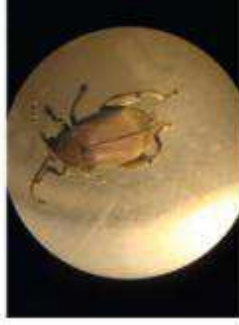


Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Integer ut turpis at augue molestie fringilla eu vel lectus. Aenean id urna est, vitae elementum libero. Nulla tristique diam ut dolor commodo cursus bibendum massa dictum. Integer a lacus eu nulla ornare blandit. Curabitur id quam velit. Sed sapien justo, posuere id ornare non, auctor eget purus. Nunc tincidunt mi est. Proin cursus quam non quam lobortis ac tristique nunc elementum. Aliquam quam neque, pellentesque id accumsan a, suscipit a eros. Mauris elementum gravida nisl et placerat. Morbi malesuada ante ut eros dapibus venenatis.

# TECNOLOGIAS PARA INOVAÇÃO NAS CADEIAS EUTERPE



*José Dalton Cruz Pessoa*  
*Gustavo Henrique de Almeida Teixeira*  
Editores

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*  
*Embrapa Instrumentação*  
*Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento*

# **TECNOLOGIAS PARA INOVAÇÃO NAS CADEIAS EUTERPE**

Editores

*José Dalton Cruz Pessoa*

*Gustavo Henrique de Almeida Teixeira*

*Embrapa*  
*Brasília, DF*  
*2012*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação**

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 2107 2800

Fax: (16) 2107 2902

www.cnpdia.embrapa.br

E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição**

Embrapa Instrumentação

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *João de Mendonça Naimé*

Membros: *Débora Marcondes Bastos Pereira Mitori, Washington Luiz de Barros Melo, Sandra Protter*

*Gouvea, Valéria de Fátima Cardoso.*

Membro Suplente: *Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior*

Revisor editorial: *Valéria de Fátima Cardoso*

Normalização bibliográfica: *Valéria de Fátima Cardoso*

Tratamento de ilustrações: *Gráfica Suprema*

Capa: *José Dalton Cruz Pessoa*

Editoração eletrônica: *Gráfica Suprema*

**1ª edição**

1ª impressão (2012): 300 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)**

Embrapa Instrumentação

T255 Tecnologias para inovação nas cadeias eutérpe / José Dalton Cruz Pessoa, Gustavo Henrique de Almeida

Teixeira editores. -- Brasília, DF : Embrapa, 2012.

343 p. ; 16 cm x 23 cm.

ISBN: 978-85-7035-089-3

1. Açaí. 2. Tecnologia de alimento. 3. Processamento. I. Pessoa, José Dalton Cruz. II. Teixeira, Gustavo Henrique de Almeida. III. Embrapa Instrumentação.

CDD 21 ED. 634.9745

664.8046

© Embrapa 2012

## AUTORES

### Ádina Lima de Santana

Engenharia de alimentos, graduação  
Mestranda em Engenharia Química pela UFPA  
adina\_santana@hotmail.com

### Alan Ribeiro dos Reis

Engenharia mecânica, mestrado  
Docente do Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, Araras - SP  
alan\_sz5@yahoo.com.br

### Alessandra Ferraiolo Nogueira Domingues

Engenharia química, doutorado  
Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém - PA  
ferraiolo@cpatu.embrapa.br

### André Colson Schwob

Engenharia mecânica, bacharelado  
Sócio diretor da NUFruits do Brasil, Belém - PA  
andre.schwob@gmail.com

### Antônio Cordeiro de Santana

Engenharia agrônômica, doutorado  
Professor Associado IV da Universidade Federal Rural da Amazônia  
acsantana@superig.com.br

### Carlos Triveño Rios

Engenharia metalúrgica, doutorado  
Professor Adjunto da Universidade Federal do ABC, Santo André - SP  
carlos.triveno@ufabc.edu.br

### Cristiane Sanchez Farinas

Engenharia química, doutorado  
Pesquisador da Embrapa Instrumentação, São Carlos - SP  
cristiane@cnpdia.embrapa.br

# 11. RESÍDUO DA AGROINDÚSTRIA DO AÇAÍ PARA PRODUÇÃO DE CELULASES

*Cristiane Sanchez Farinas*  
*Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos*  
*José Dalton Cruz Pessoa*  
*Victor Bertucci Neto*

## INTRODUÇÃO

A cadeia do açaí é uma das principais fontes de riqueza e emprego do Nordeste Paraense. Somente na cidade de Belém, existem cerca de 2,5 mil estabelecimentos que comercializam diariamente em torno de 305 toneladas do açaí (IBGE, 2008), gerando aproximadamente 253 toneladas de lixo orgânico constituído principalmente de caroços descartados em aterros sanitários e cursos d'água. O desenvolvimento da cadeia do açaí também depende da correta destinação de todos os subprodutos gerados, reduzindo-se ao máximo a geração de rejeitos. Neste sentido, os subprodutos devem ser encarados como passíveis de valorização econômica, ganhando novo status na cadeia.

A produtividade da *Euterpe oleracea*, nas várzeas periodicamente inundáveis, concentra-se nos meses de julho a novembro. Segundo dados do IBGE (2008), o Estado do Pará é responsável por 92,2% da produção nacional de açaí com 111.460 t/ano do fruto. Esta produção supera em 11,9% a registrada no ano anterior (2007). Desse total, 92.512 t/ano é de resíduo (caroço), ou seja, cerca de 83% do total produzido, evidenciando o aumento da produção da agroindústria do açaí.

Principal subproduto da indústria de processamento do açaí, o caroço do açaí é uma semente oleaginosa formada por um pequeno endosperma sólido ligado a um tegumento que na maturidade é rico em celulose. Rodríguez-Zúñiga et al. (2008) reportam que o caroço do açaí é composto por 53,20% de celulose, 12,26% de hemicelulose e 22,30% de lignina. A Tabela 1 apresenta a análise comparativa da composição química dos principais componentes do caroço do açaí, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, madeira dura e madeira mole.

**Tabela 1.** Composição química de alguns materiais lignocelulósicos

Componentes	Caroço do açaí	Farelo de trigo	Bagaço de cana-de-açúcar	Madeira dura	Madeira mole
Celulose (%)	53,20	10,90	46,86	40-55	45-50
Hemicelulose (%)	12,26	23,71	27,50	24-40	25-35
Lignina (%)	22,30	4,90	26,27	18-25	25-35
Proteínas (%)	5,20	17,60	-	-	-

**Fonte:** (SAHA, 2001; HOWARD et al., 2003; CANILHA et al., 2007; SILVA, 2007; RODRÍGUEZ-ZÚNIGA et al., 2008).

O grau de celulose de 53,20% presente no caroço do açaí é alto em relação a outros resíduos agroindustriais, como farelo de trigo (10,90%), atraindo atenção para sua utilização como substrato no processo de produção de enzimas. No entanto, o alto teor de lignina e baixo teor de proteínas confere ao caroço do açaí pouca susceptibilidade aos processos enzimáticos. Segundo Teixeira et al. (2004), o caroço apresenta quimicamente 97,40% de matéria orgânica, 2,60% de cinza, relação C/N 48,50, pH 5,05; 1,17% de N; 0,13% de P, 0,49% de K<sub>2</sub>O; 0,06% de Ca; 0,02% de Mg; e 0,19% de S; 180 mg.kg<sup>-1</sup> de Fe; 258 mg.kg<sup>-1</sup> de Mn; 13,5 mg.kg<sup>-1</sup> de Cu; 28 mg.kg<sup>-1</sup> de Zn e 42,5 mg.kg<sup>-1</sup> de B. Adicionalmente, conforme Nogueira (2007), esse resíduo disponibiliza um potencial energético de 4500 Kcal.kg<sup>-1</sup>.

