Universidade Federal da Bahia
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
Mestrado em Ciência de Alimentos

OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE POLPA DE EUCALIPTO POR CELULASES DE *Aspergillus niger* E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EXTRACELULAR POR FUNGO ISOLADO DE CACAU

JOSILEIDE GONÇALVES BORGES

Salvador

2012

JOSILEIDE GONÇALVES BORGES

OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE POLPA DE EUCALIPTO POR CELULASES DE *Aspergillus niger* E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EXTRACELULAR POR FUNGO ISOLADO DE CACAU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profª. Drª. Janice Izabel Druzian

Co-orientadora: Profª. Drª Alaíse Guimarães

Salvador

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

JOSILEIDE GONÇALVES BORGES

OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE POLPA DE EUCALIPTO POR CELULASES DE *Aspergillus niger* E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EXTRACELULAR POR FUNGO ISOLADO DE CACAU

DISSERTAÇÃO APROVADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, PELA SEGUINTE BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Hélio Kamida_____

Doutor em Ciência de Alimentos (UNICAMP)

Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho_____

Doutor em Biotecnologia Industrial (USP)

Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Profª. Dra. Janice Izabel Druzian – Orientadora_____

Doutora em Ciências de Alimentos (UNICAMP)

Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Salvador, 25 de maio de 2012.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

“*De tudo ficaram três coisas: A certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar, e a certeza de que seria interrompido antes de terminar!”*

Fernando Sabino

“Tua caminhada ainda não terminou...
A realidade te acolhe dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita de tuas palavras
e do teu silêncio.

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram. Olhes para trás...
mas vá em frente pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Quero aqui expressar os meus agradecimentos a todos os que me apoiaram, encorajaram e ajudaram ao longo deste projeto.

À Universidade Federal da Bahia, ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos pelo apoio à realização deste trabalho.

As professoras Drª Janice Druzian e Drª Alaíse pela orientação e co-orientação, respectivamente.

A professora Marília Lordelo da Universidade Estadual de Feira de Santana pela disposição e paciência em sempre tirar minhas dúvidas ao longo do trabalho.

A professora Drª Tânia Barros do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFBA por disponibilizar fungos para etapa inicial do trabalho.

Ao CEPLAC pela identificação taxônomica do fungo *Lasidioplodia theobromae*.

A Ingrid, Jeff e Tâmara pela colaboração na realização das análises.

A Caio e ao Laboratório de Química pela realização dos ensaios de DR-X.

A Jânia pela ajuda e paciência ao longo do trabalho.

A todos os pesquisadores e funcionários do LAPESCA em especial aos colegas Denilson, Larissa e Lidia e a técnica de laboratório Luciane pela prontidão em sempre me ajudar e pelo carinho e atenção que sempre me dispensaram.

As amigas Denise e Ariana pela torcida e carinho durante os períodos mais estressantes.

A FAPESB e CAPES pela bolsa e auxílio financeiro, respectivamente.

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto, citados e não citados por nome, mais de igual importância.

Obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 18
REFERÊNCIAS 19
OBJETIVOS 22
Objetivos gerais 22
Objetivos específicos 22
CAPÍTULO I 23
Revisão bibliográfica 23
1. **PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS FÚNGICOS** 24
1.1 Enzimas 24
1.1.1 Produção de enzimas 25
1. 1. 2 Celulases 28
1. 2 Biomassa fúngica 30
1. 2. 1 Biomassa obtida por fermentação fúngica 30
1. 2. 2 Exopolissacarídeos e biomassa residual 31
1. 2. 3 Fatores de influência na produção de biomassa fúngica 33
2. FUNGOS FILAMENTOSOS 36
2.1 Fungo *Aspergillus niger* 38
2. 2 Fungo *Lasidioplodia theobromae* 39
3. FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS 42
3. 1 Fibra de eucalipto 44
3. 1.1Celulose 46
3.1.2 Hemiceluloses 49
3.1. 3 Lignina 50
3. 2 Hidrólise de fibras lignocelulósicas 51
3. 2. 1 Hidrólise Química 51
3. 2. 1. 1Hidrólise com ácido concentrado 51
3. 2. 1. 2 Hidrólise com ácido diluído 51
3. 2. 2 Hidrólise enzimática 52
3. 2. 3 Nanofibras e microfibras de celulose 53
3. 2. 4 Filmes biodegradáveis (biocompósitos) e nanobiocompósitos 56
REFERÊNCIAS 58

CAPÍTULO II 72
1.0 INTRODUÇÃO 75
2.0 Material e Métodos 77
2.1 Material 77
2.2 Micro-organismos 77
2.3 Determinação qualitativa da atividade enzimática 78
2.4 Preparo do inóculo 79
2.5 Produção do extrato enzimático via fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas 80
2.6 Determinação da atividade endoglucanásica do extrato enzimático bruto 81
2.7 Determinação da concentração de proteínas no extrato enzimático bruto 82
2.7.1 Análise estatística 82
2.7.2 Determinação da influência da temperatura na atividade enzimática 83
2.7.3 Determinação do efeito do pH na atividade enzimática 83
2.8 Hidrólises de polpa de eucalipto para obtenção de nanofibras de celulose 83
2.8.1 Hidrólise ácida (controle) 83
2.8.2 Hidrólise enzimática 84
2.8.3 Hidrólise enzimática com pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído 84
2.9 Caracterização das nanofibras de celulose de eucalipto 85
2.9.1 Birrefringência das suspensões de nanofibras de celulose 85
2.9.2 Estudo de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) 85
2.9.3 Determinação de massa molecular por cromatografia 86
2.9.4 Difração de raio-x (DRX) 86
2.10 Aplicação das nanofibras de polpa de eucalipto como reforço mecânico de Nanobiocompósitos (filmes) 87
2.10.1 Caracterização dos nanobiocompósitos 87
2.10.1.1 Análise termogravimétrica (TGA) 87
2.10.1.2 Espessura (E) 87
2.10.1.3 Ensaio de Tração 88
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO 88
3.1 Determinação qualitativa da atividade enzimática dos fungos filamentosos 88
3.2 Produção de extrato enzimático de Aspergillus niger via fermentação semi sólida 89
3.3 Influência do pH e da temperatura na ação da enzima no ensaio selecionado 92

3.4 Produção das nanofibras de polpa de eucalipto obtidas por hidrólise ácida e enzimática....93
3.5 Caracterização das nanofibras de celulose 95
3.5.1 Teste de birrefringência 95
3.5.2 Estudo de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) 96
3.5.3. Massa Molecular dos hidrolisados de celulose de eucalipto 99
3.6 Difração de raio X (DRX) 103
3.7 Caracterização dos nanobiocompósitos reforçados com nanofibras de celulose de eucalipto (filmes)....107
3.7.1Transparência e espessura dos nanobiocompósitos (filmes)....108
3.7.2 Propriedades mecânicas dos nanobiocompósitos....110
3.8 Análise Termogravimétrica dos nanocompósitos 113
4.0 CONCLUSÃO....116
REFERÊNCIAS 116
CAPÍTULO III 124
1.0 INTRODUÇÃO 127
2.0 MATERIAL E MÉTODOS....129
2.1 Material 129
2.2 Micro-organismo: Isolamento e identificação Taxônomica 129
2.3 Fermentação submersa para seleção da fonte de carbono....129
2.3.1 Manutenção e repicagem do fungo 129
2.3.2 Preparo do inóculo 130
2.3.2.1 Inóculo preparado com esferas colonizadas 130
2.3.2.1 Preparo do inóculo com homogeneização micelial....130
2.3.3 Fermentação submersa para a seleção das melhores condições do processo .130
2.3.4 Separação do micélio fúngico do caldo Fermentado....131
2.3.5 Precipitação e quantificação das frações de biomassa do caldo fermentado.....131
2.4 Caracterização das frações da biomassa do ensaio selecionado 132
2.4.1 Composição centesimal das frações 132
2.4.2 Determinação de açúcares redutores das frações da biomassa 132
2.4.3 Determinação de composição monossacarídica da porção polissacarídica das frações da biomassa 132
2.4.3.1 Preparo das frações da biomassa para caracterização cromatográfica 132

2.4.3.2 Estudo de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) 133
2.4.4. Análise Termogravimétrica 133
2.4.5 Determinação da composição de monossacarídeos das frações por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-IR) 133
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO 134
3.1 Identificação taxonômica do fungo isolado do cacau 134
3.2 Padronização do inóculo 135
3.3 Seleção da fonte de carbono para produção das frações I e II da biomassa 138
3.4 Efeito da variação do pH e da concentração da fonte de carbono na produção das frações I e II da biomassa 139
3.5 Composição centesimal das frações I e II da biomassa produzidas por *Lasidioplodia theobromae* do ensaio 10 141
3.6 Análise por FT-IR 143
3.7 Análise Termogravimétrica 144
3.8 Composição monomérica de açúcares das Frações I e II 145
4.0 CONCLUSÃO 148
REFERÊNCIAS 149

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Degradação da celulose por ação de enzimas celulóliticas 28
Figura 2. Fungo *Aspergillus niger* 38
Figura 3. Botriosferana; β-(1→3, 1→6)-D-glucana 40
Figura 4. Estrutura da parede celular de fibrilas lignocelulósicas 42
Figura 5. Polimorfismo da celulose 47
Figura 6. Projeção da cela uitária da celulose no plano a e b 48
Figura 7. Regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose 48
Figura 8. Ilustração de hemiceluloses ligadas entre si à celulose 49
Figura 9. Hidrólise seletiva das fibrilas de celulose 54

Capítulo II

Figura 1. Representação esquemática da placa de caracterização de celulases.....79
Figura 2. Efeito do pH e da temperatura na atividade da celulase de *A. niger* 92
Figura 3. Preparo das nanofibras.....94
Figura 4. Ilustração de birrefringência.....95
Figura 5. Espectros de FT-IR da polpa de eucalipto e do controle 96
Figura 6. Espectros de FT-IR da polpa das nanofibras de polpa de eucalipto produzidas em diferentes condições de hidrólise enzimática.....97
Figura 7. Cromatograma CLA GPC-IR do perfil de eluição de padrões de dextranas com diferentes pesos moleculares em GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 em série 99
Figura 8. Cromatograma GPC CLAE-IR do perfil de eluição do NFC... 100
Figura 9. Cromatograma GPC CLAE-IR do perfil de eluição dos hidrolisados celulósicos de polpa de eucalipto em diferentes condições com extrato bruto da enzima fungica .. 101
Figura 10. Difratogramas de Raios-x da polpa e nanofibras de polpa de eucalipto 104
Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão das nanofibras resultantes da hidrólise com ácido concentrado.....106
Figura 12. Ilustração da transparência dos 7 nanobiocompósitos 108

Figura 13. Nanobiocompósitos de amido incorporados com nanofibras de polpa de eucalipto em placas de petri 109
Figura14. Comportamento de tensão e deformação dos nanobiocompósitos 112
Figura 15. Curvas TGA e DTG da referência e das nanofibras formulados com amido de mandioca, açúcar invertido, sacarose e nanofibras de polpa de eucalipto.....115

Capítulo III

Figura 1. Constituintes do bioprocesso 136
Figura 2. Precipitação da fração I e II produzidas em sacarose comercial 137
Figura 3. Efeito da concentração de sacarose comercial e do pH no meio fermentado na produção da fração I e II da biomassa pelo fungo *L.theobromae* 141
Figura 4. Espectros de FT-IR produzidos pelas frações da biomassa do fungo *L.theobromae*; (A) Fração I; (B) Fração II 144
Figura 5. Curvas de termogravimetria (TG) e DTG da fração I da biomassa produzida pelo fungo *L.theobromae*.....144
Figura 6. Cromatograma CLAE-IR dos padrões de glicose e de manose 146
Figura 7. Cromatogramas CLAE-IR dos hidrolisados das Frações I (A), e fração II (B) .147

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Comparação entre Fermentação em estado sólido e fermentação submersa .26
Tabela 2. Nomenclatura, substrato, massa molar média ponderal, ponto isoelétrico e teores relativos das celulases produzidas pelo *T. reesei*.....28
Tabela 3. Proporção dos componentes químicos estruturais do eucalipto 44
Tabela 4. Propriedades físicas e mecânicas da fibra de eucalipto 44
Tabela 5. Dimensões médias de nanofibras de celulose de diferentes matérias-primas ..53

Capítulo II

Tabela 1. Constituição do meio líquido de indução para produção de celulases 78
Tabela 2. Constituição da solução de traços de sais 78
Tabela 3. Constituição do meio de caracterização.....79
Tabela 4. Condições de hidrólise de polpa de eucalipto com celulases de *A. niger* 84
Tabela 5. Condições de hidrólise com pré-tratamento com ácido sulfúrico.....85
Tabela 6. Atividade celulásica de fungos filamentosos 88
Tabela 7. Valores de concentração de glicose, proteínas e atividade específica da enzima celulase produzida por *Aspergillus niger* 90
Tabela 8. Birrefringência das condições de hidrólise testadas.....96
Tabela 9. Tempos de retenção (Tr) dos padrões de dextranas de diferentes pesos moleculares (PM) obtidos por CPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 em série 100
Tabela 10. Índice de cristalinidade (%) da polpa de eucalipto e nanofibras produzidas por hidrólise ácida e enzimática.....103
Tabela 11. Médias das análises de espessura dos filmes e referência.....109
Tabela 12. Médias das propriedades mecânicas das formulações e referência 110

Capitulo III

Tabela 1. Composição do meio fermentativo para produção da fração I e II 131
Tabela 2. Efeito da quantidade de inóculo na produção da fração I e II da biomassa 136
Tabela 3. Produção da fração I e II da biomassa em função da fonte de carbono.....139
Tabela 4. Efeito da variação da concentração de sacarose comercial e do pH na produção da fração I e II da biomassa pelo fungo *L.theobromae*.....140
Tabela 5. Composição centesimal (%) da fração I e II em base seca.....142
Tabela 6. Açúcares redutores e neutros e composição monomérica das frações de biomassa produzidas por *L.theobromae*.....148

LISTA DE QUADROS

Capitulo II

Quadro 1. Seleção das melhores condições de preparo do extrato enzimático bruto 81
Quadro 2. Produção das nanofibras de polpa de eucalipto submetidas a diferentes condições de hidrólise 94
Quadro 3. Massas moleculares e limites de distribuição das massas moleculares dos hidrolisados celulósicos de polpa de eucalipto obtidos em diferentes condições 101

LISTA DE SIGLAS

GP- grau de polimerização

FS- Fermentação submersa

FSS- Fermentação semi-sólida

FES- Fermentação sólida ou em estado sólido

CMC- Carboximetilcelulose

HEC- Hidroximetilcelulose

EPS- Exopolissacarídeos

LPS- Lipopolissacarídeos

CPS- Polissacarídeos capsulares

DCP- *Diaporthe phseolorum* var. *caulivora*

CLAE- Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

IR-Índice de refração

TGA- Análise Termogravimétrica

BCC-Companhia de Negocios de Comunicação

IC-Indice de cristalinidade

NFC- nanofibras

DTG- Derivada da análise termogravimétrica

MET- Microscopia Eletrônica de Transmição

Tr- Tempo de retenção

Log PM-logaritmo de peso molecular

RESUMO

A biotecnologia é o conjunto de conhecimentos e técnicas que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial e serviços. Os micro-organismos, incluindo os fungos filamentosos são amplamente utilizados na produção de enzimas e de biomassa microbiana, dentre outros, com ampla aplicação na indústria farmacêutica e de alimentos. Uma utilização inovadora é usar as enzimas fúngicas para degradar celulose de fibras vegetais e produzir nanofibras. Estas nanofibras são cristais de alta perfeição, que tem como características alta rigidez, excelente tensão de ruptura e alto grau de cristalinidade, podendo ser utilizados para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram produzir e caracterizar novos bioprodutos, com enfoque na extração de celulases do *Aspergillus niger* para produção de nanofibras de celulose visando incorporá-las à nanobiocompósitos, e na biomassa extracelular obtida por fermentação submersa com fungo isolado do fruto de cacau com morte descendente. Foi selecionado o extrato enzimático bruto que apresentou melhor atividade, produzido por fermentação de bagaço de cana (7 dias, 35°C, pH 6,0) por *Aspergillus niger*, resultando em uma atividade específica de 12,18 U/ µg de proteínas. No entanto, o extrato enzimático apresentou condições ótimas de atividade em pH 5,0 a 30°C que foram usadas na hidrólise enzimática da polpa de celulose de eucalipto em diferentes condições. As nanofibras de celulose que apresentaram maior percentual de aumento da cristalinidade foi NFC2 (nanofibras produzidas com 90% de enzima por 120 min) com índice de cristalinidade (IC) de 75,58%. Os nanobiocompósitos contendo nanofibras de polpa de eucalipto apresentaram propriedades mecânicas melhoradas, quando comparadas a referência (filme sem incorporação de nanofibras). As nanofibras juntamente com o plastificante, foram responsáveis por aumentar em até 61% o módulo de *Young* dos nanobiocompósitos (F6, Filmes com nanofibras submetidas a pré-tratamento ácido diluído, 1%/15 min e hidrólise enzimática), em relação à referência, devido à rigidez destas nanopartículas. O fungo isolado do cacau foi identificado como *Lasidioplodia theobromae* e na fermentação de diferentes fontes de carbono produziu duas frações, uma precipitável em etanol e a outra separada por ultracentrifugação, que mostraram ser excelentes fontes de carboidratos (30,16 e 37,96%), proteínas (19,88 e 29,45%) e lipídios (11,07 e 28,79%). A composição de monômeros da fração polissacarídica, obtida por CLAE-IR, mostrou tratar-se de glucomananas. As nanofibras de celulose de polpa de eucalipto obtidas por hidrólise com celulases de *Aspergillus niger*, os nanobiocompósitos reforçados mecanicamente com estas nanofibras são alternativas viáveis de processo e produtos menos poluentes, e as frações do exopolímero obtido por fermentação com *Lasidioplodia theobromae*, são novos bioprodutos que podem ser destinados a uma grande variedade de aplicações biotecnológicas.

Palavras chave: fungos, nanofibras, filmes biodegradáveis, biomassa.

ABSTRACT

Biotechnology is the set of knowledge and techniques that allows the use of living beings as an integral and active part of the process of industrial production and services. The micro-organisms, including the filamentous fungi are widely used in the production of enzymes and microbial biomass, among others, with wide application in the pharmaceutical industry and food. An innovative use and use the fungal enzymes to degrade cellulose plant fibers and produce nanofiber. These nanofibers are crystals of high perfection, which has characteristics such as high stiffness, excellent breakdown voltage and high degree of crystallinity, and can be used to improve the mechanical properties of biodegradable films. In this context, the objectives of this work were produce and characterize new bioproducts, with focus on the extraction of cellulases of Aspergillus niger for production of nanofibers cellulose aiming to embed them in nanobiocompositos, and biomass in extracellular obtained by fermentation submerged with fungus isolated from the fruit of cocoa with descending death. We selected the enzymatic extract gross presented the best activity, produced by fermentation of sugar cane bagasse (7 days, 35 °C, pH 6.0) by *Aspergillus niger*, resulting in a specific activity of 12.18 U/ µg protein. However, enzymatic extract presented optimal conditions of activity at pH 5.0 at 30 °C that were used in enzymatic hydrolysis of cellulose pulp of eucalyptus in different conditions. The nanofiber pulp that had the highest percentage increase of crystallinity was NFC2 (nanofibers produced with 90% of the enzyme for 120 min) with index of crystallinity (CI) of 75.58 %. The nanobiocompositos nanofibers containing pulp of eucalyptus had mechanical properties improved when compared to reference (movie without the incorporation of nanofibers). The nanofibers together with the plasticizer, were responsible for increase in up to 61% the Young module of nanobiocompositos (F6, Movies with nanofibers subjected to pre-treatment dilute acid, 1 % /15 min and enzymatic hydrolysis), compared to the reference, due to the rigidity of these nanoparticles. The fungus isolated from cocoa was identified as *Lasidioplodia theobromae* and fermentation of different carbon sources produced two fractions, the precipitable in ethanol and the other separated by ultracentrifugation, which proved to be excellent sources of carbohydrates (30.16 and 37.96 %), protein (19.88 and 29.45 %) and lipids (11.07 and 28.79 %). The composition of monomers of polysaccharide fraction obtained by HPLC-IR, revealed that it was glucomananas. The nanofiber cellulose pulp eucalyptus obtained by hydrolysis with cellulases of *Aspergillus niger*, the nanobiocompositos reinforced mechanically with these nanofibers are viable alternatives to process and least polluting products, and the fractions of exopolimero obtained by fermentation with *Lasidioplodia theobromae*, are new bioproducts that can be destined for a variety of biotechnological applications.

Key Words: fungi, nanofibers, biodegradable films, biomass.

Introdução Geral

Os processos biotecnológicos têm sido aplicados em diversos setores, incluindo a obtenção de enzimas e de biomassa extracelular de fungos, entre inúmeros outros.

O mercado mundial de enzimas de interesse industrial foi de U$ 3,3 bilhões de dólares em 2010, devendo chegar a 4,4 bilhões de dólares em 2015, com previsão de crescimento anual de 6% para os próximos 5 anos, (COMPANHIA E MERCADOS, 2011). Sabe-se que mais de 500 tipos de enzimas garantem 50 aplicações biotecnológicas para diversos segmentos econômicos como curtumes, papel e celulose, têxtil e na indústria de alimentos, entre outros (BORGES, 2011; HASAN et al., 2006), destacando-se as celulases.

Mundialmente, a quantidade de fibras lignocelulósicas produzidas é estimada em 1,55 bilhões de toneladas/ano (EPOBIO, 2006), e no Brasil de aproximadamente 350 milhões de toneladas (SILVA et al., 2009). O baixo custo e a grande disponibilidade no Brasil de fontes de fibras vegetais ricas em celulose justificam os esforços para viabilizar o uso destas para a obtenção de materiais biodegradáveis. Nanocristais de celulose (nanofibras de celulose, nanocelulose, ou *whiskers*), são os domínios cristalinos da celulose, e têm sido usados como reforço em matrizes poliméricas para melhorar as propriedades mecânicas, ópticas, dielétricas, dentre outras (SOUZA, 2004; SAMIR et al., 2005). Dentre as vantagens deste tipo de materiais incluem a baixa densidade, seu caráter renovável, biodegradabilidade, boas propriedades mecânicas e baixo custo quando comparados com nanofibras sintéticas.

Nanofibras de celulose são isolados das fibras lignocelulósicas por meio de hidrólise com ácidos fortes concentrados (SILVA et al., 2009), que contribuem para aumentar os problemas de danos ambientais. Uma alternativa interessante seria a hidrólise enzimática, já que existe uma variedade de celulases produzidas por fungos e bactérias, e a especificidade destas vem estimulando muitas pesquisas (VIEIRA et al, 2011; OLIVEIRA, 2010; ZHANG; LING, 2004).

Outra inovação bem promissora no campo da biotecnologia é a produção de biopolímeros fúngicos (BERWANGER et al., 2007). As principais características de interesse industrial desses materiais são, em geral, as formações de géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações, a compatibilidade com uma grande variedade

de sais em ampla faixa de pH e temperatura, a estabilidade em elevadas concentrações iônicas, alta solubilidade em água (CLOSS et al., 1999; LUCYSZYN et al., 2005).

Entre os produtos produzidos por fungos que têm despertado interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos encontram-se os lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e exopolissacarídeos (EPS) tais como celulose bacteriana e as β-glucanas, entre outras (CANILHA et al., 2006; GARCIA-OCHOA et al., 2004). Estes biomateriais têm encontrado amplo campo de aplicações, devido a sua ação antitumoral, antiviral, anti-inflamatória, anticoagulante, espessantes, gelificantes, dentre outras (HWANG et al., 2003).

Na produção de celulases e biomassa por fungos, deve ser considerada além da cepa escolhida, as condições ideais que simulem em laboratório o habitat natural desses micro-organismos, como fontes de carbono, nitrogênio, macroelementos e microelementos, pH de cultivo, aeração e agitação, temperatura, concentração de substrato entre outras, de forma a serem obtidos altos rendimentos e boas propriedades (BARBOSA et al., 2004).

Neste contexto, a proposta do trabalho foi produzir e caracterizar novos bioprodutos, com enfoque, na extração de celulases de *Aspergillus niger* para produção de nanofibras de celulose visando incorporá-las à nanobiocompósitos, e na biomassa extracelular obtida por fermentação submersa com fungo isolado do fruto de cacau apresentando morte descendente.

