto ótimo que satisfaça simultaneamente as duas respostas é o da função desejabilidade (*desirability*). Quando se tem mais de uma variável de resposta, geralmente está-se interessado em encontrar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes. Para isso, o primeiro passo é determinar o modelo apropriado para descrever as variáveis de resposta e então encontrar uma série de condições operacionais que otimize todas as respostas ou, no mínimo, mantenha-as em faixas desejáveis. A busca dessa faixa desejável pode ser feita graficamente, através da superposição das curvas de nível para todas as respostas onde se usa o procedimento da

otimização com restrição (BARROS NETO *et al.*, 2007). Assim, a Figura 4.3 apresenta os valores dos pontos ótimos das 2 variáveis de resposta: FPase = 35,36 U.g<sup>-1</sup>, CMCase = 39,42, e as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas: U = 80% e pH = 5,05. A função desejabilidade global neste caso foi de 0,9244.



**Figura 4.3:** Perfis de valores preditos da FPase e CMCase e desejabilidade do DCCR para a FES com o *Trichoderma viride* ( $\alpha = 0,10$ ).

#### 4.2.2. Planejamento DCCR da FES para o *Trichoderma asperellum*

A Tabela 4.5 apresenta os resultados de atividade enzimática de FPase e CMCase produzidas por FES, no tempo de 48h, para o *T. asperellum*. Observa-se, assim como para o *T. viride*, que as maiores atividades enzimáticas para a FPase ocorreram nos ensaios de triplicata do ponto central (ensaios 5, 6 e 7), tendo 80% de umidade inicial, porém com pH inicial 7,0. Os valores variaram de 19,3 a 22,2 U g<sup>-1</sup>. Para a CMCase o melhor resultado foi obtido no ensaio 11 (42,6 U g<sup>-1</sup>) com umidade inicial de 100% e pH 7,0.

**Tabela 4.5.** Matriz de dados do DCCR para a FES com o *Trichoderma asperellum*. Resultados de FPase e CMCase no tempo de 48h da FES.

| Ensaio | Umidade (%) | pH  | FPase (U g <sup>-1</sup> ) | CMCase (U g <sup>-1</sup> ) |
|--------|-------------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| 1      | 66          | 5,6 | 9,3                        | 13,0                        |
| 2      | 94          | 5,6 | 12,9                       | 17,2                        |
| 3      | 66          | 8,4 | 10,1                       | 5,6                         |
| 4      | 94          | 8,4 | 11,4                       | 17,9                        |
| 5      | 80          | 7   | 20,9                       | 29,3                        |
| 6      | 80          | 7   | 22,2                       | 31,1                        |
| 7      | 80          | 7   | 19,3                       | 27,0                        |
| 8      | 80          | 5   | 7,9                        | 10,2                        |
| 9      | 80          | 9   | 11,9                       | 2,6                         |
| 10     | 60          | 7   | 9,8                        | 15,7                        |
| 11     | 100         | 7   | 9,1                        | 42,6                        |

Estudos realizados por Raghuwanshi *et al.* (2014) sobre bioprocessamento da produção de celulasas a partir de um mutante de *Trichoderma asperellum* RCK2011 e sua aplicação na hidrólise da celulose, utilizando como substrato a espiga de milho obtiveram valores inferiores nas atividades enzimáticas das celulasas. Os melhores resultados foram FPase 2,2 U g<sup>-1</sup> e CMCase 13,2 U g<sup>-1</sup>, enquanto no presente estudo as atividades de FPase e CMCase foram 20,8 U g<sup>-1</sup> e 42,6 U g<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesse mesmo estudo foram avaliados os parâmetros umidade e pH. Os autores obtiveram 90% de atividade ótima quando o pH variou de 4,0 a 9,0, estando a variável pH 7,0 do presente estudo dentro da variação estudada pelos autores. A umidade ideal nesse estudo foi de 1:2,5, e quando se submeteu um nível maior de umidade os valores de atividade enzimática sofreram queda.

O parâmetro pH foi avaliado por Ibrahim *et al.* (2013) em seu estudo sobre celulase bruta de óleo de palma pelo *Trichoderma asperellum* UPM1 e *Aspergillus fumigatus* UPM2 para produção de açúcares fermentescíveis onde obtiveram melhores resultados de atividade enzimática para FPase (0,8 U ml<sup>-1</sup>) e CMCase (24,7 U ml<sup>-1</sup>) em pH 7,0 utilizando a espécie *Trichoderma asperellum* UPM1 coincidindo com o pH do presente estudo.

Valores muito superiores em relação a atividade enzimática da CMCase foram relatados por Nava-Cruz *et al.* (2016) em seu estudo sobre *Agave*

*atrovirens* (planta nativa do México) como substrato e suporte por fermentação em estado sólido para produção de celulasas por *T. asperellum*, onde obtiveram com 216 horas de fermentação atividade enzimática de 12. 860,8 U g<sup>-1</sup>. Os autores utilizaram umidade 80%, a mesma utilizada no presente estudo.

A Tabela 4.6 apresenta o cálculo dos efeitos que as variáveis pH e umidade iniciais, com os termos lineares (L) e quadráticos (Q), exercem sobre as respostas das atividades enzimáticas de FPase e CMCase no nível de significância estabelecido ( $\alpha = 0,10$ ). Para a FPase os dois termos quadráticos de pH e umidade são significativos e com efeito negativo, indicando que o aumento dessas variáveis no processo, a partir do ponto central, acarreta a diminuição de ambas as atividades de FPase e CMCase. Para a CMCase o pH foi significativo, tanto para o termo linear como para o termo quadrático com efeito negativo. A umidade apresentou efeito linear significativo e positivo.

**Tabela 4.6.** Tabela de efeitos e coeficientes da regressão quadrática do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o *Trichoderma asperellum* ( $\alpha = 0,10$ ).

| Variável          | Efeito |        | p-valor        |                | Coeficiente |        |
|-------------------|--------|--------|----------------|----------------|-------------|--------|
|                   | FPase  | CMCase | FPase          | CMCase         | FPase       | CMCase |
| Média/Intercepto  | 20,81  | 29,05  | 0,00168        | 0,00169        | 20,81       | 29,05  |
| (1) U (L)         | 0,96   | 13,60  | 0,45051        | <b>0,01131</b> | 0,48        | 6,80   |
| U (Q)             | -10,60 | -2,17  | <b>0,01316</b> | 0,33393        | -5,30       | -1,08  |
| (2) pH (L)        | 1,26   | -4,35  | 0,34794        | <b>0,09621</b> | 0,63        | -2,17  |
| pH (Q)            | -10,19 | -24,44 | <b>0,01423</b> | <b>0,00491</b> | -5,09       | -12,22 |
| Interação (1)x(2) | -1,19  | 4,00   | 0,50448        | 0,19339        | -0,59       | 2,00   |

Na Tabela 4.7 são mostrados os resultados da análise de variância (ANOVA) para ambas as respostas FPase e CMCase. Assim como para o *Trichoderma viride*, o baixo p-valor da “regressão” ( $< 0,10$ ) e o alto p-valor da “falta de ajuste” ( $> 0,10$ ) indica que o modelo (regressão) estatístico (equações 4.3 e 4.4) gerado ajusta bem os resultados experimentais obtidos. Isso é corroborado pela análise dos resíduos gerados pelo modelo conforme o “gráfico dos resíduos vs valores preditos” (Figura 3 do Anexo) onde se observa a aleatoriedade dos resíduos em torno do zero indicando uma distribuição normal dos mesmos (menos evidente para a CMCase) e também pela análise

do “gráfico da probabilidade normal dos resíduos” (Figura 4 do Anexo) onde se observa que os resíduos brutos encontram-se dentro do espectro de resíduos padronizados (-1,96 à +1,96) de uma distribuição normal indicando a ausência de pontos influentes (valor extremo) ou valor atípico (*outlier*).

$$FPase (U g^{-1}) = 20,81 + 0,48.U - 5,3.U^2 + 0,63.pH - 5,09.pH^2 - 0,59.U.pH \quad (4.3)$$

$$CMCase (U g^{-1}) = 29,05 + 6,80.U - 1,08.U^2 - 2,17.pH - 12,22.pH^2 + 2,00.U.pH \quad (4.4)$$

Por outro lado, os valores dos coeficientes de determinação do modelo  $R^2$ , tanto para a FPase como para a CMCase, não foram tão bons quanto os obtidos para o fungo *T. viride* indicando um menor ajuste das regressões. Além disso, o teste F para regressão resultou na relação  $F_{calc}/F_{Tab}$  de 3,06 para a FPase e 2,43 para CMCase valores considerados baixos para fins de validação dos modelos obtidos (Montgomery, 2013).

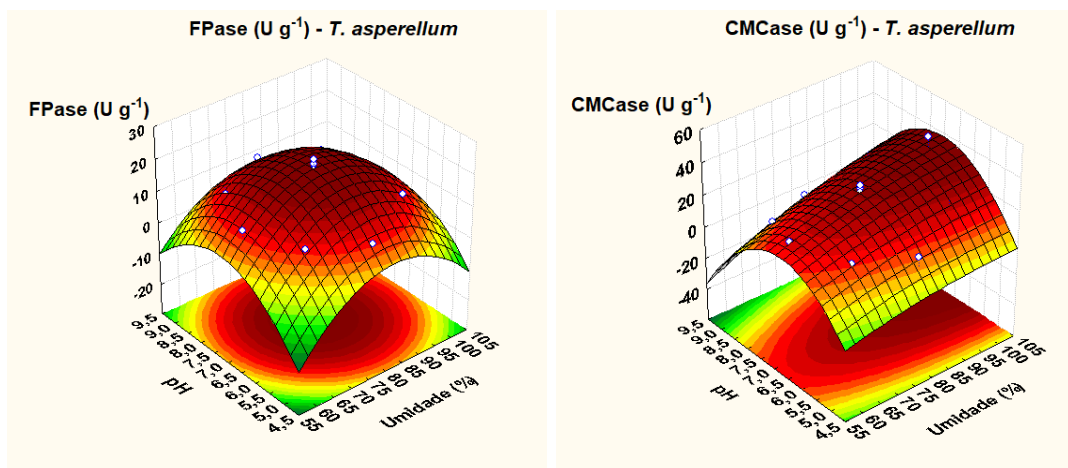
**Tabela 4.7.** ANOVA do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o *Trichoderma asperellum* ( $\alpha = 0,10$ ).

| Variável        | SQ     |         | GL | MQ     |        | Fcalc |        | p-valor |        |
|-----------------|--------|---------|----|--------|--------|-------|--------|---------|--------|
|                 | FPase  | CMCase  |    | FPase  | CMCase | FPase | CMCase | FPase   | CMCase |
| (1) U (L)       | 1,90   | 373,59  | 1  | 1,90   | 373,59 | 0,87  | 86,94  | 0,4505  | 0,0113 |
| U (Q)           | 163,28 | 6,85    | 1  | 163,28 | 6,85   | 74,48 | 1,59   | 0,0131  | 0,3339 |
| (2) pH (L)      | 3,24   | 38,33   | 1  | 3,24   | 38,33  | 1,48  | 8,92   | 0,3479  | 0,0962 |
| pH (Q)          | 150,81 | 867,11  | 1  | 150,81 | 867,11 | 68,79 | 201,79 | 0,0142  | 0,0049 |
| 1L x 2L         | 1,43   | 16,00   | 1  | 1,43   | 16,00  | 0,65  | 3,72   | 0,5044  | 0,1933 |
| Regressão       | 247,69 | 1338,85 | 5  | 49,54  | 267,77 | 15,44 | 12,26  | 0,005   | 0,0078 |
| Falta de ajuste | 11,66  | 100,60  | 3  | 3,89   | 33,53  | 1,77  | 7,80   | 0,3805  | 0,1157 |
| Erro puro       | 4,38   | 8,59    | 2  | 2,19   | 4,30   |       |        |         |        |
| Resíduos        | 16,04  | 109,20  | 5  | 3,21   | 21,84  |       |        |         |        |
| Total           | 263,73 | 1448,04 | 10 |        |        |       |        |         |        |

FPase:  $R^2=0,93918$ ;  $R^2_{Ajust}=0,87835$  CMCase:  $R^2=0,92459$ ;  $R^2_{Ajust}=0,84918$   
 $F_{Tab}(5;5;0,05)=5,05$  Teste F p/ Regressão: FPase:  $F_{calc}/F_{Tab}=3,06$  CMCase:  $F_{calc}/F_{Tab}=2,43$

A Figura 4.4 apresenta as respectivas superfícies de resposta onde verifica-se picos de produção das enzimas próximo do ponto central para a FPase. Para a CMCase verifica-se uma superfície de resposta com formato de

cela onde valores crescentes de umidade induzem aumento na atividade de forma linear e significativa ( $p$ -valor = 0,011) e valores de pH com influência não linear altamente significativa ( $p$ -valor = 0,00491). Os melhores resultados experimentais obtidos de atividade da FPase (média  $20,8 \pm 1,48$ ) foram no ponto central (ensaios 5, 6 e 7) com 80% de umidade e pH 7,0. Para a CMCase o melhor resultado experimental ( $42,6 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtido no ensaio 11 com  $U = 100\%$  e pH 7,0. Por meio de dupla integração das equações (4.3) e (4.4) pode-se determinar os pontos de máximo (pontos críticos) previstos pelos modelos (Tabela 4.8), onde se verifica a proximidade com os resultados experimentais para a FPase. Para a CMCase o valor da umidade crítica encontra-se fora da faixa de trabalho do planejamento (60 à 100%).