Assim, a utilização do caroço do açaí como substrato para o processo de fermentação em estado sólido (FES) mostra-se promissor frente a sua composição química e baixo custo de aquisição. A geração crescente e a concentração da produção em uma pequena área da Região Norte brasileira garantem a sustentabilidade de seu fornecimento à indústria de tecnologia enzimática. Diversos processos têm sido estudados para obtenção de produtos com alto valor agregado, obtidos a partir de compostos lignocelulósicos. Neste contexto, o caroço do açaí destaca-se quanto a sua utilização por apresentar uma grande fração de celulose (53,20%) em sua composição, a qual pode ser utilizada por um microorganismo na FES para produção de enzimas de interesse comercial.

Com várias aplicações industriais, a demanda de enzimas mais estáveis e altamente ativas tem crescido mundialmente, tendo seus principais exportadores localizados na Europa, Estados Unidos e Japão (INT, 2010). Em todo o mundo, o custo de produção destas enzimas tem se apresentado como o maior problema para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais. De acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior do Governo Federal (ALICEWEB, 2010) sobre o mercado de enzimas do Brasil, no ano de 2009 as importações brasileiras ultrapassaram US\$ 71 milhões, enquanto as exportações atingiram US\$ 32,2 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, o que indica uma desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país.

O processo de fermentação em estado sólido (FES) tem se destacado na produção enzimática com a utilização de fungos filamentosos, que apresentam morfologia adequada ao processo de fermentação e tem importante papel na degradação de materiais orgânicos, possibilitando uma vasta aplicação biotecnológica. No entanto, no processo de FES, grande número de variáveis afeta o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a produção de metabólitos de interesse. Dentre estas, destaca-se a composição nutricional do meio de cultivo utilizado.

Uma das principais funções do substrato na FES é fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento e metabolismo do fungo e, uma vez que o meio de cultura *in natura* não fornece a quantidade necessária de nutrientes, uma suplementação deve ser realizada em termos das fontes de nitrogênio, carbono e sais minerais. Indutores de crescimento e metabolismo podem compor a suplementação do meio quando um produto específico é desejado. Outro fator importante para o processo de FES é a umidade do meio, que deve ser determinada considerando-se as características fisiológicas do microorganismo fermentador, bem como o produto desejado. Além disso, variáveis como temperatura, aeração e pH do meio influem significativamente no processo. Na avaliação deste processo, a metodologia estatística de planejamento experimental pode ser utilizada para seleção de variáveis que influenciam a produção enzimática com o aproveitamento do caroço do açaí como substrato. Essa metodologia permite a obtenção de um maior número de informações a partir de um número reduzido de experimentos.

Assim, são apresentadas aqui informações sobre o processo de FES bem como os resultados de um estudo sobre a viabilidade da utilização do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por FES através do cultivo de uma linhagem selecionada do fungo filamentoso *Aspergillus niger*. As enzimas selecionadas foram as celulases e xilanases, que possuem uma importante aplicação nos processos de conversão da biomassa para a produção de biocombustíveis, entre outras aplicações nas industriais. No entanto, um dos obstáculos para o uso dessas enzimas de forma mais ampla é o seu custo elevado. A utilização do caroço de açaí como um substrato de baixo custo poderá ser uma alternativa para sobrepor essa barreira.

## FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Os processos fermentativos de produção de enzimas podem ser conduzidos tanto em meio líquido, chamado de fermentação submersa (FS), quanto em meio sólido, chamado de fermentação em estado sólido (FES). A fermentação em estado sólido é definida como o processo de desenvolvimento microbiano em superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microorganismo, isto é, isento de água livre (RAHARDJO et al., 2005), sendo estes materiais sólidos biodegradáveis ou não, com ou sem nutrientes solúveis.

Por ser um processo com baixos níveis de água residual, a FES apresenta-se como um processo industrial limpo. Pode ser classificada em dois tipos: i) as condições para o crescimento do microorganismo fermentador são propiciadas pelo próprio substrato; e ii) o crescimento do microorganismo ocorre em um suporte inerte. Em todos os casos, são necessárias a seleção

da matéria-prima, a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita e o controle da mesma, bem como a extração e a purificação dos produtos que se deseja. Dentre os parâmetros do processo, deve-se atentar à necessidade da utilização de pré-tratamentos do substrato, como a moagem e lavagem, e para fatores físico-químicos e bioquímicos: temperatura de incubação, transferência de massa ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) e de energia (calor produzido na fermentação), suplementação de nutrientes ao substrato (N, C, P), aeração, umidade relativa do sistema, entre outros (PANDEY, 2003).

O uso da FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes microrganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produção quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HOLKER et al., 2004). Sob o ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada ao menor volume de efluente produzido e à possibilidade de conduzir o processo em condições semi-estéreis.

No entanto, o processo de fermentação em estado sólido apresenta como principais desvantagens a dificuldade de medida e controle da aeração, da temperatura e da umidade durante o processo. O tamanho das partículas do substrato interfere diretamente nessas variáveis. Partículas maiores aumentam a aeração e impedem o aquecimento do sistema pela respiração do fungo, porém limitam a superfície do substrato a qual o microrganismo tem acesso. Por outro lado, partículas menores podem ocasionar a compactação do substrato, dificultando a aeração e o equilíbrio térmico do processo. Além disso, a homogeneidade das condições do meio também é dificultada pela não solubilização do substrato (HONG et al., 1988; RODRIGUES; SANT'ANNA, 2001).

Em relação à seleção do substrato sólido para FES, o custo e a viabilidade de uso são os fatores primordiais a serem analisados (PANDEY et al., 2000). A utilização de resíduos agroindustriais é vantajosa economicamente, uma vez que o custo do processo é minimizado, já que estes resíduos são subprodutos de outras atividades industriais (COELHO et al., 2001), possuem geração em grande quantidade e, normalmente, sem nenhum valor comercial. Além disso, sua destinação, muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento, leva à geração de problemas ambientais.

Segundo Alexandrino et al. (2007), nos últimos anos, há um crescente interesse no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos e enzimas.

Diversos resíduos agroindustriais, como os farelos de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, mandioca e laranja, polpa de café, entre outros, podem ser utilizados como substratos para FES. As estruturas básicas desses materiais (celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina, fibras) conferem as propriedades de sólidos aos substratos e, geralmente, servem de fontes de carbono e energia para o desenvolvimento do microrganismo fermentador (BRAVO et al., 2000; CAPUDI et al., 2003; CANUTO, 2006).

Atualmente, novos resíduos agroindustriais estão sendo estudados. Dentre estes, o caroço do açaí apresenta um grande potencial para utilização como substrato para FES devido a sua disponibilidade crescente e baixo custo, sobretudo na região Norte do Brasil.