Referências

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BERWANGER, A. L. S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L.; TREICHEL,T.; PADILHA, F. F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphigomonas Capsulata* a partir de meios industriais. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 177-183, 2007.

BORGES, D. G. Preparação de derivados de β-glicosidases por imobilização em suportes sólidos derivatizados. 2011. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CANILHA, L.; SILVA, D. D.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, n. 20, 2006.

CLOSS, C. B.; CONDE-PETIT, B.; ROBERTS, I. D.; TOLSTOGUZOV, V. B.; ESCHER, F. Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 67-77, 1999.

COMPANHIA E MERCADOS. Enzimas na Indústria de alimentos e bebidas. Disponível em: http://www.companiesandmarkets.com. Acesso em janeiro de 2012.

EPOBIO, Wageningen International Conference Centre. *1st EPOBIO Workshop: Products from Plants - the Biorefinery Future*. 2006. Disponível em: <http://epobio.net/workshop0605/0605ws_finalreport_v3.pdf>. Acesso em junho de 2010.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCON, A. Chemical structured kinetic model for xanthan production. Enzyme and Microbial Technology, v. 35, p. 284-292, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HWANG, H. J.; KIM, S.W.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 309-319, 2003.

LUCYSZYN, N.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Carbohydrate Research at the UFPR. **Metals Materials And Processes**, v. 17, p. 173-182, 2005.

MOTTIN, A. C.; CÂMARA, J. J. D.; DE MIRANDA, C. A. S.; PAGNAN, C. S. O uso de bioplásticos no desenvolvimento de produtos sustentáveis. DESENHANDO O FUTURO 2011| 1º CONGRESSO NACIONAL DE DESIGN, 2011.

OLIVEIRA, S. L. R. Aproveitamento da casca de coco verde para produção de celulases. 2010, 86 p. Mestrado (Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

SAMIR, M. A. S. A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, p. 661-671, 2009.

SOUZA LIMA, M. M.; BORSALI, R. Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, and Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 25, p. 771-787, 2004.

ZHANG, Y. P.; LYND, L. R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 30, 2004.

Objetivos

Objetivos gerais

Produzir e caracterizar novos bioprodutos, com enfoque na extração de celulases de *Aspergillus niger* para produção de nanofibras de celulose visando incorporá-las à nanobicompósitos, e na biomassa extracelular obtida por fermentação submersa com fungo isolado do fruto de cacau com morte descendente.

Objetivos específicos

1. Avaliar se o fungo *Aspergillus niger* apresenta atividade celulásica pelo método "cup plate" e determinar as melhores condições para a produção e atividade da enzima celulase secretada pelo fungo;
2. Definir condições de hidrólise enzimática para a obtenção de nanofios de celulose de polpa de eucalipto, utilizando o extrato bruto enzimático de *Aspergillus niger*;
3. Fazer a caracterização das nanofibras de polpa de eucalipto produzidas por meio de técnicas de análises morfológicas, térmicas e de peso molecular, entre outras;
4. Comparar as propriedades das nanofibras de celulose obtidas por hidrólise enzimática com as obtidas por hidrólise ácida convencional;
5. Incorporar as nanofibras produzidas a filmes biodegradáveis de amido (nanobiocompósitos) para avaliar a melhoria das propriedades mecânicas;
6. Isolar e identificar o fungo isolado da fruta de cacau apresentando morte descendente;
7. Avaliar a influência da composição do meio de cultivo e do pH da fermentação submersa na produção de frações de biomassa precipitáveis ou não em etanol pelo fungo isolado de cacau;
8. Caracterizar as frações de biomassa produzidas eplao fungo isolado do cacau que resultaram em maior produção.

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

1. Produtos biotecnológicos fúngicos

A biotecnologia pode ser entendida como o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo industrial de bens e serviços (CARVALHO, 2005). A diversidade de linhagens fúngicas que, sob condições adequadas e controladas, são capazes de produzir substâncias ou de provocar alterações desejáveis em outras, resultando em produtos ou processos comerciais, tem permitido ao homem fazer amplo uso dessa tecnologia (COLEN, 2006). Vários produtos que foram criados e/ou melhorados com o advento da biotecnologia já fazem parte da vida cotidiana da população como: ácido cítrico, etanol, iogurte, ácido acético, queijos, diacetil, biofármacos, produtos de limpeza, enzimas, gomas microbianas, entre outros.

1.1 Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações biológicas, ou seja, aumentam a velocidade de uma reação química sem interferir no processo. Elas apresentam propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores, como alta atividade catalítica e seletividade específica sobre o substrato (LEHNINGER et al., 1995). Com isso, conseguem catalisar transformações moleculares de modo seletivo e rápido, em condições brandas de reação sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em síntese química. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, bastando modificar a natureza do meio de reação, como, por exemplo, pela alteração do pH. Consequentemente, os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de baixo custo de investimento (PATEL, 2002; PIZARRO; PARK, 2003).

As enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes, os substratos, formando complexos: enzima-substrato, com subsequente formação do produto. Essa cinética do processo vai depender da estrutura da proteína, isto é, do número de cadeias peptídicas e arranjo dessas cadeias na molécula, da natureza do substrato e ainda, se existir, da natureza do grupo prostético (KIELING, 2002).

Segundo FELLOWS (1994) a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos micro-organismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (retidas no interior das células microbianas). Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana.

1.1.1Produção de enzimas

O processo de produção das enzimas se dá pela extração de tecidos animais (renina, insulina etc) e vegetais (papaína, bromelina etc) ou por fermentação. Contudo, a maioria das enzimas empregadas na indústria de alimentos e nos processos industriais em geral é de origem microbiana. As tecnologias existentes para a produção de enzimas microbianas utilizam processos fermentativos que podem ser conduzidos tanto em meio líquido, chamado de fermentação submersa (FS), quanto em meio sólido, fermentação semi-sólida (FSS) ou em estado sólido (FES).

VINIEGRA (1997) define a fermentação semi-sólida (FSS) como o processo de crescimento de micro-organismos em um substrato sólido, contendo uma umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do micro-organismo, isto é, isento de água livre. A fermentação semi- sólida (FSS) também pode ser definida como um processo que se refere à cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ele está a um nível de atividade de água que, assegure o crescimento e metabolismo das células e, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001).

O uso da fermentação semi-sólida (FSS) tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat destes micro-organismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FSS são menos suscetíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HOLKER, 2004).

Farelos, cascas, bagaços e outros resíduos são materiais considerados viáveis para a biotransformação, já que são renováveis e produzidos em grandes quantidades. A

estrutura desses materiais tem como principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos que serve tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2001).

O bagaço de cana-de açúcar tem sido o principal substrato usado na produção de celulases por *Aspergillus niger.* Este organismo pode produzir enzimas que são ativas em diversas condições ambientais como as pectinases, proteases e amiloglicosidase que foram as primeiras a serem exploradas e originalmente produzidas em culturas de superfícies (SCHUSTER et al., 2002).

Isso faz do Brasil um potencial produtor desta enzima via fermentação semi-sólida, já que no Brasil, planta-se cana do Centro-Sul ao Norte-Nordeste, o que permite dois períodos de safra e produção de álcool e açúcar durante o ano todo (UNICA, 2006). Com isso, estima-se uma produção de 651,5 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2010/2011 (CONAB, 2010).

De natureza lignocelulósica, o bagaço da cana-de-açúcar é constituído por três frações principais, celulose (aproximadamente 47%), hemicelulose (aproximadamente 27,5%) e lignina (aproximadamente de 20,3 a 26,27%) que, juntas, perfazem mais de 90% da massa total desse material fibroso. Em geral, o teor de cinzas presente no bagaço é pequeno, mas pode representar acima de 5% da massa total (CANILHA et al., 2007). Além disso, o bagaço também apresenta, em menores proporções, compostos não constituintes da parede celular, os quais podem ser extraídos com diferentes solventes (BROWNING, 1967).

Sob o ponto de vista ambiental, a vantagem da FSS está relacionada ao menor volume de efluente produzido e à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido, servindo estes como fontes de carbono e energia. A fermentação submersa designa-se como um processo pelo qual se utiliza um meio fermentativo líquido onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis. Este processo é o mais empregado para a produção de enzimas lipolíticas devido à facilidade dos microrganismos de crescerem em condições controladas de pH e temperatura (FEITOSA, 2009).

Na tabela 1 pode-se notar uma comparação entre a fermentação em estado sólido (FSS) e a fermentação submersa (FES).

Tabela 1. Comparação entre Fermentação em estado sólido e Fermentação submersa.

Fermentação em estado sólido	Fermentação submersa
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Consumo limitado de água, baixa a_w, sem efluentes	Grandes quantidades de consumo de água e descarte de efluentes
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Aeração requer elevado fluxo	Fácil aeração e grande área de contato ar/ substrato
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Condições estáticas	Boa homogeneização
Inoculação de esporos em batelada	Fácil inoculação, batelada ou processo contínuo
Risco de contaminação por fungos de crescimento lento	Risco de contaminação por bactérias do ácido lático
Baixo consumo de energia	Elevado consumo de energia
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico

HOLKER et al., (2004); RAIMBAULT et al., (1997).

Os tipos de fermentadores podem ser operados de forma contínua, semi-contínua ou descontínua. De acordo com PINHEIRO (2006), no regime contínuo há uma constância na entrada de substrato conforme as necessidades do microrganismo e na saída do meio fermentado. Os processos descontínuos podem ser conduzidos na forma de batelada, quando quantidades únicas de substrato são fornecidas ao microrganismo no início do experimento (SHU et al., 2006).

A maioria das enzimas comerciais é obtida por fermentação submersa, uma vez que os métodos modernos de controle de fermentação são mais facilmente adaptados, os rendimentos são maiores e os e riscos de contaminação menores (AGUIAR; MENEZES, 2000). As numerosas variáveis que envolvem o processo de obtenção de enzimas microbianas vão desde a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores) até as condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (BURKERT, 2003). Isto ocorre, segundo BORZANI e colaboradores (2001), devido à estrutura e a forma do sítio ativo da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica.

1.1.2 Celulases

Celulases são proteínas, podendo ou não apresentar unidades glicosídicas em suas estruturas, atuam na hidrólise de substratos celulósicos sinergicamente e compreendem três componentes enzimáticos marjoritários, as endoglucanases (endo-1,4-β-glucanase), exoglucanases (celobiohidrolases ou exo-1,4-β-glucanase) e β-glicosidases, (GOTO, 2007; SOUZA et al., 2008).

As endo-1,4-β-D-glucanases hidrolisam randomicamente ligações β-(1→4) intramoleculares da cadeia celulósica, principalmente em regiões com baixo grau de organização (celulose amorfa), (ZHANG et al., 2006). Além disso, as endoglucanases são capazes de atuarem sobre celuloses modificadas estruturalmente, como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC), as quais são os substratos recomendados para a determinação da atividade enzimática de endoglucanases (GHOSE, 1987). O grupo das exoglucanases hidrolisa as ligações β-(1-4) das unidades de celobiose nas terminações deixadas pelas endoglucanases (Figura 1).

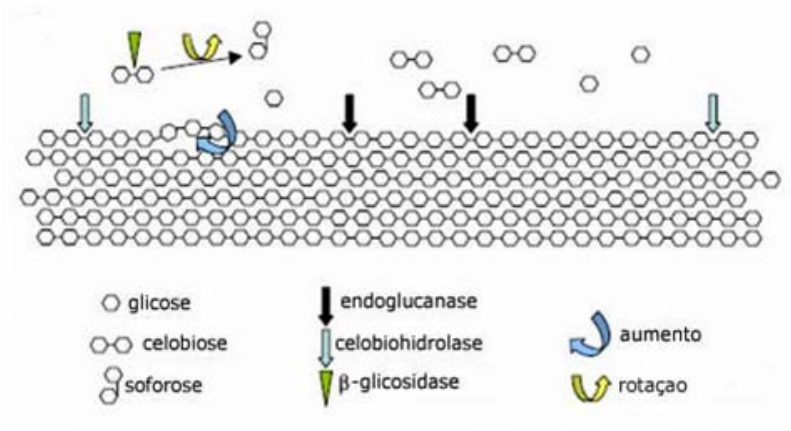


Figura 1. Degradação da celulose por ação de enzimas celulolíticas. ARO, (2005).

A enzima não ataca outros substitutos da celulose, refletindo numa alta especificidade da molécula em comparação com as endoglucanases, tornando as celobiohidrolases enzimas de maior afinidade com a celulose. Essa enzima também é capaz de hidrolisar moléculas cristalinas de celulose com, aproximadamente 80% de degradação (ZHANG, 2006).

As β-glicosidases, também denominadas celobiases, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose, minimizando a ação inibitória que a presença de celobiose exerce sobre atividades endo e

exo (MEDVE, 1997). Essas três classes de celulases atuam em sinergismo para hidrolisar a cadeia de celulose de forma eficaz. Segundo WOOD (1988) sinergismo é quando a atividade exibida por misturas de componentes é maior que a soma das atividades desses componentes avaliadas separadamente.

Tal sinergismo acontece da seguinte maneira: as endoglucanases atuam de maneira aleatória na cadeia celulósica, diminuindo o grau de polimerização da cadeia de celulose, produzindo os celuoligossacarídeos e, consequentemente, aumentando o número de sítios de ataque para as exoglucanases. As exoglucanases hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades, liberando principalmente moléculas de celobiose. As β-glicosidases, por sua vez, promovem a hidrólise da celobiose à glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuoligossacarídeos, diminuindo problemas de inibição (VÄLJAMÄE et al., 2003).

O sistema das celulases de fungos foi largamente interpretado em termos de desenvolvimento substancial biológico molecular e bioquímico a partir do fungo *Trichoderma reesei*, o primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial de celulase, permanecendo ainda como fonte mais utilizada (Tabela 2).

Tabela 2. Nomenclatura, substratos, massa molar média ponderal (N*W*), ponto isoelétrico (pI) e teores relativos das celulases produzidas pelo *T. reesei*.

Enzima [a]	Substratos [b]	Família	M*W* (Kg/mol)	pI	Teor relativo (%)
EGI (Ce17B)	CM, CA, CMC, HEC, xilana	7	48, 2	4,5	6-10
EGII (Ce 15A)	CM, CA, CMC, HEC, galactomanana	5	44, 2	5,5	1-5
EGIII (Ce 12 A)	CM, CA, CMC, HEC	12	25, 2	7,5	<5
EGIV (Ce 16 A)	CM, CA, CMC, HEC	61	35, 5	d. d	d. d
RGV (Ce 45 A)	CM, CA, CMC, HEC	45	24, 4	2,9	<5
CBHI (Ce 17 A)	CC, CM, AC	7	54, 1	3,9	60-75
CBHII (Ce 16A)	CC, CM, AC, CMC	6	49, 7	5,9	10-20
BGI (Ce 13 A)	CB, CT	3	78, 4	d. d	1-2
BGII (Ce 11 A)	CB, CT	1	52,2	d. d	1-2

OLSSON, (2005). d. d- dados desconhecidos.

[a] Abreviações entre parênteses correspondem à classificação das famílias das glicosil hidrolases.

[b] Substratos para os quais as celulases são ativas. CM (celulose microcristalina, Avicel), CA-celulose amorfa, (CMC, carboximetil celulose), HEC (Hidroximetil celulose), CC (celulose cristalina), CB (Celobiose), CT (Celotriose).

*A familía diz respeito à classificação de enzimas com sequência homólogas de aminoácidos similares, as quais geram estruturas tradimensionais e sítios ativos semelhantes e, portanto, mecanismos catalíticos semelhantes.

A hidrólise da celulose por celulases pode resultar, dependendo do grau de ação, na produção final de glicose. Estas, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade na lignina das células vegetais e, desta forma, o difícil acesso destas

enzimas às fibras constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (THIEMANN et al., 1980).

1.2 Biomassa fúngica

Na natureza, algumas espécies microbianas são capazes de secretar polissacarídeos ou gomas para o meio ambiente, que podem, por exemplo, auxiliar na aderência de um micro-organismo patogênico durante a infecção em uma planta ou animal (SUTHERLAND, 1998). Polissacarídeos tradicionais, tais como alginatos microbianos, goma xantana, goma dextrana são muito utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e química como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, formadores de filmes, gelificantes, agentes de suspensão (GÓMEZ et al., 2007). Juntamente com essas gomas o micro-organismo produz biomassa residual, ambas as frações têm sido comumente estudadas para aplicação biotecnológica devido aos seus constituintes de grande valor agregado que podem ser utilizados para melhorar o valor nutricional de alguns alimentos e/ou qualidade de produtos.

A biomassa residual de bactérias são boas fontes de proteínas (50~83%) e ácidos nucléicos (15~16%), as de algas são boas fontes de proteínas (40~60%) e gorduras (5~10%), enquanto de fungos são boas fontes de proteínas (30~70%) e ácido nucléico (6~12%), (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000). A biomassa fúngica tem sido muito explorada comercialmente para isolamento de seus componentes celulares e consequentemente de seus principais constituintes, tais como enzimas (invertases, glicosidades), nucleotídeos, proteínas (manoproteínas), polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas), além de lipídeos, como fosfolipídeos e ergosterol, pois estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico. (PAVLOVA et al., 2005).

1.2.1 Biomassa obtida por fermentação fúngica

Os polissacarídeos microbianos são biomassas renováveis, biodegradáveis e, geralmente, não tóxicos. Pela capacidade de retenção de água, de formar filmes e propriedades reológicas específicas essas moléculas têm sido aplicadas na indústria especialmente nos ramos alimentício e farmacêutico (FREITAS et al., 2009).

Estes polissacarídeos microbianos podem apresentar-se como constituintes da parede celular ou secretados para o meio extracelular. Além disso, os exopolissacarídeos (EPS) também podem proteger contra ataques de organismos, como bacteriófagos ou protozoários ou evitar desidratação das estruturas celulares (SUTHERLAND, 1998; RUAS-MADIEDO et al., 2002).

Os polímeros mais estudados nos últimos anos têm sido os de origem microbiana, devido a vantagens na obtenção em relação às outras gomas de origem vegetal ou marinha, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno. Além disto, as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de cultivo (NERY et al., 2008; BRANDÃO et al., 2010).

Os polissacarídeos fúngicos, tanto pertencentes à parede celular como os extracelulares, têm sido investigados por apresentarem uma variedade de respostas biológicas de defesa, tais como, atividade antitumoral, antiinflamatória e imuno-moduladora (WASSER, 2002). A aplicação terapêutica parece depender da estrutura química e da conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças estruturais de cada polímero resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (COLLEONI et al., 2003).

1.2.2 Exopolissacarídeos e biomassa residual

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio (ZHANG et al., 2006).

As β-glucanas constituem-se como o principal tipo de exopolissacarídeos produzidos por fungos (BARBOSA et al., 2004). PIÑERO (2004) e colaboradores propõem o uso das β-glucanas, de baixo conteúdo calórico uma vez que não são absorvidas no intestino delgado, como substitutos de gorduras em alimentos. Diversos autores relatam que entre os polissacarídeos biologicamente ativos, as glucanas tipo β-(1→3) e β-(1→3; 1→6) revelaram-se compostos potentes, sendo efetivos contra tumores autólogos tanto quanto alogenêicos e singenêicos, favorecendo diferentes atividades biológicas como

antitrombótica, antiviral ou anticoagulante, no entanto o maior obstáculo da utilização clínica das β-glucanas é a baixa solubilidade em meio aquoso (WANG et al, 2006). Lentinana e esquizofilana, duas glucanas fúngicas β-(1→3; 1→6), tornaram-se clinicamente relevantes como imunoadjuvantes na terapia contra o câncer (CHEN; SERVIOUR, 2007).

Por apresentar ação antitumoral e anti-inlamatória, as glcanas podem ser usadas no controle da formação de leucócitos (efeito anti-inflamatório), no tratamento da artrite reumatóide, na síntese de antígenos para produção de anticorpos, na proteção contra danos oxidativos no DNA e em cosméticos como agentes de hidratação da pele. Estes polissacarídeos interagem também com lipoproteínas de baixa densidade por meio de forças de Van der Waals, o que resulta na eliminação da fração lipídica do sangue (CHEN; SEVIOUR, 2007; RINAUDO, 2008).

A biossíntese de EPS está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência dos micro-organismos em condições adversas de meio ambiente (MOREIRA, 2002), sendo que esses EPS desempenham diferentes papéis, que incluem: proteger os microorganismos contra desidratação; servir de barreira, impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular; acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuar como fonte de carbono e energia; converter o excesso de carboidratos em massa espumosa que é mais difícil de ser metabolizada por outros micro-organismos (PACE,1991).

Nos cultivos para produção do EPS, ocorre abundante produção de biomassa residual. O aproveitamento deste material é interessante tanto para evitar a geração de resíduos, quanto com relação a seu potencial como suplemento alimentar na alimentação humana e animal. O interesse também na biomassa residual se justifica pela facilidade de obtenção, velocidade de crescimento muito maior do que animais ou vegetais, por não sofrer interferência de condições ambientais, e pelo alto valor nutricional, sendo boa fonte de aminoácidos essenciais e vitaminas (SEVIOUR et al., 1992).

Trabalhos como os realizados por MENDES-COSTA & MORAES (1999) mostram que é possível isolar da biomassa de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frações de carboidratos solúveis, e que estas moléculas podem ser utilizadas como indutoras de mecanismos de defesa em plantas. A biomassa excedente da produção industrial de antibióticos por *Penicillium chrysogenum*, além de ser aproveitada para ração para gado e/ ou no preparo de fertilizantes (MUZZARELLI et al., 2000), também vem se

mostrando uma fonte viável de moléculas importantes, como os polissacarídeos do tipo glucanas (WANG et al., 2007), aplicados na área medicinal devido a suas atividades antitumorais e imunomoduladoras.

Entretanto, existem desafios para que a biomassa microbiana possa ser utilizada como suplemento alimentar. Bactérias podem produzir toxinas, além do alto conteúdo de ácidos nucléicos que pode predispor o indivíduo a acumular ácido úrico. No caso de fungos filamentosos a principal limitação seria a produção de micotoxinas por alguns gêneros. *Lasidioplodia theobromae* e *Botryodiplodia rhodina* podem ser patogênicos para algumas espécies vegetais, entretanto não pela produção de toxinas, mas pela colonização dos tecidos internos da planta e secreção de exopolissacarídeos que impede a condução de seiva pelo vegetal, causando necrose (LIMA, 1991apud CAMPIONI et al., 2010). Não há relatos de toxicidade humana ou animal (MIRANDA, et al., 2008).

O potencial do emprego da biomassa é avaliado através de análises que incluem valor nutricional, ausência de componentes tóxicos produzidos e as propriedades funcionais, a solubilidade, capacidade de emulsificação e digestibilidade protéica, dentre outras. Estas últimas avaliações devem ser feitas para orientar a escolha do processo tecnológico a ser adotado (ROGER, 2001).

1.2.3 Fatores de influencia na produção de biomassa fúngica

A biomassa fúngica é normalmente obtida por meio fermentativo cujo foco principal tem sido a obtenção de exopolissacarídeos de origem microbiana. Durante esse processo para a produção de exopolissacarídeos (EPS), um grande percentual de biomassa também é obtido. Segundo alguns autores o resultado esperado no final do procedimento, se biomassa ou EPS, determinará como essas variáveis serão aplicadas no cultivo microbiano (BARBOSA et al., 2004; SELBMANN et al., 2002).

A produção de metabólicos fúngicos exige um conhecimento detalhado da fisiologia microbiana e do comportamento celular durante a fase fermentativa. Parâmetros como temperatura, agitação, pH, O_2 dissolvido, vitaminas, fontes de carbono e de nitrogênio podem ser determinantes no controle de fontes de carbono e nitrogênio, viabilizando o processo de produção industrial (HE et al., 2004).

Diversas fontes de carbono (glucose, sacarose, açúcar comercial, manose, galactose, lactose, celobiose, etc) tem sido utilizadas para a produção de EPS fúngicos,

embora a glucose e a sacarose sejam as fontes mais utilizadas pelos pesquisadores (SELBMANN et al., 2002; CUNHA et al., 2008). As concentrações de glucose e sacarose, utilizadas na produção dos EPS variam bastante em relação ao micro-organismo empregado, mostrando a importância de se fazer testes individuais para cada cepa estudada e não usar simplesmente um valor padrão.