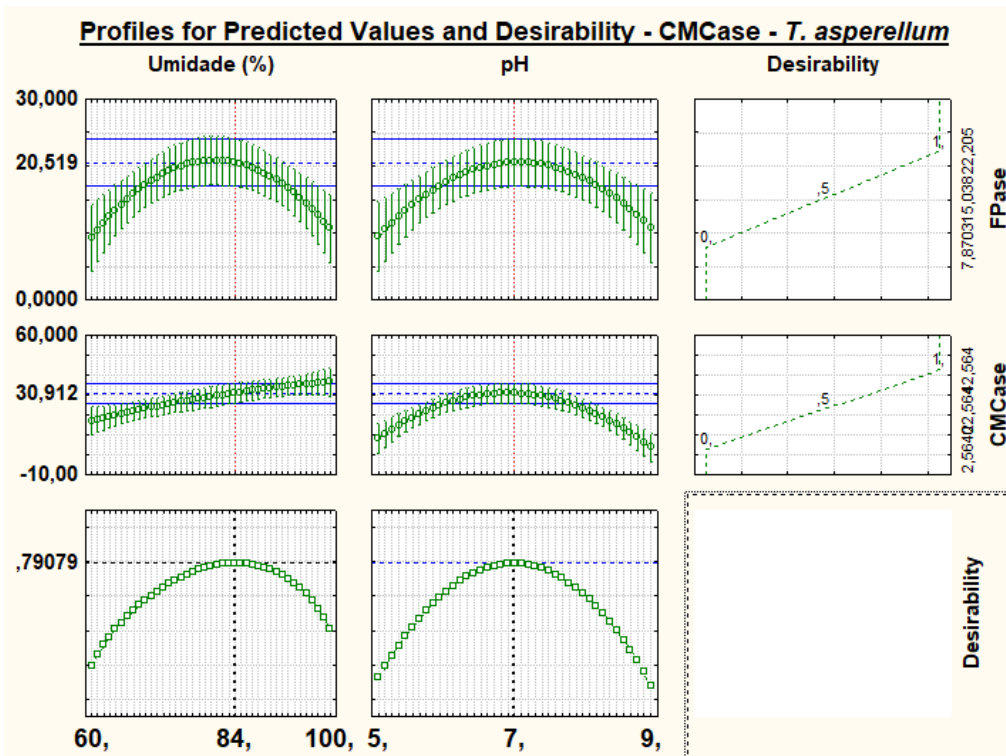


**Figura 4.4.** Superfície de resposta da FPase e CMCase do planejamento DCCR para a FES com o *Trichoderma asperellum*

**Tabela 4.8.** Valores críticos para a umidade e pH no ponto de máximo predito pelo modelo quadrático e valores de atividade obtidos para a FES com *T. asperellum*.

| Enzima (máx. predito)               | U (%)  | pH   |
|-------------------------------------|--------|------|
| FPase ( $20,84 \text{ U g}^{-1}$ )  | 80,59  | 7,08 |
| CMCase ( $40,06 \text{ U g}^{-1}$ ) | 126,13 | 7,25 |
| Enzima (obtida FES)                 | U (%)  | pH   |
| FPase ( $20,8 \text{ U g}^{-1}$ )   | 80     | 7,0  |
| CMCase ( $42,6 \text{ U g}^{-1}$ )  | 80     | 7,0  |

Assim, a Figura 4.5 apresenta os valores dos pontos ótimos das 2 variáveis de resposta: FPase = 20,52 U.g<sup>-1</sup>, CMCase = 30,91 U.g<sup>-1</sup>, e as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas: U = 84% e pH = 7,0. A função desejabilidade global neste caso foi de 0,79079.



**Figura 4.5.** Perfis de valores preditos da FPase e CMCase e desejabilidade do DCCR para a FES com o *Trichoderma asperellum* ( $\alpha = 0,10$ ).

#### 4.2.3. Planejamento DCCR da FES para o *A. niger* I

A Tabela 4.9 apresenta os resultados de atividade enzimática de FPase e CMCase produzidas por FES, no tempo de 48h, para o *A. niger* I. Observa-se, assim como para o *T. viride* e *T. asperellum*, que as maiores atividades enzimáticas para a FPase ocorreram nos ensaios de triplicata do ponto central (ensaios 5, 6 e 7), tendo 80% de umidade inicial, porém com pH inicial 6,0. Os valores variaram de 14,6 a 16,7 U g<sup>-1</sup>. Para a CMCase o melhor resultado foi obtido no ensaio 11 (25,2 U g<sup>-1</sup>) com umidade inicial de 100% e pH 6,0.

Em estudos realizados por Dhillon *et al.* (2011) sobre agregação de valor a resíduos agrícolas para produção de celulase xilanase via FES utilizando

cultura mista de fungos, foram observados valores semelhantes quanto a atividade enzimática de FPase. Os autores utilizaram a espécie fúngica *A. niger* e, como substrato uma mistura na proporção de 3:2 de palha de arroz e farelo de trigo, obtendo atividade enzimática para FPase de  $13,57 \text{ U g}^{-1}$ , estando próximas do presente estudo, que foi de  $15,63 \text{ U g}^{-1}$ . Para CMCase, os autores obtiveram atividade de  $89,54 \text{ U g}^{-1}$ , superiores aos encontrados no presente trabalho.

**Tabela 4.9.** Matriz de dados do DCCR para a FES com o *A. niger* I. Resultados de FPase e CMCase no tempo de 48h da FES.

| Ensaio | Umidade (%) | pH  | FPase ( $\text{U g}^{-1}$ ) | CMCase ( $\text{U g}^{-1}$ ) |
|--------|-------------|-----|-----------------------------|------------------------------|
| 1      | 66          | 4,6 | 7,3                         | 2,4                          |
| 2      | 94          | 4,6 | 7,2                         | 1,6                          |
| 3      | 66          | 7,4 | 3,3                         | 12,0                         |
| 4      | 94          | 7,4 | 10,3                        | 9,3                          |
| 5      | 80          | 6   | 15,6                        | 19,8                         |
| 6      | 80          | 6   | 16,7                        | 17,3                         |
| 7      | 80          | 6   | 14,6                        | 18,1                         |
| 8      | 80          | 4   | 7,6                         | 4,6                          |
| 9      | 80          | 8   | 2,5                         | 3,7                          |
| 10     | 60          | 6   | 6,6                         | 1,5                          |
| 11     | 100         | 6   | 12,9                        | 25,2                         |

Valores semelhantes para atividade enzimática de FPase também foram encontrados nos estudos realizados por Facchini *et al.* (2011) que estudaram a produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* C03 utilizando resíduos agroindustriais, tendo como resultado  $19,38 \text{ U g}^{-1}$  de FPase para farelo de trigo e utilizando umidade em torno de 70%.

Em relação aos valores de atividade enzimática de CMCase, pode-se citar Senna (2014) que estudou o isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais. Nesse trabalho o valor de atividade enzimática de CMCase foi inferior ao encontrado neste trabalho, obtendo  $5,90 \text{ U g}^{-1}$  utilizando como substrato o farelo de trigo e a linhagem de *Aspergillus* sp 1 IP8-A1.

Ibrahim *et al.* (2013) em seu estudo sobre celulase bruta de óleo de palma pelo *T. asperellum* UPM1 e *A. fumigatus* UPM2 para produção de

açúcares fermentescíveis obtiveram melhores resultados de atividade enzimática para FPase (1,7 U ml<sup>-1</sup>) e CMCase (24,2 U ml<sup>-1</sup>) em pH 6,0 quando a espécie *A. fumigatus* UPM2 foi avaliada, coincidindo com o pH deste estudo.

Segundo Mrudula & Murugammal (2011), que estudaram a produção de celulase utilizando *A. niger* na FES, o pH ideal para a produção da enzima encontra-se em 6,0, coincidindo com o pH do presente estudo. Os autores também avaliaram a atividade enzimática de Fpase (3,56 U g<sup>-1</sup>) e CMCase (8,89 U g<sup>-1</sup>), tendo resultados inferiores ao presente estudo, tanto para Fpase (15,63 U g<sup>-1</sup>) quanto para CMCase (25,2 U g<sup>-1</sup>).

A Tabela 4.10 apresenta o cálculo dos efeitos das variáveis pH e umidade inicial para as atividades enzimáticas de FPase e CMCase para  $\alpha = 0,10$ . Para a FPase a umidade foi significativa afetando positivamente de forma linear e negativamente de forma não linear (quadrática) a partir do ponto central e o pH afetou negativamente de forma não linear. Para a CMCase ambas as variáveis foram significativas com maior ênfase na influência negativa do pH não linear.

**Tabela 4.10.** Tabela de efeitos e coeficientes da regressão quadrática do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o *A. niger* I ( $\alpha = 0,10$ ).

| Variável            | Efeito |        | p-valor         |                 | Coeficiente |        |
|---------------------|--------|--------|-----------------|-----------------|-------------|--------|
|                     | FPase  | CMCase | FPase           | CMCase          | FPase       | CMCase |
| Média/Intercepto    | 15,59  | 18,36  | 0,001465        | 0,001591        | 15,59       | 18,36  |
| (1)U (L)            | 3,89   | 7,51   | <b>0,033279</b> | <b>0,013854</b> | 1,94        | 3,75   |
| U (Q)               | -5,98  | -6,17  | <b>0,019968</b> | <b>0,027990</b> | -2,99       | -3,08  |
| (2)pH (L)           | -2,02  | 3,94   | 0,108631        | <b>0,047727</b> | -1,01       | 1,97   |
| pH (Q)              | -10,59 | -15,23 | <b>0,006509</b> | <b>0,004761</b> | -5,29       | -7,61  |
| Interação (1) x (2) | 3,57   | -0,98  | <b>0,074455</b> | 0,519286        | 1,78        | -0,49  |

Na Tabela 4.11 são mostrados os resultados da ANOVA para ambas as respostas FPase e CMCase. Pode-se observar que apenas a FPase apresentou ajuste aos dados experimentais pois o p-valor da regressão (equação 4.5) foi menor que 0,01 e o p-valor da falta de ajuste foi maior que 0,01. Para a CMCase não se verificou ajuste.

Para a FPase, isso fica evidenciado pela análise dos resíduos gerados pelo modelo conforme o “gráfico dos resíduos vs valores preditos” (Figura 5 do Anexo) onde se observa a aleatoriedade dos resíduos em torno do zero indicando uma distribuição normal dos mesmos e também pela análise do “gráfico da probabilidade normal dos resíduos” (Figura 6 do Anexo) onde se observa a ausência de *outliers*. Para a CMCase fica evidente na Figura 6 a tendência não linear na distribuição dos resíduos.

$$FPase (U g^{-1}) = 15,59 + 1,94.U - 2,99.U^2 - 1,01.pH - 5,29.pH^2 + 1,78.U.pH \quad (4.5)$$