## CAROÇO DO AÇAÍ COMO SUBSTRATO

Neste estudo, tem-se como objetivo avaliar a viabilidade da utilização do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES), através do cultivo de uma linhagem selecionada do fungo filamentosso *Aspergillus niger*. No processo de FES, um grande número de variáveis afeta a produção de metabólitos de interesse, destacando-se as fontes de carbono e nitrogênio, indutores de crescimento e sais minerais, bem como a umidade do meio. Assim, avaliou-se a influência da composição do meio de cultivo através da aplicação da metodologia de planejamento estatístico fatorial para seleção das variáveis significativas.

## PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS

A influência de multivariáveis em processos biotecnológicos é um fato bastante comum. A técnica estatística de planejamento fatorial permite investigar o efeito de várias variáveis de um processo, minimizando o trabalho necessário e o custo dos experimentos, extraindo do sistema em estudo o máximo de informação útil. O planejamento fatorial permite também a determinação dos efeitos de interação entre as variáveis, além de possibilitar, simultaneamente, a otimização de vários parâmetros do processo em estudo.

Nesta técnica de planejamento de experimentos, as variáveis que, em princípio, influenciam as propriedades de interesse, chamadas de variáveis respostas, são os fatores, e a função que descreve essa influência é chamada de superfície de resposta. Quando o objetivo é a otimização de um processo, utiliza-se a técnica de metodologia de superfície de resposta, e para isso é necessário programar os ensaios através de um planejamento fatorial, selecionando um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e executando experimentos com todas as combinações possíveis. Neste trabalho realizou-se um planejamento experimental sequencial, utilizando inicialmente um planejamento fatorial completo para a seleção das variáveis significativas no processo, seguidas de um delineamento composto central rotacional (DCCR), no qual fez-se uso da metodologia de superfície de resposta para otimização do processo. As variáveis inicialmente avaliadas foram a umidade inicial do meio e as concentrações de extrato de peptona de carne, extrato de levedura e carboximetilcelulose (CMC). Após a fermentação, realizou-se a extração do complexo enzimático e a quantificação das atividades das enzimas celulases (na forma de endoglucanase ou CMCase) e xilanase.

Após a realização dos experimentos de FES nas condições definidas no planejamento experimental sequencial, as atividades enzimáticas de CMCase e xilanase foram analisadas, permitindo a identificação, através de métodos estatísticos e empíricos, do efeito das variáveis estudadas (concentrações de peptona, de extrato de levedura e de CMC, e a umidade inicial do meio) e das variáveis significativas ao processo. Tanto para o planejamento fatorial  $2^4$  completo, para o delineamento composto central rotacional (DCCR), quanto para os ensaios utilizados no teste de comparação de médias, as atividades enzimáticas foram analisadas primeiramente para CMCase e posteriormente para xilanase, obtidas ao final de 72 horas de fermentação, com a utilização do caroço do açaí como substrato e *Aspergillus niger* como microrganismo fermentador.

Os valores codificados e reais empregados no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo e os resultados obtidos para atividades de CMCase e xilanase, utilizando caroco do açaí como substrato, são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo para as atividades enzimáticas de CMCase e xilanase (U.g<sup>-1</sup>)

Ensaio	Extrato de peptona (g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	CMC (%)	Umidade inicial do meio (%)	CMCase (U.g <sup>-1</sup> )	Xilanase (U.g <sup>-1</sup> )
1	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0,5)	-1 (40)	0,51	0,85
2	1 (14)	-1 (1)	-1 (0,5)	-1 (40)	1,11	1,85
3	-1 (2)	1 (9)	-1 (0,5)	-1 (40)	1,56	1,87
4	1 (14)	1 (9)	-1 (0,5)	-1 (40)	3,38	4,75
5	-1 (2)	-1 (1)	1 (2,5)	-1 (40)	0,75	0,92
6	1 (14)	-1 (1)	1 (2,5)	-1 (40)	1,70	2,02
7	-1 (2)	1 (9)	1 (2,5)	-1 (40)	2,57	2,30
8	1 (14)	1 (9)	1 (2,5)	-1 (40)	3,60	4,67
9	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0,5)	1 (80)	1,46	1,75
10	1 (14)	-1 (1)	-1 (0,5)	1 (80)	1,61	2,03
11	-1 (2)	1 (9)	-1 (0,5)	1 (80)	1,13	1,11
12	1 (14)	1 (9)	-1 (0,5)	1 (80)	2,68	2,53
13	-1 (2)	-1 (1)	1 (2,5)	1 (80)	1,09	0,75
14	1 (14)	-1 (1)	1 (2,5)	1 (80)	1,24	1,54
15	-1 (2)	1 (9)	1 (2,5)	1 (80)	1,54	1,18
16	1 (14)	1 (9)	1 (2,5)	1 (80)	1,79	3,06
17 (C)	0 (8)	0 (5)	0 (1,5)	0 (60)	2,24	1,50
18 (C)	0 (8)	0 (5)	0 (1,5)	0 (60)	2,14	1,89
19 (C)	0 (8)	0 (5)	0 (1,5)	0 (60)	2,60	1,77

#### ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CMCase PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup> COMPLETO

Os efeitos das variáveis independentes foram avaliados inicialmente em termos da atividade da enzima CMCase. Observou-se que, em condições de maior concentração de peptona bovina (14 g.L<sup>-1</sup>) e maior concentração de extrato de levedura (9 g.L<sup>-1</sup>), nível +1, a atividade enzimática da

CMCase atingiu 3,60 U.g<sup>-1</sup>. Nas condições com os menores valores para todas as variáveis (nível -1), foi obtido o menor resultado para atividade enzimática da CMCase (0,51 U.g<sup>-1</sup>).

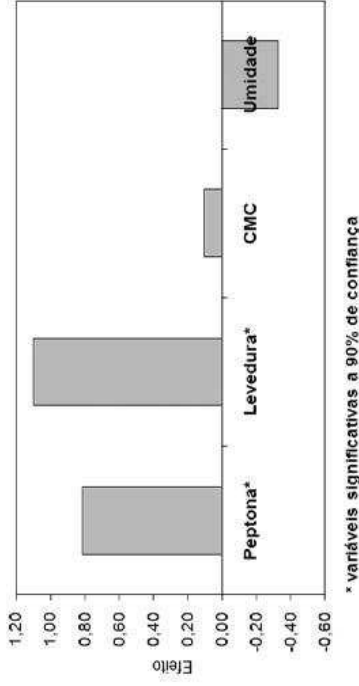
A Tabela 3 apresenta a estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo para atividade enzimática da CMCase.

**Tabela 3.** Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo para a atividade enzimática da CMCase

	Efeitos	Desvio padrão	t (8)	p-valor	Lim. Conf. - 90%	Lim. Conf. + 90%
Média*	1,826	0,097	18,798	0,000	1,645	2,006
(1) Extr. de peptona*	0,812	0,212	3,838	0,005	0,419	1,206
(2) Extr. de levedura*	1,099	0,212	5,190	0,001	0,705	1,492
(3) CMC	0,104	0,212	0,492	0,636	-0,290	0,498
(4) Umidade inicial	-0,330	0,212	-1,557	0,158	-0,723	0,064
1 x 2	0,350	0,212	1,653	0,137	-0,044	0,743
1 x 3	-0,217	0,212	-1,024	0,336	-0,610	0,177
1 x 4	-0,286	0,212	-1,352	0,213	-0,680	0,107
2 x 3	0,081	0,212	0,382	0,712	-0,313	0,475
2 x 4*	-0,659	0,212	-3,114	0,014	-1,053	-0,266
3 x 4*	-0,411	0,212	-1,939	0,088	-0,804	-0,017

\* variáveis significativas a 90% de confiança (p<0,1).