Durante a fermentação, a fonte de carbono é convertida pela célula microbiana em biopolímero e biomassa residual sob certos parâmetros fixos (pH, temperatura, tempo de incubação, etc). Geralmente, concentrações limitantes de alguns nutrientes e excesso de carboidrato favorecem a produção de polissacarídeos. Obtém-se um alto rendimento quando ocorre a conversão de 70-80% da fonte de carbono em biopolímero (MARGARITIS; PACE, 1985; SUTHERLAND, 1979).

Outro fator de importância na produção de EPS é a fonte de nitrogênio. Várias fontes têm sido citadas na literatura como: peptona, sais de vogel, sais de sabourad, extrato de levedura, sulfato de amônio, os nitrato (sódio, potássio e amônio) dentre outros (SEVIOUR et al.,1992; GUIMARÃES et al., 2009).

GUIMARÃES et al., (2009) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio (caldo de batata, caldo nutriente, extrato de levedura, peptona, aveia, meio mínimo de sais de vogel e de sabouraud) no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phseolorum* var. *caulivora* (DPC) responsável pelo cancro de haste na soja. Observou-se que o fungo *Dpc* foi capaz de crescer em todas as fontes de nitrogênio avaliadas, embora os meios de aveia, vogel e sabouraud apresentassem um maior rendimento. O fungo *Dpc* tem melhor crescimento quando absorve fontes de nitrogênio simples, como no meio de Vogel e o bom desenvolvimento da biomassa nos meios de aveia e de sabouraud são devido ao maior teor de glucose e de outras fontes nutritivas que estes meios proporcionam ao microorganismo e não as suas fontes de nitrogênio.

SEVIOUR et al., (1992) relataram que os polissacarídeos são produzidos somente sob condições de nitrogênio limitantes e altos níveis de nitrogênio no meio de cultivo reprimem a formação de EPS. Embora, acredita-se que este tipo de regulação depende da fonte de nitrogênio utilizada e do metabolismo de cada micro-organismo. Em geral o tipo e a concentração de nitrogênio têm uma influência média no fluxo de carbono, na formação de produtos ou na formação de biomassa. Isto já foi relatado no caso da produção de xantana, alginato e gelana, onde uma alta proporção C: N favorece um acúmulo de exopolissacarídeos (DRUZIAN; PAGLIARINE, 2007; BRANDÃO et al., 2010).

Entre os sais inorgânicos mais utilizados para a produção de EPS por fungos estão: K_2HPO_4, KCl, $MgSO_4$, $FeSO_4$, NaCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, $MnSO_4$, entre outros. Normalmente o fosfato e o sulfato são requeridos em maiores concentrações pelos micro-organismos em comparação com outros sais inorgânicos (GRESHAM et al.,1997).

Para a produção de EPS devem-se estudar as condições de aeração mais apropriadas para cada micro-organismo. Para alguns fungos, a aeração pode não afetar a produção, enquanto que para outros, pode aumentar ou mesmo diminuí-la (BARBOSA et al., 2004). Os autores YANG & LIAU (1998) analisaram diferentes velocidades de rotação e relatam que o grau de agitação ótimo de 150 rpm, para máxima produção de EPS por por *Ganoderma lucidum* em cultivo submerso.

GIBBS & SEVIOUR (1996) estudaram uma grande variedade de taxas de agitação para a produção de pululana pelo *Aureobasidium pullulans* ATTC 9348, em fermentador. Os autores constataram que a produção do referido EPS em velocidades de agitação menores como 125 e 250 rpm, sem controle do nível da pressão de oxigênio para as células, foi satisfatória devido aos baixos níveis de oxigênio que atingiram as células, nestas condições de agitação.

A agitação dos meios de cultivo tem a função de melhorar a distribuição de oxigênio e outros nutrientes para as células fúngicas. Para a produção de EPS pelo fungo *Botryosphaeria rhondina* forma telamorfa *L. theobromae* a agitação de 180 rpm foi satisfatória (CUNHA et al., 2008; SALDANHA, 2006). A temperatura é um fator crítico na síntese de polissacarídeos e exopolissacarídeos, por fungos. Sendo que o maior crescimento e produção ocorrem na faixa de 25-35ºC, onde cada espécie microbiana apresenta uma temperatura ótima (GANDHI et al.,1997; VERMANI et al., 1995).

O pH do meio de cultivo microbiano pode ser um parâmetro de grande relevância em relação ao crescimento micelial e a produção do metabólito de interesse, uma vez que esse parâmetro pode interferir diretamente na solubilidade dos nutrientes, e, portanto na capacidade de utilização destes pelo micro-organismo. Um pH de cultivo desfavorável pode, também contribuir para maior gasto de energia pela célula para manter o pH intracelular em valores fisiológicos adequados (FABBRIS et al., 2008). Além disso, todas as enzimas possuem uma faixa de pH e temperatura para exercerem sua atividade, sendo o pH e temperatura ótimo onde produzem o máximo de sua capacidade. Portanto, pH e a acidez do meio podem ser fatores fundamentais no rendimento da produção de biopolímero por micro-organismos.

A viscosidade das soluções de EPS fúngicos varia de acordo com alguns fatores físico-químicos como: pH, temperatura, concentração do EPS, massa molecular, solubilidade, além das características morfológicas dos fungos produtores (CUNHA, 2002). A viscosidade é determinante para a seleção de cepas produtoras de biopolímeros. Na indústria o maior interesse é por gomas que quando adicionadas em concentrações mínimas (0,01 à 3%), sejam capazes de promover altas viscosidades (PASQUEL, 1999).

Os exopolissacarídeos são recuperados do meio de cultivo por centrifugação, filtração, precipitação, purificação e secagem. Após a centrifugação, utilizada para separar o EPS da biomassa residual, podem ser utilizados agentes precipitantes no sobrenadante, entre os quais o etanol tem sido o mais utilizado (em proporções de volumes variados), embora se possa utilizar também cetonas e isopropanol.

2. Fungos filamentosos

Estima-se que existam mais de 1,5 milhões de espécies fúngicas no mundo, embora apenas 80.000 espécies tenham sido descritas (HAWKSWORTH, 2001). CARLILE et al., (2001) relatam que a cada ano 700 novas espécies são descobertas. Os fungos filamentosos compõe o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos (COLEN, 2006).

Fungos filamentosos são micro-organismos eucarióticos heterotróficos. Caracterizam-se por formarem estruturas filamentosas denominadas hifas. A reprodução normalmente ocorre por meio de esporos, podendo ser sexuada ou assexuada (LIMA, 1975). Os fungos crescem melhor na ausência de luz e em ambientes úmidos. A maioria é saprófita, assegurando nutrientes de matéria orgânica morta e promove a hidrólise da celulose à glicose através das enzimas celulases. São quimiorganotróficos, e utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono, elétrons e energia (ZHANG et al., 2006).

A maioria utiliza carboidratos (de preferência glicose ou maltose) e compostos nitrogenados para sintetizar proteínas e aminoácidos e para satisfazer suas necessidades nutricionais requerem carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, boro, manganês, cobre, molibdênio, ferro e zinco. Desempenham papel ecológico preponderante, pois contribuem na degradação de substâncias orgânicas, acelerando o ciclo biogeoquímico dos elementos na natureza (PRESCOTT et al., 2002).

Entre os micro-organismos que tem despertado o interesse biotecnológico estão os gêneros *Aspergillus* e *Botryosphaeria*. Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus niger* pertencem ao domínio Eucariota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; classe Eurotiomycetes; Ordem Eurotiales; Família Trichocomaceae (USECHE et al., 2007).

As espécies são identificadas de acordo com as diferenças morfológicas observadas, quer macroscópicas quer microscópicas. O gênero *Aspergillus* apresenta formas anamorfas (assexuadas ou mitótica) e amorfas (sexuadas), (LATGE, 1999). Relativamente ao aspecto macroscópico, as colônias apresentam uma superfície de cor branca, na fase inicial de maturação. Dependendo das espécies, a sua cor pode evoluir para verde, amarelo, laranja, castanho ou preto. No seu verso, a colônia apresenta-se geralmente branca, dourada ou acastanhada. A textura da colônia surge algodoada, tornando-se pulverulenta com a produção de esporos, os quais podem apresentar rugosidade da parede, característica igualmente importante na identificação de espécie (O'FEL, 1997; LARONE, 2002). Este táxon possui mais de 200 espécies dentro deste gênero, 11 variedades e 9 formas na literatura e distribuídas na natureza e cerca de 20, normalmente encontradas em países de clima temperado, têm sido consideradas causadoras da doença aspergillose, afetando principalmente indivíduos com um status imunológico debilitado. (INDEX FUNGORUN, 2010). Em países tropicais como o Brasil, tem sido mais frequentemente isoladas as espécies *Aspergillus flavus* e A*spergillus niger* (O'FEL, 1997) sendo o *Aspergillus niger* amplamente utilizado em indústrias alimentícias.

Os fungos do gênero *Botryosphaeria* são ascomicetos fitopatogênicos, com ampla distribuição mundial, pertence ao domínio Eucariota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; classe Pyrenomycetes ou Loculoascomycetes; Ordem Dothideales; Família Botryosphaeriaceae (GUARRO et al., 1999) causadores de doenças em diversas plantas de importância econômica como: eucalipto (SILVEIRA et al., 2001), acácia (ROUX, WINGFIELD, 1997), arvores frutíferas como pessegueiro, mangueira, macieira, goiabeira (KIM et al., 2001; CARDOSO et al., 2002), e ornamentais (SANCHEZ et al., 2003) podendo infectar várias partes da planta hospedeira como caule, folhas e frutos, em diferentes estágios do desenvolvimento.

Por se tratar de um microrganismo com duplo estágio de propagação em seu ciclo de vida, fungos da família Botryosphaeriaceae podem ser encontrados tanto no estágio anamorfo, denominado *Lasiodiplodia theobromae* ou *Botryodiplodia theobromae*, quanto no estágio teleomorfo, denominado *Botryosphaeria* (SALDANHA, 2006). As formas

anamórficas de *Botryosphaeria* são: *Botryodiplodia* (*Lasiodiplodia*), *Dothiorella*, *Diplodia*, *Macrophoma, Fusicoccum, Lasidio, Macrophoma, Macrophomopsis e Sphaeropsis*, que afetam caules herbáceos e troncos de madeiras. Considera-se *Lasidioplodia theobromae* (Pat.) como anamórfica de *Botryosphaeria rhodina* (Cook e Arx), e associada à grande variedade de doenças de plantas (CROUS; PALM, 1999).

2.1 Fungo *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* é composto por fungos cujos conídios estão presentes no ar, mas normalmente não causam doenças muito sérias em humanos. Membros do gênero *Aspergillus,* incluindo *Aspergillus niger*, são distribuídos por todo mundo e estão comumente presentes em restos vegetais. São caracterizados por conidios escuros, geralmente negros e conidióforos hialinos globosos marrons, medindo 4-5 µm de diâmetro (Figura 2). Estes saprófitos degradam moléculas complexas de materiais derivados celulósicos vegetais por secretarem uma variedade de enzimas hidrolíticas (DE VRIES; VISSER, 2001).

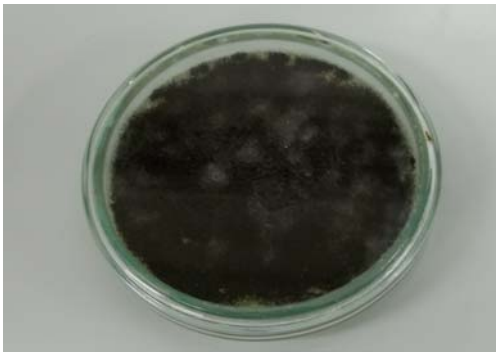


Figura 2. Fungo *Aspergillus niger*.

As espécies do gênero *Aspergillus* são de grande importância econômica graças a suas propriedades de produzir enzimas que são utilizadas na indústria de panificação, cervejeira, em antibióticos e ácidos orgânicos. O uso diário desses produtos é considerado seguro pelo OMS (Organização Mundial da Saúde) e outras organizações de referência no controle alimentar como a FDA (Food and Drug Administration), (EMBRAPA, 1996).

Aspergillus niger cresce em material orgânico em ampla escala de temperatura de 6 a 47º C, e pH de 1,4-9,8 e o limite de crescimento para atividade de água é 0,88, que é

relativamente alto quando comparado a outras espécies de *Aspergillus* (FROST; MOSS, 1987). *Aspergillus niger* é fonte de celulases destinadas ao uso alimentício e *Trichoderma viride* é usado para aplicações não alimentícias, embora as enzimas de ambos os fungos possam cumprir muitas tarefas. Segundo GOKHALE (1986) *Aspergillus niger* pode ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como *Trichoderma viride.*

2.2 Fungo *Lasidioplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae é um patógeno típico das regiões tropicais e subtropicais, atinge numerosas espécies vegetais cultivadas (PEREIRA et al., 2009). No cacaueiro, *Lasiodiplodia theobromae* pode ser encontrado causando a doença denominada “morte descendente”. Esta doença se manifesta inicialmente nos ramos, pela formação de manchas úmidas, de coloração escura, seguida de murcha e queda das folhas. Os ramos secam e morrem, apresentando a casca mole que se desintegra e se desprende do lenho e os tecidos internos apresentam lesões necróticas de coloração castanha. A planta morre e nos ramos afetados encontram-se numerosos picnídios do fungo (BASTOS; EVANS, 1984).

Em cultura pura de Batata Dextrose Agar (BDA), as colônias de *Lasiodiplodia theobromae* são acinzentadas a negras, com abundante micélio aéreo e ao reverso da cultura em placa de Petri são foscas ou negras, tendo um pleno desenvolvimento em temperaturas entre 12°C e 25 ºC (GALET,1977). Existem 19 sinonímias para *Lasidioplodia theobromae*, incluindo *Diplodia gossypina Cooke* e *Botryodiplodia theobromae* (PUNITHALINGAN, 1976 apud RODRIGUES; PAZ LIMA, 2010).

De acordo com OKEY & ADISA (1977), as condições ótimas para a germinação de conídios de *Botryodiplodia theobromae* caracteriza-se por 100% de umidade relativa, temperatura de 30°C e pH 7,0, não sendo influenciada pela luz. GUPTA (1977) verificou que a germinação de conídios, a 30°C, aumenta em função da concentração de sacarose no meio.

Estudos relataram que o EPS secretado no meio de cultivo pelo fungo *Botryosphaeria rhodina,* em concentrações elevadas de glucose (5% (p/v)) tinha aproximadamente 22% de ramificações, as quais consistem de resíduos glicosídicos e gentiobiosídicos, vinculados à cadeia principal por ligações tipo β(1→6). Este EPS foi

então denominado de botriosferana (Figura 3), (BARBOSA et al., 2004). SELBMAN e colaboradores, no mesmo ano, estudando confirmaram os mesmos tipos de ligações glicosídicas e determinaram a massa molecular em 4,8 kDa.

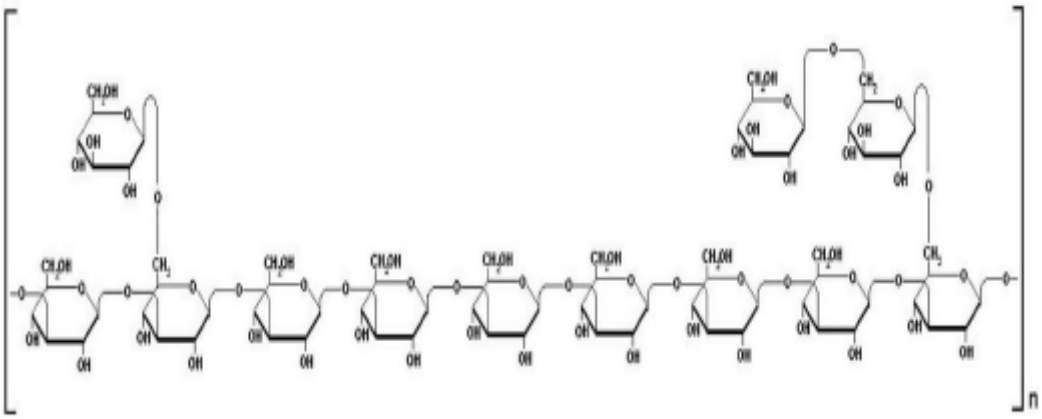


Figura 3. Botriosferana; β-(1→3,1→6)-D-glucana. BONGIOVANI, (2009).

STELUTI e colaboradores (2004) analisaram a influência de diferentes fontes de carbono (glucose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melaço de cana de açúcar) na produção de botriosferana (1,7 g/L após 72 h de cultivo) e concluíram que a sacarose comercial favorecia a formação do exopolissacarídeos. A produção de EPS com a cepa MAMB-5 também foi estudada com outras fontes de carbono em substituição à glicose, todos com concentrações de 50 g/L, como fonte de carbono e em todos os casos, o EPS produzido era unicamente β-glucana.

Alguns pesquisadores estudaram a influência de diferentes condições de cultivo na produção do EPS por *L. theobromae*, sendo determinados como fatores importantes a utilização de sacarose grau analítico como fonte de carbono, $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio e pH inicial do meio igual a seis (MATTOS, 2009; TSUTSUMI , 2009).

SILVA et al., (2006) caracterizaram duas botriosferanas produzidas pelo *Botryosphaeria rhodina*, apartir de fermentações com sacarose e frutose. Demonstraram que o grau de ramificação da botriosferana produzida em sacarose foi menor (21%) do que a obtida com frutose (31%), o que certamente proporcionará diferentes propriedades reológicas aos respectivos polímeros. Esse metabólito foi obtido por precipitação etanólica, purificado por cromatografia de filtração em gel e submetido à hidrólise ácida para determinação de seus constituintes monossacarídicos. Os resultados das análises por cromatografia de troca-iônica de alta pressão revelaram 98% de glicose.

Os espectros de infravermelho e RMN (GLAZER; NIKAIDO, 1995) mostraram que todas as ligações glicosídicas apresentavam configuração β. Os resultados das análises de metilação e degradação de Smith indicaram que a botriosferana é uma β-D-(1→3) glucana com cerca de 22% de ramificações em C-6. Após hidrólise ácida parcial, foi demonstrado que as ramificações consistem de resíduos glucopiranosídicos e gentiobiosídicos unidos à cadeia principal por ligações glicosídicas β-D-(1→6), presentes a cada cinco resíduos da cadeia principal (BARBOSA et al., 2004), (Figura 3).

Estudos realizados por GIESE e colaboradores (2008) relatam que a botriosferana, obtida com a glucose como fonte de carbono, apresenta conformação em tripla hélice, que tem sido descrita como necessária para a atividade biológica de polissacarídeos. Os primeiros estudos sobre atividade biológica da botriosferana, obtida com glucose como fonte de carbono, mostraram que este EPS não é mutagênico e apresenta atividade anticlastogênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica (MIRANDA et al., 2008).

Os fungos *Botryosphaeria rhodina* e o *Lasidioplodia theobromae* e seu EPS produzidos, a botriosferana, compõem parte importante do cenário de pesquisa nacional e internacional, com trabalhos de pesquisa relacionados à produção e solubilidade de β-glucanas, caracterização e aplicação médica e na área de alimentos, inclusive várias patentes envolvendo as propriedades biológicas, métodos de crescimento dos fungos, produção, dentre outros. Em pesquisa realizada no Espacenet foram encontrados 27 resultados envolvendo a *Botryosphaeria*, 10 resultados de botriosferana, 12 resultados relacionados à *theobromae*. No entanto, a literatura ainda carece de dados publicados envolvendo os dois fungos e seu EPS (ESPACENET, 2011).

Os polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos lignolíticos tem importância no processo de degradação de xenobióticos, uma vez que imobilizam as enzimas extracelulares. O gel formado por estes biopolímeros impede a desidratação da hifa e permite adesão entre as células ou a adesão destas às superfícies, além de selecionar moléculas do meio. Vários exopolissacarídeos e biomassa residual produzida por microrganismos ainda não foram adequadamente explorados e somente poucos têm sido produzidos em larga escala (MAZIERO et al., 1999 apud BARBOSA, 2004).

3. Fibras lignocelulósicas

As fibras lignocelulósicas são as mais abundantes no mundo e apresenta um potencial enorme para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose, biomassa proteíca e enzimas. Esses resíduos são abundantes fontes de carboidratos e sua bioconversão tem atraído muito interesse nos últimos anos (OJUMU, 2003; AGUIAR, 2010). As fibras lignocelulósicas incluem vários resíduos agrícolas (palhas, cascas, bagaços), madeiras duras provenientes de árvores de folhas decíduas (dicotiledôneas), madeiras moles provenientes de coníferas e resíduos das indústrias de papel (TAMANINI, 2004).

A composição destes materiais é bastante variável, pois os constituintes possuem características químicas semelhantes às da madeira e são identificados em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento (Figura 4).

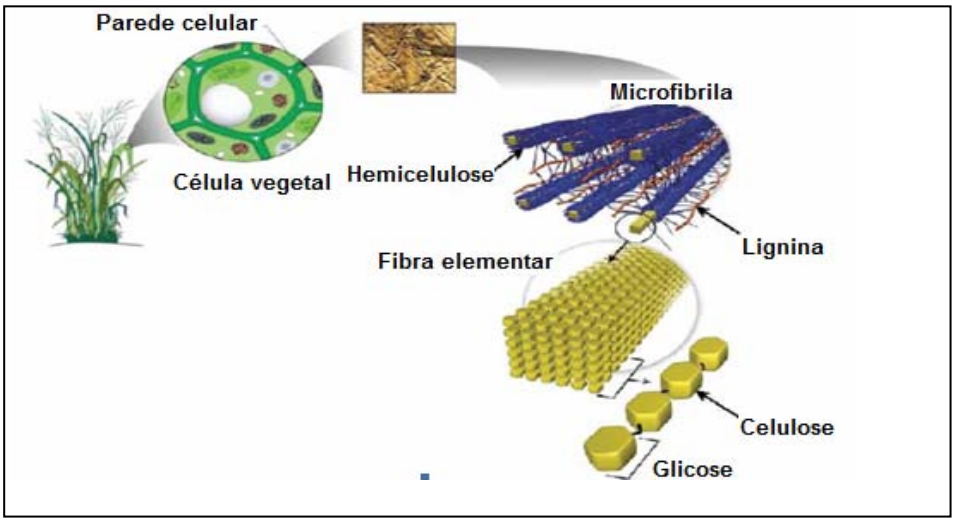


Figura 4. Estrutura da parede celular de fibras lignocelulósicas. CANILHA et al., (2010).

As fibras lignocelulósicas são compostas de celulose (~35-50%), hemicelulose (~20-35%), lignina (~10-25%), além de pequenas quantidades de outros componentes (extrativos) (~5-20%) (TAMANINI, 2004). A agroindústria gera inúmeras fontes de resíduos que não são satisfatoriamente e/ou adequadamente aproveitados, transformando-os em rejeitos industriais. O setor de produção de biocombustíveis, como etanol e biodiesel, está entre os segmentos da agroindústria que mais geram esse tipo de rejeito (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Em geral, a maioria desses materiais, no fim de sua vida útil é disposto em aterros ou lixões, e mesmo incinerados, representam uma forma de poluição por sua combustão incompleta, armazenamento inadequado, o que causa um grave problema ambiental. Compósitos formados a partir de biomassa vegetal apesentaram aspectos positivos como: a possibilidade de serem biodegradáveis; dependendo do polímero usado, características interessantes como durabilidade, resistência e estabilidade; se decompõem a uma temperatura de degradação maior e ainda pode ser reciclado por inúmeras vezes, o que contribui para atuarem a favor do meio ambiente (LEÃO, 2006; CORRÊA, 2010).

Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos entre outros. A utilização de resíduo de bagaço de cana em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental (PANDEY et al., 2000; MENEZES et al., 2009).

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO-ONU) declarou o ano de 2009 como o ano internacional das fibras naturais. O objetivo era estimular a utilização de fibras naturais, por meio de políticas governamentais de incentivo ao setor, além da relevância da produção para os pequenos agricultores, especialmente aqueles de países pobres ou em desenvolvimento, na luta diária pelo incremento da renda. Algumas plantas que fornecem fibras ocorrem espontaneamente na natureza, outras são cultivadas como atividade agrícola e ainda há aquelas que são resíduos gerados, principalmente, pela agroindústria (SILVA et al., 2009).