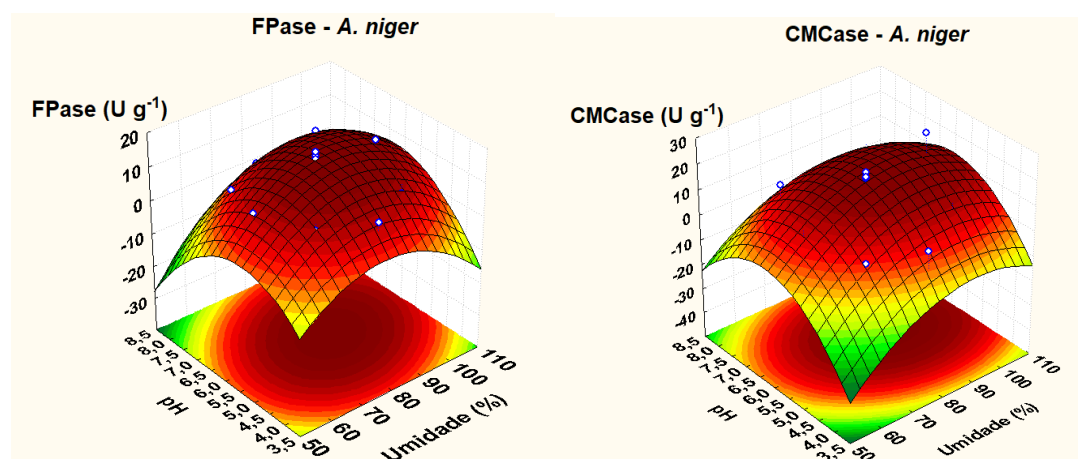
**Tabela 4.11.** ANOVA do DCCR de ambas as enzimas para a FES com o *A. niger* I ( $\alpha = 0,10$ )

| Variável        | SQ     |        | GL | MQ     |        | Fcalc  |        | p-valor |        |
|-----------------|--------|--------|----|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
|                 | FPase  | CMCase |    | FPase  | CMCase | FPase  | CMCase | FPase   | CMCase |
| (1)Umid (L)     | 30,60  | 114,11 | 1  | 30,60  | 114,11 | 28,56  | 70,69  | 0,0332  | 0,0138 |
| Umid (Q)        | 52,06  | 55,26  | 1  | 52,06  | 55,26  | 48,59  | 34,23  | 0,0199  | 0,0279 |
| (2)pH (L)       | 8,29   | 31,42  | 1  | 8,29   | 31,42  | 7,73   | 19,46  | 0,1086  | 0,0477 |
| pH (Q)          | 163,01 | 336,63 | 1  | 163,01 | 336,63 | 152,13 | 208,53 | 0,0065  | 0,0047 |
| 1L x 2L         | 12,80  | 0,97   | 1  | 12,80  | 0,97   | 11,95  | 0,60   | 0,0744  | 0,5192 |
| Regressão       | 227,02 | 487,00 | 5  | 45,40  | 97,40  | 27,84  | 2,12   | 0,0011  | 0,2147 |
| Falta de ajuste | 6,01   | 226,65 | 3  | 2,00   | 75,55  | 1,87   | 46,80  | 0,3669  | 0,0209 |
| Erro puro       | 2,14   | 3,23   | 2  | 1,07   | 1,61   |        |        |         |        |
| Resíduos        | 8,16   | 229,88 | 5  | 1,63   | 45,98  |        |        |         |        |
| Total           | 235,18 | 716,87 | 10 |        |        |        |        |         |        |

FPase:  $R^2 = 0,96532$ ;  $R^2_{Ajust} = 0,93064$  CMCase:  $R^2 = 0,67933$ ;  $R^2_{Ajust} = 0,35867$   
 $F_{Tab}(5;5;0,05)=5,05$  Teste F p/ Regressão: FPase:  $F_{calc}/F_{Tab}=5,51$  CMCase:  $F_{calc}/F_{Tab}=0,42$

Para a FPase os elevados valores dos coeficientes de determinação do modelo  $R^2$  e a sua proximidade com o  $R^2$  ajustado ( $R^2_{Ajust}$ ) indicam um bom ajuste da regressão. Além disso, o teste F para regressão resulta na relação  $F_{calc}/F_{Tab}$  de 5,51 para a FPase a qual é elevada atestando a validade do modelo obtido (Montgomery, 2013). A Figura 4.6 mostra as respectivas superfícies de resposta da FPase e da CMCase onde verificam-se picos de produção das enzimas próximo do ponto central para a FPase. Para a CMCase verifica-se uma superfície de resposta com formato com tendência de sela onde valores crescentes de umidade induzem aumento na atividade de forma linear e significativa ( $p$ -valor = 0,0138) e valores de pH com influência não

linear altamente significativa ( $p\text{-valor} = 0,0047$ ). Assim como para o *T. asperellum*, os melhores resultados experimentais obtidos de atividade da FPase (média  $15,63 \pm 1,05$ ) foram no ponto central (ensaios 5, 6 e 7) com 80% de umidade inicial porém com pH inicial 6,0. Da mesma forma, para a CMCase o melhor resultado experimental ( $25,2 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtido no ensaio 11 com  $U = 100\%$  e pH 6,0. Os pontos críticos são apresentados na Tabela 4.12, onde se verifica a proximidade com os resultados experimentais para a FPase. Para a CMCase o valor da umidade crítica é de 88,40% e pH 6,15 com valor inferior de atividade ( $19,60 \text{ U g}^{-1}$ ) decorrente do ajuste não satisfatório do modelo gerado.



**Figura 4.6.** Superfície de resposta da FPase e CMCase do DCCR para a FES com o *A. niger* I

**Tabela 4.12.** Valores críticos para a umidade e pH no ponto de máximo predito pelo modelo quadrático e valores de atividade obtidos para a FES com *A. niger* I.

| Enzima (máx. predito)               | U (%) | pH   |
|-------------------------------------|-------|------|
| FPase ( $15,92 \text{ U g}^{-1}$ )  | 84,37 | 5,94 |
| CMCase ( $19,60 \text{ U g}^{-1}$ ) | 88,40 | 6,15 |
| Enzima (obtida FES)                 | U (%) | pH   |
| FPase ( $15,63 \text{ U g}^{-1}$ )  | 80    | 6,0  |
| CMCase ( $25,2 \text{ U g}^{-1}$ )  | 80    | 6,0  |

A Figura 4.7 apresenta os valores dos pontos ótimos das 2 variáveis de resposta: FPase = 15,83 U.g<sup>-1</sup>, CMCase = 19,49 U.g<sup>-1</sup>, e as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas: U = 86% e pH = 6,1. A função desejabilidade global neste caso foi de 0,84532.

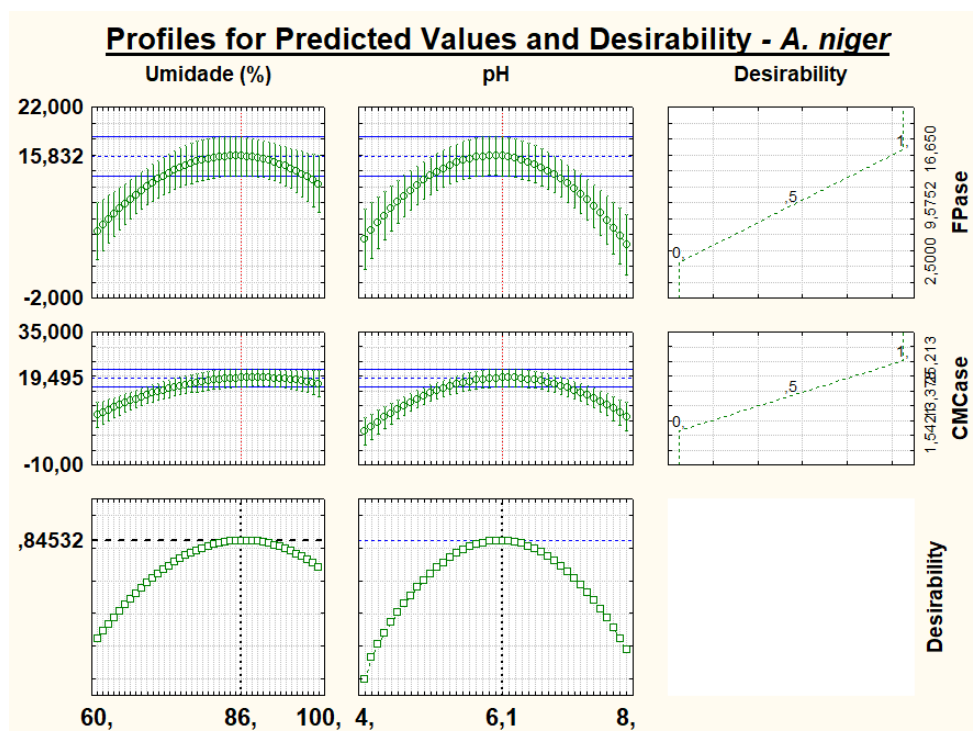


Figura 4.7: Perfis de valores preditos da FPase e CMCase e desejabilidade do DCCR para a FES com o *A. niger* I ( $\alpha = 0,10$ ).

#### 4.3. Cinética da produção das enzimas na condição ótima

Nos pontos ótimos de operação determinados nos planejamentos DCCR para cada fungo (Tabela 4.13), foram feitas replicatas (triplicata) das fermentações em estado sólido para os três fungos, considerando a cinética da fermentação até o tempo de 168h (7 dias).

Pode-se observar (Figuras 4.8, 4.9 e 4.10) que no tempo de 48h se verifica o pico de produção da enzima com valores das atividades enzimáticas próximas as obtidas nos planejamentos experimentais (DCCR) para ambas as enzimas e os três fungos, confirmando assim o estudo de otimização. Observa-se também que a concentração dos açúcares redutores decresce ao longo da FES, como era esperado. A Tabela 4.14 apresenta os resultados das

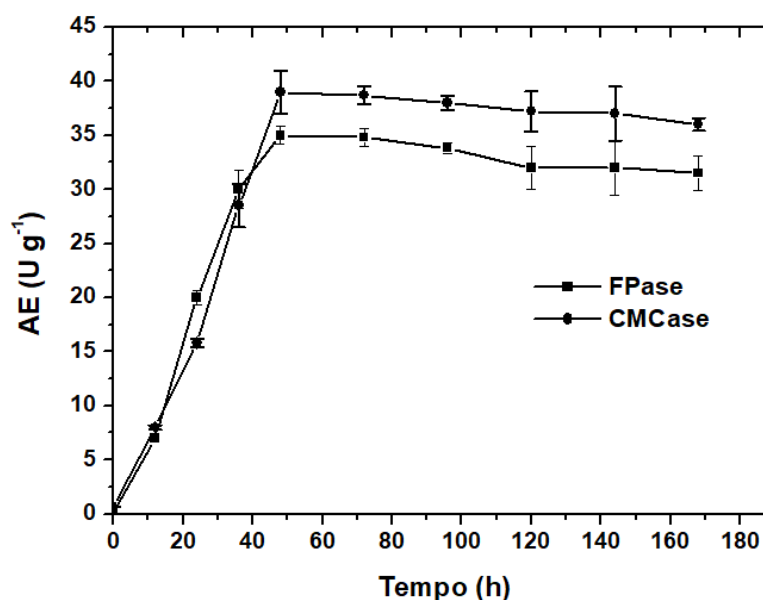
atividades enzimáticas da FPase e da CMCase para os três fungos na FES no tempo de 48h, conforme obtido nas Figuras 4.8 à 4.10.

**Tabela 4.13.** Valores ótimos de operação (umidade e pH inicial) determinados nos planejamentos DCCR para os três fungos.

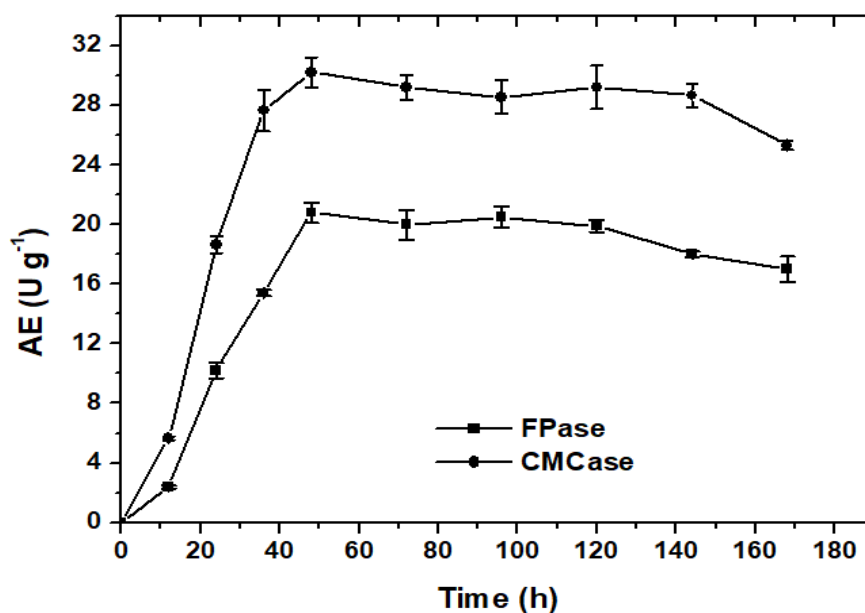
| Fungo                | U (%) | pH  | Desejabilidade |
|----------------------|-------|-----|----------------|
| <i>T. viride</i>     | 80    | 5,0 | 0,924          |
| <i>T. asperellum</i> | 84    | 7,0 | 0,791          |
| <i>A. Niger</i> I    | 86    | 6,0 | 0,845          |

**Tabela 4.14.** Resultados de atividade enzimática da cinética de ambas as enzimas para os três fungos na FES no tempo de 48h.