As variáveis concentrações de extrato de peptona bovina e extrato de levedura e os efeitos de interação entre a concentração de extrato de levedura e umidade inicial do meio e entre a concentração de CMC e umidade inicial do meio se mostraram estatisticamente significativas a 90% de confiança para atividade de CMCase no intervalo estudado. A variável umidade inicial e a interação entre o extrato de peptona e extrato de levedura foram consideradas nas estimativas dos efeitos por apresentarem-se significativos próximos a 90% de confiança. A variável concentração de CMC não apresentou efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança. O histograma do efeito das principais variáveis estudadas é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Histograma dos efeitos das variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e de CMC e umidade inicial do meio sobre a atividade enzimática da CMCase.

O histograma (Figura 1) e a Tabela 3 apresentam um efeito positivo significativo a 90% de confiança do extrato de peptona e do extrato de levedura para produção de CMCase, indicando que o incremento dessas variáveis levaria a maiores respostas. Já a umidade inicial do meio apresentou efeito negativo, indicando que melhores resultados são obtidos com os níveis mais baixos dessa variável.

Ensaio comparativos realizados nas mesmas condições do ponto central, porém utilizando farelo de trigo como substratos, elevaram a produção de CMCase a  $11,62 \text{ U.g}^{-1}$ . Apesar de ser superior aos valores obtidos usando o caroço do açaí como substrato, a crescente disponibilidade, a baixo custo, desse resíduo pode ser uma vantagem no processo de obtenção das enzimas de interesse.

#### ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA XILANASE PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup> COMPLETO

Em relação à atividade enzimática da xilanase, as melhores respostas foram observadas em meios contendo maiores concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura, com menor concentração de CMC e menor umidade inicial, atingindo  $4,75 \text{ U.g}^{-1}$  (Tabela 2). Já os menores valores de atividade enzimática da xilanase foram observados em condições opostas, ou seja, menores concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura, com maior concentração de CMC e maior umidade inicial do meio, atingindo  $0,75 \text{ U.g}^{-1}$ .

A Tabela 4 apresenta a estimativa dos efeitos e teste de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo para a atividade enzimática da xilanase.

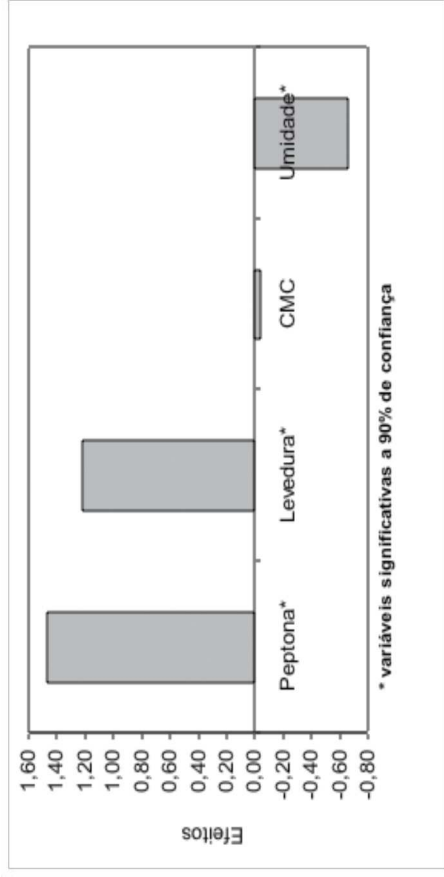
**Tabela 4.** Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo para a atividade enzimática da xilanase

	Efeitos	Desvio padrão	t(8)	p-valor	Lim. Conf. - 90%	Lim. Conf. + 90%
Média*	2,017	0,075	26,740	0,000	1,877	2,157
(1) Extr. de peptona*	1,466	0,164	8,916	0,000	1,160	1,771
(2) Extr. de levedura*	1,221	0,164	7,427	0,000	0,915	1,527
(3) CMC	-0,038	0,164	-0,229	0,825	-0,343	0,268
(4) Umidade inicial*	-0,660	0,164	-4,015	0,004	-0,966	-0,354
1 x 2*	0,672	0,164	4,086	0,004	0,366	0,977
1 x 3	0,072	0,164	0,440	0,672	-0,233	0,378
1 x 4*	-0,373	0,164	-2,268	0,053	-0,679	-0,067
2 x 3	0,275	0,164	1,671	0,133	-0,031	0,580
2 x 4*	-0,768	0,164	-4,672	0,002	-1,074	-0,462
3 x 4	-0,184	0,164	-1,120	0,295	-0,490	0,122

\* variáveis significativas a 90% de confiança ( $p < 0,1$ )

As variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e a umidade inicial do meio apresentaram efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança. Já a variável concentração de CMC não apresentou efeito estatisticamente significativo no intervalo estudado. O histograma do efeito das variáveis estudadas é apresentado na Figura 2.





**Figura 2.** Histograma dos efeitos das variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e de CMC e umidade inicial do meio sobre a atividade enzimática da xilanase.

O histograma (Figura 2) e a Tabela 4 apresentam um efeito positivo significativo das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura para atividade enzimática da xilanase, indicando que o incremento dessas variáveis levaria a maiores respostas. Já a concentração de CMC e a umidade inicial do meio apresentaram efeito negativo (significativo a 90% de confiança para umidade inicial do meio), indicando que melhores resultados são obtidos com os níveis mais baixos dessas variáveis. Da mesma forma que para a enzima CMCase, foram realizados ensaios comparativos utilizando farelo de trigo como substrato para produção de xilanase. Atividades enzimáticas de até 14,56 U.g<sup>-1</sup> foram obtidas em condições do ponto central. Novamente, a crescente disponibilidade do caroço do açaí a baixo custo configura-se como uma vantagem quanto à utilização desse resíduo como substrato no processo FES para obtenção de enzimas de interesse.

A partir das análises estatísticas feitas sobre os resultados obtidos no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo foi possível identificar as variáveis concentração de extrato de peptona bovina e concentração de extrato de levedura, como significativas estatisticamente com p-valor menores que 10% (p<0,1) para as atividades de CMCase e xilanase. O efeito dessas duas variáveis se apresentou como positivo para a produção enzimática, indicando que melhores resultados podem ser obtidos com o incremento de seus valores nas etapas seguintes do planejamento experimental sequencial, como o delineamento composto central rotacional (DCCR).

Embora não tenha sido identificada como variável estatisticamente significativa para atividade de CMCase no intervalo estudado, a umidade inicial do meio é uma variável com grande influência para o processo de FES, sendo que altos valores de umidade afetam negativamente na produção enzimática. Neste sentido, a umidade inicial do meio foi fixada no nível mais baixo utilizado anteriormente (40%).