No Brasil, existe uma variedade de fibras vegetais com diferentes propriedades químicas, físicas e mecânicas. A utilização de fibras naturais em substituição às fibras sintéticas como reforço de compósitos poliméricos é uma possibilidade promissora, principalmente por serem biodegradáveis, atóxicas, de fonte renovável, o que condiz com os atuais esforços de proteção ao meio ambiente (MARTIN et al., 2009).

As fibras naturais vegetais, originadas ou não de resíduos, citadas na literatura especializada como potenciais modificadoras de polímeros termoplásticos são: sisal, coco, juta, rami, caruá, bagaço de cana, soja, açaí, etc (MARINELLI et al., 2008). Os principais benefícios de tecnologias de conversão de fibras lignocelulósicas, através de rotas biotecnológicas e/ou químicas para o Brasil, são: fontes abundantes e baratas de recursos renováveis; redução nas emissões gasosas que causam o “efeito estufa”; são

tecnologias mais limpas; promovem benefícios macroeconômicos para as comunidades rurais e para a sociedade como um todo; estão inseridas no contexto de Desenvolvimento Sustentável (AGUIAR, 2010).

A importância das fibras naturais como reforço para plásticos vem aumentando significativamente nas últimas décadas devido ao alto preço das fibras sintéticas e a busca por materiais de baixo custo, provenientes de fontes renováveis de matérias-primas, que não causem danos ao meio ambiente e possam competir com os materiais tradicionais. As fibras naturais estão sendo bastante estudadas para substituir parcialmente e até totalmente as fibras sintéticas em muitas aplicações, especialmente aquelas cujas condições de uso são menos severas (LEE et al., 1989; SILVA et al., 1999).

As fibras naturais quando incorporadas aos plásticos podem ser processadas por praticamente todos os métodos convencionais de processamento de plásticos (extrusão, injeção, calandragem e prensagem) e possuem menor densidade que as fibras inorgânicas tais como as fibras de vidro. O Brasil é sem dúvida um dos países que possuem uma das maiores biomassas vegetais do mundo e a maior extensão territorial cultivável, cujo potencial deve ser melhor explorado. Além disso, o interesse crescente da sociedade pelo uso de materiais “ecologicamente corretos” faz que as fibras vegetais retomem o espaço perdido para os sintéticos em vários setores (MEDINA, 1989; MEDEIROS et al., 2002).

3.1 Fibra de eucalipto

Atualmente, mais de 95% da celulose produzida mundialmente é fabricada a partir de madeiras de árvores de espécie de coníferas e folhosas. Dentre as madeiras folhosas destaca-se o eucalipto, que é a principal fonte de matéria-prima do Brasil para a produção de celulose branqueada de fibra curta (KRAMER, 1999).

Embora seja grande o número de espécies de eucaliptos, poucas são usadas na indústria de celulose. Dentre as espécies que possuem características desejáveis para a produção de celulose branqueada de eucalipto destacam-se, no Brasil, o *Eucalyptus grandis*, *urophylla, saligna* e alguns híbridos dessas espécies. A melhoria da qualidade da madeira e a redução do custo variável de sua produção são os dois grandes desafios dos modernos empreendimentos para a produção de celulose branqueada de eucalipto (MOKFIENSKI, 2004; COTTERIL; MACRAE,1997).

A tabela 3 mostra a composição química das fibras de eucalipto. Pode-se notar que o teor de lignina e hemicelulose estão na faixa de 36-60%, esse grande percentual dificulta a hidrólise enzimática, tornando-a um processo demorado. As características físicas e mecânicas (densidade básica, elasticidade, resistência), químicas (teor de celulose, hemicelulose e lignina) e anatômicas (dimensões das fibras) são interdependentes, por isso, dificilmente se consegue alterar uma propriedade sem que as demais também sejam afetadas (SHIMOYAMA; BARRICHELO,1991).

Tabela 3. Proporção dos componentes químicos estruturais do eucalipto.

Componente	Teor (%)
Celulose	40-45
Hemicelulose	15-35
Lignina	21-25
Extrativos	3-8
Cinzas	0,4-0,5

MOKFIENKSKI, (2004).

Poucos trabalhos sobre a fibra de eucalipto são encontrados na literatura, assim como, dados de suas propriedades físicas e mecânicas. Na tabela 4 são mostradas as propriedades físicas e mecânicas da fibra de eucalipto. Pode-se notar que sua resistência à tração é bem variável. Deve-se levar em conta que as diferentes espécies de eucalipto devem influenciar nestes resultados. O módulo de elasticidade é bastante elevado chegando a ser maior do que o do sisal.

Tabela 4. Propriedades físicas e mecânicas da fibra de eucalipto.

Referência	Comprimento (mm)	Diâmetro (µm)	Módulo de elasticidade (GPa)	Resistência à tração (MPa)
Hillis *et al*., apud Coutts (1984).	1,0	20	-	-
Fordos *et al*., (1986).	0,9-1,2	12-30	45	200-1300

http:// www.lambda.maxwell.ele.puc-rio.br.

FILHO e colaboradores (2009) produziram nanofibras de polpa de eucalipto por hidrólise ácida. O diâmetro dos nanocristais variou de 10 a 15 nm e o comprimento variem de 200 e 500 nm.

3.1.1 Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante encontrado no planeta terra e sua biossíntese anual é estimada entre 1.010 e 1.011 toneladas (SAMIR et al., 2005). Como o principal constituinte da biomassa vegetal, a celulose é encontrada quase que exclusivamente na parede celular de vegetais. Entretanto, a celulose também pode ser sintetizada por alguns animais (tunicados, por exemplo) e algumas bactérias (PITARELO, 2007).

A celulose é formada por microfibrilas que são estruturas relativamente rígidas que contribuem para resistência e a predisposição estrutural da parede celular, estando firmemente empacotadas em cadeias lineares de D-glucose com ligações β-(1→4) (TAIZ; ZEIGER, 2004). As ligações do tipo β-(1→4) presentes na molécula de celulose são de difícil hidrólise, apenas alguns seres, como fungos e bactérias, são capazes de tal função. Alem destas ligações, são encontradas forças de van der Waal's (ZHANG; LYND, 2004) e pontes de hidrogênio intra e intercadeia, as quais permitem a combinação de cadeias de celulose para formar os cristalitos (SHULER, 1992).

Os glucanos (polímeros de glicose) que constituem a microfibrila estão fortemente alinhados e ligados entre si, formando uma fita altamente ordenada (cristalina), que exclui água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. A estrutura molecular exata das microfibrilas de celulose ainda é desconhecida. Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem uma subestrutura constituída de domínio altamente cristalinos unidos entre si por ligações não- covalentes, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Quando a celulose é degradada, primeiramente são atacadas as regiões amorfas, liberando pequenas cristalitas, consideradas como correspondentes aos domínios cristalinos das microfibrilas (TAIZ; ZEIGER, 2004; BASSO, 2010).

A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam orientação randomizada. A proporção da parte cristalina é normalmente expressa em porcentagem (índice de

cristalinidade) e depende da origem e processo de obtenção da celulose (PITARELO, 2007). O grau ou índice de cristalinidade é determinado de acordo com a proporção da região cristalina presente nas fibrilas de celulose. Para determinação da cristalinidade das fibrilas de celulose, a difração de raios-X (DRX) é o método mais recomendado e frequentemente utilizado (LYND et al., 2002).

A combinação de difração de raios- X com cálculos de modelo indica que cadeias de celulose cristalina estão em conformação de duplas hélices, achatadas e estendidas. Pequenas variações nesta conformação ou no empacotamento das cadeias celulósicas dentro dos cristais levam a um bom número de polimorfos cristalinos, muitos dos quais podem ser interconvertidos por vários processos de tratamento (KROON- BATENBURG et al., 1996). Sete cristais polimorfos foram identificados para celulose, e são designados como Iα. Iβ, II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}, como indicado na figura 5 (KADLA, 2000).

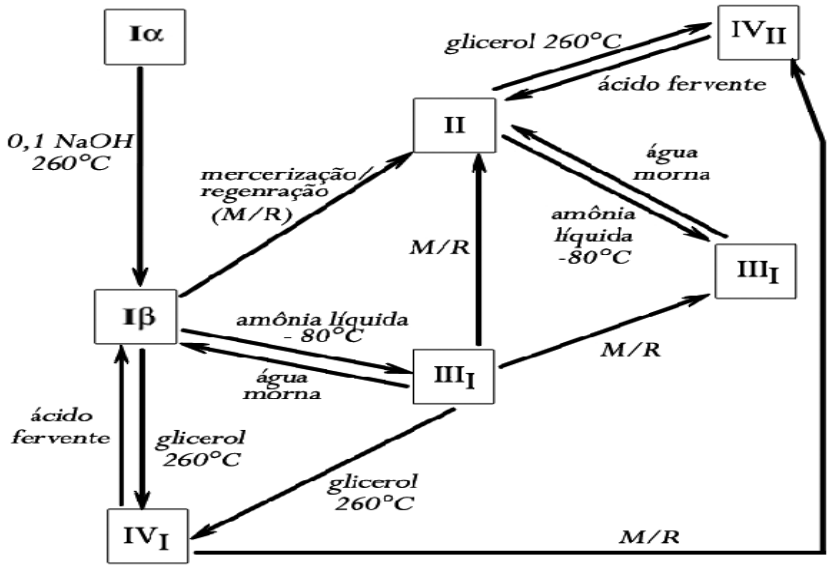


Figura 5. Polimorfos da celulose. OGEDA; PETRI, (2010).

Cada uma destas formas cristalinas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas (MARK; MEYER, 1928; KROON- BATENBURG et al., 1996). Na natureza, celulose Iα e Iβ são as mais abundantes e, logo, são chamadas de celulose nativa. Celulose Iβ é a forma cristalina majoritária em plantas superiores e é monoclínica na natureza, com duas metades de celobiose por cela unitária. Celulose II é o polimorfo majoritário na indústria de processamento de celulose. Celulose II por ser

formada a partir de regeneração ou mercerização da celulose I e é também o alomorfo termodinamicamente mais estável (WYMAN et al., 2005).

Como consequência das diferentes conformações que o grupo hidroximetila pode assumir, tornam-se possíveis duas estruturas de empacotamento das cadeias de celulose em um microcristal: estrutura de cadeia paralela e antiparalela, característica da celulose I e celulose II, respectivamente. A estrutura paralela ocorre quando os grupos $–CH_2OH$ das cadeias adjacentes encontram em lados diferentes do “backbone” do polímero, (Figura 6).

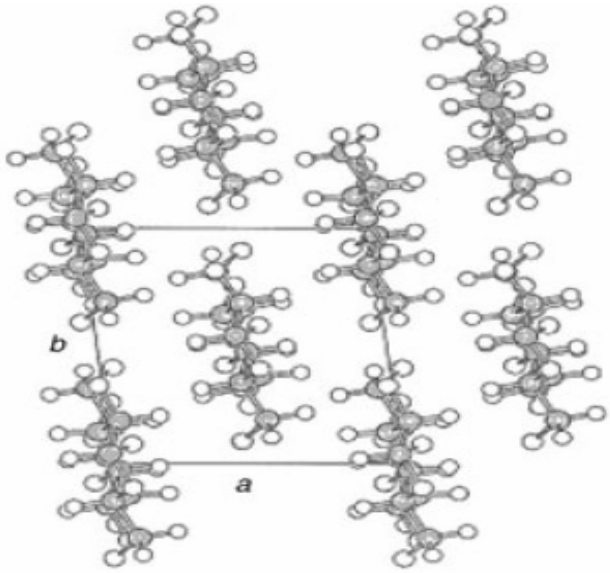


Figura 6. Projeção da cela unitária da celulose no plano a e b. MELO, (2007).

Vários autores sugerem que a celulose amorfa, devido a maior área superficial, é mais suscetível a hidrólise enzimática do que a celulose cristalina (Figura 7). As fibrilas de celulose conferem elevada resistência à tensão e tornam insolúvel em um grande número de solventes, e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (PITARELO, 2007; DING; HIMMEL, 2006).

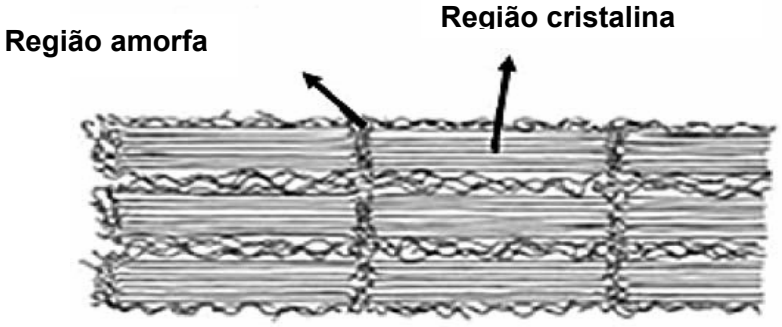


Figura 7. Regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose. TAMEM (2005).

A extensão ou tamanho da cadeia de celulose é expresso em relação ao seu grau de polimerização (GP), isto é, o número de unidades de D-glucose unidas por ligações β-(1→4), que formam uma determinada cadeia celulósica. Na natureza, o grau de polimerização das cadeias celulósicas pode variar de menos de 100 até mais de 15.000 unidades de resíduos de glicose. Esse valor varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, tempo, o processamento das fibras e está relacionado à solubilidade desse polímero (ZHANG; LYND, 2004; PITARELO, 2007).

3.1.2 Hemiceluloses

As polioses ou hemiceluloses constituem uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, associados á celulose e a lignina (Figura 8) (SALMÉM et al.,1998).

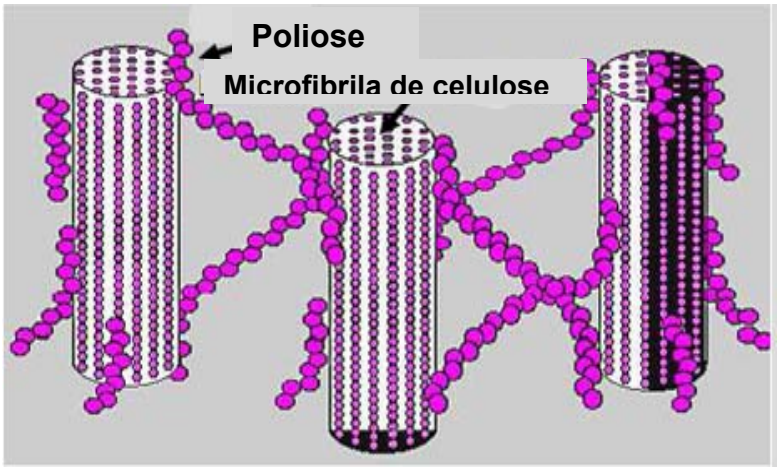


Figura 8. Ilustração de hemiceluloses ligadas entre si e à celulose. AGUIAR, (2010).

Algumas estão presentes anormalmente quando a planta está sob estresse. Além disso, as hemiceluloses variam qualitativa e quantitativamente com a espécie e entre indivíduos de uma mesma espécie (SJOSTROM, 1993).

As cadeias de hemiceluloses podem ser lineares ou ramificadas, amorfas, e possuem peso molecular relativamente baixo. Podendo ser chamadas de xilanas, mananas, arabinanas, entre outras, conforme a composição e predominância de monossacarídeos. São depositadas de forma intercalada nas microfibrilas de celulose em um estágio anterior à lignificação, dando elasticidade e flexibilidade ao agregado e impedindo que as microfibrilas de celulose se toquem. As hemiceluloses também se ligam firmemente entre si, mantendo ligações cruzadas através de pontes de hidrogênio, em uma rede complexa (FASANELLA, 2008; AGUIAR, 2010).

Devido à ausência de cristalinidade, sua baixa massa molecular e sua configuração irregular e ramificada, as polioses absorvem água facilmente. Esse fato contribui para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento de flexibilidade das fibras, além do aumento da área especifica ou de ligação das fibras (CORRÊA, 2010). A combinação de celulose e hemicelulose é chamada de holocelulose e corresponde a 65-70% do peso seco da planta (ROWEL, 2000).

3.1.3 Lignina

A lignina é um polímero fenólico com um padrão de ligações complexo e irregular, unindo as subunidades aromáticas de álcool (álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). Tais subunidades, sintetizadas a partir da fenilanina, são secretadas para a parede, onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas peroxidade e lacase. Como a lignina se forma na parede, ela remove água da matriz e constitui uma rede hidrofóbica, que se liga firmemente à celulose e impede a expansão da parede. A lignina acrescenta uma resistência mecânica significativa às paredes e reduz a sua suscetibilidade ao ataque enzimático e de patógenos. (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A lignina é sem dúvida o grande problema para a hidrólise, fazendo com que o material lignocelulósico seja recalcitrante para a hidrólise e o processo anaeróbico tende a não atacar o anel aromático (GOMES et al., 2008). As funções biológicas da lignina são: (1) Fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares. A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência à fibra lignocelulósica; (2) Tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares; e (3) Conferir resistência contra ataques microbianos (FASANELLA, 2008; LEE, 2003).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar porque a lignina apresenta uma ação inibitória na digestibilidade dos carboidratos estruturais da parede celular. JARVIS (2003) propôs algumas maneiras: as ligações químicas da lignina formam compostos indisponíveis, ocorre inibição local das enzimas, devido à ação tóxica dos grupos fenólicos oriundos da degradação parcial da lignina. No entanto, a lignina também poderia agir, possivelmente, como uma barreira física entre os carboidratos estruturais e as enzimas microbianas (AGUIAR, 2010). Segundo FERREIRA (2006), o tratamento com

NaOH, além de remover impurezas e tornar a superfície da fibra mais rugosa retira parcialmente a lignina da fibra da hemicelulose deixando a celulose mais expostas ao ataque enzimático.

3.2 Hidrólise de fibras lignocelulósicas

No processo de hidrólise de fibras lignocelulósicas tem-se empregado normalmente a hidrólise química usando ácido concentrado, ou com ácido diluído associado à hidrólise enzimática, surge como uma inovação neste processo.

3.2.1 Hidrólise Química

3.2.1.1 Hidrólise com ácido concentrado

Diversos autores apontam condições variáveis para o processo de hidrólise ácida. São utilizadas concentrações de ácido sulfúrico de 45 a 65 % em massa, temperaturas de 45° a 70°C e tempos que variam de 10-780 minutos dependendo da composição e arranjo estrutural das fibras (ROSA et al., 2010; HABIBI; DUFRESNE, 2008). Apesar de este ser o método comumente usado para obtenção de nanofibras, tráz alguns agravantes: os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos e exigem reatores resistentes à corrosão. Além disso, o ácido concentrado deve ser recuperado após a hidrólise para tornar o processo economicamente viável (SUN, 2002).

3.2.1.2 Pré-tratamento com ácido diluído

Os pré-tratamentos químicos podem ser definidos como técnicas que envolvam agentes químicos tais como ácidos, bases e solventes orgânicos. Um tratamento químico tem como objetivo aumentar a superfície do substrato por inchação das fibras e a modificação ou a remoção da hemicelulose e/ou da lignina para tornar a celulose mais acessíveis para hidrólise enzimática. (MOISER et al., 2003).

Os processos que empregam ácidos diluídos, em geral utilizam como catalisador o ácido sulfúrico diluído a 0,1-0,7% ou o ácido clorídrico (CARDOSO, 2008). A hidrólise ocorre em dois estágios para acomodar as diferenças entre a hemicelulose e a celulose e

para maximizar o rendimento em açúcares redutores provenientes da hemicelulose e da celulose (HARRIS et al., 1985). O uso de altas temperaturas serve para otimizar a hidrólise da fração de celulose mais resistente e tem sido considerado como um pré-tratamento eficaz em fibras lignocelulósicas (NGUYEN, 1998).

3.2.2 Hidrólise enzimática

Processos biotecnológicos têm sido estudados para buscar alternativas à hidrólise ácida com ácido concentrado para produção de etanol e açúcares fermentáveis e para obtenção de nanofibras vegetais. Não existem relatos de estudos de preparação de nanofibras de fibras lignocelulósicas de piaçava, licuri, sisal e eucalipto via hidrólise enzimática. Recentes progressos foram alcançados no isolamento de lignina de fibras vegetais com a hidrólise enzimática em condições amenas, a qual produz lignina com características mais próximas às do material em sua forma nativa (GUERRA et al., 2007).

KIRK & FARREL (1987) relatam que é necessário remover a lignina para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática e relataram que a bioconversão da celulose depende do grau de cristalização e da força de ligação da mistura de celulose. A remoção de materiais ligados e a degradação da estrutura cristalina podem aumentar a eficiência da bioconversão da celulose (KANSOH et al., 1999).

Segundo a literatura os pré-tratamentos mais eficientes são os que combinam técnicas físicas e químicas para promover o afrouxamento das paredes celulósicas, sendo ainda sugerido o uso do vapor saturado (explosão a vapor) reconhecido como um dos métodos mais promissores para implementação industrial. Na explosão a vapor úmida, a biomassa lignocelulósica é aquecida a altas temperaturas (cerca de 250 °C) e a pressão é liberada rapidamente, levando à redução do tamanho das partículas. Em razão da alta temperatura empregada, há degradação da hemicelulose e transformação da lignina, beneficiando a etapa de hidrólise (WOOD; SADDLER, 1988; RAMOS; SADDLER, 1994).

Durante o pré-tratamento, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído. No segundo passo, a hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada pela ação das enzimas celulases (EKLUND et al., 1990). Esses pré-tratamentos têm sido usados, no entanto, para produção de açúcares e não de nanofibras, uma vez que resultam também na diminuição da cristalinidade da fibra. Adaptações de alguns desses métodos tornam-se necessários para

acelerar o processo de hidrólise enzimática tendo por alvo a obtenção de nanofibras.

Os processos enzimáticos empregam celulase como biocatalisador de hidrólise, que requer condições brandas, temperaturas próximas a 50 ºC, pH na faixa 4,5-6,0, e processo à pressão atmosférica, permitindo ainda, conversões superiores às obtidas pela hidrólise química, menor destruição de açúcares e menor acúmulo de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) que podem afetar as células microbianas que serão utilizadas para fermentação. Na rota enzimática são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético, como de materiais, visto que os equipamentos podem ser elaborados com materiais menos nobres. As principais barreiras aos processos enzimáticos são: o custo elevado da enzima celulase comercial e o tempo mais longo para se obter rendimentos altos; um consumo energético elevado para manter os grandes volumes agitados e aquecidos por 48 a 96 horas, além do risco de contaminação (CASTRO; PEREIRA, 2010).

3.2.3 Nanofibras e microfibras de celulose

Nanofibras de celulose, também reportados na literatura como w*hiskers*, nanocristais, cristalitos ou cristais de celulose, são os domínios cristalinos de fibras celulósicas isoladas normalmente por meio de hidrólise ácida, têm sido avaliadas como material de reforço em matrizes poliméricas e os nanocompósitos resultantes geralmente apresentam propriedades superiores de estabilidade térmica, resistência mecânica, ópticas, dielétricas e de permeação de líquidos e gases, mesmo quando as nanofibras estão em baixa concentração (SILVA; D'ALMEIDA; 2009; DUFRESNE, 2003).

A proporção entre as regiões cristalina e amorfa, que determina o grau de cristalinidade e as características dimensionais dos domínios cristalinos, é variável. Sob condições controladas, a hidrólise consiste na destruição das regiões amorfas ao redor e entre as microfibrilas de celulose, enquanto os segmentos cristalinos continuam intactos, pois a cinética da hidrólise da região amorfa é mais rápida do que da região cristalina, em virtude da maior permeabilidade da região amorfa (SAMIR, 2005).

Na Figura 9 é apresentado um esquema da hidrólise seletiva das fibrilas de celulose que resulta na formação dos nanofibras de celulose.