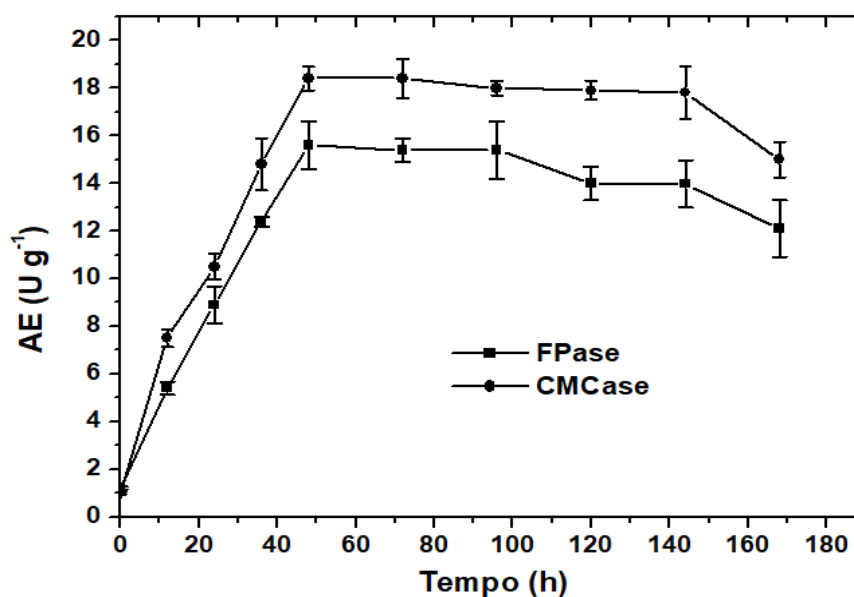
| Fungo                | AE FPase ( $\text{U g}^{-1}$ ) | AE CMCase ( $\text{U g}^{-1}$ ) |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>T. viride</i>     | 35,0                           | 39,0                            |
| <i>T. asperellum</i> | 20,8                           | 30,2                            |
| <i>A. Niger</i> I    | 15,6                           | 18,4                            |



**Figura 4.8.** Cinética da FES do fungo *T. viride*. Perfis de produção de FPase e CMCase.



**Figura 4.9.** Cinética da FES do fungo *T. asperellum*. Perfis de produção de FPase e CMCase.



**Figura 4.10.** Cinética da FES do fungo *A. niger* I. Perfis de produção de FPase e CMCase.

A Tabela 4.15 apresenta os parâmetros de produtividade das enzimas no tempo de 48h ( $AE/48h$ ), bem como os resultados de fator de conversão produto/substrato  $Y_{P/S}$  ( $AE/celulose$ ), este último considerando a concentração inicial de celulose de  $0,50 \text{ g.gms}^{-1}$ , a qual foi determinada no capim elefante pré-tratado. É possível observar os maiores níveis de produtividade e de

conversão  $Y_{P/S}$  obtidos para o fungo *T. viride* para ambas as enzimas FPase e CMCase.

**Tabela 4.15.** Valores máximos de AE observados na FES em 48h e cálculo da produtividade e fator de conversão produto/substrato  $Y_{P/S}$ .

| Enzima                        | AE<br>(U.gms <sup>-1</sup> ) | Produtividade<br>(U.gms <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | Celulose<br>(g.gms <sup>-1</sup> ) | $Y_{P/S}$<br>(U.g cel <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Trichoderma viride</i>     |                              |                                                          |                                    |                                       |
| FPase                         | 35                           | 0,73                                                     | 0,5                                | 70                                    |
| CMCase                        | 39                           | 0,81                                                     | 0,5                                | 78                                    |
| <i>Trichoderma asperellum</i> |                              |                                                          |                                    |                                       |
| FPase                         | 20,8                         | 0,43                                                     | 0,5                                | 41,6                                  |
| CMCase                        | 30,2                         | 0,63                                                     | 0,5                                | 60,4                                  |
| <i>Apergillus niger</i> I     |                              |                                                          |                                    |                                       |
| FPase                         | 15,6                         | 0,33                                                     | 0,5                                | 31,2                                  |
| CMCase                        | 18,4                         | 0,38                                                     | 0,5                                | 36,8                                  |

**Tabela 4.16.** Comparação com enzimas lignocelulolíticas produzidas por FES

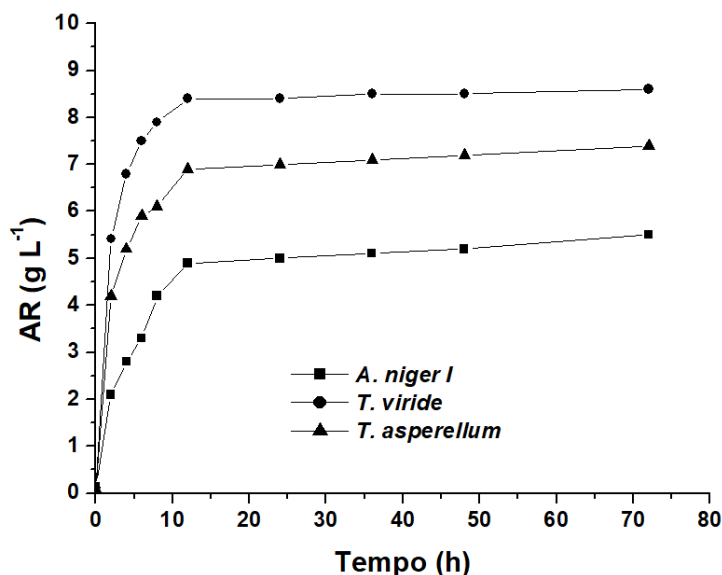
| Enzima | Fungo                             | Ativ. Enzim.<br>(U.gms <sup>-1</sup> ) | Fonte Carbono           | Referência                  |
|--------|-----------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| FPase  | <i>Penicillium echinulatum</i>    | 32,93                                  | Capim elefante          | SCHOLL <i>et al.</i> (2015) |
|        | <i>Penicillium brasilianum</i>    | 0,59                                   | Pinheiro                | JORGENSEN & OLSSON (2006)   |
|        | <i>Trichoderma viride</i>         | 0,4                                    | Bagaço de cana          | ADSUL <i>et al.</i> (2004)  |
|        | <i>Aspergillus niger</i>          | 0,3                                    | Bagaço de cana          | AGUIAR & LUCENA (2011)      |
|        | <i>Aspergillus niger</i>          | 0,098                                  | Bagaço de cana          | SCHEUFELE (2012)            |
|        | <i>Aspergillus niger</i>          | 17,32                                  | Palma forrageira        | REIS (2015)                 |
| CMCase | <i>Penicillium echinulatum</i>    | 205,83                                 | Capim elefante          | SCHOLL <i>et al.</i> (2015) |
|        | <i>Aspergillus niger</i>          | 3,35                                   | Palma forrageira        | REIS (2015)                 |
|        | <i>Actinomicetos Streptomyces</i> | 40,3                                   | CMC e sulfato de amônio | JANG & CHEN (2003)          |

Uma análise comparativa das atividades enzimáticas obtidas no presente trabalho com aquelas de literatura (Tabela 4.16) indicam que o fungo

estudado apresenta quantidade considerável de enzimas do complexo celulolítico. Para a enzima FPase, resultados inferiores aos apresentados neste trabalho, foram encontrados na literatura, mesmo para outras fontes de carbono e outros fungos. Já para a enzima CMCase, poucos trabalhos foram encontrados para a obtenção de uma comparação de produção de enzimas em condições semelhantes.

#### 4.4. Hidrólise Enzimática do capim elefante pré-tratado

Foram realizados experimentos para avaliar a cinética da hidrólise enzimática do Capim elefante pré-tratado utilizando os extratos enzimáticos obtidos da FES no tempo de 48h na condição otimizada (Tabela 4.14). Nos ensaios de hidrólise foi usada a concentração de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de substrato (Capim elefante pré-tratado). A cinética da hidrólise enzimática teve duração de 72 h, conforme se pode observar na Figura 4.11.



**Figura 4.11.** Cinética da hidrólise enzimática do capim elefante pré-tratado. Perfis de produção de AR para os extratos enzimáticos das três espécies fúngicas.

Observando a Figura 4.11 é possível notar os perfis de produção de açúcares redutores gerados na hidrólise considerando os extratos enzimáticos obtidos após FES com os fungos *A. niger I*, *T. viride* e *T. asperellum*. É possível

notar que a partir de 12 h de hidrólise os valores de AR se estabilizam, tendo pouca variação até o final da cinética (72h) para as três espécies.

A espécie *A. niger* I tem estabilidade no teor de AR a partir de 12h de hidrólise, tendo  $4,9 \text{ g L}^{-1}$  e obtendo ao final da cinética (72h) um teor de  $5,5 \text{ g L}^{-1}$ . O teor de AR da espécie *T. asperellum* em 12 h de cinética é de  $6,9 \text{ g L}^{-1}$ , tendo ao final da cinética um teor de  $7,4 \text{ g L}^{-1}$ . A espécie que mais se destacou no teor de AR foi *T. viride* obtendo em 12 h de hidrólise  $8,4 \text{ g L}^{-1}$  e tendo ao final da cinética  $8,6 \text{ g L}^{-1}$  de AR.

O capim elefante também foi utilizado como substrato para obtenção de AR por Menegol *et al.* (2014a) estudando o potencial de um complexo enzimático de *Penicillium echinulatum* produzido em culturas submersas ou em estado sólido para hidrólise enzimática de capim elefante, obtiveram o maior rendimento de AR no tempo de 48 h ( $558,56 \text{ mg g}^{-1}$ ) com capim elefante pré-tratado com 3% de NaOH.

Em outro estudo de Menegol *et al.* (2014b), os autores verificaram o aumento da libertação de açúcares fermentáveis de capim elefante por hidrólise enzimática na presença de surfactantes, onde obtiveram em 8 h de hidrólise  $516,06 \text{ mg g}^{-1}$  de AR sem adição de surfactantes, tendo um tempo de hidrólise menor que o presente estudo. Com a adição do surfactante Tween 80® houve a liberação de  $566,92 \text{ mg g}^{-1}$  de AR e quando foi utilizado o surfactante Triton X-100® a liberação de AR foi de  $717,02 \text{ mg g}^{-1}$ , ambos em 8 h de hidrólise. A partir disso, os autores concluíram que a adição de surfactantes melhora a eficiência da hidrólise enzimáticas de materiais lignocelulósicos.

O capim elefante também foi utilizado na hidrólise enzimática nos estudos de Scholl *et al.* (2015b) sobre produção de etanol a partir de açúcares obtidos durante a hidrólise enzimática de capim elefante pré-tratado por explosão a vapor, tendo picos de AR em 36 h de hidrólise com  $1054,82 \text{ mg g}^{-1}$  obtidas a partir de fibras de celulose deslignificadas por Celuflock®.

Muniz *et al.* (2015) estudaram a potencialidade do capim elefante para a produção de etanol de segunda geração usando enzima comercial Celluclast® 1,5 L obtendo na hidrólise enzimática  $1,94 \text{ g L}^{-1}$  de AR com pré-tratamento alcalino usando hidróxido de sódio 0,25 M. Obtendo resultados inferiores ao

presente estudo, mesmo comparando o menor rendimento de AR, que foi para o fungo *A. niger* I, que obteve 5,5 g L<sup>-1</sup> em 72 h de hidrólise.

Scheufele (2012) estudando a bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos do Bioma Amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas, utilizando bagaço de cana pré-tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em fermentação submersa por *A. niger*, obteve teor de AR de 1,263 g L<sup>-1</sup> no tempo de 96 h de fermentação. Apesar do autor utilizar maior tempo de fermentação os teores de AR foram inferiores aos encontrados neste trabalho.

A espécie *T. asperellum* foi utilizada por Nava-Cruz *et al.* (2016), onde os autores estudaram *Agave atrovirens*, uma planta usada como substrato e suporte para FES para produção de celulase por *Trichoderma asperellum* e obtiveram 0,07 g L<sup>-1</sup> de AR utilizando o tratamento químico com NaOH (2%), obtendo assim resultados inferiores ao encontrados neste trabalho, que foi de 7,4 g L<sup>-1</sup> em 72 h de hidrólise.

Outro estudo utilizando a espécie fúngica *T. asperellum* foi o realizado por Ibrahim *et al.* (2013) que estudaram sobre celulase bruta obtida de óleo de palma pelo *T. asperellum* UPM1 e *A. fumigatus* UPM2 para produção de açúcares fermentescíveis e obtiveram 1,47 g L<sup>-1</sup> de AR em 72 horas utilizando 5% de concentração de enzima para a espécie *T. asperellum*.

Estudos realizados por Raghuwanshi *et al.* (2014) sobre bioprocessamento da produção de celulasas a partir de um mutante de *T. asperellum* RCK2011 e sua aplicação na hidrólise da celulase, utilizando o bagaço de cana de açúcar, mostram valores de AR de 210,1 mg g<sup>-1</sup>.