Visando a otimização do processo de produção das enzimas, bem como a redução dos custos operacionais, a variável concentração de CMC, também identificada como não significativa a 90% de confiança no planejamento experimental, foi fixada no nível mais baixo estudado (0,5%).

A partir desses resultados é possível definir as variáveis significativas ao processo e selecionar as condições experimentais do ensaio do delineamento composto central rotacional (DCCR).

### DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Um novo planejamento estatístico com o incremento nos valores das variáveis significativas, concentração de extrato de peptona bovina e concentração de extrato de levedura, foi realizado utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR). O delineamento foi constituído por 4 ensaios em dois níveis (-1 e +1), 4 pontos axiais (-1,41 e +1,41) e 3 pontos centrais. A matriz contendo as condições dos ensaios realizados com caroço do açaí e as respostas obtidas para atividade enzimática da CMCase e xilanase são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Condições dos ensaios realizados no DCCR e os resultados obtidos para atividades enzimáticas de CMCase e xilanase (U.g<sup>-1</sup>)

Ensaio	Extrato de peptona (g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	CMCase (U.g <sup>-1</sup> )	Xilanase (U.g <sup>-1</sup> )
1	-1 (14)	-1 (9)	5,54	3,11
2	1 (26)	-1 (9)	7,19	5,51
3	-1 (14)	1 (21)	7,77	5,98
4	1 (26)	1 (21)	8,24	8,08
5	0 (20)	-1,41 (6,4)	6,82	4,46
6	0 (20)	1,41 (23,6)	6,93	6,30
7	-1,41 (11,4)	0 (15)	5,81	3,62
8	1,41 (28,6)	0 (15)	7,93	7,08
9 (C)	0 (20)	0 (15)	6,62	5,79
10 (C)	0 (20)	0 (15)	5,93	5,99
11 (C)	0 (20)	0 (15)	5,76	6,04

Para as análises estatísticas dos resultados obtidos para as atividades enzimáticas CMCase e xilanase, o nível de confiança foi ajustado a 85%, visando uma melhor adequação do modelo gerado.

#### ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CMCase OBTIDA NO DCCR

Com base nos resultados obtidos no DCCR (Tabela 5), foi possível observar um aumento de 2,29 vezes na atividade enzimática da CMCase em relação ao planejamento fatorial completo, atingindo 8,24 U.g<sup>-1</sup> (Tabela 10).

A Tabela 6 apresenta a estimativa por ponto e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para atividade enzimática da CMCase. Os efeitos dos termos lineares são apresentados associados à letra L, e os termos quadráticos associados à letra Q.

**Tabela 6.** Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase

Efeitos	Desvio padrão	t (5)	p-valor	Lim. Conf. - 85%	Lim. Conf. + 85%
Média*	6,103	16,992	0,000	5,493	6,714
(1)Peptona (L)*	1,279	2,908	0,033	0,532	2,027
Peptona (Q)*	0,925	1,766	0,138	0,035	1,815
(2)Extr. de Levedura (L)*	0,858	1,951	0,109	0,111	1,606
Extr. de Levedura (Q)*	0,928	1,773	0,136	0,038	1,818
1L x 2L	-0,592	0,622	-0,951	-1,649	0,465

\* variável significativas a 85% de confiança (p<0,15)

Apenas a interação entre as concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura não se mostrou estatisticamente significativo a 85% de confiança, tendo sido incorporadas aos resíduos nas análises seguintes.

Assim, a Tabela 7 apresenta os resultados para o coeficiente de regressão, desvio padrão, teste t e p-valor obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase, já com a exclusão da variável identificada como não significativa a 85 % de confiança (Tabela 14).

**Tabela 7.** Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, teste t e p-valor obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (6)	p-valor	Lim. Conf. - 85%	Lim. Conf. + 85%
Média*	6,103	0,356	17,128	0,000	5,515	6,692
Extr. de peptona (L)*	0,640	0,218	2,932	0,026	0,280	1,000
Extr. de peptona (Q)*	0,462	0,260	1,780	0,125	0,034	0,891
(2)Extr. de levedura(L)*	0,429	0,218	1,967	0,097	0,069	0,789
Extr. de levedura(Q)*	0,464	0,260	1,787	0,124	0,036	0,893

\* variáveis significativas a 85% de confiança (p<0,15)

A Tabela 8 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da CMCase no DCCR, com a exclusão da variável não significativa a 85% de confiança.

**Tabela 8.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da CMCase no DCCR após a exclusão das variáveis não significativas a 85% de confiança.

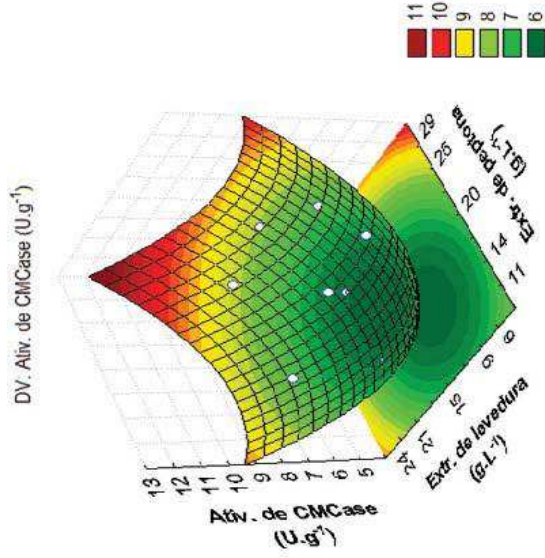
Variáveis estatísticas	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados
Regressão	6,624	4	1,656
Resíduo	2,282	6	0,380
Total	8,907	10	
F <sub>(Modelo)</sub> =	4,35		
R <sup>2</sup> =	0,744		
Nível de confiança =	85%		
F <sub>tabelado (4;6;0,15)</sub> =	2,52		
F <sub>modelo</sub> / F <sub>tabelado</sub> =	1,73		

No teste F, o F do modelo foi 1,73 vezes maior que o F tabelado, e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup> = 0,7437) se mostrou satisfatório para obtenção de um modelo preditivo da atividade enzimática da CMCase.

O modelo com as variáveis codificadas, que representa a atividade enzimática (U.g-l) em função da concentração de extrato de peptona bovina e da concentração de extrato de levedura na faixa estudada pode ser representado pela equação 1:

$$\text{Atividade enzimática da CMCase} = 6,103 + (0,640 \cdot [\text{peptona}]) + (0,429 \cdot [\text{levedura}]) + (0,462 \cdot [\text{peptona}]^2) + (0,464 \cdot [\text{levedura}]^2) \quad (1)$$

Os dados obtidos pelo modelo para atividade enzimática da CMCase foram utilizados para a construção do gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 3.



**Figura 3.** Superfície de respostas para a atividade enzimática da CMCase ( $\text{U.g}^{-1}$ ) em função das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

Apesar dos resultados obtidos no DCCR apresentarem um incremento na atividade enzimática da CMCase em relação ao planejamento fatorial  $2^4$  completo, o estudo da superfície de resposta indica que melhores resultados podem ser obtidos com o incremento das variáveis concentração de extrato de peptona e levedura.