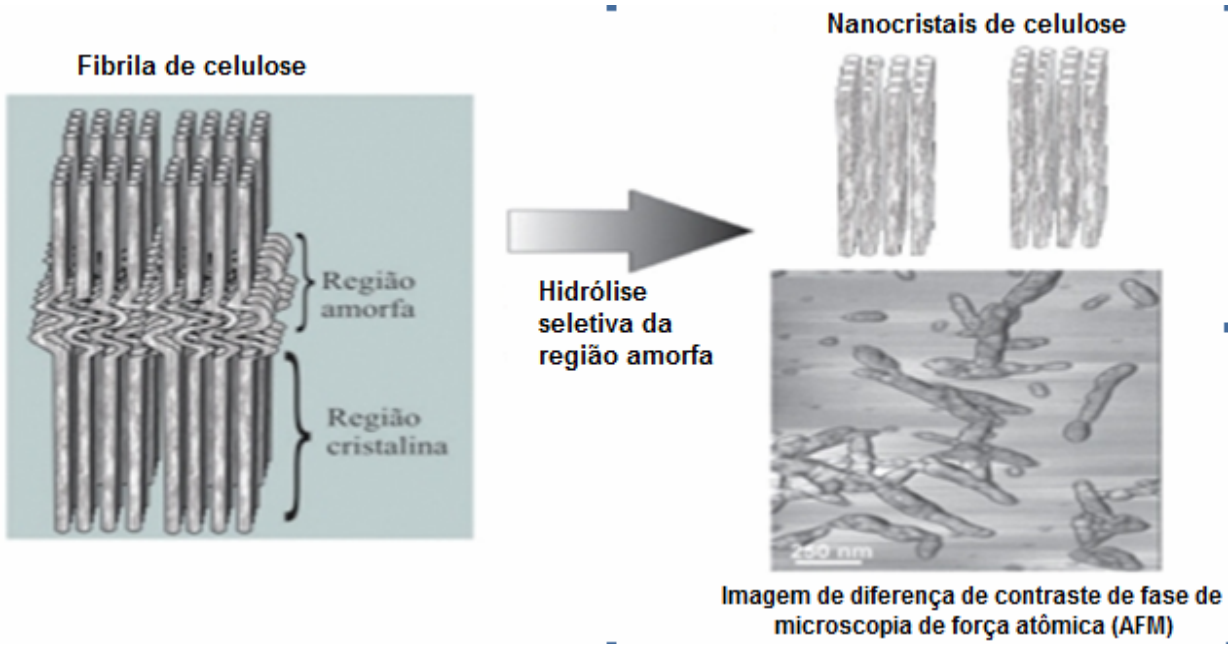


Figura 9. Hidrólise seletiva das fibrilas de celulose. SILVA et al., (2009).

Nanofibras de celulose são isolados a partir de diferentes fontes de fibras celulósicas (Tabela 5), de fonte vegetal, tais como algodão, eucalipto, sisal, coco, bananeira entre outras e de fonte animal, tal como os tunicados. No Brasil, podem ser citados alguns estudos utilizando a fibra de coco (ROSA et al., 2008) e as nanofibras provenientes do amido e de resíduos agrícolas de mandioca (TEIXEIRA, 2007).

Tabela 5. Dimensões médias de nanofibras de celulose de diferentes matérias primas.

Matéria-prima	Comprimento (nm)	Diâmetro (nm)	Referência
Algodão	105-141	21-27	Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, (2008).
Celulose microcristalina	105	12	Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, (2008).
Tunicados	1000 – 2000	15	Van Den Berg *et al.*, (2007).
Casca de coco	201±57	5,6±0,98	Machado, (2011).
Sisal	500	15	Filho *et al.*, (2009).
Eucalipto	200	15	Filho *et al.*,(2009).

Os cristais de nanofibras são partículas com alto grau de cristalinidade, alta área específica, e podem ser obtidos de diferentes fontes de fibras naturais e de alguns animais marinhos, cujo manto é constituído de celulose. Suas propriedades de dimensões

e cristalinidades dependem da fonte e do método de preparação (SOUSA LIMA; BORSALI, 2004).

Para aplicação como reforço, a celulose é convertida na forma de nanoestruturas, passando por vários tratamentos físicos e/ou químicos. Entre eles o tratamento alcalino, referido em alguns trabalhos como mercerização (ROSA et al., 2010) constitui-se basicamente de imersão da fibra em álcali, normalmente hidróxido de sódio, sob aquecimento e forte agitação. Neste processo ocorre remoção de lignina, hemicelulose e outros componentes da fibra que dificultam a hidrólise propriamente dita. Outro tratamento, utilizado em indústrias de papel e celulose, é o branqueamento, onde a aplicação de peróxido de hidrogênio à fibra aumenta seu valor comercial, devido à eliminação de cromóforos. O tratamento ácido ou hidrólise ácida é utilizado para quebrar as microfibras em nanofibras (KAMEL, 2007; ROSA et al., 2010).

Dependendo da matéria-prima e das condições de hidrólise, vários tamanhos podem ser obtidos, o que influencia diretamente na aplicação de microcristais de celulose ou nanofibras, geralmente associado a compósitos. Preenchimento para reforço em materiais compósitos é uma das aplicações mais testadas por vários autores, visando compósitos mais leves, mais resistentes e biodegradáveis. Outras aplicações de interesse são: filmes biodegradáveis utilizados como embalagens para alimentos e produtos farmacêuticos, como barreira contra umidade e oxigênio; filmes ópticos transparentes, para embalagens translúcidas, e para telas de aparelhos eletrônicos, como celulares e computadores (ROSA et al., 2010; SILVA et al., 2009).

As microfibras são formas de celulose não fibrosas, originada da parede celular da fibra vegetal fragmentada em pequenas partículas. É produzida a partir da hidrólise controlada da alfa-celulose despolimerizada, empregando soluções diluídas de ácidos minerais (SCHMIDT, 2005). É obtida em larga escala a partir de polpa de madeira, sendo as regiões não cristalinas removidas por hidrólise ácida, apresentando por isso elevado índice de cristalinidade. Pode ser composta de microfibras fragmentadas e partículas que possuem entre 5 e 10 nm de diâmetro e comprimento de 100 nm a alguns micrômetros, o que corresponde a uma elevada área superficial. O uso de agentes de reforço com área superficial elevada é considerado como um método para obter melhores interações entre matriz e reforço, resultando em boas propriedades mecânicas, além de estabilidade dimensional e térmica (RAMIRES, 2010).

Apresentam uma rigidez de 300-600 GPa, com excelente tensão de ruptura, alto grau de cristalinidade (monocristais com alta perfeição, semelhantes a agulhas), além de suas pequenas dimensões, podendo vir a substituir os nanotubos de carbono em algumas aplicações (KVIEN; OKSMAN, 2007). Um aspecto relevante dos nanocristais é a relação entre espessura e comprimento dos nanofios, pois quanto maior esta relação, maior a capacidade de reforço da nanofibras, (Tabela 4) (SOUZA-LIMA; BORSALI, 2004).

3.2.4 Filmes biodegradáveis (biocompósitos) e nanobiocompósitos

Os plásticos sintéticos têm dominado o mercado devido a sua grande versatilidade de uso, propriedades e preço acessível à maioria da população. Entretanto, no decorrer do tempo observou-se que pela composição e estrutura das macromoléculas poliméricas, apresentam uma degradação natural muito lenta, levando em média 150 anos. Isso tem gerado muita preocupação com o meio ambiente porque grande quantidade de resíduos descartados são plásticos sintéticos (PARRA et al., 2004; MOTA, 2009).

A necessidade de um plástico descartável com propriedades ideais tem levado a muitas pesquisas buscando materiais biodegradáveis ou fotodegradáveis. Entre as alternativas estão as modificações na estrutura dos polímeros originais, como por exemplo, a inclusão de grupos funcionais na cadeia principal, especialmente grupo éster e carbonila os quais podem sofrer respectivamente, clivagem por reações fotoquímicas. Outra possibilidade é adicionar polímeros biodegradáveis aos sintéticos, para que os primeiros sejam degradados por micro-organismos, e o segundo fique mais exposto e acelere sua degradação (MOTA, 2009).

Filme biodegradável é um filme fino preparado de materiais biológicos, que age como barreira a elementos externos e, conseqüentemente, pode proteger o produto e aumentar a sua vida de prateleira. Algumas possíveis propriedades funcionais dos filmes incluem retardar a migração de umidade, o transporte de gases (O_2, CO_2), a migração de óleo ou gordura, o transporte de solutos, oferecer uma integridade estrutural adicional aos alimentos, podendo também reter compostos aromáticos e carregar aditivos alimentícios ou componentes com atividade anti-bacteriana ou anti-fúngica, com liberação controlada sobre o produto onde foi aplicado (PALMU et al., 2002).

Os filmes biodegradáveis podem ser preparados pelo método "*casting*", onde a solução aquosa é depositada numa superfície apropriada e secada: a primeira etapa é a

solubilização da macromolécula em um solvente (água, etanol, solução de ácido acético e outros), ao qual podem ser incorporados diversos aditivos como plastificantes, usados para melhorar a flexibilidade do filme agindo como lubrificante , através do aumento da mobilidade das moléculas (MOTA, 2009).

Os filmes biodegradáveis estão sendo elaborados para serem usados na indústria de embalagens, em setores agrícolas e de liberação de fármacos, porém os filmes biodegradáveis possuem desempenho mecânico limitado e alto custo quando comparados com os filmes não biodegradáveis devido à produção em pequena escala. Uma exceção é o amido que apresenta alta disponibilidade e renovabilidade e tem sido considerado como a opção mais econômica para produção de plásticos biodegradáveis (TEIXEIRA, 2007; JACOB, 2006).

Uma alternativa para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis é incorporar a sua matriz as nanofibras de celulose tornando-o um nanobiocompósito. Os nanobiocompósitos são formados pela incorporação de nanopartículas e/ou micropartículas com uma baixa quantidade de carga e dimensões inferiores a 100 nm em matrizes poliméricas biodegradáveis, com o objetivo de melhorar as propriedades térmicas, mecânicas e de barreira dos biomateriais (ROSA et al., 2010; SILVA et al., 2011).

Novos nanobiocompósitos tem sido desenvolvidos utilizando nanofibras para reforçar biopolímeros hidrosolúveis como amido, acetato de celulose, poli (ácido lático) e proteína de soja. Os nanobiocompósitos resultantes apresentaram propriedades melhoradas, tais como, maior módulo de elasticidade e elongação, decréscimo da permeabilidade a gases, aumento da resistência à água e aumento na biodegradabilidade do polímero, quando comparados com polímeros de matriz *in natura* ou com micro e macro-compósitos convencionais (SILVA et al., 2011; MACHADO, 2011).

As nanofibras de celulose são uma alternativa atraente para preparo de nanocompósitos poliméricos, devido à suas propriedades mecânicas e sua natureza renovável. No entanto, a dispersão em polímeros hidrofóbicos é dificultada, devido à agregação e a fraca interação com a matriz, podendo ser feita modificações químicas na superfície das nanofibras de celulose para melhorar a interação com estas matrizes, no entanto geralmente estas modificações são trabalhosas, envolvendo várias etapas de reação e gerando resíduos químicos adicionais (ZOPPE et al., 2009).

O aumento do número de trabalhos publicados sobre a incorporação destas nanofibras isoladas da celulose em matrizes poliméricas biodegradáveis vem crescendo nos últimos anos, devido principalmente ás preocupações com as questões ambientais (ROSA et al., 2010; SILVA et al., 2010). Entretanto, muitos estudos ainda precisam ser feitos com o objetivo de substituir a hidrólise ácida como meio principal para obtenção dessas nanopartículas, pela hidrólise enzimática, que é uma alternativa mais econômica e menos poluente, suprindo os anseios mundiais de preservar o meio ambiente.

Referências

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos Utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger.* 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.

ALBUQUERQUE, M. C. G.; MACHADO, Y. L.; TORRES, A. E. B.; AZEVEDO, D. C. S.; CAVALCANTE Jr., C. L.; FIRMIANO, L. R.; PARENTE Jr., E. J. S. Properties of biodisel oils formulated using different biomass sources and their blends. **Renew Energy**, v. 34, p. 857, 2009.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA. Value added food: Single cell protein. **Biotechnology advances**, v. 18, p. 459-479. 2000.

ARO N, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptiond regulation of plant cell wall degration by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas,** v. 25, p. 29-42, 2004.

BASSO, T. P. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana- de –açúcar e serapilheira em comparação de cepas de *Trichoderma reesei*. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. Ocorrência de “morte descendente” do cacaueiro no Território Federal de Rondônia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, n. 3, p. 119-129, 1984.

BONGIOVANI, R. A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; PENNA, A. L. B. Nota científica - Caracterização reológica dos botriosferanas produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina*

MAMB-05 em glucose, sacarose e frutose como fontes de carbono. **Brazilian Jounal Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 53-59, 2009.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**: *Fundamentos*. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. 288 p.

BRANDÃO, L. V.; ESPERIDÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Utilização do Soro de Mandioca como Substrato Fermentativo para a Biossíntese de Goma Xantana: Viscosidade Aparente e Produção. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 175-180, 2010.

BROWNING, B. L. **Methods of Wood Chemistry**. 13 ed. John Wiley & Sons Inc, p. 882, 1967.

BURKERT, J. F. M. Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. 2003. 187 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) UNICAMP, Campinas.

CAMPIONI, T. S.; OLIVEIRA, K. S.; LIMA, V. M. G. Análise bromatológica da biomassa de *Lasiodiplodia theobromae* visando sua aplicação como suplemento Alimentar. In: XXII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2010, São José do Rio Preto. **Anais**... São Paulo: UNESP, 2010.

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: 47° CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA - CBQ, 2007, Natal. **Tópicos temáticos**...Natal: Associação Brasileira de Química, 2007.

CANILHA, L., MILAGRES, A. M. F., SILVA, S. S., SILVA, J. B. A., FELIPE, M. F. A., ROCHA, G. J. M., FERRAZ, A., CARVALHO. W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidólise enzimática: Uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.

CARDOSO, V. M. Aplicação da radiação de feixe de elétrons como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para hidrólise enzimática da celulose. 2008. 69 p Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARDOSO, J. E.; MAIA, C. B.; PESSOA, M. N. G. Ocorrência de *pestalotiopis psidii* e *Lasidioplodia theobromae* causando podridão no caule da goiabeira no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 320, 2002.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2 ed .London: Academic Press, 2001. 588 p.

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

CHEN, J. Z.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1 -> 3), (1 -> 6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, p. 635-652, 2007.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos folamentosos produtores de lípases. 2006. 206 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

COLLEONI-SIRGHIE, M.; FULTON, D. B.; WHITE, P. J. Structural features of water soluble (1, 3) (1, 4) –B-D-glucans from high B-glucans and tradicional oat lines. **Carbohydrate polymers**, v. 54, n. 2, p. 237-249, 2003.

CONAB -2011. Disponível em:<http: www.conab.gov.br>. Acesso em outubro de 2011.

CORRÊA, A. C. Preparação de nanofibras de celulose a partir de fibras de curauá para desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos de EVA. 2010. 153 p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

COTTERILL, P.; MACRAE, S. Improving Eucalyptus pulp and paper quality using genetic selection and good organization. **Tappi**, v. 80, p. 82-89, 1997.

CROUS, P. W.; PALM, M. E. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. **Sydowia**, v. 51, p. 167-175, 1999.

CUNHA, M. A. A.; PAWLAK, M. P.; FABBRIS, E. Z.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Produção de expolissacarídeo pelo fungo Ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MMPI. In: VI SEMANA DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2, 2008. Paraná, **Tópicos temáticos**... Paraná: Universidade Tecnológica do Paraná, 2008. p. 20.

CUNHA, P. D. T. Produção de exopolissacarídeos fúngicos e suas aplicações. 2002. 36 p. (Monografia) Universidade Federal de Londrina, Londrina.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: Schmidell et al. Biotecnologia industrial. São Paulo: ed. Edgard Blüeche, v. 2, p. 247 – 276, 2001.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillu*s enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006.

DRUZIAN, J. I; PAGLIARIN, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, 2007.

DUFRESNE, A. Interfacial phenomena in nanocompósitos based on polysaccharide nanocrystals. Composite. **Interfac**, v. 10, p. 369, 2003.

EKLUND, R.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 12, p. 225-228, 1990.

ELAZZOUZI, H. S.; NISHIAMA, Y.; PUTAUX, J. L.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; ROCHAS, C. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 57-65, 2008.

EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUARIAS . Conservação pós-colheita. Brasília: Serviço de produção de informação, 1996.

ESPACENET. Disponível em:< www.espacenet.com>. Acesso em fevereiro de 2011.

FABBRIS, E. Z.; CUNHA, M. A. A.; IVANOV, R. C.; BARBOSA, A. M. Seleção de fontes de carbono, nitrogênio e pH inicial de cultivo para a produção de exopolissacarídeo pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*. XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 1. 2008, Paraná. **Anais**… Paraná: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2008. p. 1-4.

FAO-ONU - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Disponível em:< http://www.fao.org.br>. Acesso em Fevereiro 2011.

FASANELLA, C. C. Ação das enzimas lignolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 2008, 80 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FEITOSA, I. C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. 2009, 103 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) Universidade Tiradentes, Aracaju.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos**: *Princípios e Práticas*. Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

FERREIRA, A.; HANNA, R. K.; LEBRÃO, G. W.; LEBRÃO, S. M. G.; NAGASHI, L.; SU, M. T.; VICENTINI, T. Avaliação de compósito de poliéster e fibra de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS DOS MATERIAIS, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais**... Foz do Iguaçu: Universidade Federal de São Carlos, 2006. p. 17.

FILHO, A. J. F.; CARVALHO, A. J. F.; MENEZES, A Jr.; MAGALHÃES, D.; SILVA, M. P. Preparação e caracterização de nanocristais de Celulose a partir de polpa de eucalipto e sisal. In: 8° JORNADA CIENTÍFICA E BIOTECNOLÓGICA DA UFSCAR, 2009, Sorocaba, **Tópicos temáticos**...Sorocaba: Universidade Federal de São Carlos, 2009.

FROST, M. G.; MOSS, D. A. Production of enzymes by fermentations. In Biotechnology. 7 ed. Weinheim: Verlagsgesellschaft, 1987. p. 108-110.

GALET, P. Les maladies et les parasites de la vigne. Mont - Pellier, **Payson du Midi**, v. 1, 1977.

GANDHI, H. P.; RAY, R. M.; PATEL, R. M. Exopolymer production by Bacillus species. **Carbohydrate Polymers** ,v.34, p.323-327, 1997.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p.503-510, 1996.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SILVA, R. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1→3;1→6)-_-D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Polymers,** In Press, Corrected Proof. doi:10.1016, 2008.

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

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial Polysaccharides and Polyesters. In:_____. **Microbial Biotechnology:** *Fundamentals of applied microbiology*. New York: Freeman, 1995. p. 265-272.

GOKHALE, D. U. Xylanase and betaxylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 137138, 1986.

GOMES, L. D.; STEELE-KING, C. G; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainableloquid bioflues from biomass: The writing's on the walls. **New Phytologist**, v. 178, p.473-485, 2008.

GÓMEZ, M.; RONDA, F.; CABALLERO, P. A.; BLANCO, C. A.; ROSELL, C. M. Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 167–173, 2007.

GOTO, M. Protein O-glycosylation in fungi: diverse structure and multiple function. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 1415-1427, 2007.

GREASHAM, Randolph L.; HERBER, Wayne K. Design and optimization of growth media. In: RHODES, P. M.; STANBURY, P. F. *Applied Microbial Physiology*. Oxford: Oxford University, 1997. p. 60.

GUIMARAES, L. B.; SANTOS, V. Z. R.; COVIZZI, L. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum var. caulivora.* **Brazilian Jounal of Food Technolology**, VII BMCFB, 2009.

GUPTA, O. A note oneffect of diferent concentrations of sucrose on spores germination of *Colletotrichum papaye* and *Botryodiplodia theobromae*. **Indian Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 282-283, 1977.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGUEL, A. M. Developments in fungal taxonomy .**Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 454-500, 1999.

HABIBI, Y.; DUFRESNE, A. Highly Filled Bionanocomposites from Functionalized Polysaccharide Nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1974-1980, 2008.

HARRIS, J. F.; BAKER, A. J.; CONNER, A. H.; JEFFRIES, T. W.; MINOR, J. L.; PATTERSON, R. C.; SCOTT, R. W.; SPRINGER, E. L.; ZORBA, J. **Two-Stage Dilute Sulfuric Acid Hydrolysis of Wood: An Investigation of Fundamentals**. General Technical Report FPL-45, U.S. Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, 1985.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: 1,5 million species estmate revised. **Mycological Research***,* v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HE, N.; LI, Y.; CHEN, J. Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 1, p. 99-105, 2004.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnology advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp. Acesso em dezembro de 2011.

JACOB, R. F. Estudo das propriedades das blendas de amido termoplástico e látex natural. São Carlos, 2006. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências físico-químicas). Universidade de São Paulo, São Paulo.

JAVIS, M. Celulose stacks up. **Journal Nature**, v. 426, p. 611-612, 2003.

KADLA, J. F.; GILBERT, R. D. Cell. **Chemistry Technolology**, v. 34, p. 197, 2000.

KAMEL, S. Nanotechnology and its applications in lignocellulosic composites: A Mini Review. **Polymer Letters**, v.1, p. 546–575, 2007.

KANSOH, A. L.; ESSAM, S. A.; ZEINAT, A. N. Biodegradation and utilization of bagasse with Trichoderma reesei. **Polymer Degradation and Stability**, v. 63, p. 273-278, 1999.

KIELING, D. D. Enzimas: Aspectos Gerais. Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

KIRK, T. K.; FARELL, L. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KIM, K. W.; PARK, E. W.; KIM, Y. H.; AHN,K. K.; KIM, P. G.; KIM, K. S. Latency and defence-related ultraestructural characteristics of apple fruit tissue infected with Botryosphaeria dothidea . **Phytopathologia**, v. 91, p. 165-172, 2001.

KRAMER, J. D. Bleaching Eucalyptus pulp-a review. In: CONGRESSO ANUAL de ABTCP, 32., 1999, São Paulo. **Anais**... São Paulo: ABTCP, 1999.

KROON-BATENBURG, L. M. J.; BOUMA, B.; KROON, J. The crystal and molecular structures of cellulose I and II. **Macromolecules**, v. 29, p. 5695, 1996

KVIEN, K.; OKSMAN, K. Orientation of Cellulose Nanowhiskers in Polyvinyl Alcohol (PVA). **Applied Physics***,* v. 87, p. 641-643, 2007.

LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 310-50, 1999.

LARONE, D. H. Medically Important Fungi A guide to identification. Washington, ASM Press, 2002.

LEAO, A. L.; SARTOR, S.; CARASCHI, J. Natural Fibers Based Composites Technical and Social Issues. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 448, p. 161-177, 2006.

LEE, K.; MOON, S. H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 261-268, 2003.

LEE, S. M. Natural fiber composites. In: International encyclopedia of composites. New York: VCH Publishers. v. 4, 1989. p. 8-16.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 839.

LIMA, L. P. C. Elementos de microbiologia. In: LIMA, U.A., AQUARONE, BORZANI, W., coord. Tecnologia das fermentações, São Paulo: **Edgar Blücher**, 1975. v. 1. p. 1-18.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews***,* v. 66, p. 506-577, 2002.

MACHADO, B. A. Desenvolvimento e caracterização de filmes flexíveis de amido de mandioca reforçados pela incorporação de nanocelulose de coco. 2011.159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. **Microbial polysaccharides**. In: _____. Comprehensive Biotechnology. Cap 49, University of Waterloo, p. 1005-1044, 1985.

MARINELLI, A.; MONTEIRO, M. R.; AMBRÓSIO, J. D. ; BRANCIFORT, M. C.; KOBAYASHI, M.; NOBRE, A. D. Desenvolvimento de compósitos poliméricos com fibras vegetais naturais da biodiversidade: uma contribuição para a sustentabilidade amazônica. **Polímeros**, v. 18, p. 92-99, 2008.

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. “Caracterização química e estrutural de fibras de sisal da variedade *Agave sisalana*”. **Polímeros**, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

MARK, H.; MEYER, K.H. The constitution of sugars. Berichte der Deutschen C hemischen Gesellschaft, v. 61, p. 593, 1928.

MATTOS, A. M. Influência do pH inicial do meio do cultivo na produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae*. 2009. Disponível em: <http://prope.unesp.br Acesso em junho de 2011.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II. Lund, Sweden, 1997. 119 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departament of Biochemistry, Lund University. 1997.

MEDEIROS, E. S.; MATTOSO, L. H.; CARVALHO, L. H.; Uso de Tecidos de Fibras Vegetais para Melhoria das Propriedades de Materiais Plásticos. Circular técnica do Ministério da Agricultura, ISSN 1517-4778, 2002. São Carlos, SP.

MEDINA, J. C. Plantas fibrosas da flora mundial. Campinas: **Instituto Agronômico**, p. 1-21, 1989.

MELO, J. C. P. Síntese e caracterização de derivados da celulose modificada com anidridos orgânicos – Adsorção e termodinâmica de interação com cátions metálicos. 2007. 95p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

MENDES-COSTA, M. C.; MORAES, W. B. C. Comparação entre os teores de carboidratos totais solúveis presentes em distintas frações da levedura *saccharomyces cerevisiae* meyen. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 59, p. 1-9, 1999.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para a produção de enzimas lignocelulóliticas. **Estudos tecnológicos**, v. 5, p. 68-78, 2009.