Os autores Xin *et al.* (2013) estudaram a produção de bioetanol a partir de resíduos de hortaliças usando misturas de enzimas fúngicas brutas produzidas por FES e obtiveram uma quantidade de 25,06 g L<sup>-1</sup> de AR usando extrato enzimático de *T. reesei* RUT- C30 num período de hidrólise enzimática foi de 72 h. O tempo de hidrólise foi idêntico ao presente estudo e a quantidade de AR foram bem superiores aos encontrados neste trabalho para a mesma espécie, *T. viride* que foi de 8,6 g L<sup>-1</sup> de AR.

Maehara (2016) estudou a produção de enzimas pelo co-cultivo de fungos filamentosos por FES e aplicação do meio integral na sacarificação da

biomassa para obtenção de etanol celulósico e obteve um teor de 14,1 g L<sup>-1</sup> de AR após 36 horas de hidrólise enzimática. A autora utilizou na FES o bagaço de cana-de-açúcar tratado com explosão à vapor e como extrato enzimático o co-cultivo de *T. reesei* e *A. oryzae*. Obtendo resultados superiores de AR em um menor tempo de hidrólise enzimática.

#### **4.5. Modelagem e simulação da cinética de hidrólise enzimática do capim elefante**

##### **4.5.1. Dados experimentais da hidrólise enzimática**

A Tabela 4.17 apresenta os resultados experimentais da cinética de hidrólise do capim elefante pré-tratado utilizando o extrato enzimático bruto obtido por FES com o fungo *T. viride*. A Tabela 4.18 apresenta os resultados experimentais da cinética de hidrólise do capim elefante pré-tratado utilizando um extrato enzimático comercial Celluclast® (Sigma), conforme dados obtidos de Godinho (2018) para fins de comparação. Com o uso do extrato enzimático bruto obtido por FES com o *T. viride*, foram testadas três concentrações iniciais da enzima (10 g/L, 20 g/L e 30 g/L). A hidrólise foi realizada em duplicata pelo período de 72 h, sendo feitas amostragens nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 13, 24, 36, 48 e 72 h após o início da reação.

Ao analisar os dados das Tabelas 4.17 e 4.18, fica evidente o efeito das diferentes concentrações iniciais de enzima de acordo com o tempo de hidrólise enzimática, o que torna evidente, que ao aumentar o tempo da hidrólise e a concentração inicial da enzima maior será a obtenção (conversão) de glicose.

Além disso, é possível observar que de acordo com o passar do tempo, a velocidade de hidrólise enzimática reduz, demonstrando que a maior obtenção de glicose ocorre nas primeiras horas. Tal fato se deve, principalmente, a desativação enzimática, a qual é influenciada por muitos fatores, como tensão de cisalhamento, temperatura, inibição de produtos e adsorção ineficaz da celulase. Além da desativação enzimática, a atuação de

complexos contendo hemiceluloses/ligninas/cinzas contra a adsorção enzimática e a perda da consistência do substrato são fatores que interferem na taxa do processo de hidrólise enzimática (Ganesh *et al.*, 2000).

Observa-se que a hidrólise enzimática na qual utiliza a solução de enzima comercial produz mais glicose se comparada a hidrólise enzimática feita com a enzima produzida pela fermentação em estado sólido para concentrações iniciais de enzima de 10 g/L e 20 g/L.

**Tabela 4.17.** Cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima ( $E_0$ ) obtida a partir da fermentação em estado sólido.

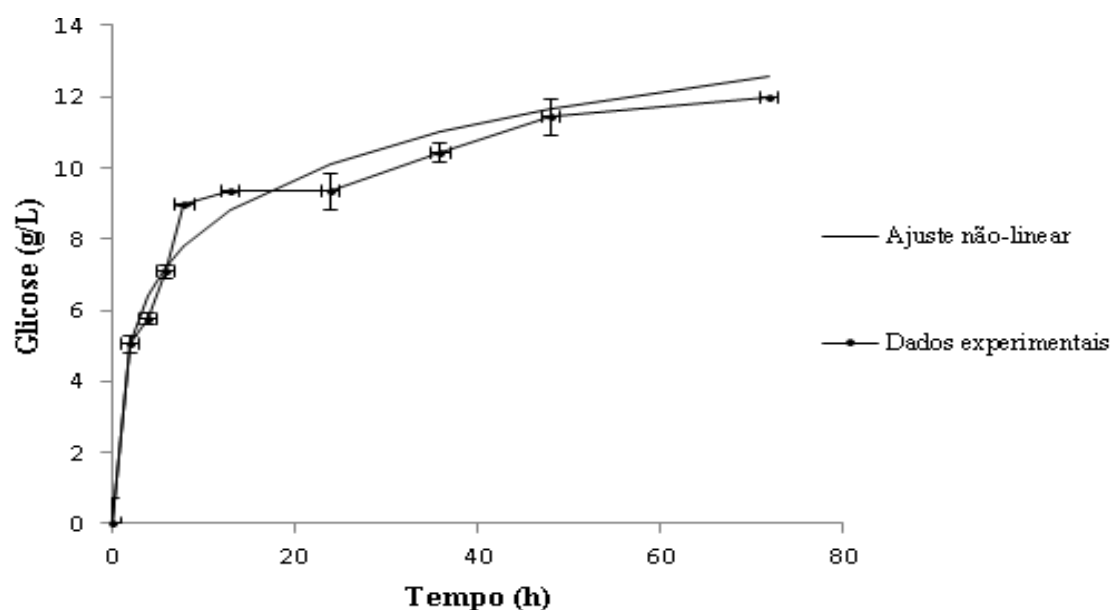
| Tempo (h) | $[E_0]=30$ g/L  | $[E_0]=20$ g/L  | $[E_0]=10$ g/L   |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|
| 2         | $4,34 \pm 0,30$ | $3,47 \pm 0,24$ | $2,17 \pm 0,14$  |
| 4         | $5,44 \pm 0,50$ | $4,35 \pm 0,40$ | $2,72 \pm 0,24$  |
| 6         | $6,00 \pm 0,40$ | $4,80 \pm 0,32$ | $3,0 \pm 0,19$   |
| 8         | $5,86 \pm 0,20$ | $5,30 \pm 0,10$ | $3,10 \pm 0,09$  |
| 13        | $6,72 \pm 0,50$ | $5,38 \pm 0,20$ | $3,36 \pm 0,32$  |
| 24        | $6,72 \pm 0,40$ | $5,70 \pm 0,40$ | $3,36 \pm 0,24$  |
| 36        | $6,50 \pm 0,20$ | $5,65 \pm 0,06$ | $2,90 \pm 0,096$ |
| 48        | $6,80 \pm 0,50$ | $5,44 \pm 0,60$ | $3,20 \pm 0,24$  |
| 72        | $6,88 \pm 0,40$ | $5,50 \pm 0,02$ | $3,30 \pm 0,24$  |

**Tabela 4.18.** Cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima comercial ( $E_0$ ). Fonte: Godinho (2018).

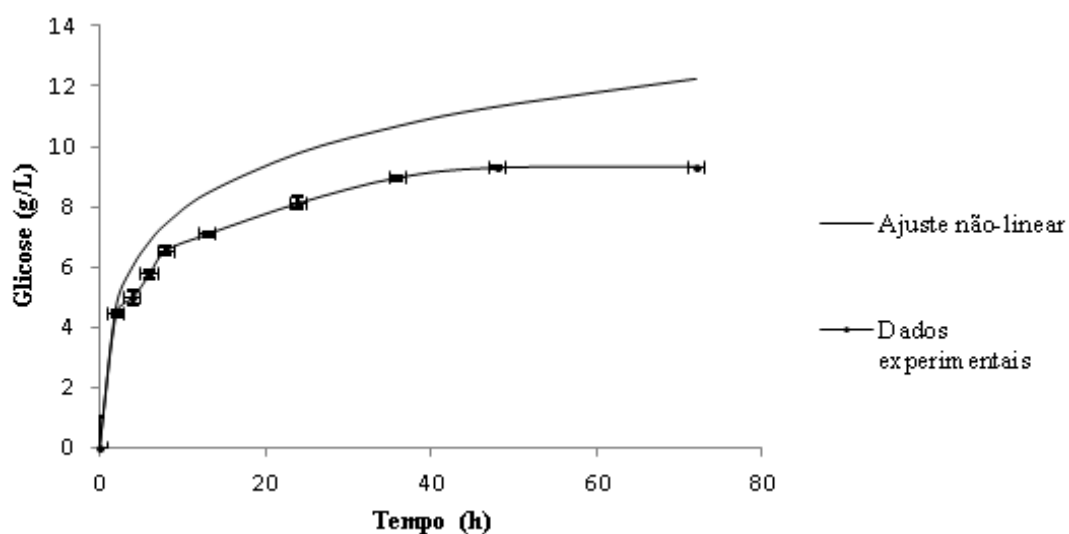
| Tempo (h) | $[E_0]=20$ g/L   | $[E_0]=10$ g/L   | $[E_0]=5$ g/L     |
|-----------|------------------|------------------|-------------------|
| 2         | $5,04 \pm 0,71$  | $4,49 \pm 1,01$  | $0,47 \pm 0,02$   |
| 4         | $5,75 \pm 0,24$  | $4,96 \pm 0,08$  | $0,70 \pm 0,0016$ |
| 6         | $7,08 \pm 0,15$  | $5,75 \pm 0,24$  | $0,87 \pm 0,006$  |
| 8         | $8,96 \pm 0,19$  | $6,53 \pm 0,12$  | $0,95 \pm 0,04$   |
| 13        | $9,33 \pm 0,02$  | $7,08 \pm 0,15$  | $1,11 \pm 0,03$   |
| 24        | $9,33 \pm 0,02$  | $8,11 \pm 0,08$  | $1,16 \pm 0,026$  |
| 36        | $10,42 \pm 0,53$ | $8,96 \pm 0,19$  | $1,22 \pm 0,005$  |
| 48        | $11,43 \pm 0,27$ | $9,29 \pm 0,07$  | $1,25 \pm 0,02$   |
| 72        | $12,00 \pm 0,50$ | $9,33 \pm 0,025$ | $1,35 \pm 0,005$  |

#### 4.5.2. Simulação do modelo matemático

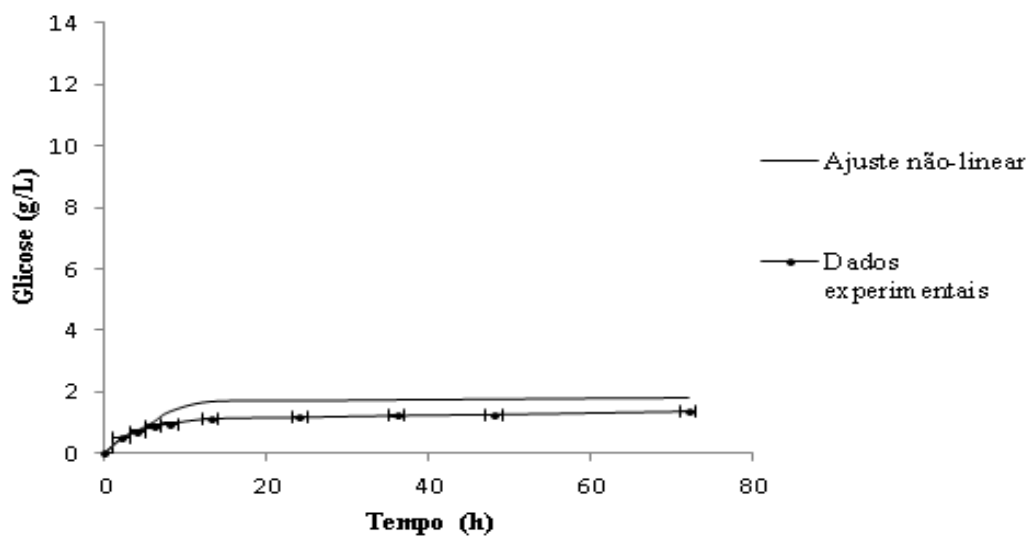
A partir da Equação 2.6, foram substituídos os dados da Tabela 4.17 e 4.18, os quais foram ajustados pelo modelo matemático não linear e comparados com os dados experimentais para cada tipo de enzima, sendo esta comparação representada pelas figuras 4.12 à 4.17. Posteriormente, a partir do ajuste não-linear, foram obtidos os parâmetros cinéticos  $K_e$ ,  $k_{de2}$  e  $k_2$ , os quais estão apresentados na Tabela 4.19.