Neste sentido, foram feitos ensaios com concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura três vezes maiores ao ponto central utilizados na primeira otimização (DCCR), a fim de obter resultados preliminares para uma segunda otimização. Assim, os novos valores adotados foram  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de peptona e  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura. Os resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para a atividade enzimática da CMCase ( $\text{U.g}^{-1}$ ) são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores codificados para as variáveis estudadas e resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para atividade enzimática da CMCase

Ensaios	Extrato de peptona	Extrato de levedura	CMCase ( $\text{U.g}^{-1}$ )
12	3,00	3,00	15,13
13	3,00	3,00	15,39
14	3,00	3,00	14,39

Através da análise da Tabela 9, observa-se que, em média, os resultados obtidos ( $13,09 \text{ U.g}^{-1}$ ) representam um acréscimo de 1,59 vezes na atividade enzimática da CMCase em relação aos valores atingidos na primeira otimização ( $8,24 \text{ U.g}^{-1}$ ). Estes resultados corroboram o aumento da atividade enzimática da CMCase através do incremento das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura pressuposto no DCCR.

### ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA XILANASE OBTIDA NO DCCR

Em relação à xilanase, as melhores respostas obtidas no DCCR foram observadas em meios contendo as mesmas condições encontradas para CMCase chegando a  $8,08 \text{ U.g}^{-1}$ , indicando um aumento de 1,7 vezes na atividade enzimática em relação ao planejamento fatorial  $2^4$  completo.

A Tabela 10 apresenta a estimativa por ponto e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para atividade enzimática da xilanase. Os termos lineares das variáveis estudadas são apresentados associados à letra L, e os termos quadráticos associados à letra Q.

**Tabela 10.** Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para a atividade enzimática da xilanase

	Efeitos	Desvio padrão	t (5)	p-valor	Lim. Conf. - 85%	Lim. Conf. + 85%
Média*	5,938	0,289	20,578	0,000	5,448	6,429
(1)Peptona (L)*	2,352	0,353	6,655	0,001	1,751	2,953
Peptona(Q)	-0,436	0,421	-1,036	0,348	-1,151	0,279
(2)Extr. de Levedura (L)*	2,011	0,353	5,690	0,002	1,410	2,612
Extr. de Levedura (Q)	-0,407	0,421	-0,967	0,378	-1,122	0,308
1L by 2L	-0,154	0,500	-0,308	0,770	-1,004	0,695

\* variável significativas a 85% de confiança ( $p < 0,15$ )

Apenas os termos lineares das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura se apresentaram estatisticamente significativos a 85 % de confiança. Todos os termos quadráticos e o efeito de interação não se mostraram significativos a 85% de confiança, tendo sido incorporados aos resíduos nas análises seguintes.

A Tabela 11 apresenta os resultados para o coeficiente de regressão, desvio padrão, teste t e p-valor obtidos pelo DCCR para a atividade enzimática da xilanase, com a exclusão das variáveis identificadas como não significativas.

**Tabela 11.** Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, teste t e p-valor obtidos no DCCR para a atividade enzimática da xilanase, com exclusão das variáveis não significativas

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t(8)	p-valor	Lim. Conf. - 85%	Lim. Conf. + 85%
Média*	5,632	0,137	40,991	0,000	5,413	5,851
(1) Extr. de peptona (L)*	1,176	0,161	7,299	0,000	0,919	1,433
(2) Extr. de levedura (L)*	1,005	0,161	6,241	0,000	0,749	1,262

\* variáveis significativas 85% de confiança (p<0,15).

A Tabela 12 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da xilanase no DCCR, com a exclusão da variável não significativa a 85% de confiança.

**Tabela 12.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da xilanase no DCCR

Variáveis Estatísticas	Soma dos Quadrados	Grav de Liberdade	Média dos Quadrados
Regressão	19,151	2	9,576
Resíduo	1,661	8	0,208
Total	20,812	10	
F <sub>(Modelo)</sub>	46,11		
R <sup>2</sup>	0,9202		
Nível de confiança	85 %		
F <sub>tabelado(2; 8; 0,15)</sub>	2,43		
F <sub>modelo</sub> / F <sub>tabelado</sub>	18,98		

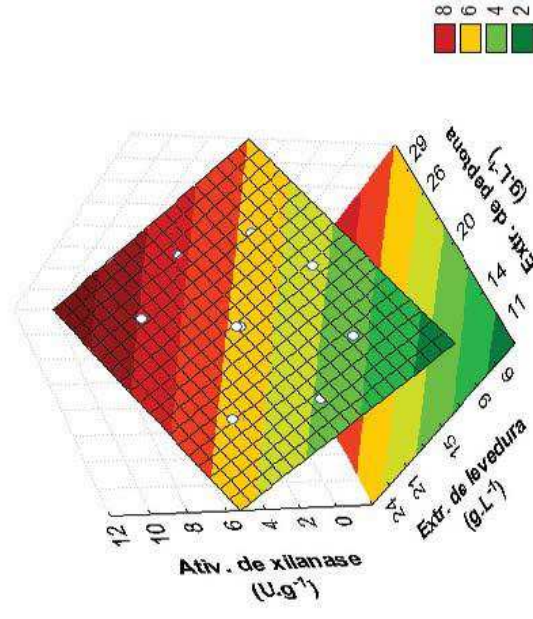
O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,9202$ ) e o teste F (18,98 vezes o valor do F tabelado) se mostraram muito satisfatórios para obtenção de um modelo preditivo da atividade enzimática da xilanase.

O modelo com as variáveis codificadas que representa a atividade enzimática ( $U \cdot g^{-1}$ ) em função das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura na faixa estudada pode ser representado pela equação 2:

$$\text{Atividade enzimática da xilanase} = 5,632 + (1,176 \cdot [\text{peptona}]) + (1,005 \cdot [\text{levedura}])$$

Os dados obtidos pelo modelo para atividade enzimática da xilanase foram utilizados para a construção do gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 4.

Apesar de os resultados obtidos no DCCR também apresentarem um incremento na atividade da xilanase em relação ao planejamento fatorial  $2^4$  completo, o estudo da superfície de resposta indica que melhores resultados podem ser obtidos com o incremento das variáveis concentração de extrato de peptona e de extrato de levedura.



**Figura 4.** Superfície de respostas para a atividade enzimática da xilanase ( $U \cdot g^{-1}$ ) em função das concentrações de extrato de peptona bovina e de extrato de levedura ( $g \cdot L^{-1}$ ).

Neste sentido, foram feitos ensaios com concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura três vezes maiores ao ponto central utilizados na primeira otimização (DCCR), a fim de se obter resultados preliminares para uma segunda otimização. Assim, os novos valores adotados foram 60 g.L<sup>-1</sup> de extrato de peptona e 45 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura. Os resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para a atividade enzimática da xilanase (U.g<sup>-1</sup>) são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para atividade enzimática da xilanase

Ensaio	Extrato de peptona	Extrato de levedura	Xilanase (U.g <sup>-1</sup> )
12	3,00	3,00	9,69
13	3,00	3,00	9,20
14	3,00	3,00	9,47

Observa-se que em média os resultados obtidos (9,45 U.g<sup>-1</sup>) representam um acréscimo de 1,16 vezes na atividade enzimática da xilanase em relação aos valores atingidos no DCCR (8,08 U.g<sup>-1</sup>).