MIRANDA, C. C.; DEKKER, R. F. H.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172-177, 2008.

MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; DRESCHEL, R.; WELCH, G.; DIEN, B. S.; BOTHAST, R.; LADISCH, M. R. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production, Paper 103, BIOT Division, 225th. **American Chemical Society Meeting**, 2003.

MOKFIENSKI, A. Importância relativa da densidade básica e da constituição química de madeira de *Eucalyptus spp*. no rendimento, branqueabilidade e qualidade da polpa Kraft. 2004,153 p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MOREIRA, A. S. Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas Campetris* PV pruni. 2002. Tese (Doutorado em Biotecnologia Agrícola) Universidade Federal de Pelotas, São Paulo.

MOTA, R. D. P. Elaboração e caracterização de filmes biodegradáveis através de blenda polimérica de amido de lírio-do-brejo e de amido de fruto-do-lobo. 2009,116 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Molecular) Universidade Estadual de Goiás, Goiás.

MUZZARELLI, R. A. A.; MILIANI, M.; CARTOLARI, M.; TARSI, R.; TOSI, G.; MUZZARELLI, C. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia sp*. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 55-61, 2000.

NERY, T. B. R.; ESPERIDÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008.

NGUYEN, Q. Milestone Completion Report: Evaluation of a Two-Stage Dilute Sulfuric Acid Hydrolysis Process. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1998.

O'FEL, A. **Parasitologie – Mycologie**. 5. ed, Saint-Maur: Format Utile, 1997. 349 p.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. Química Nova, v. 33, n.7, p. 1549-1558, 2010.

OJUMU, T. V.; SOLOMON, B. O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S. K.; AMIGUN, B. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 150–152, 2003.

OLSSON, L.; JORGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROÇA, C. Biotehanol Production from lignocellulosic Material. Em Polysacharides: Structural Diversity and Functional Versatility; Dekker, 2005, Cap 42.

OKEY, E. N.; ADISA, V. A. Some nutricional requerements and the effects of four environmental factors on spore germination and growth of *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudocercospora tinorensis.* **Cryptogamie Mycologie**, v. 9, p. 282-283, 1977.

PACE, G. W. Polímeros microbianos. In: BU'LOCK, J & KRISTIASEN, B**. Biotecnologia Básica.** Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 449-462p.

PALMU, P. T.; FAKHOURI, F. M.; GROSSO, C. R. F. Filmes biodegradáveis. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 26, p. 12-17, 2002.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARRA, D.F.;TADINI,C.C.;PONCE,P.;LUGÃO, A. B. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 475–481, 2004.

PASQUEL, A. Gomas: Utilização e aspectos reológicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 86-87, 1999.

PATEL, R. N. Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 804-826, 2002.

PAVLOVA, K.; PANCHEV, I.; HRISTOZOVA, T. S. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 279-283, 2005.

PEREIRA, A. V. S. Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* – Patógeno do mamão. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

PIÑERO, M. P.; FERRER, M. A.; MORENO, L. A.; HUERTA- LEIDENZ, N.; KATYNNA C. PARRA, K. C.; BARBOZA , Y. Evaluation of physical properties of “Low-Fat” meat for hamburger beef formulated with β-Glucan. **Revista Científica**, v. 14, p. 500-505, 2004.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de Lipases por Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como Microrganismo. 2006. 120 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada, Rio Grande do Sul.

PITARELO, A.P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. 2007. 142 p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

PRESCOTT, LANSING. M.; HARLEY, JOHN. P.; KLEIN, DONALD. A. **Microbiology**. 5. ed. McGraw Hill: editora, 2002.1147 p.

RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; LONSANE B. K.. Solid State Fermentation at orstom: history, evolution and perspectives. **Advances in solid state fermentation**, Kluwer Acad Pub, Dordrecht, p. 577-612, 1997.

RAMIRES, E. C.; MEGIATTO, J. D. Jr.; GARDRAT, C.; CASTELLAN.; A.; FROLLINI, E. Biocompósitos de Matriz Glioxal-Fenol Reforçada com Celulose Microcristalina. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 126-133, 2010.

RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Bioconversion of wood residues: Mechanisms involved in pretreating and hydrolyzing lignocellulosic materials. In: M. e. HIMMEL, J. O. BAKER,

AND R. P. OVEREND (eds), Enzymatic conversion of biomass for fuels production. ACS Symposium Series, n. 566. **American Chemical Society**, DC. p. 325-341, 1994.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

RODRIGUES, D. V.; PAZ LIMA, M. L. Aspectos gerais e morfológicos de *Lasidioplodia theobromae* (2010)**.** Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.com.br. Acesso em janeiro de 2012.

ROGER, G. Mycoprotein – A meat Alternative New to the U.S. **Food Technology**, v. 55, n. 7, p. 36-50, 2001.

ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; MALMONGED, J. A.; GREGORSKIB, K. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 1, p. 83-92, 2010.

ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; MALMONGE, J. A.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L. H. C.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. Extração e caracterização de whiskers de fibra de côco. In: 18º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 2008, São Carlos. **Tópicos temáticos**... São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2008.

ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased Acacia measnsii in South Africa. **Forest Ecology and Management**, v. 99, p. 327-336, 1997.

ROWEL, R. M.; HAN, J. S.; ROWEL, J. S. Characterization and factors affecting fiber properties. Série: Natural polymers and agrofibers based composites, São Carlos, 292 p, 2000.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163-171, 2002.

SALDANHA, R. L. Diversidade genética de isolados de *Botryosphaeria* e a produção de lacases, pectinases e β-1,3-glucanases. 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado em genética e Biologia molecular) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SALDANHA, L. Diversidade genética de isolados de *Botryosphaeria* e a produção de lacases, pectinases e β-1,3-glucanases. 2006. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SALMÉM, L.; OSLON, A. M. Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: Struture –property relationship.**Jornal of pulp and paper science**, v. 24, p. 99-103, 1998.

SAMIR, M. A. S. A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005.

SANCHEZ, M. E.; VENEGAS, J.; ROMERO, M. A.; PHILIPS, A. J. L.; TRAPERO, A. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker is southwestern Spain. **Plant Disease**, v. 87, p. 1515-1521, 2003.

SCHIMIDT, R. **Topical delivery of α1-antichimotrypsin for wound healing,** München: Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians – Universität München, 2005. 192p (Thesis, Doctor in Pharmaceutical Technology).

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied in Microbiology of Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* in different bench-top bioreactors. **Journal of Applied Microbiology***,* 2004.

SELBMAN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICE, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysacharide of the Antarctic fungus Phoma herbarum CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 585-592, 2002.

SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; AUER, D. P. F.; GIBBS, P. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 279, 1992.

SHIMOYAMA, V. R. S.; BARICHELLO, L. E. G. Influência de características anatômicas e químicas sobre a densidade básica de madeira de Eucalyptus SP. In: CONGRESSO ANUAL DA ABTCP, 24.,1991,São Paulo. **Anais**...São Paulo: ABTCP, 1991. p. 23-36.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering** – *Basic Concepts.* Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, G. C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, p. 734–738, 2006.

SILVA, D. J; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O papel**, v. 70, p. 34 – 52, 2009.

SILVA, J. B. A.; SANTOS, A. V.; VARGAS, F. P.; DRUZIAN, J. I**.** Preparação e caracterização de filmes de fécula de mandioca e nanowhiskers de celulose. In: 11 CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2011, Campos do Jordão. **Tópicos temáticos**...Campos de Jordão: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SILVA, O. R. R. F.; BELTRÃO, N. E. M. (Ed.). O agronegócio do sisal no Brasil. Brasília: EMBRAPASPI, 1999.

SILVA, R.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Grupo de Materiais Polimericos e Compósitos*,* **Langmuir**, v. *25*, p. 873, 2009.

SILVA, M. L. C; MARTINEZ, P.; IZELI, N. L; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. Melo. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006.

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; SGARBI, F.; MUNIZ, M. R. A. Principais doenças na cultura do *Eucalyptus*. **Informações agronômicas** (Encarte Técnico), 2001. p. 26-30.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry**: *Fundamentals and applications*. New York: Academic Press, 1993. 293 p.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciências eTecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116-124, 2008.

SOUZA LIMA, M. M.; BORSALI, R. *Rodlike* Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, and Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 25, p. 771-787, 2004.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. E.; SILVA, M. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the *ascomyceteous* fungus *Botryosphaeria sp*., grown on different carbohydrate carbon sources , and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.

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

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides**.** **Tibtech**, v. 16, p. 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v.8, p.142-213, 1979.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 25, p. 315-330, 2004.

TAMEM, B. S. T.; OKSMAN, K. Investigation of the structure of cellulose whiskers and its nanocomposites by TEM, SEM, AFM and X-ray diffration. In: 8th INT. CONFERENCE ON WPC. Madison, 2005.

TEIXEIRA, E. M. Utilização de amido de mandioca na preparação de novos materiais termoplásticos, in Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo: São Carlos. 201p, 2007.

THIEMANN, J. E.; XAVIER, M. S. S. P.; COLEN, G.; GUIA, M. M. 1980. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. Pp. 168 – 185. In: Furtado, J.S.

(coord.). **Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo**. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo.

TSUTSUMI, N. P. Influência de Diferentes Fontes de Carbono na Produção de exopolissacarídeos por *Lasiodiplodia theobromae.* In: XXI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2009, São José do Rio Preto. **Anais...** São José do Rio Preto: Universidade estadual de São Paulo, 2009.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Cana-de-açúcar**:** subprodutos. Disponível em:<http: *www.unica.com.br/pages/cana_subprodutos.asp*>. Acesso em março 2011.

USECHE, Y.; VENEGAS, P. C.; VANEGAS, C. G. 2007. *Aspergillus nigerTiegh* (1867). Disponível em: http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie. Acesso em maio de 2012.

VAN DEN BERG, O.; CAPADONA, J. R.; WEDER, C. Preparation of Homogeneous Dispersions of Tunicate Cellulose Whiskers in Organic Solvents. **Biomacromolecules**. v. 8, p. 1353-1357, 2007.

VÄLJAMÄE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal–like kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 254-257, 2003.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M Y.Production and optimization of certain growth parametersfor an exopolysaccharide from Azotobacter vinelandii MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering** , v. 80, n. 6, p. 599- 602, 1995.

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

WANG, Y.; CAO, X.; ZHANG, L. Effects of Cellulose Whiskers on Properties of Soy Protein Thermoplastics. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, p. 524-531, 2006.

WANG, T.; DENG, L.; LI, S.; TAN, T. Structural characterization of a water-insoluble (1→3)-α-D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum.* **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 133-137, 2007.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **Applied Microbiolog**y. **Biotechnology**, v. 60, p. 258, 2002.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. In: Wood, W.A., Kellogg, S.T. (Eds.). **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 3-11, 1988.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.;VIIKARI,

L. **Polysaccharides: Strutural Diversity and Functional Versatility**, Dumitriu, S., ed. Dekker: New York, cap. 43, 2005.

YANG, F. C.; LIAU, C. B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 547-553, 1998.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHANG, M; CUI, S. W; CHEUNG, P. C. K; WANG, Q. Polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 4-19, 2006.

ZOPPE, J.; PERESIN, M. S.; HABIBI, Y.; ROJAS, O. Nanocomposites of cellulose nanocrystals produced by electrospinning and their applications. In: The 237th ACS National Meeting. Salt Lake City, UT, 2009.

Capítulo II

Obtenção de nanofibras de polpa de eucalipto via hidrólise enzimática com celulases do fungo *Aspergillus niger*

CAPITULO II

Obtenção de nanofibras de polpa de eucalipto via hidrólise enzimática com celulases de *Aspergillus niger*

Resumo

O uso e produção de enzimas têm se tornado uma das áreas de maior interesse da indústria biotecnológica. Uma inovação neste campo é a sua utilização em fibras lignocelulósicas objetivando produzir nanofibras. Essas nanofibras são os domínios cristalinos da celulose extraídos normalmente por hidrólise convencional ácida e tem sido amplamente utilizados em matrizes poliméricas pelo seu potencial em melhora-las quanto às propriedades mecânicas, ópticas, dielétricas, dentre outras. O objetivo deste estudo foi obter nanofibras de polpa de eucalipto via hidrólise enzimática por celulases do fungo *Aspergillus niger*, caracterizá-las, traçar um perfil comparativo com as nanofibras produzidas por hidrólise convencional ácida e incorporá-las a filmes biodegradáveis de amido (nanobiocompósitos) para avaliar a melhoria das propriedades mecânicas. Foi selecionado o extrato enzimático bruto que apresentou melhor atividade, produzido por fermentação de bagaço de cana (7 dias, 35°C, pH 6,0) com *Aspergillus niger*, resultando em uma atividade específica de 12,18 U/ µg de proteínas. O extrato enzimático apresentou condições ótimas de atividade em pH 5,0 a 30°C que foram usadas na hidrólise enzimática da polpa de celulose de eucalipto em diferentes condições. Foram testados diferentes tratamentos de pré-hidrólise levemente ácida e/ou enzimática, sendo que a hidrólie enzimática sem pré-tratamento resultou em nanofibras com maior índice de cristalinidade de 75,58% (NFC2, nanofibras produzidas com 90% de enzima por 120 min). Os nanobiocompósitos foram elaborados pelo processo de ‘’casting” utilizando amido, açúcar invertido e sacarose como plastificante, e solução das nanofibras (0,2%). Filme de amido de mandioca sem a nanofibras foi usado como referência. Os resultados indicam que a incorporação de nanofibras de polpa de eucalipto em alguns filmes resultaram em mudanças nas propriedades mecânicas com aumentos no módulo de *Young* e na tração. Constatou-se também a presença de dois eventos térmicos em todas as curvas de TGA e DTG dos nanobiocompósitos, indicando assim, que degradações das nanofibras de celulose, da matriz e da sacarose ocorrem em eventos distintos. Conclui-se que nanofibras de celulose obtidas por hidrólise enzimática com celulases de *Aspergillus niger* apresentam propriedades similares as obtidas por hidrólise ácida, reduzindo o tempo e custo do processo de preparação, e as propriedades dos nanobiocompositos podem ser melhoradas a partir da incorporação de nanofibras de polpa de eucalipto obtidas pelos dois processos.

Palavras chave: enzimas, *Aspergillus niger*, nanofibras, filmes biodegradáveis.

Obtaining nanofibres of pulp of eucalyptus using enzymatic hydrolysis with cellulases of *Aspergillus niger*

Abstract

The use and production of enzymes has become one of the areas of greatest interest to the biotechnology industry. An innovation in this field and its use in lignocellulosic fibers aiming at producing nanofibers. These nanofibers are the areas of crystalline cellulose extracted normally by hydrolysis conventional acid and have been widely used in polymer matrixes by their potential to improve them as the mechanical properties, optical, dielectrical features, among others. The objective of this study was to obtain nanofibers of pulp of eucalyptus via enzymatic hydrolysis by cellulases of the fungus *Aspergillus niger*, characterize them, to draw a comparative profile with the nanofibers produced by hydrolysis conventional acid and embed them in biodegradable films of starch (nanobiocompósitos) to assess the improvement of mechanical properties. We selected the enzymatic extract gross presented the best activity, produced by fermentation of sugar cane bagasse (7 days, 35 °C, pH 6.0) with *Aspergillus niger*, resulting in a specific activity of 12.18 U/ µg protein. The enzymatic extract presented optimal conditions of activity at pH 5.0 at 30 °C that were used in enzymatic hydrolysis of cellulose pulp of eucalyptus in different conditions. We tested different treatments of pre-hydrolysis slightly acidic and/or enzymatic, being that the enzyme hidrolie without pre-treatment resulted in nanofibers with higher index of crystallinity of 75.58 % (NFC2, nanofibers produced with 90% of the enzyme for 120 min).The nanobiocompósitos were prepared by the process of "casting" using starch, sugar and invert sucrose as a plasticizer, and solution of nanofibers (0.2 %). Movie of cassava starch without the nanofibers was used as reference. The results indicate that the incorporation of nanofibers of pulp of eucalyptus in some movies have resulted in changes in mechanical properties with a significant increase in *Young* module and in traction. It was also noted the presence of two thermal events in all the curves of TGA and DTG of nanobiocompósitos, indicating that degradation of nanofibers of cellulose, matrix and sucrose occur in separate events. It is concluded that nanofiber cellulose obtained by enzymatic hydrolysis with cellulases of *Aspergillus niger* have properties similar to those obtained by acid hydrolysis, by reducing the time and cost of the preparation process, and the properties of nanobiocompósitos may be improved with the incorporation of nanofibers of pulp of eucalyptus obtained by the two processes.

Key-words: Enzymes, *Aspergillus niger*, nanofibers, biodegradable films.

1.0 Introdução

Os fungos são micro-organismos muito utilizados pela indústria na produção de enzimas celulolíticas (NOVO NORDISK, 1996). As espécies do gênero *Aspergillus* são de grande importância econômica graças a suas propriedades bioquímicas de produzir enzimas que são utilizadas nas indústrias de panificação e cervejaria, em antibióticos e ácidos orgânicos, e, há séculos, vêm sendo empregadas na produção de alimentos fermentados, no Japão e em outros países asiáticos (EMBRAPA, 2003). Dentre as enzimas de importância industrial, produzidas por fungos estão às celulases que atuam na hidrólise de substratos celulósicos e compreendem um complexo de enzimas celulolíticas compostas por endoglucanase ou endo-1,4-β-glucanase, exoglucanase ou exo-1,4-β (SOUZA et al., 2008). O mercado mundial da tecnologia enzimática estima movimentar em 2015 cerca de 4,4 bilhões de dólares (HASAN et al., 2006).

O desenvolvimento tecnológico mundial avança cada vez mais no caminho dos processos biotecnológicos, como a substituição de processos químicos convencionais por processos enzimáticos, devido à tendência de prevalência das políticas ambientais (COELHO, 2001). A elevada disponibilidade de fibras lignocelulósicas, somada à necessidade de uma fonte renovável para a produção de polímeros, abre uma grande oportunidade para avanços tecnológicos que agreguem valor aos produtos da agroindústria e, ao mesmo tempo, atuem na fixação de carbono na natureza. As fibras lignocelulósicas são excelentes matérias-primas para a produção de polímeros e compósitos, isso é demonstrado pelo elevado número de pesquisas na utilização dessas fibras, depósitos de patentes nacionais e internacionais e o elevado número de produtos já comercializados (EICHHORN et al., 2010; ORTEGA; BAILLIE, 2011).

Os principais componentes das fibras vegetais são celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é formada por regiões amorfas que surgem como imperfeições nas microfibrilas, e por regiões cristalinas. Dependendo do procedimento utilizado, a nanocelulose obtida pode estar na forma de nanocristais, *nanorods*, *nanowhiskers* e/ou nanofibras. Os nanocristais são uma denominação mais utilizada para a matéria-prima na zona cristalina. Após a hidrólise, os nanocristais são liberados e podem tornar-se *nanorods*, ou nanoagulhas, cristais retos; *nanowhiskers*, nanocristais curvos e nanofibras, quando possuem um grande comprimento, sendo que para ser considerado nano, uma das dimensões precisa ter dimensões inferiores a 100 nm (PEREIRA, 2010).

Nanofibras de celulose são normalmente isolados das fibras lignocelulósicas por meio de hidrólise ácida, e são assim chamados devido a suas características físicas de rigidez, de espessura e de comprimento (SOUZA LIMA et al., 2004). SAMIR et al., (2005), reportam que as nanofibras de celulose são regiões que crescem sob condições controladas, o que permite a formação de cristais individuais de alta pureza. Sua estrutura altamente ordenada pode conferir não somente alta resistência, mas também mudanças significativas em algumas propriedades importantes de materiais, tais como elétrica, óptica, magnética, ferromagnética, dielétrica e de condutividade. Na hidrólise ácida podem ser utilizados o ácido sulfúrico e clorídrico. O ácido sulfúrico, na concentração de 64% a 65% p/p, se constitui no ácido que mais vem sendo utilizado em estudos para o isolamento das nanofibras de celulose, (HABIBI et al., 2007; ELAZZOUZI-HAFRAOUI et al., 2008; SILVA et al., 2011).

O grande problema da hidrólise ácida é que necessita de reatores não corrosivos e o ácido utilizado precisa ser recuperado para não gerar problemas ambientais. Uma alternativa interessante e que condiz com os esforços de preservação ambiental é a hidrólise enzimática. Nesse processo são utilizadas enzimas produzidas por micro-organismos por meio de fermentação semi-sólida ou submersa. Na fermentação semi-sólida, utiliza-se como substrato rejeitos industriais que parariam em lixões, como cascas de frutas e verduras, bagaços, entre outros. A quantidade de água adicionada aos substratos é mínima para permitir apenas a manutenção das atividades essênciais dos micro-organismos. Não existem relatos de estudos de preparação de nanofibras de materiais lignocelulósicos de polpa de piaçava, licuri, sisal e eucalipto via hidrólise enzimática. Essas nanofibras podem ser incorporadas como reforço para a produção de plásticos biodegradáveis e filmes comestíveis.

Porém o maior desafio da utilização de filmes biodegradáveis é substituir as embalagens convencionais mantendo, com a mesma eficácia, a qualidade do produto, garantindo sua vida de prateleira através do controle de características mecânicas e de permeabilidade (RIGO, 2006). Para os filmes, o fator mais importante é apresentar uma alta resistência à tensão, enquanto que o valor de elongação depende do tipo de aplicação do filme. É essencial que o filme mantenha sua integridade e propriedades de barreira, sob a tensão normal aplicada durante transporte e manuseio (DAVANÇO, 2006). O objetivo do trabalho foi obter nanofibras da polpa de eucalipto via hidrólise enzimática por celulases extraídas pelo fungo *Aspergillus niger*, caracterizá-las, fazer a comparação

com nanofibras produzidas por hidrólise convencional ácida, e incorporá-las a filmes de amido (nanobiocompósitos) como reforço mecânico.

2.0 Material e Métodos

2.1 Material

Os substratos utilizados para a produção da enzima celulase foram: bagaço de cana-de-açúcar cedido por vendedores de caldo de cana na localidade da Avenida Sete de setembro (SSA-BA) e casca de aipim cedida por feirantes do Engenho Velho de Brotas (SSA-BA).

Para o preparo das soluções-tampão foram utilizados os reagentes: fosfato de sódio monobásico anidro e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Nuclear), ácido acético glacial (Vetec) e acetato de sódio trihidratado (Nuclear). Para o preparo da solução nutriente, utilizou-se K_2HPO_4 (Nuclear), $NaNO_3$ (Nuclear), Uréia (Chemco), $MgSO_4$ (Dinâmica), $ZnSO_4$ (Synth), $FeSO_4$ (Synth) e $MnSO_4$ (Synth).

Para os métodos analíticos foram utilizados os seguintes reagentes: Carboximetilcelulose (Cromoline), NaOH (Dinâmica), DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Vetec),corante vermelho congo (Nuclear), tartarato duplo de sódio e potássio anidro (Cinética), glicose anidra (Synth), HCl (F.Maia), sacarose grau analítico (Fmaia), amido solúvel (Synth), Albumina Bovina (BSA ,Inlab), glicerol (Synth), H_2SO_4 (Qhimex), Fosfato de amônio (Vetec), Sulfato de magnésio (Vetec), Cloreto de cálcio (Vetec), Sulfato Ferroso (Vetec), Cloreto manganoso (Qhemis), Sulfato de zinco (Fmaia), Polpa de α-celulose de eucalipto (cedida pela Empresa Bahia pulp (Brasil) e Membrana de celulose para diálise D9777 - 100 FTO, da Sigma-Aldrich.

2.2 Micro-organismos

O micro-organismo utilizado foi o fungo *Aspergillus niger*, cedidos pelo laboratório de Microbiologia de Alimentos, UFBA, embora tenham sido testados também o *Aspergillus clavatus*, *Lasidioplodia theobromae*. O fungo foi repicado em meio Batata Dextrose Agar (BDA) e acondicionados em incubadora BOD (Marca Tecnal) a 28ºC. As culturas puras após crescimento foram armazenadas a 4°C com repiques mensais (AGUIAR, 2010 adaptado).