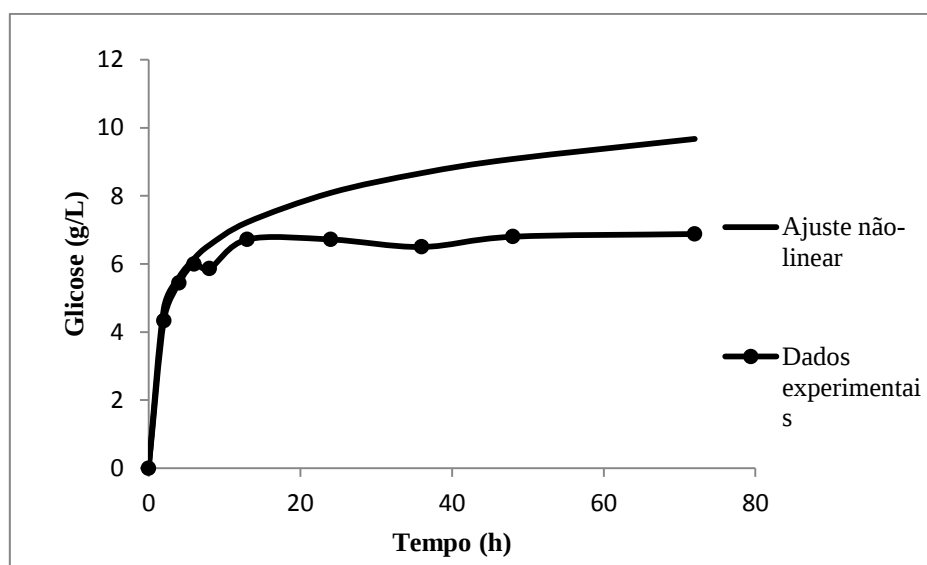
**Figura 4.12.** Simulação do modelo matemático utilizando 20 g/L de concentração inicial de enzima comercial. Fonte: Godinho (2018).



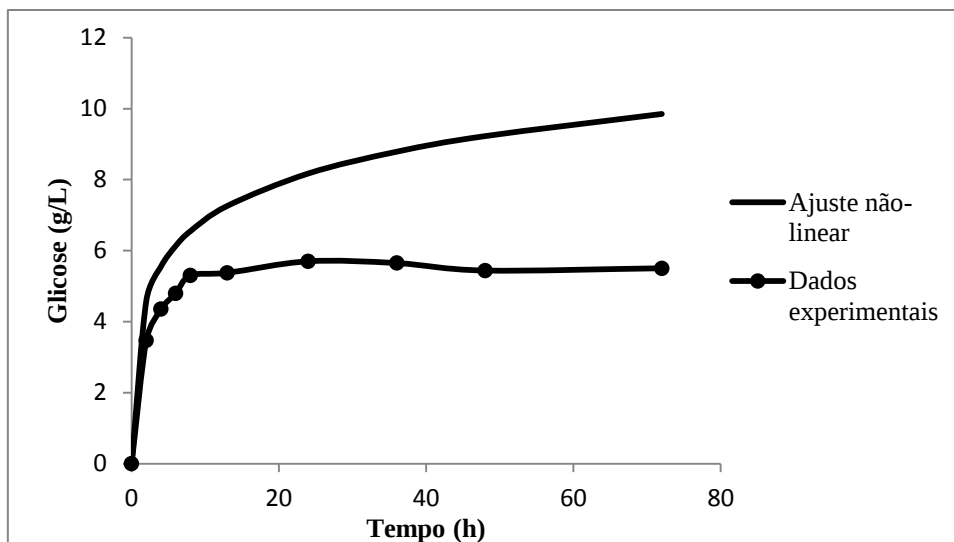
**Figura 4.13.** Simulação do modelo matemático utilizando 10 g/L de concentração inicial de enzima comercial. Fonte: Godinho (2018).



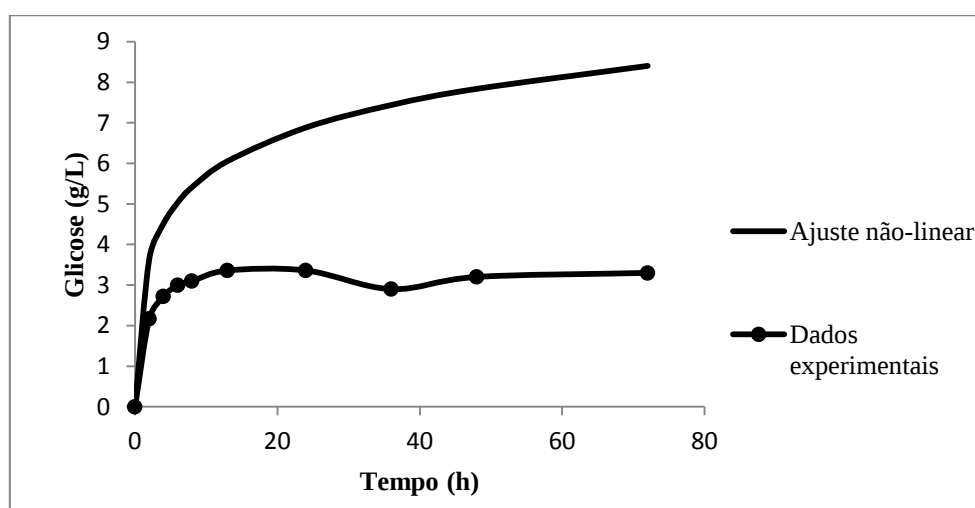
**Figura 4.14.** Simulação do modelo matemático utilizando 5 g/L de concentração inicial de enzima comercial. Fonte: Godinho (2018).



**Figura 4.15.** Simulação do modelo matemático utilizando 30 g/L de concentração inicial de enzima obtida a partir da FES.



**Figura 4.16.** Simulação do modelo matemático utilizando 20 g/L de concentração inicial de enzima obtida a partir da FES.



**Figura 4.17.** Simulação do modelo matemático utilizando 10 g/L de concentração inicial de enzima obtida a partir da FES.

Observa-se na Tabela 4.19 que quanto maior a concentração inicial de enzima, maior será a desativação enzimática  $k_{de2}$ , maior será a constante de equilíbrio ( $K_e$ ) e maior será a formação de produto ( $k_2$ ). Tais fatos podem ser explicados pela inibição do produto e pela adsorção ineficaz entre produto e substrato, observando que para uma maior concentração inicial de enzima, maior será a produção de glicose e de celulase não adsorvida (Zhang *et al.*, 2010). Também, foi possível observar que o ajuste não-linear para a enzima

obtida a partir da fermentação em estado sólido não é satisfatório, pois apresenta coeficiente de determinação baixo ( $R^2$ ).

**Tabela 4.19.** Valores determinados para os parâmetros cinéticos  $K_e$ ,  $k_{de2}$ ,  $k_2$  e coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) para diferentes concentrações iniciais de enzima. Valores obtidos para a enzima comercial e para a solução de enzima bruta obtida a partir da FES.

| Parâmetros | Enzima comercial              |              |             |
|------------|-------------------------------|--------------|-------------|
|            | [Eo]= 20 g/L                  | [Eo]= 10 g/L | [Eo]=5 g/L  |
| $K_e$      | 28,125                        | 26,5632      | 19,0672     |
| $k_2$      | 0,9102                        | 0,69123      | 0,4514      |
| $k_{de2}$  | 0,890662                      | 0,70148      | 0,602063    |
| $R^2$      | 0,974224                      | 0,987701     | 0,957858    |
| Parâmetros | Enzima obtida a partir da FES |              |             |
|            | [Eo]= 30 g/L                  | [Eo]= 20 g/L | [Eo]=10 g/L |
| $K_e$      | 27,9916                       | 27,5542      | 25,7543     |
| $k_2$      | 0,8912                        | 0,8851       | 0,75642     |
| $k_{de2}$  | 1,2981                        | 1,243        | 1,2291      |
| $R^2$      | 0,9084                        | 0,8865       | 0,79879     |

#### 4.5.3. Determinação da velocidade inicial da hidrólise enzimática ( $v_o$ )

Substituindo os dados da Tabela 4.19 nas Equações 3.10, 3.11 e 3.12, foram obtidos os dados que estão apresentados nas Tabela 4.20.

**Tabela 4.20.** Valores determinados para os parâmetros cinéticos  $V_{emax}$  e  $v_o$  para diferentes concentrações iniciais de enzima. Valores obtidos para a enzima comercial e enzima obtida a partir da FES.

| Parâmetros         | Enzima comercial              |              |              |
|--------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                    | [Eo]= 20 g/L                  | [Eo]= 10 g/L | [Eo]=5 g/L   |
| $V_{emax}$ (g/L·h) | 45,51                         | 34,56        | 22,57        |
| $v_o$ (g/L·h)      | 18,91                         | 9,45         | 4,68         |
| Parâmetros         | Enzima obtida a partir da FES |              |              |
|                    | [Eo]= 30 g/L                  | [Eo]= 20 g/L | [Eo]= 10 g/L |
| $V_{emax}$ (g/L·h) | 44,56                         | 44,26        | 37,82        |
| $v_o$ (g/L·h)      | 23,05                         | 18,61        | 10,58        |

Ao observar os resultados obtidos presentes na Tabela 4.20, observa-se para a enzima comercial e, também para a enzima obtida a partir da FES, que quanto maior a concentração inicial de enzima, maior será  $V_{max}$  e, consequentemente,  $v_0$ . Além disso, foi possível observar que para a enzima obtida pela FES a mesma apresenta menores  $V_{max}$  e  $v_0$  se comparada a enzima comercial.

## 5. CONCLUSÃO

Dentre as espécies de fungos submetidas ao *screening*, pode-se destacar as cepas de *T. viride*, *T. asperellum* e *A. niger* I, que se revelaram como potenciais cepas produtoras de enzimas celulasas.

Em termos de produção das enzimas celulasas, o fungo que mais se destacou na obtenção das enzimas celulasas totais (FPase) e endoglicanases (CMCase) foi o *T. viride*, obtendo  $35 \text{ U g}^{-1}$  e  $39 \text{ U g}^{-1}$ , respectivamente, com umidade inicial na FES de 80% e pH de 5,0. O pH para produção das enzimas celulasas variam de acordo com a espécie fúngica utilizada, sendo o ideal o pH 5,0 para a espécie *T. viride*, 6,0 para a espécie *A. niger* I e 7,0 para a espécie *T. asperellum*.

Nos ensaios de hidrólise a espécie que mais se destacou no teor de AR gerado foi o *T. viride* obtendo em 12h de hidrólise  $8,4 \text{ g L}^{-1}$ . Na modelagem matemática da hidrólise foi possível observar que tanto para a enzima obtida a partir da FES como para a enzima comercial, usada para fins de comparação, que quanto maior a concentração inicial de enzima, maior a velocidade inicial de reação.

Conclui-se que na hidrólise enzimática do Capim elefante para a geração dos açúcares fermentescíveis necessários para a produção de etanol 2G é possível e viável a utilização de enzimas celulasas fúngicas obtidas por FES do capim elefante, o que confere caráter de especificidade enzimática como aspecto vantajoso no estudo.

## 6. REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDEA, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. **Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production.** *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 67–72, 2004.
- AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. **Produção de celulases por *A. Niger* e cinética da desativação celulósica.** *Acta Scientiarum Technology*, v. 33, n. 4, 2011.
- ARANTES V.; SADDLER J. N. **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.
- AROEIRA, L. J. M.; LOPESA, F. C. F.; DERESZA, F.; VERNEQUEA, R.S.; DAYRELLA, M.S.; MATOSA, L.L.; MALDONADO-VASQUEZB, H.; VITTORI, A. **Pasture availability and dry matter intake of actatin across bred cows grazing elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.).** *Animal Feed Science and Technology*, v. 78, p. 313-324, 1999.
- ASTOLFI, V.; A. L. ASTOLFI, A. L.; VARGAS, C. E. B.; RIGO, E.; LUCCIO, M. DI.; H. TREICHE. **Caracterização parcial e avaliação de parâmetros cinéticos de carboximetilcelulase produzida por fermentação em estado sólido utilizando casca de soja.** In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br/s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0347-25904-152966.pdf>. Acesso em: 19 março 2018.
- BAILEY, C. **Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis.** *Biochemistry Journal*, v. 262, p. 1001, 1989.
- BANSAL, N.; SONI, R.; TEWARI, R; SONI, S. **Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues.** *Waste Management*, v. 32, n. 7, p. 1341-1346, 2012.
- BARBA, C.; MONTANÉ, D.; RINAUSO.M.; FARRIOL, X. **Synthesis and characterization of carboxymethylcelluloses (CMC) from non-wood fibers I. Accessibility of cellulose fibers and CMC synthesis.** *Cellulose*, v. 9, p. 319-326, 2002.