A exemplo do ocorrido com a atividade enzimática da CMCase, estes resultados também corroboram o aumento da atividade enzimática da xilanase através do incremento das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura pressuposto no DCCR. No entanto, novamente após a aplicação do teste de Tukey, esse aumento não apresentou diferença estatística dos resultados obtidos ao nível +1,41, indicando que o aumento da atividade enzimática obtida não justifica economicamente o incremento das concentrações das variáveis estudadas.

### TESTE DE TUKEY

O teste de Tukey foi aplicado nos resultados obtidos em novos ensaios experimentais, sob condições de menor (-1,41) e maior (1,41) concentração de extrato de peptona e concentração de extrato de levedura, bem como em condições 3 vezes maiores ao ponto central utilizadas no DCCR para as variáveis estudadas (Tabela 9), visando à identificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das atividades enzimáticas de CMCase e xilanase. Os ensaios identificados com as letras  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são triplicatas entre si. As médias obtidas marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem-se significativamente entre si, com intervalo de 5% de confiança, e são apresentadas na Tabela 14.

**Tabela 14.** Atividades enzimáticas de CMCase e xilanase e médias utilizadas no teste de Tukey

Ensaio	CMCase (U.g <sup>-1</sup> )	Média*	Xilanase (U.g <sup>-1</sup> )	Média
12 $\alpha$	15,13	14,97 <sup>a</sup>	9,69	9,45 <sup>d</sup>
13 $\beta$	15,39		9,20	
14 $\gamma$	14,39		9,47	
15 $\alpha$	7,06	7,16 <sup>b</sup>	1,78	1,88 <sup>e</sup>
16 $\beta$	6,91		2,37	
17 $\gamma$	7,50		1,50	
18 $\alpha$	13,10	13,69 <sup>a</sup>	7,27	6,79 <sup>d</sup>
19 $\beta$	13,82		6,21	
20 $\gamma$	14,15		6,88	

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : triplicatas

\* médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Através do teste de Tukey, verificou-se que tanto para atividade enzimática da CMCase quanto para a atividade enzimática da xilanase houve diferença estatisticamente significativa entre os ensaios feitos nos maiores níveis (+3) dos extratos de peptona e de levedura e os ensaios feitos nos menores níveis (-1,41) no intervalo estudado. Os resultados obtidos para os níveis +1,41 e +3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os ensaios experimentais para as duas atividades enzimáticas.

Estes dados indicam que o incremento das variáveis estudadas ao nível +3 não resultam atividades enzimáticas estatisticamente superiores às obtidas ao nível +1,41, conferindo vantagem econômica aos ensaios feitos com menores concentrações de reagentes.

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos comparados com os relatados na literatura para atividade enzimática da CMCase e da xilanase pelo processo de FES, com a utilização de diferentes substratos e microrganismos fermentadores.

**Tabela 15.** Resultados obtidos para atividade enzimática da CMCase e xilanase por FES com diversos substratos

Microorganismo	Substrato	Meio	CMCase (U.g <sup>-1</sup> )	Xilanase (U.g <sup>-1</sup> )	Fonte
<i>Aspergillus niger</i>	Caroço de açaí	1	8,24	8,08	Este trabalho
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	1	11,78	15,70	Este trabalho
<i>A. niger</i>	Caroço de açaí	2	1,54	1,73	Rodríguez-Zuñiga et al., 2008
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	2	31,09	54,48	Rodríguez-Zuñiga et al., 2008
<i>A. niger</i>	Casca de arroz	2	1,85	0,29	Rodríguez-Zuñiga et al., 2008
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	3	3,24	-	Chandra et al., 2007
<i>A. niger</i>	Casca de amendoim	3	1,36	-	Chandra et al., 2007
<i>A. niger</i>	Farelo de arroz	3	1,09	-	Chandra et al., 2007
<i>A. niger</i>	Casca de arroz	4	0,0	5,07	Park et al., 2002
<i>A. niger</i>	Casca de dendê	5	-	33,99	Kheng; OMAR, 2005
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	6	-	13,8	Archana et al., 1997
<i>B. licheniformis</i>	Farelo de trigo	6	-	14,9	Archana et al., 1997
<i>B. licheniformis</i>	Casca de arroz	6	-	10,1	Archana et al., 1997
<i>A. ellipticus</i> e <i>A. fumigatus</i>	Bagaco de cana-de-açúcar	7	14,55	-	Gupta; Madamwar 1997
<i>M. albomyces</i>	Palha de trigo	8	-	7,8	Narang et al., 2001
<i>P. themophila</i>	Palha de trigo	9	-	18,5	Yang et al., 2006
1 – Mandels e Weber,	peptona 26 g.L <sup>-1</sup> , extr. levedura 21 g.L <sup>-1</sup> , CMC 5,0 %				
2 – Mandels e Weber,	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,90%				
3 – Czapek Dox,	sacarose 30 g.L <sup>-1</sup> , CMC 5 g.L <sup>-1</sup>				
4 – Água de maceração	de milho 50% (v/w), extr. levedura 5% (w/w)				
5 – Mandels,	NaNO <sub>3</sub> 0,075 % (w/w) e 1,67 mg glucosamina.g <sup>-1</sup> substrato				
6 – MgSO <sub>4</sub> 0,5 g.L <sup>-1</sup> ,	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 g.L <sup>-1</sup> , extr. de levedura 2,0 g.L <sup>-1</sup> ; peptona, 2,0 g.L <sup>-1</sup>				
7 – Mandels,	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,90%				
8 – Uréia 5,1%,	extr. levedura, 0,74%				
9 – Extr. levedura	5% (w/w)				

Através da Tabela 15, é possível concluir que os valores obtidos neste trabalho são satisfatórios, atingindo níveis superiores aos obtidos por Chandra et al. (2007) — 3,24 U.g<sup>-1</sup> para CMCase com farelo de trigo e *A. niger* — e por Park et al. (2002) — 5,07 U.g<sup>-1</sup> para xilanase com casca de arroz e *A. niger*.

No entanto, valores superiores aos obtidos neste trabalho também são relatados na literatura, porém em outras condições experimentais quanto à suplementação do meio, substrato e microorganismo fermentador. Estas diferenças indicam que novos parâmetros experimentais devem ser estudados, visando à otimização do processo e maximização da produção das enzimas CMCase e xilanase.

## CONCLUSÕES

Neste capítulo, foi apresentada a viabilidade da utilização do caroço de açaí como substrato para a produção das enzimas pelo processo de fermentação em estado sólido. O caroço do açaí mostrou-se promissor por apresentar disponibilidade crescente a baixo custo. A utilização desse resíduo agroindustrial possibilitaria minimizar os problemas ambientais ocasionados por sua destinação no meio ambiente, quase sempre sem nenhum tratamento. Outro fator é a possibilidade de agregar valor ao resíduo, tornando-o uma nova fonte de renda para as populações ribeirinhas da Região Norte do Brasil, que tem no cultivo do açaí sua principal atividade financeira.