2.3 Determinação qualitativa da atividade enzimática

O fungo foi repicado em placas de petri contendo 20 mL de batata dextrose Agar (BDA) e incubados a 28°C por 7 dias em BOD. 50 mL do meio nutriente líquido (Tabela 1) a pH p7,0 (ajustado com solução de HCl ou NaOH) em frascos Erlemeyer de 250 mL foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Com uma ponteira autoclavada foi realizado perfurações na placa contendo o fungo e transferiu-se 3 discos de 0,5 cm para o meio líquido de indução a 28°C por três dias conforme constituição descrita nas Tabelas 1 e 2 (DINGLE et al., 1953; RASTOGI et al., 2009).

Tabela 1. Constituição do meio líquido de indução para produção de celulases.

Componentes	Concentração (g/L)
Fosfato de amônio	7,0
Fosfato dibásico de potássio	1,5
Sulfato de magnésio	0,5
Cloreto de cálcio	0,3
Carboximetilcelulose (CMC)	5,0
Solução de traços de sais*	2,5 mL

*A constituição da solução de traços de sais consta na tabela 2.

Tabela 2. Constituição da solução de traços de sais.

Componente	Concentração (g/L)
Sulfato ferroso	1
Cloreto manganoso	1
Sulfato de zinco	1

Para caracterizar a atividade enzimática de celulase, usou-se a técnica “cup plate” (DINGLE et al., 1953; TEIXEIRA, 1996) onde foi empregado meio de cultura sólido e estéril contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono e tendo pH ajustado entre 7-7,4 (Tabela 3).

Tabela 3. Constituição do meio de caracterização.

Componentes	Concentração (g/L)
Carboximetilcelulose	10
Ágar-agar	20

As placas contendo o meio sólido foram perfuradas com ponteiras de diâmetro de 5 mm. Em placas de Petri de 15 cm foram feitos 9 furos (conforme representação esquemática da figura 1) e adicionados 70 µL do meio líquido de indução, usando pipeta automática com ponteiras estéreis, tendo o cuidado de não pipetar a massa celular. As placas foram incubadas a 28°C durante 24 horas. Para revelar o halo de atividade enzimática as placas foram lavadas com uma solução de revelador vermelho congo a 1% em tampão fosfato pH 8, possibilitando a medição dos halo. A zona translúcida em forma de halos indica a ação enzimática da celulase (que foi medida com uma régua).

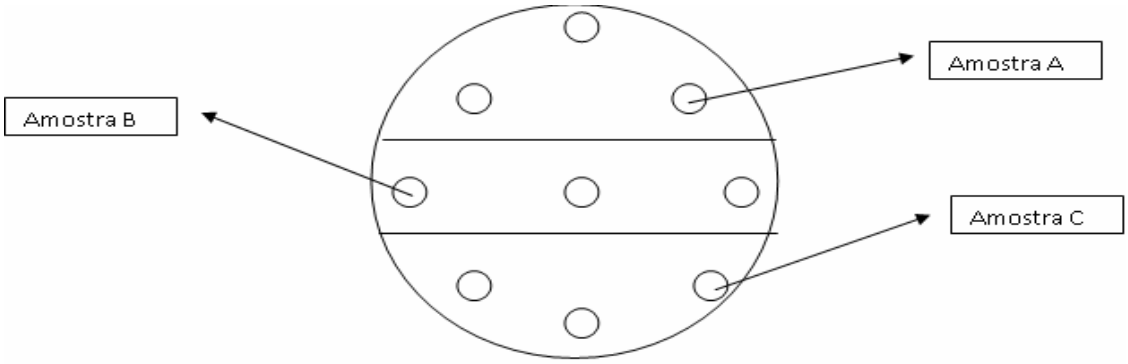


Figura 1. Representação esquemática da placa de caracterização de celulases.

2.4 Preparo do inóculo

O crescimento do *Aspergillus niger* foi realizado em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) inclinado em tubo de ensaio com incubação por sete dias a 28°C±2°C em incubadora BOD. Para obter o inóculo foram adicionados 5mL de água esterilizada no tubo contendo o fungo e em seguida, realizou-se a raspagem dos esporos com uma alça de platina estéril utilizando-se, assim, esta suspensão de esporos para o ensaio de fermentação (adaptado de AGUIAR; MENEZES, 2000).

A determinação de esporos em suspensão foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico segundo RAIMBAULT & ALAZARD (1980) citados por

PARIS (2008). Transferiu-se para a superfície da câmara uma gota da solução de esporos até preencher os quadrantes da câmara. Após, foram contadas as células nos quatro campos de um lado da câmara, realizando posteriormente à média. O cálculo da concentração de esporos (C_{esp}) foi realizado conforme a equação:

$$C_{esp} \quad (esp/mL) = \frac{número \quad médio \quad esporos \quad contados \times fator \quad diluição}{4 \cdot 10^{-4} \, mL}$$

Foi contado quatro campos em diagonal para cada retículo da câmara, sendo adotada a média aritmética para 3 repetições. O volume de cada campo de contagem da câmara foi de 10^{-4} mL.

2.5 Produção do extrato bruto enzimático via fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas

Para avaliar as melhores condições para produção do extrato enzimático bruto, utilizou-se as mesmas condições de cultivo (pH, temperatura e tempo) com modificações nos substratos testados. Como substratos foram utilizados resíduos lignocelulósicos (cascas de aipim e bagaço de cana-de-açúcar), descritos na literatura como boas fontes para produção de enzimas celulásicas (AGUIAR FILHO, 2008; MENEZES et al.,1991).

As cascas de aipim e o bagaço de cana-de-açúcar foram cortados em pequenos pedaços, secos em estufa para secagem com circulação de ar (Marca Nova Ética) a 80°C e moídos em triturador de café (Modelo MDR301, Marca Cadence) até a obtenção de um particulado fino (DA SILVA et al., 1994). O meio de cultivo foi constituído de 14 g de substrato moído e 6 mL de tampão fosfato em pH 6,0 e 8,0. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, sendo inoculado $1x10^6$ esporos/mL do fungo *Aspergillus niger* e fez-se a incubação a 25°C ±1°e 35°C±1°C em incubadora BOD (Marca Tecnal).

Após o tempo de fermentação de 7 e 11 dias, o material foi retirado da estufa, colocado em frascos Erlemeyers dentro de bandejas contendo gelo, e foi adicionado 50 mL de água gelada. O meio foi homogeneizado em intervalos regulares durante uma 1 hora com bastão de vidro e filtrado em gaze, obtendo-se o caldo enzimático para determinação da atividade enzimática. Os parâmetros utilizados na seleção de variáveis

para os ensaios de fermentação constam no quadro 1, (AGUIAR, 2010; COELHO et al., 2002 adaptado).

Quadro 1. Seleção das melhores condições de preparo do extrato enzimático bruto.

Ensaio	Tempo dias	Temperatura (ºC)	pH	Substrato
1	7	25	6,0	Bagaço de cana
2	11	25	6,0	
3	7	35	6,0	
4	11	35	6,0	
5	7	25	8,0	
6	11	25	8,0	
7	7	35	8,0	
8	11	35	8,0	
9	7	25	6,0	Casca de aipim
10	11	25	6,0	
11	7	35	6,0	
12	11	35	6,0	
13	7	25	8,0	
14	11	25	8,0	
15	7	35	8,0	
16	11	35	8,0	

2.6 Determinação da atividade endoglucanásica do extrato enzimático bruto

A realização destes ensaios teve como objetivo a determinação da atividade endoglucanases do extrato bruto enzimático de *A.niger* sobre carboximetilcelulose (CMC) por determinação da concentração de glicose liberada pelo método de ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) (SHARROCK, 1988; MILLER et al.,1959). As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro em 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mmol de glicose mL^{-1} min^{-1} nas condições do ensaio (U=µmol mL^{-1} min^{-1}).

Foram adicionados 4,5mL da solução de CMC, 0,5% dissolvida em tampão acetato de sódio, pH 5,0, em frascos Erlemeyer de 50 mL e incubado sob agitação a temperatura de 50ºC por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,5mL da solução enzimática filtrada, e mantida sob agitação por 30 minutos. Em paralelo realizaram-se ensaios em

branco substituindo-se o caldo enzimático por tampão acetato de sódio pH 5,0. 10 mL do meio foram transferidos pata tubos eppendorf e centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante de cada tubo foi retirada e colocada em tubos de ensaio onde foram adicionados 0,5 mL de DNS e levado a banho de ebulição por 5 minutos, e rapidamente, resfriado em banho de gelo. Adicionou-se 5 mL de água destilada, homogeneizou-se em vórtex e efetuou-se a leitura a 540 nm, em Espectrofotomêtro (Modelo Lambda 20, Marca Perkin Elmer).

Os resultados, após a hidrólise enzimática do extrato bruto, foram expressos em ART (açúcares redutores totais), visto que, além de glicose, podem ser quantificados também açúcares redutores como oligossacarídeos e celobiose. Para determinar a concentração dos ART nos hidrolisados, construiu-se uma curva padrão de glicose com concentrações de 0,2 a 1,5 mg/mL, gerando um modelo de regressão linear e coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida. Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1µmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, ou seja, U= µmol mL^{-1} $min^{-1.}$

2.7 Determinação da concentração de proteínas no extrato enzimático bruto

A concentração proteíca do extrato bruto foi determinada pelo método colorimétrico de LOWRY et al., (1951), utilizando uma curva de albumina bovina como padrão e leitura a 660 nm em espectrofotômetro (Modelo Lambda 20, Marca PerkinElmer). A concentração de proteínas foi determinada através de uma curva padrão de albumina bovina com concentrações de 20 a 100 ug/mL gerando um modelo de regressão linear e coeficiente de determinação da proteína em função da absorbância medida. Para a quantificação foi utilizada a relação de 1 unidade de enzima que equivale a quantidade necessária para liberar 1ug de proteína por minuto de reação (AE= atividade da enzima em U/mL conc. de proteína em µg/mL).

2.7.1 Análise estatística

Os resultados encontrados foram tratados pelo Teste de Tuckey para identificar se ás alterações nos parâmetros avaliados foram significativas ao nível de 95% de significância.

2.7.2 Determinação da influência da temperatura na atividade enzimática

Foram realizadas análises para acompanhar o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática do ensaio selecionado (maior atividade enzimática) e determinar a temperatura ideal da ação do extrato bruto enzimático de *A. niger*. O procedimento foi realizado conforme descrito no item 2.6, variando-se a temperatura durante a reação. A incubadora refrigerada com agitação, (Modelo TE-39812, Marca Tecnal) foi ajustada para as seguintes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80ºC a rotação de 121 rpm.

2.7.3 Determinação do efeito do pH na atividade enzimática

As temperaturas do ensaio de melhor atividade enzimática foram realizadas análises para acompanhar o efeito do pH sobre a atividade enzimática do ensaio selecionado e determinar o pH ideal para ação das enzimas celulases. O procedimento foi realizado conforme descrito no item 2.6, fixando a temperatura ótima e utilizando tampões com diferentes pH. Os pH estudados foram: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10. Foi utilizada uma incubadora refrigerada com agitação (Modelo TE-39812, Marca Tecnal) a rotação de 121 rpm.

2.8 Hidrólises de polpa de eucalipto para obtenção de nanofibras de celulose

2.8.1 Hidrólise ácida (controle)

As nanofibras de celulose foram preparadas por hidrólise ácida utilizando H_2SO_4 64% (controle). Um total de 12 g/mL de polpa de celulose comercial foi submetida à agitação constante durante um período de 10 a 15 minutos, numa temperatura de 50 ºC. Após o tratamento de hidrólise ácida, as amostras foram filtradas, e completadas o volume para 100 mL com tampão acetato pH 5,0 e centrifugadas durante 10 minutos a 4400 rpm numa temperatura de 10°C, para separar os cristais da solução por centrifugação. Este procedimento foi repetido até não apresentar mais sobrenadante (uma média de 6 a 7 vezes). Em seguida as suspensões foram submetidas à diálise, até atingir o pH entre 5–7. Após atingir o pH desejado, as amostras foram colocadas em banho de ultra-som por 5 minutos (Modelo1400, Marca Ultrasonic Cleaner). Essa metodologia foi adaptada da literatura utilizando como referência SILVA et al., (2011).

2.8.2 Hidrólise enzimática

A possibilidade de obter nanofibras de polpa de eucalipto por hidrólise enzimática foi testada por duas metodologias. A polpa de celulose foi triturada em liquidificador por 2 minutos e 0,5 g foi pesada em frascos Erlemeyer de 250 mL. Foi acrescentado tampão fosfato no pH ótimo da enzima e o extrato enzimático bruto de *A. niger*. Os erlemeyers foram mantidos em agitação em incubadora refrigerada com agitação (Modelo TE-39812, Marca Tecnal) a 150 rpm a 30°C por tempos previamente determinados (Tabela 4).

Tabela 4. Condições de hidrólise de polpa de eucalipto com enzima celulase extraída de *Aspergillus niger.*

Condições de hidrólise	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Enzima (mL)	10	90	90
Tampão acetato pH 5,0 (mL)	90	10	10
Tempo (min)	90	120	240
Código	NFC1	NFC2	NFC3

Após esse tempo os frascos Erlemeyers foram mergulhados em banho de 100°C por 5 minutos para inativação das enzimas e em seguida em banho de gelo. O material foi centrifugado a 4400 rpm por 10 minutos e lavado com água destilada. Essa operação foi repetida sucessivas vezes, até pH constante (5,0-7,0). O sobrenadante foi armazenado em geladeira para determinações quantitativas (ZANDONÁ, 2001). O rendimento foi determinado por diferença de massa após a secagem em estufa com circulação de ar (Marca Nova Ética) de uma alíquota de 10 mL da suspensão (SILVA et al, 2011).

2.8.3 Hidrólise enzimática com pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

A polpa de celulose depois de triturada em liquidificador por 2 minutos (0,5 g) foi pré-tratada com ácido sulfúrico em baixas concentrações em dois tempos para diminuir o tempo de hidrólise enzimática e possibilitar a obtenção de nanofibras e/ou microfibras. Foram acrescentados 100 mL de solução de ácido sulfúrico na concentração de 0,5 e 1,0% ao frasco Erlemeyer contendo a polpa de eucalipto e o meio foi autoclavado a 121°C por tempos de 15 e 30 minutos (Tabela 5). O conteúdo dos frascos Erlemeyes foi

dialisado por transferência da solução para membrana em incubadora refrigerada com agitação (Modelo TE-39812, Marca Tecnal) com trocas sucessivas de água por 3 dias até atingir pH constante (5,0-7,0) indicativo também da ausência dos resíduos do ácido (CARDOSO, 2008). A agua presente nas membranas de diálise foi descartada e o conteúdo foi colocado em frascos Erlemeyer de 250 mL onde foi acrescentado 40 mL de enzima e 10 mL de tampão acetato (pH=5,0). A partir daí segui-se o procedimento da metodologia da hidrólise enzimática (2.8.2).

Tabela 5. Condições de hidrólise com pré-tratamento com ácido sulfúrico.

Concentração ácido (%)	Pré-trat (min)	Enzima (mL)	Temperatura (°C)	Tempo Hidrólise enzimática (min)	Código
0,5	15	40	30	30	NFC4
0,5	30	40	30	30	NFC5
1,0	15	40	30	30	NFC6
1,0	30	40	30	30	NFC7

2.9 Caracterização das nanofibras de celulose de eucalipto

2.9.1 Birrefringência das suspensões de nanofibras de celulose

Para a determinação da birrefringência nas suspensões de nanofibras em água, foram utilizados dois filmes de polarizadores cruzados, ajustados de maneira a ficarem perpendiculares entre si, onde foi incidida uma luz direta sobre um deles, e a amostra foi interpolada entre os dois filmes (VAN-DER-BERG et al., 2007).

2.9.2 Estudo de espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

Os grupos estruturais das fibras hidrolisadas em diferentes concentrações de enzimas e tempos foram analisados por espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier (Modelo Spectrum 100, Marca Perkin Elmer). O espectro FT-IR do material obtido das hidrólises foi obtido usando pastilha de KBr. Amostras dos hidrolisados enzimáticos da polpa de celulose dialisadas foram liofilizadas e misturadas

com KBr para obtenção de pastilhas. O espectro FT-IR obtido com varredura na região de 4000- 400 cm^{-1} (SILVA et al., 2011).

2.9.3 Determinação de massa molecular por cromatografia

A determinação da massa molecular (MM) dos hidrolisados enzimáticos da polpa de eucalipto foi realizada por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência de Permeação em Gel com detecção de Índice de Refração (GPC CLAE-IR, Modelo série 200, Marca PerkinElmer), utilizando colunas SB 803, 804, 805, 806 em série, tendo como fase móvel solução aquosa de nitrato de sódio (0,5 % m/v) a um fluxo de 1,0 mL/min. Foram injetados 80 µL dos hidrolisados das soluções aquosas (0,5 % m/v). Padrões de dextrana (American Polymer Standards) de diferentes pesos moleculares (102000, 207200, 431800, 655200, 759400, 1360000, 2025000, 2800000, 34500000, 5900000) também foram injetados nas mesmas condições. Os valores das massas moleculares foram obtidos a partir de uma curva de calibração (log Peso Molecular x Tempo de Retenção) dos padrões de dextranas (DRUZIAN, 2000).

2.9.4 Difração de raio-x (DRX)

As análises da polpa de eucalipto e dos hidrolisados de celulose obtidos por hidrólise ácida, enzimática ou enzimática com pré-tratamento ácido depois de liofilizadas submetidas um Difratômetro de raios-X (Modelo XRD- 6000, Marca SHIMADZU), com passo de 2º/min e radiação de cobre λ = 1, 5433 Â, operando com 40 kV e corrente de 30 mA, com varredura entre 8º e 80 º. Com os resultados obtidos no difratômetro foi possível calcular os índices de cristalinidade da polpa de celulose e das nanofibras (Equação 1) de acordo com o método empírico de SEGAL et al., (1959), que fornece um valor aproximado de cristalinidade:

$$Ic - \frac{I(002) - I(am)}{I(002)} \; x \; 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

Ic = Índice de cristalinidade em percentagem

I(002) = máxima intensidade do pico de difração que representa o material cristalino na região de $2\theta = 22^0$

I(am) = mínima intensidade do pico de difração que representa o material amorfo na região de $2\theta = 18^0$.

2.10 Aplicação das nanofibras de polpa de eucalipto como reforço mecânico de Nanobiocompósitos (filmes)

Foram adicionados em um béquer 4 g de fécula de mandioca, 1,4 g de açúcar invertido, 0,7 g de sacarose e suspensão de nanofibras de polpa de eucalipto em água (até o volume final de 100 mL), sendo submetido a aquecimento até 70º C em banho-maria, sob agitação moderada. Os nanobiocompósitos foram preparados com a incorporação das nanofibras obtidas nas diferentes condições (NFC1 a NFC7) nas proporções 0,2 % (m/m), relacionados à massa de nanofibras em relação á massa do polímero e dos plastificantes.

Um filme sem adição de nanofibras que foi usado como referência. A mistura foi mantida em repouso por aproximadamente 2 h para resfriar e retirar as bolhas formadas durante o aquecimento e agitação. Foram pesadas em placas de PE (polietileno) 40 g da suspensão para formação dos filmes. Em seguidas as placas foram levadas à estufa para secagem com circulação de ar (Marca Nova Ética) por aproximadamente 48 h a 40 ºC. Após a retirada da estufa os filmes foram mantidos em dessecador com solução de cloreto de sódio saturada para controle da umidade, por 7 dias antes de serem caracterizados, conforme adaptação da metodologia de SILVA et al., (2011).

2.10.1 Caracterização dos nanobiocompósitos

2.10.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas dos nanobiocompósitos (filmes) foram realizadas em um analisador térmico (Modelo DTG-60, Marca Shimadzu). Nos ensaios foram usadas massas de aproximadamente 8 mg, cadinho de alumínio, atmosfera inerte de nitrogênio de 20 mL min^{-1}, com taxa de aquecimento de 10 ºC min^{-1}, no intervalo de temperatura de 25 a 600 ºC (SILVA et al., 2011).

2.10.1.2 Espessura (E)

A espessura dos nanobiocompósitos (filmes) pré-acondicionados (60% UR, 25°C) foi avaliada através da espessura média, de 3 medições em posições aleatórias, por meio de micrômetro digital Mitutoyo de ponta plana (com resolução de 1μm), em triplicata (SILVA et al., 2011).

2.10.1.3 Ensaio de Tração

Os ensaios de tração dos nanobiocompósitos (filmes) pré-acondicionados (60% UR, 25°C) foram realizados em uma máquina universal de ensaios (Modelo DL2000/700, Marca EMIC), com carga máxima de 20KN, seguindo a norma ASTM D-882, com velocidade de 12,5 mm min^{-1} e temperatura de 25ºC. Foram realizados ensaios de tração em 4 corpos de prova para cada amostra. Os corpos de provas possuíam dimensões de 50 mm de comprimento e 25 mm de largura (SILVA et al., 2011).

3.0 Resultados e discussão

3.1 Determinação qualitativa da atividade enzimática dos fungos filamentosos

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos pelo método "cup plate" onde o diâmetro dos halos formados foi medido para seleção qualitativa do fungo produtor de celulase. Esse método foi utilizado como parâmetro por ser simples e rápido para selecionar micro-organismos produtores de enzimas (TEATHER; WOOD, 1982). Quando ocorre degradação de CMC é possível visualizar a formação de halos translúcidos ao redor dos pontos de aplicação contrastando com a cor vermelha da placa, constatada em 1 linhagem das 3 que foram testadas.

Tabela 6. Atividade celulásica de fungos filamentosos.

Fungos	Média de Diâmetro do halo (cm)
Aspergillus niger	1,6
Aspergillus clavatus	-
Lasidioplidia theobromae	-

(-) = não resultou em produção de halo nas condições testadas.

A formação de halos em meio CMC sólido resulta da quebra do CMC em fragmentos menores que celohexose, à qual o vermelho congo não se liga. A quebra do CMC gera fragmentos pequenos o suficiente para serem lavados para fora da placa de Petri durante o processo. Apenas a atividade de endoglucanases pode ser esperada por produzir zonas de hidrólise (WOOD, 1988).

O vermelho congo mostrou uma forte interação com polissacarídeos β(1,4) ligados em unidades D-glucopiranosil fornecendo a base para um ensaio sensível para detecção de colônias de fungos produtores de celulases (THEATER; WOOD, 1982). Foram estudados poucos fungos filamentosos, pois o objetivo do trabalho era encontrar um fungo produtor de celulase que se adaptasse bem a metodologia empregada e usar o extrato enzimático bruto na hidrólise enzimática, e não fazer seleção de fungos por sua atividade celulásica.

Somente o fungo *A. niger* respondeu bem a essa metodologia apresentando um halo de 1,6 cm (Tabela 6). Embora isso não exclua que os outros fungos testados produzam celulases, pois a visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas do meio de cultura podem interferir no corante proporcionando resultados falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir ligação deste aos polissacarídeos (NEIROTTI; AZEVEDO, 1988).

RUEGGER & TORNISIELO (2004) utilizaram técnica semelhante na seleção de micro-organismos produtores de celulases, detectando um halo de 1,4 cm e relataram que a atividade da celulase depende, não somente da linhagem, mas das técnicas utilizadas. Vários autores descrevem o *A.niger* como um bom produtor dos complexos celulolíticos, algumas vezes superior aos outros fungos, portanto reconhecidamente bom produtor de celulases e potencialmente seguro para ser utilizado em aplicações alimentícias (CASTILLO et al.,1994; KIM et al.,1997; AGUIAR, 2010).

3.2 Produção de extrato enzimático de *Aspergillus niger* via fermentação semi sólida

Para a produção do extrato enzimático foram testados dois substratos, bagaço de cana de açúcar e casca de aipim em diferentes pH, temperaturas e tempos de cultivo (Quadro 1). As concentrações de glicose e proteínas dos extratos enzimáticos foram calculadas através da equação da reta obtida pela curva padrão de glicose ($y= 0,3718x + 0,3741$) e de albumina ($y= 0,0016x + 0,0286$) (Anexo). Pelo teste de tuckey pode-se concluir, no entanto, que para o substrato bagaço de cana-de-açúcar, a variação de 7 e 11 dias e da temperatura de 25°C e 35°C no pH 6,0 não influenciaram significativamente ($p<0,05$) nas concentrações de glicose liberada (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de concentração de glicose, proteínas e atividade específica do extrato enzimática bruto de *Aspergillus niger*.