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª. Ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2007.
- BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei*.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado).
- BHAT, M. K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** *Biotechnology Advances*, v.18, p. 355–383, 2000.
- BŁASZCZYK, L.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, K.; LISIECKA, J.; JĘDRYCZKA, M. **Trichoderma spp. – application and prospects for use in organic farming and industry.** *Journal of plant protection Research*, v. 54, n. 4, p. 309-317, 2014.
- BOMTEMPO, F. V. S.; CARREIRO, S. C.; PIMENTA, R. S.; GUARDA, E. A. **Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas.** *Bioenergia em revista: diálogos*, v. 1, p. 26-44, 2017.
- BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia:** produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência Brasil, 2008. p. 241-271.
- CAMPOS, F. P.; LANNA, D. P. D.; BOSE, M. L. V.; BOIN, C.; SARMENTO, P. **Degradabilidade do capim elefante em diferentes estágios de maturidade avaliada pelo método in vitro/gás.** *Scientia Agricola*, v.59, n.2, p.217-225, 2002.
- CARDONA, E.; RIOS, J.; PENA, J.; RIOS, L. **Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass.** *Fuel*, v. 118, p. 41-47, 2013.
- CASTELLANI, A.A. **Maintenance in cultivation of the common pathogenic fungi of man. In sterile distilled water. Further researches.** *Journal of Tropical Medicine*. London, v. 70, 1967.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. **Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of**

- agroindustrial residues with *Aspegillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 71, p. 45-50, 2000.**
- CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana de açúcar (*Saccarum spp*)**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006. Dissertação (Mestrado).
- CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.**
- CAVALCANTE, P. A. W.; COÊLHO, D. F.; SILVA, C. F.; ABUD, A. K. S.; SOUZA, R. R. DE. **Use of lignocellulosic residues in the production of cellulases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Scientia Plena*, v.14, n. 6, 2018.**
- COELHO, M. A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro. EPUB, 2008. 288 p.
- DEL BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em estado sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher. v. 2, 2001.
- DHILLON. G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K. **Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production though solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and products*, v. 34, p. 1160-1167, 2011.**
- DITTENBER, D. B.; GANGARAO, H. V. S. **Critical review of recent publications on use natural composites in infrastructure. *Composite: Part A*, v. 43, n. 8, p. 1419- 1429, 2012.**
- EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesquisa investe em capim como fonte de energia**. 2015. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2422024/pesquisa-investe-em-capim-como-fonte-de-energia>> Acesso em 02 de Fev. 2018.
- FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F., REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. T. M. **Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential**

- application as additives in animal feed.** *Bioprocess Biosystem Engineering* v. 34, p. 347–355, 2011.
- FAHEINA JÚNIOR, G. S.; AMORIN, M. V. F. S.; SOUZA, C. G.; SOUZA, D. M.; SOUZA, K. A.; SAAVEDRA, G. A. **Strategies to increase cellulase production with submerged fermentation using isolated from the Brazilian biome.** *Acta Scientiarum*, v. 37, p. 15-22, 2015.
- FARINAS, C.S. **Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.52, p.179-188, 2015.
- FLORENCIO, C. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011, 83f. Dissertação (Mestrado).
- FONTOURA, C. F.; BRANDÃO, L. E.; GOMES, L. L. **Elephant grass biorefineries: towards a cleaner Brazilian energy matrix?** *Journal of Cleaner Production* , v. 96, p. 85-93, 2015.
- FUENTES, L. L. G. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009, 149p. Dissertação (Mestrado).
- GANESH, K., JOSHI, J. B., SAWANT, S. B. **Cellulase deactivation in a stirred reactor.** *Biochemistry Engineering Journal*, n. 4, p. 137–141, 2000.
- GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. **Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its applicaton.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 87. p. 511-519, 1999.
- GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities.** *Pure and Applied Chemistry*, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268,1987.
- GODINHO, E. Z. **Otimização da hidrólise enzimática do capim elefante pré-tratado para obtenção de açúcares fermentescíveis.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2018, 106p. Dissertação (Mestrado).
- GRIEBELER, N. E.; BORTOLI. A.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. **Screening of filamentous fungi for the production of amylases,**

- proteases, cellulases, and pectinases.** *Revista Acadêmica Ciências Animal*, v. 13, p. 15-24, 2015.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. ***Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts.** *Nature Reviews Microbiology*, London-UK, v.2, p.43-56, 2004.
- HEIKINHEIMO, L. ***Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton.** Espoo, Finlândia, 2002, 77 p. Dissertação (Doutorado).
- HENDRIKS, A. T. W.; ZEEMAN, G. **Pre-treatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v. 00, p. 10-18, 2009.
- HORN, S. J.; KOLSTAD, G. V.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. **Novel enzymes for the degradation of cellulose.** *Biotechnology for Biofuels*, p. 5-45, 2012.
- IBRAHIM, M. F.; RAZAK, M. N. A.; PHANG, L. Y.; HASSAN, M. A.; ABD-AZIZ, S. **Crude Cellulase from Oil Palm Empty Fruit Bunch by *Trichoderma asperellum* UPM1 and *Aspergillus fumigatus* UPM2 for Fermentable Sugars Production.** *Appl Biochem Biotechnol*, v. 170, p. 1320–1335, 2013.
- JANG, H. D.; CHEN, K. S. **Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, n. 2, p. 263-268, 2003.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. **Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification.** *Biotechnology for Biofuels*, p. 6-16, 2013.
- JORGENSEN, H.; OLSSON, L. **Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 351, p. 381-390, 2006.
- JUHASZ, T.; SZENGYEL, Z.; SZIJARTO, N.; RECZEY, K. **Effect of pH on Cellulase Production of *Trichoderma reesei* RUT C30.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 201-211, 2004.
- KHAN, M. H.; ALI, S.; FAKRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. **Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme-Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes.** *Journal of Environmental Science and Health*, v. 42, p. 381-386, 2007.

- KRISHNA, S.; H.; RAO, K. C. S.; BABU, J. S.; REDDY, D. S. **Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414.** *Bioprocess Engineering*, v. 22, p. 467-470, 2000.
- LATIF, F.; RAJOKA, M. **Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts.** *Bioresource Technology*, v. 77, n. 1, p. 57-63, 2001.
- LIAO, H.; FAN, X. T.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. **Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification.** *Biomass and Bioenergy*, v. 74, p. 122 – 134, 2015.
- LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2013. Dissertação (Mestrado).
- LYND, L. R.; WEIMER, P. L.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. **Microbial cellulose utilization fundamentals and biotechnology.** *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- 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.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006, 129 p. Dissertação (Mestrado).
- MAEHARA, L. **Produção de enzimas pelo cocultivo de fungos filamentosos por fermentação em estado sólido e aplicação do meio integral na sacarificação da biomassa para obtenção de etanol celulósico.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2016, 104 p. Dissertação (Mestrado).
- MANDELS, M.; REESE, E. T. **Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals.** *J. Bacteriol*, v. 73, p. 269-278, 1957.
- MANSOURI, S.; KHIARI, R.; BETTAIEB, F.; EL-GENDY, A. A.; MHENNI, F. **Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose from Tunisian Vine Stem: Study of Water Absorption and Retention Capacities.** *Journal of Polymers and the Environment*, v. 23, p. 190-198, 2015.

- MARIO, P.; ADINUGRADA, D. W.; HARYADI, M. **Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from Cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT).** *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 164-169, 2005.
- MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T. E.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Microbiologia Média.** Editora Manole Ltda, 2005. p. 39-45.
- MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado).
- MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K.A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. **Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação.** *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.
- MAURYA, D. P.; SINGH, D.; PRATAP, D.; MAURYA, J. P. **Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*.** *Journal of Environmental Biology*, v. 33, n. 1, p. 5-8, 2012.
- MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. **Influence of different chemical pretreatments of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) used as a substrate for cellulase and xylanase production in submerged cultivation.** *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 39, p. 1455–1464, 2016.
- MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. **Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass.** *Fuel*, v.133, p. 232-240, 2014a.
- MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. **Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants.** *Energy conversion and management*, v.88, p. 1252-1256, 2014b.
- MILLER, G. H. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-429, 1959.

- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. **Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review.** *Biomass and Bioenerg.*, v. 56, p. 526-544, 2013.
- MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. **Natural fibers, biopolymers, and biocomposites.** Boca Raton: Taylor & Francis Group, p. 896, 2005.
- MOISER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. **Features of promising Technologies for preatreatment oh lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673-686, 2005.
- MONTALVÃO, S. C. L. Potencial do *Trichoderma* spp no biocontrole de doenças do tomateiro. Brasília: Universidade de Brasília, 2012, 105 p. Dissertação (Mestrado).
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments.** 8th. Ed. – New York, USA: John Wiley & Sons, 2013.
- MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. **Production of cellulase by aspergillus niger under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate.** *Brazilian Journal of Microbiology* , v. 4, p. 1119-1127, 2011.
- MUENSRI, P.; KUNANOPPARAT, T.; MENUT, P.; SIRIWATTANAYOTIN, S. **Effect of lignin removal on the properties of coconut coir fiber/wheat glúten biocomposite.** *Composites: Part A*, v. 42, p. 173-179, 2011.
- NAVA-CRUZ, N. Y.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; AGUILAR-GONZÁLEZ, M. A.; NUNCIO, A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. **Agave atrovirens fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum*.** *3 Biotech*, v. 115, p. 1-12, 2016.
- OLIVEIRA, C. C. S. **Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a alta concentração de sólidos para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012. Dissertação (Mestrado).
- ORIOLE, E.; SCHETTINO, B.; VINEGRA-GONZALES, G.; RAIMBAULT, M. **Solid state Culture of *Bioresource Technology* on Support.** *Journal of Fermentation Technology*, v. 66(1), p. 57-62, 1988.

- PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Tese (Doutorado).
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A., RADHAKRISHNAN, S. **Packed-bed column bioreactor for production of enzyme**. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 14, p. 486-488, 1992.
- PENA, Fernanda Rodrigues. **Otimização de parâmetro concentração de hidróxido de sódio, empregado no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, visando à obtenção de etanol celulósico**. Assis: Programa de Iniciação Científica, Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, 2011. 45p. (Iniciação Científica).
- PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003. Tese (Doutorado).
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S. de; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Comunicado Técnico on line Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005.
- RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. **A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 144, p. 87–100, 2008.
- RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. **Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose**. *Fuel*, v. 124, p. 183-189, 2014.
- RAIMBAULT, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation**. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, p. 1-22, 1998.

- REIS, N. S. **Aplicação de enzimas produzidas por *Aspergillus niger* na extração do óleo essencial de *Mentha arvensis***. Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015. 65p. Dissertação (Mestrado).
- RIBEIRO, J. A. B. **Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando Extrato enzimático celulolítico produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado).
- ROCHA, M. S. R. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. **Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras**. *Engevista*, v. 19, n. 1, p. 217-235, 2017.
- RODRIGUES, M.L.F.; DA SILVA, E.A.; BORBA, C.E., OLIVEIRA, A.C.D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L.P.; VANZIN, M.; STUANI, B.T. **Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium sp.* Isolado das folhas de *Ricinus communis* L.** *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v. 4, p. 129- 145, 2015.
- ROJAS, M. J. **Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja**. São Carlos: UFSCar, 2012. 96p. Dissertação (Mestrado).
- ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado).
- ROSA, T. M. F.; MARINHO, B. M.; BENASSI, V. M. **Produção de celulases e formação de açúcares fermentescíveis pela degradação do bagaço de cana-de-açúcar**. *Ciência & Tecnologia*, v. 9, n. 1, p. 38-43, 2017.
- RUTZ, F.; TORERO, A.; FILER, K. **Fermentação em estado sólido: a evolução na produção de enzimas**. *Revista Aveworld*, Ed. 29, 2008.
- SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi**. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185–194, 2009.
- SANTOS, F. A., QUEIROZ, J. H., COLODETTE, J. L., MANFREDI, M., QUEIROZ, M. E. L. R., CALDAS, C. S., SOARES, F. E. F. **Otimização do pré-tratamento**

- hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico.** *Química Nova*, v. 37, p. 56-62, 2014.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; DE; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; RESENDE, S. T.; **Potencial da Palha de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol.** *Química Nova*, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, F.; COLODETTE, J.; QUEIROZ, J. H. **Bioenergia & Biorrefinaria: Cana-de-Açúcar & Espécies Florestais.** Viçosa: Ed. da UFV, 2013.
- SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007. Tese (Doutorado).
- SARSAIYA, S.; AWASTHI, S. K.; AWASTHI, M. K.; AWASTHI, A. K.; MISHRA, S.; CHEN, J. **The dynamic of cellulase activity of fungi inhabiting organic municipal solid waste.** *Bioresource Technology*, v. 251, p. 411-415, 2018.
- SCHEUFELE, F. B. **Bioconversão de resíduos agroindustriais por microorganismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2012. Tese (Mestrado).
- SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L. P.; DILLON, A. J. P.; **Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation.** *Industrial Crops and Products*, v. 77, p. 97-107, 2015a.
- SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L. P.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. **Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) preteated by steam explosion.** *Bioresource Technology*, v. 192, p. 228-237, 2015b.
- SEGEL, I. W. **Enzyme kinetics- behaviour and analysis os rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.** New York: Jonh Wiley & Sons.1993.
- SENNA, S. N. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulasas utilizando resíduos agroindustriais.** São José do Rio