No estudo de caso apresentado, demonstrou-se que através da metodologia de planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo foi possível identificar as variáveis estudadas como significativas ou não para a produção de celulases e hemicelulases. Assim, os valores para concentração de extrato de peptona e concentração de extrato de levedura apresentaram-se estatisticamente significativas a 90% de confiança no intervalo estudado. Por outro lado, a concentração de CMC e a umidade inicial do meio não se apresentaram estatisticamente significativas, podendo ser fixadas em seu menor nível (0,5% e 40%, respectivamente), reduzindo os custos do processo. Após a elaboração de um delineamento composto central rotacional (DCCR), as maiores atividades enzimáticas obtidas para CMCase (8,24 U.g<sup>-1</sup>) e xilanase (8,08 U.g<sup>-1</sup>) foram obtidas com adição de 26 g.L<sup>-1</sup> de extrato de peptona de carne e 21 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura ao meio de suplementação.

As análises das superfícies de resposta indicam que o incremento nos valores destas variáveis resultaria em melhores atividades enzimáticas. Neste sentido, novos ensaios foram realizados em condições de concentrações de extrato de peptona e extrato de levedura três vezes maiores às adotadas no ponto central do DCCR, resultando em aumento da atividade enzimática da CMCase em 1,59 vezes, e para atividade enzimática da xilanase em 1,16 vezes. No entanto, a aplicação do teste de comparação de médias, teste de Tukey, indicou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos nos ensaios feitos em concentrações de extrato de peptona e extrato de levedura nos níveis +1,41 e +3. Esse resultado sugere vantagem econômica aos ensaios feitos ao nível +1,41, uma vez que é possível a utilização de reagentes do processo em menor quantidade. Esse resultado sugere que novos ensaios de otimização dos parâmetros podem ser realizados próximos a essas concentrações, possibilitando a redução das quantidades dos reagentes e, conseqüentemente, aumentando a viabilidade econômica do processo.

- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G. de; SOUZA, C. G. M. de; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 364-368, abr./jun. 2007.
- ALICEWEB. 2010. Ministério do desenvolvimento e comércio exterior do Brasil. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>. Acesso em: 22 fev. 2010.
- ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 1, p. 12-17, 1997.
- BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P. de; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 137-152, 2000.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007, Natal. [S. l.: s. n.], 2007.
- CANUTO, A. P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CAPUDI, M.; CASTRO, M. C. de; RAMSDORE, W. A.; SILVA, E. R. Biodegradação de compostos lignocelulósicos pelo fungo *Pleurotus sajor-caju*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais...** [S. l.: s. n.], 2003.
- CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; RAJASEKHAR REDDY, B. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian J. Microbiol.**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 323-328, 2007.
- COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. de F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 3342, 2001.
- GUPTA, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and betaglicosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Process**, v. 13, n. 4, p. 166-169, 1997.
- HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.
- HONG, K.; TANNER, R. D.; CROOKE, P. S.; MALANEY, G. W. Semisolid state fermentation of baker's yeast in an air-fluidized bed fermentor. **Applied Biochemist Biotechnology**. [S. l.], v. 18, p. 3-17, 1988.
- HOWARD, R. L.; MASOKO, P.; ABOTSI, E. Enzyme activity of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (CBHI.1) expressed as a heterologous protein from *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 296-300, 2003.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: anuário 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2008/comentario.pdf>. Acesso em: 13 maio 2010.
- INT - INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA. **Biocatálise auxilia no desenvolvimento de tecnologias limpas**. 2006. Ministério da Ciência e Tecnologia (Brasil). Disponível em: <http://www.int.gov.br/Novo/Menu/C%F3pia%20de%20main.html>. Acesso em: 14 maio 2010.
- KHENG, P. P.; OMAR, I. C. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** [S. l.], v. 27, n. 2, p. 325-336, 2005.
- NARANG, S.; SAHAL, V.; BISARIA, V. S. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS-68 In: Solid state fermentation using response surface methodology. **J. Biosci. Bioeng.** [S. l.], v. 92, p. 425- 427, 2001.
- NOGUEIRA, M. F. M. **Biomassa energética**: caracterização de biomassa. Belém: Universidade Federal do Pará, 2007.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 13, n. 2/3, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresouce Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 81-87, 2000.
- PARK, Y. S.; KANG, S. W.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Xylanase production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Appl. Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 58, p. 761-766, 2002.
- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 161-179, 2005.
- RODRIGUES, A. M.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 57-62, 2001.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI, V.; LEMO, V. A. Produção de complexos lignocelulíticos em substratos derivados de resíduos agroindustriais por fermentação semisólida. In: WORKSHOP DE BIOCATALÍSE E BIOTRANSFORMAÇÃO, 2008, Guarujá. **Anais ...** [S. l.: s. n.], 2008.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiological and Biotechnological*, v. 30, p. 279-291, 2001.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção do etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.

TEIXEIRA, L. B.; OLIVEIRA, R. F. de; FURLAN JUNIOR, J.; GERMANO, V. L. C.

**Características químicas de composto orgânico produzido com lixo orgânico, caroço de açaí, capim e serragem**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico).

YANG, S. Q.; YAN, Q. J.; JIANG, Z. Q.; LI, L. T.; TIAN, H. M.; WANG, Y. Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 15, p. 1794-1800, 2006.

# 12. APROVEITAMENTO ENERGÉTICO DOS RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA

*Jose Dalton Cruz Pessoa*

*Alan Ribeiro dos Reis*

## INTRODUÇÃO

A produção média de frutos do açaizeiro entre 1990 e 2009, de acordo com o IBGE (IBGE, 2011), foi de 113.769 toneladas por ano, com um desvio padrão de aproximadamente 11,7%. A polpa, principal produto de comercialização, corresponde a apenas 15% da massa total do fruto, o restante corresponde ao resíduo formado por semente e borra. Realizando um cálculo simples, pode-se concluir que a agroindústria do açaí foi responsável por gerar em média 96.700 toneladas de resíduos por ano. Essa enorme quantidade de lixo orgânico, se não tratada de forma adequada, pode trazer malefícios à sociedade e ao meio ambiente.

Além de atender às questões ambientais, as soluções elegíveis para esse problema devem atender às escalas de oferta do resíduo e demanda da solução, às limitações de logística, e serem capazes de absorver uma provável valoração do resíduo. Até onde é possível avaliar neste momento, a utilização dos resíduos para geração de energia térmica atende razoavelmente esses requisitos. Ou seja, nesse caso, parte da biomassa que é retirada da floresta e transferida para o meio urbano sem fim definido seria, após as transformações necessárias, utilizada para a geração de energia no próprio meio urbano ou no meio rural. A proposta não é nova, mas este capítulo contribui com uma apresentação organizada de resultados próprios e da literatura que esperamos que forme uma argumentação plausível ao leitor, ajudando empreendedores a analisar a oportunidade de utilizar os resíduos da agroindústria do açaí como fonte de energia. A transformação de uma possível solução técnica em uma solução estruturada passa por duas etapas: o das especificações técnicas e pelo plano de negócio. Este capítulo contribui para as especificações técnicas quando persegue e detalha a resposta à seguinte pergunta: como concentrar e liberar a energia disponível nos resíduos da agroindústria do açaí?

Em outro capítulo, é analisado o potencial de produção de celulase (que pode ser usada na produção de combustível a partir de biomassa) usando resíduos da agroindústria do açaí. Aqui exploraremos uma tecnologia já madura: a da carbonização para produção de carvão vegetal.