- Preto: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2014. 89f. Dissertação (Mestrado).
- SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. **Optimization of enzymeloading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate.** *Biochemistry Engineering Journal*, v. 41, p. 241–250, 2008.
- SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011. 104p. Dissertação (Mestrado).
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de Segunda Geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 107 p. Dissertação (Mestrado).
- SILVA, V. F. **Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico.** *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 13, n. 20, p. 1-15, 2012.
- SINGHANIA R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 1, p. 541-549, 2010.
- SIPOS, B. **Conversion of lignocelluloses to fermentable sugars production for ethanol.** Budapest: Department of Applied Biotechnology and Food Science. Budapest: University of Technology and Economics, 2010. 201 p. (PhD Thesis).
- SIQUEIRA, P. F. I.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURN, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J. L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Production of bioethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales.** *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8156-8163, 2008.
- SOCCOL, C. R. L.; VANDENBERGHE, P. D. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M. I.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAUJO, J. A.; TORRES, F. A. G. **Bioethanol from**

- lignocellulose: status and perspectives in Brazil.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4826-4825, 2010.
- SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 178 f. Dissertação (Mestrado).
- SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1–11, 2002.
- TOSCAN, Andréia. **Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise enzimática do capim-elefante.** Caxias do Sul: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2013. 146f. Dissertação (Mestrado).
- VAN ZYL, W. H.; CHIMPHANGO, A. F. A.; DEN HAAN, R.; GORGENS, J. F.; CHIRWA, P. W. C. **Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa.** *Interface Focus*, v. 1, p. 196-211, 2011.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; NOE AGUILAR, C.; de JESÚS ROMERO-GÓMEZ, J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 157-167, 2003.
- WEIZMANN, 2010. Weizmann Institute of Science. Disponível em:<[http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/Bayer/enzymes](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Bayer/enzymes)>. Acesso em 01 de Fev. 2018.
- XIN, F.; ZHANG, H.; WONG, W. **Bioethanol production from horticultural waste using crude fungal enzyme mixtures produced by solid state fermentation.** *Bioenergy Research*, v. 6, p. 1030-1037, 2013.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. **Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies.** *Biotechnology Advances*, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.
- ZHANG, Y; XU, J. L.; XU, H. J.; YUAN, Z. H. & GUI, Y. **Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8261–8266, 2010.

ZHAO, Y.; WU, B.; YAN, B.; GAO, P. **Mechanisms celobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase.** *Sciense in China Series C: Life Sciencies*, v. 47, n. 1, p. 18-24, 2004.

ZUNIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração.** São Carlos: Escola de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010. 197 p. Tese (Doutorado).

## ANEXO

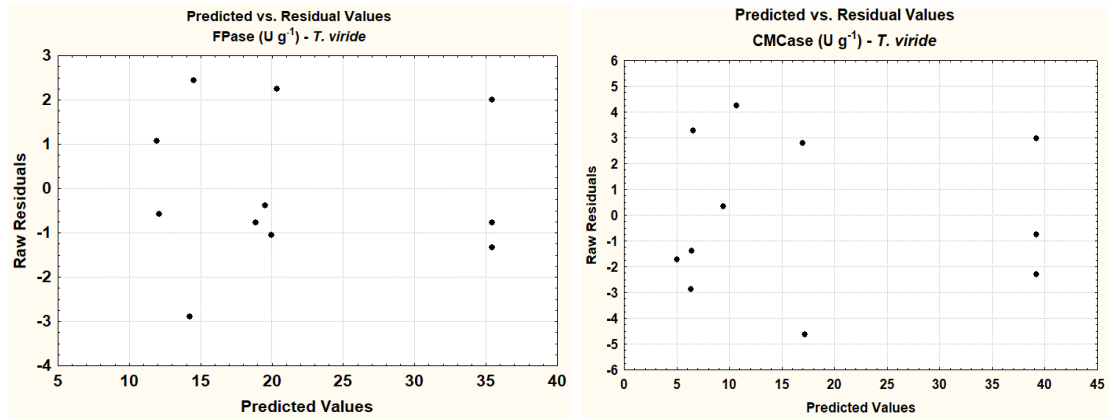


Figura 1: Gráfico dos resíduos vs valores preditos da FPase e CMCase do DCCR para o *Trichoderma viride* ( $\alpha = 0,10$ ).

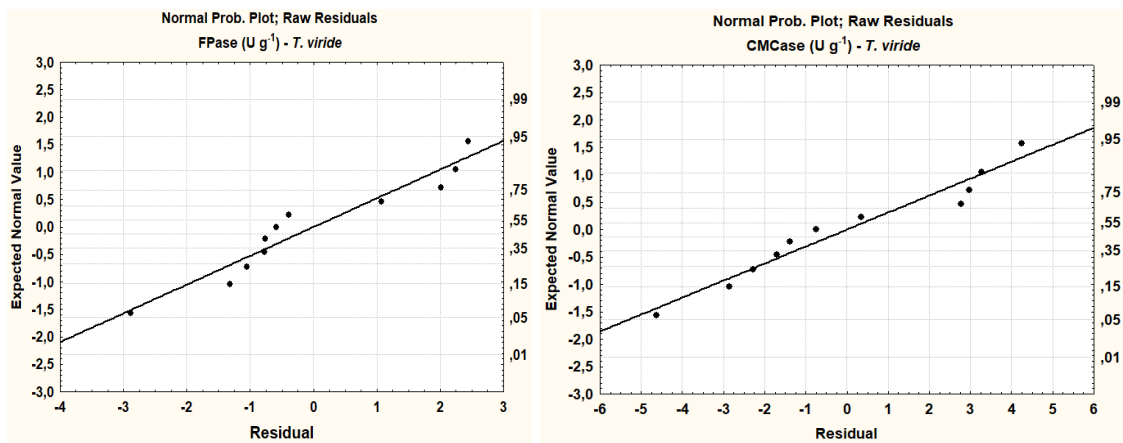


Figura 2: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da FPase e CMCase do DCCR para o *Trichoderma viride* ( $\alpha = 0,10$ ).

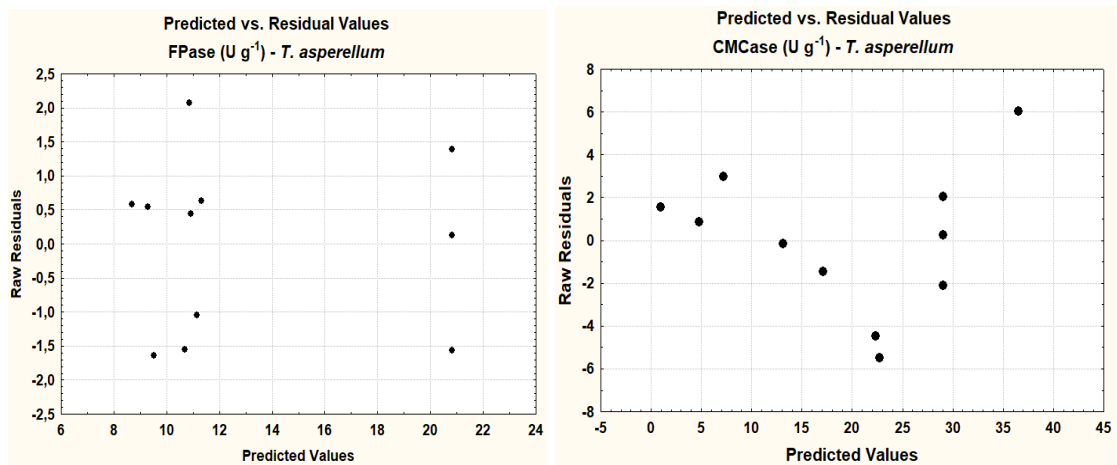


Figura 3: Gráfico dos resíduos vs valores preditos da FPase e CMCase do DCCR para o *Trichoderma asperellum* ( $\alpha = 0,10$ ).

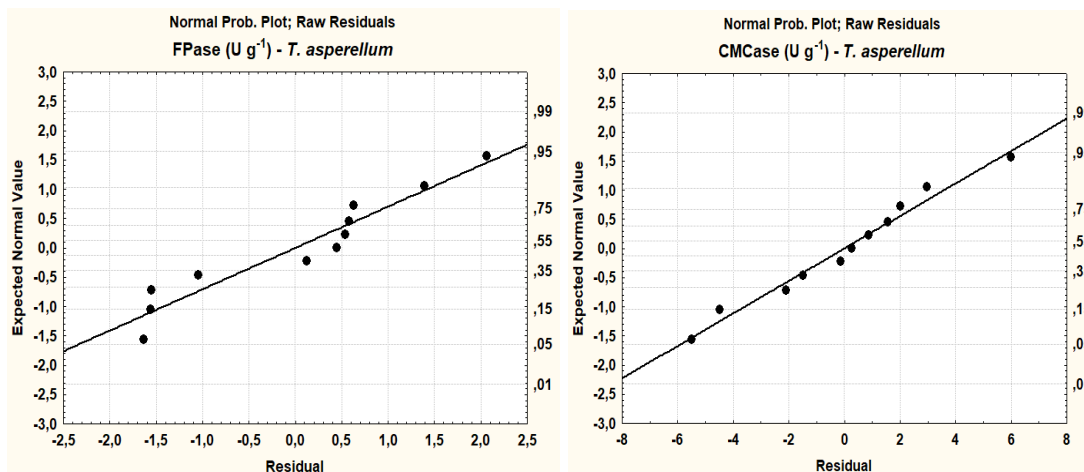


Figura 4: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da FPase e CMCase do DCCR para o *Trichoderma asperellum* ( $\alpha = 0,10$ ).

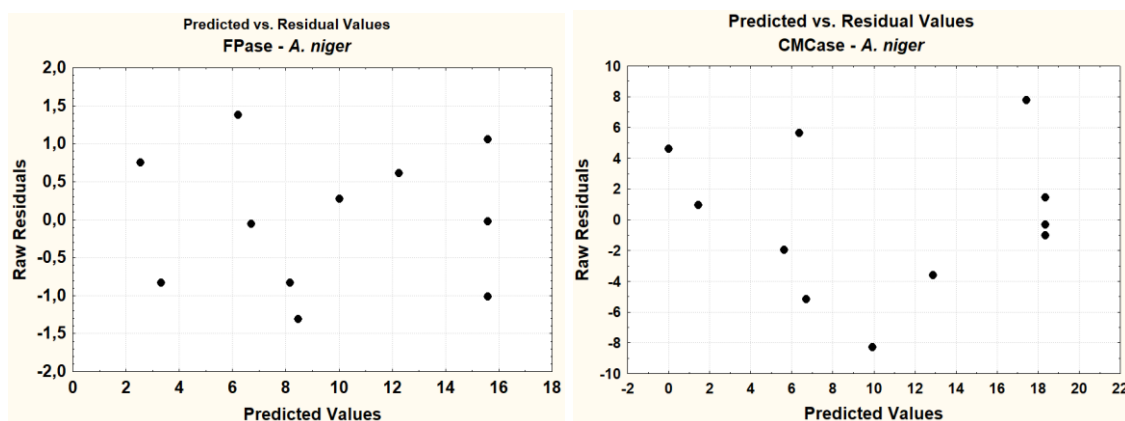


Figura 5: Gráfico dos resíduos vs valores preditos da FPase e CMCase do DCCR para o *A. niger* ( $\alpha = 0,10$ ).

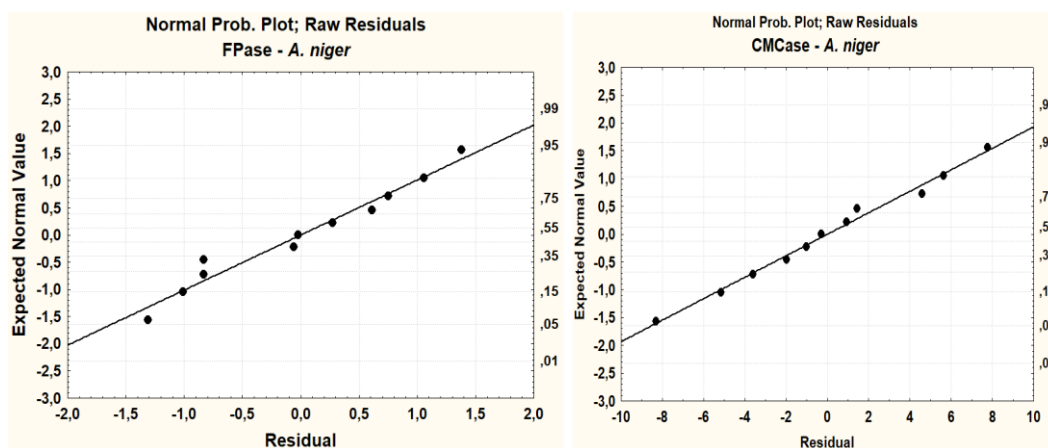


Figura 6: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da FPase e CMCase do DCCR para o *A. niger* ( $\alpha = 0,10$ ).