Ensaio	Conc. Glicose ±dp (mg/mL)	Ativ. Cel ±dp (U/mL)	Conc. Prot ± dp (µg/mL)	Ativ. Espf (U/µg de prot.)
1	1,04± 0,04[a]	1522±0,04[a]	221, 0833± 0,04 [c]	6,8843 [a]
2	1,08 ±0,03 [a]	1566±0,03 [a]	243, 7917± 0,02 [d]	6,4235 [d]
3	1,37± 0,01 [a]	1780± 0,01 [a]	146, 0833± 0,01 [a]	12,1848 [e]
4	-0,23± 0,02 [b]	580± 0,02[b]	205, 0417± 0,02 [e]	2,8287 [b]
5	0,18± 0,07 [a, b]	872± 0,07 [a, b]	229, 0000± 0,01 [f]	3,8079 [c]
6	0,07± 0,03 [b]	808± 0,03 [b]	216, 9167± 0,07 [g]	3,7249 [c]
7	0,06± 0,04 [b]	796± 0,04 [b]	249, 0000± 0,03 [b]	3,1968 [f]
8	0,04± 0,001 [b]	760± 0,001 [b]	145, 6667± 0,01 [a]	5,2174 [g]
9	0,01± 0,04 [b]	748± 0,04 [b]	109, 2083± 0,01 [h]	6,8493 [a]
10	0,32± 0,02 [a, b]	982± 0,02 [a, b]	150, 2500± 0,02 [i]	6,5358 [h]
11	0,27± 0,01 [a, b]	938± 0,01 [a, b]	208, 5833± 0,17 [j]	4,4970 [i]
12	0,56± 0,02 [a, b]	1096± 0,02 [a, b]	440, 0417± 0,05 [l]	2,4907 [j]
13	-0,54± 0,02 [b]	364± 0,02 [b]	126, 9167± 0,01 [m]	2,8680 [b]
14	-0,62± 0,04 [b]	294± 0,04 [b]	286, 5000± 0,01 [n]	1,0262 [l]
15	-0,64± 0,01 [b]	260± 0,01 [b]	280, 0417± 0,06 [o]	0,9284 [m]
16	-0,64± 0,01 [b]	260± 0,01 [b]	489, 2083± 0,01 [p]	0,5315 [n]

*Ensaios de concentração de glicose e proteínas realizadas com desvio pardrão.
* Valores que apresentaram a mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas (p>0,05) pelo Teste de Tuckey a 95% de confiança.

No pH 8,0 os ensaios não diferem significativamente independente das variações de tempo e temperatura, mais diferem dos ensaios realizados em pH 6,0. Sendo assim o pH 8,0 não é indicado para a produção de celulases nas condições realizadas neste experimento. Com relação à produção da enzima, as melhores condições de cultivo foram identificadas no ensaio 3, com o uso do bagaço de cana de açúcar como substrato, a 35°C, com o tempo de cultivo de 7 dias e pH 6,0, e que correspondeu a uma maior atividade em açúcares redutores (1,37mg de glicose/mL, Tabela 7). Esse valor equivale a uma atividade de 0,24 U/mL (Equação 2) para 14 g de bagaço de cana.

Para o substrato casca de aipim nenhum dos ensaios apresentou diferença significativa, logo as variações de tempo, temperatura e pH não exercem influências relevantes na atividade da enzima produzida para este substrato.

A obtenção da concentração de proteínas dos ensaios possibilitou a obtenção da atividade específica da enzima. Os valores de concentração de proteínas variaram de 109, 21 a 489, 21 µg/mL e a atividade especifica de 0, 53 a 12, 18 U/µg de proteínas. Pode-se notar (Tabela 7) que quando se tem um alto teor de proteínas, a atividade específica diminui. Isso significa que nas condições testadas, o microrganismo *Aspergillus niger* produz outras proteínas além da enzima de interesse (celulase) o que pode acarretar uma menor degradação da celulose.

Para efeito de comparação, AGUIAR & MENEZES (2000) relata para produção de celulases de *Aspergillus niger* com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% como fonte de carbono, valores de atividade enzimática de aproximadamente 0,25 U/mL para 10g/L de bagaço de cana. AGUIAR et al., (2010) utilizando as mesmas condições citadas obtiveram uma atividade de 0,21 U/mL.

Os resultados de atividade enzimática apresentaram-se menores que os encontrados por AGUIAR & MENEZES (2000) e maiores que os encontrados por AGUIAR et al., (2010) embora tenham sido utilizado 14 g/L de bagaço de cana. Maiores quantidades de celulose presentes no meio acarretam uma elevação dos níveis de endoglucanases (OLSSON et al., 2003), as quais, de acordo com PEIXOTO (2006), são responsáveis pela liberação de glicose, celobiose e celodextrinas direto da cadeia de celulose. Maior atividade enzimática não foi encontrada provavelmente devido à falta de pré-tratamento dos resíduos agrícolas utilizados. O pré-tratamento favorece o ataque dos fungos as fibras vegetais, devido aumento da área superficial dos substratos favorecendo o ataque das enzimas ás moléculas de celulose. Durante a ação das enzimas, são formados produtos intermediários (oligossacarídeos e celobiose), sendo o produto final da hidrólise, a glicose (ZHANG; LYND, 2004).

Entretanto deve-se considerar a dificuldade de traçar um perfil comparativo entre os experimentos já que os diversos autores seguem metodologias, número de esporos e meios de cultivos diferentes, o que influencia nos resultados encontrados. Entretanto, muitos autores têm considerado a cana-de-açúcar como melhor fonte de carbono para produção de celulases, fato também constatado neste experimento (AGUIAR; MENEZES, 2000; OJUMU et al., 2003; AKHTAR, 2001; AGUIAR, 2010).

3.3 Influência do pH e da temperatura na ação da enzima no ensaio selecionado

As celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* apresentaram um pH ótimo no valor de 5,0 quando submetida a temperatura de 30°C (Figura 2). SINGH (2009), em estudo de otimização das condições de sacarificação de palha de trigo com celulases produzidas por *Aspergillus heteromorphus*, também obteve maiores resultados de ART a pH 5,0. CHEN et al., (2007) trabalhou com condições de pH 4,8 na hidrólise enzimática de sabugo de milho, obtendo 79% de rendimento. Valores de pH similares com relação ao parâmetro temperatura são citados (AGUIAR et al., 2008; AGUIAR, 2010) comprovando que a enzima celulase atua melhor quando pH está na faixa da neutralidade.

Variações no pH do meio resultam em mudanças na forma iônica do sitio ativo e mudanças na atividade das enzimas e, portanto, na taxa da reação hidrolítica. Mudanças no pH podem também alterar a forma tridimensional da enzima. Por essas razões, enzimas são somente ativas em certa faixa de pH. Em alguns casos o substrato pode conter grupos iônicos e o pH do meio pode afetar a afinidade da enzima pelo substrato. Determinações teóricas do pH ótimo de enzimas são extremamente difíceis. O pH ótimo para uma enzima é geralmente determinado experimentalmente (SHULER, 1992).

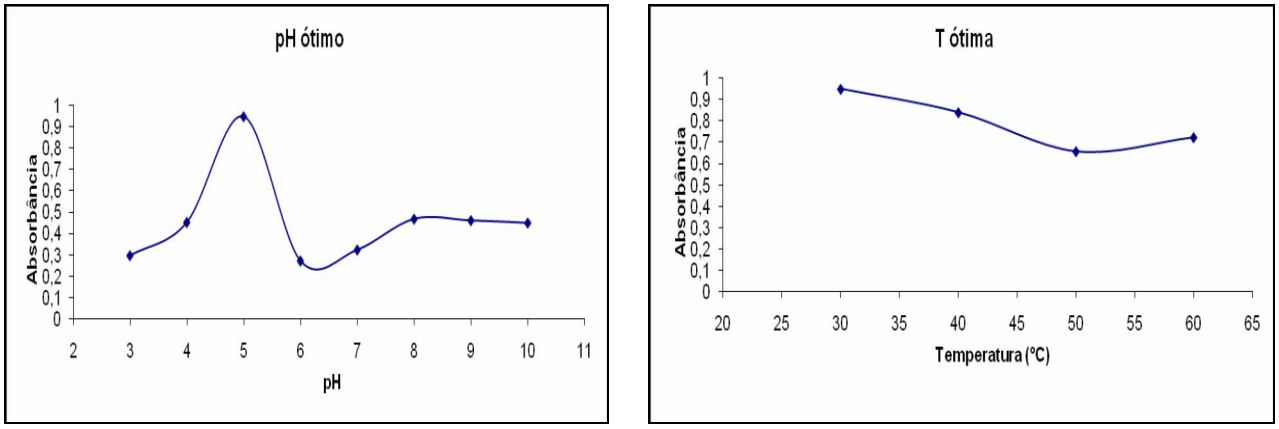


Figura 2. Efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima celulase produzida por *Aspergillus niger*.

O efeito da temperatura de uma enzima depende de um número de fatores que incluem o pH, a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos frequentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor. No processo de desnaturação térmica ocorre a perda da atividade biológica da enzima. Toda enzima tem uma temperatura ótima para que atinja sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura

máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo, (Figura 3) (FURIGO Jr., 2001).

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais, porém, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente: (a) a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas; e (b) a estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica (FURIGO Jr., 2001). O aumento da atividade é chamado de *ativação* pela temperatura e a redução é chamada de *inativação* pela temperatura ou *desnaturação térmica* (SHULER, 1992). Portanto, espera-se que na temperatura testada à enzima produza a hidrólise das fibras vegetais sem ser desnaturada.

KRISHNA (1997), em estudos de produção e aplicação de celulases de *T. reesei* QM-9414, realizou sacarificação de resíduos lignocelulósicos e a temperatura ideal para a condução da hidrólise enzimática foi 50°C. AGUIAR (2010) utilizando o *Aspergillus niger* para produção de celulases em diferentes resíduos agroindustriais observou que a atividade enzimática aumentava gradativamente até a temperatura de 50°C, caindo drasticamente, nas temperaturas de 60 a 80ºC. O aumento da atividade enzimática se deve à ativação pela temperatura (SHULER, 1992), na qual os átomos adquirem muita energia e grande tendência a se moverem. Após este período ocorre a desnaturação ou desativação térmica causada pelo rompimento das fracas interações que mantêm unida a estrutura globular da proteína (BAILEY; OLLIS, 1986). Portanto a temperatura ideal de trabalho do complexo celulásico é de 30ºC, nas condições aqui estudadas.

3.4 Produção das nanofibras de polpa de eucalipto obtidas por hidrólise ácida e enzimática

A suspensão de nanofibras obtida por hidrólise enzimática não apresentou boa estabilidade, ou seja, decantou e apresentou precipitado (Figura 3). Esses precipitados provavelmente devem corresponder às micropartículas da polpa de eucalipto que não foram hidrolisadas totalmente.

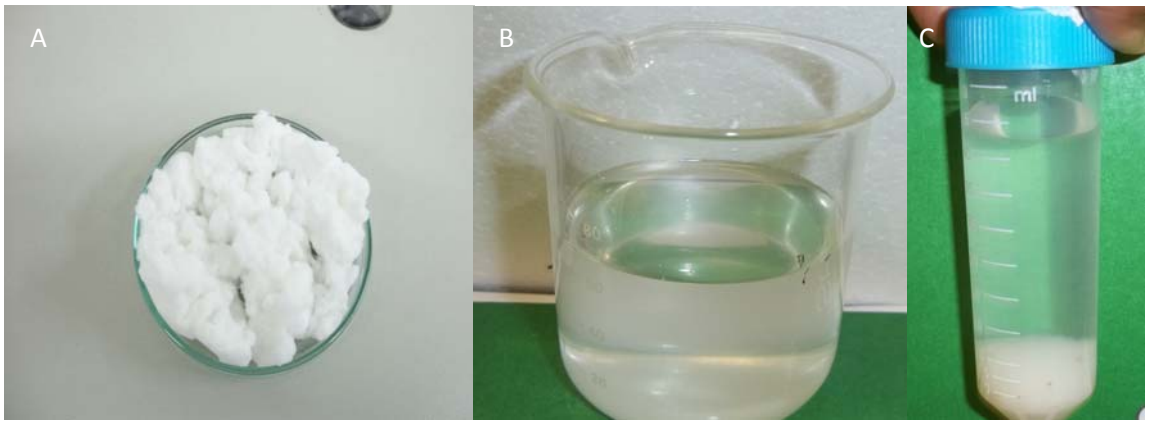


Figura 3. Preparo de nanofibras; (A) Polpa de eucalipto; (B) solução de nanofibras com boa dispersão e (C) solução de nanofibras com micropartículas precipitadas.

No quadro 2 pode-se observar a produção das nanofibras de polpa de eucalipto em diferentes condições de hidrólise.

Quadro 2. Produção das nanofibras de polpa de eucalipto submetidas a diferentes condições de hidrólise.

Hidrólise	**Código**	**Peso da polpa (g)**	**Condição**		**Tempo (min)**		**Prod (g)**	**Prod (%)**
			Ác (%)	**Enz (mL)**	**Ác**	**enz**		
Ácida (controle)	NFCc	1	64	---	10-15	---	0,05	5,4
Enzimática	NFC1	0,5	---	10	---	90	0,04	8
Enzimática	NFC2	0,5	---	90	---	120	0,06	12
Enzimática	NFC3	0,5	---	90	---	240	0,07	14
Enz/ácida	NFC4	0,5	0,5	40	15	30	0,05	10
Enz/ácida	NFC5	0,5	0,5	40	30	30	0,06	12
Enz/ácida	NFC6	0,5	1	40	15	30	0,04	8
Enz/ácida	NFC7	0,5	1	40	30	30	0,02	4

Pode-se notar que todos os ensaios, exceto NFC7, mostraram produções superiores ao controle, sendo as melhores as NFC3 (14%), NFC2 e NFC5 (12%) e NFC4

(10%). Entretanto deve-se salientar que juntamente com as nanofibras podem estar partículas não hidrolisadas e que contribuíram para a produção encontrada.

FILHO et al., 2009 em estudos sobre a preparação de nanofibras de celulose a partir de polpa de eucalipto e sisal utilizando hidrólise com ácido concentrado (1 g de polpa em 8,75 mL de ácido sulfúrico 64%, 45 °C por 1 hora) obteve para polpa de eucalipto um teor de material sólido em suspensão de 0,1% em massa e para o sisal 0,6%. Valores superiores ao relatado foram encontrados nas condições estudadas.

3.5 Caracterização das nanofibras de celulose

3.5.1 Teste de birrefringência

As soluções de nanofibras obtidas por ação das enzimas celulases extraídas de *Aspergillus niger* com e sem pré-tratamento por hidrólise ácida diluída não apresentaram uma fase nemática, que resulta em birrefringência da luz, normalmente considerada uma indicação de presença de nanofibras na suspensão (fase líquido-cristalina), (Figura 4, Tabela 8).

As suspensões de nanofibras apresentam tendência em se alinharem devido a sua alta rigidez e elevada relação comprimento/diâmetro. Essa tendência causa a birrefringência da dispersão e pode ser visualizada diretamente através de polarizadores (SOUZA-LIMA; BORSALI, 2004; VAN-DEN-BERG et al., 2007).

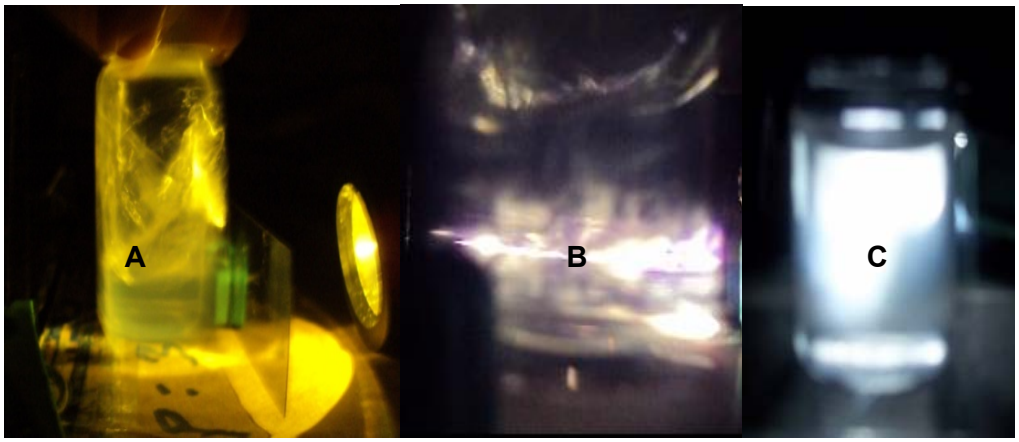


Figura 4. Ilustração (A) teste de birrefringência utilizando filmes polaróides; (B) fotografia ampliada de nanofibras obtidas por hidrólise ácida; (C) solução de nanofibras obtidas por hidrólise enzimática sem birrefringência.

Tabela 8. Birrefringência das nanofibras obtidas nas condições de hidrólises testadas.

Hidrólise	Birrefringência
Ácida (H_2SO_4, 64%)	+
Enzimática (NFC1 a NFC3)	-
Enzimática com pré-tratamento ácido (NFC4 a NFc7)	-

É extremamente importante avaliar se as nanofibras de celulose possuem uma boa dispersão em suspensão, já que este é um pré-requisito necessário para alcançar resultados desejáveis quando incorporados a matrizes poliméricas com o objetivo de reforço mecânico (MACHADO, 2011).

O fato dos hidrolisados enzimáticos não apresentarem birrefringência não exclui a hipótese de ter-se obtido nanofibras de celulose, uma vez que existem relatos de nanofibras produzidos por hidrólise com HCl não apresentaram este comportamento (WOEHL, 2009). Outra hipótese que também não se pode descartar é a possibilidade de obtenção de microfibras.

3.5.2 Estudo de espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia FT-IR é uma técnica muito utilizada para caracterização de celulose. Podem-se observar na Figura 5 os espectros da polpa de eucalipto comercial e das nanofibras usadas como controle, na Figura 6 os espectros das nanofibras utilizada como controle (nanofibras obtidas por hidrólise com ácido, 64%).

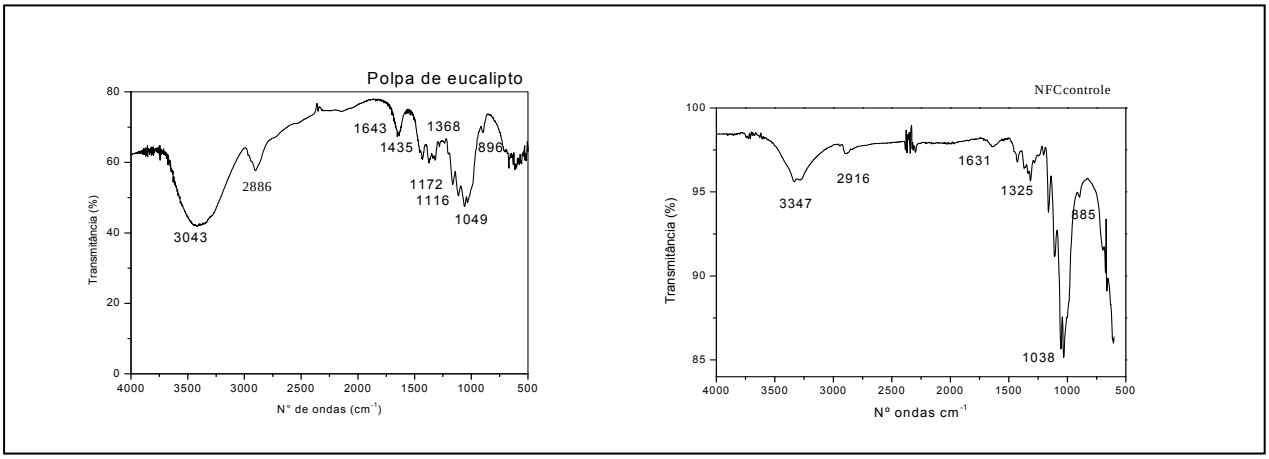


Figura 5. Espectros de FT-IR da polpa de eucalipto e do controle (hidrólise ácida).

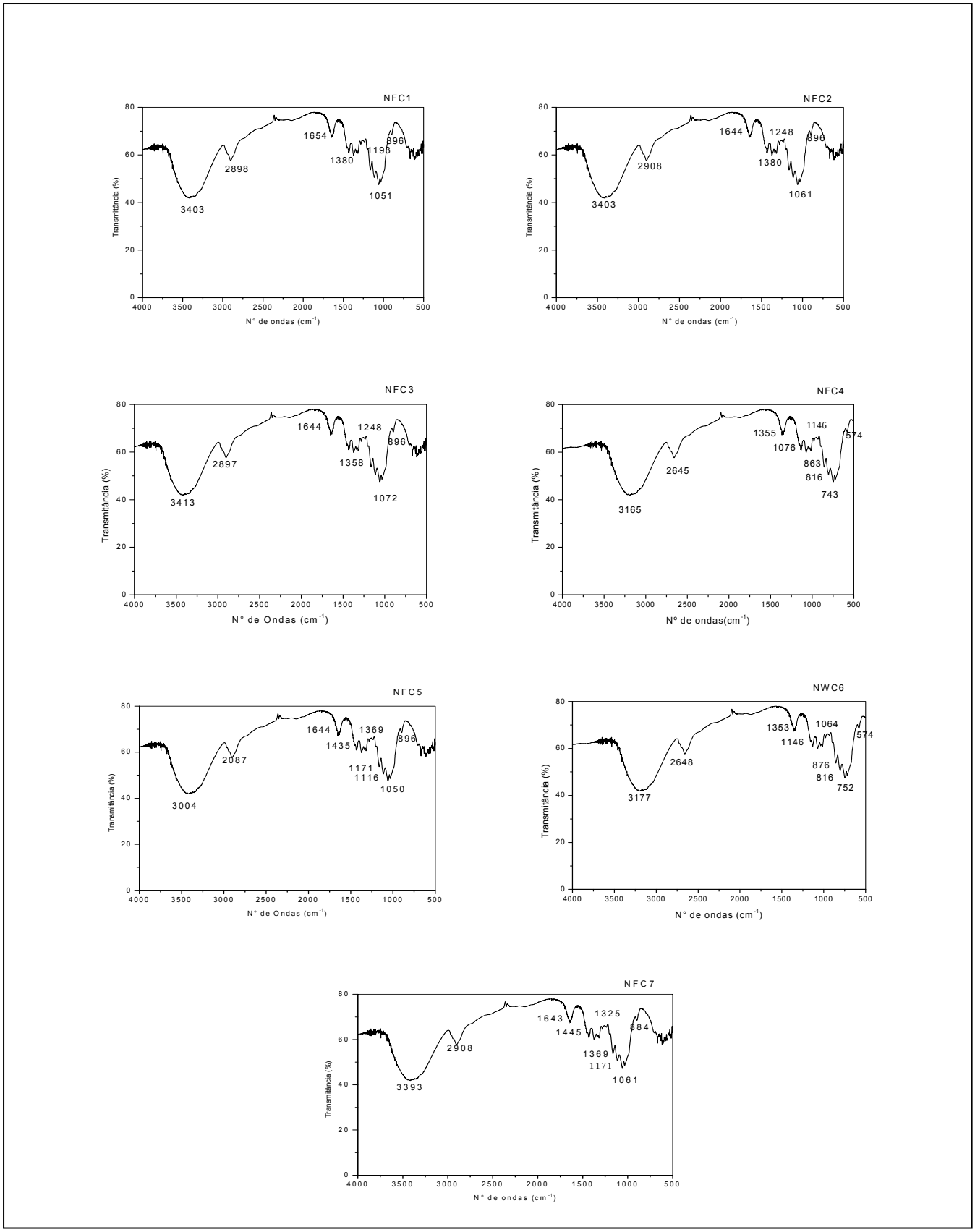


Figura 6. Espectros de FT-IR das nanofibras de polpa de eucalipto produzidos em diferentes condições de hidrólise enzimática (NFC1 a NFC3), enzimática com pré-hidrólise ácida (NFC4 a NFC7).

As análises de polpa de celulose tratada com hidróxido de sódio e dióxido de carbono, realizadas por YOUN OH et al., (2005), permitiram caracterizar as principais modificações através de observações dos espectros no infravermelho. CAZAL (2006) utilizou essa técnica para identificar e quantificar grupos carboxílicos e carbonílicos em polpa de celulose Kraft branqueada. Outros estudiosos a utilizaram para caracterização de celulose oxidada (PRINCI et al., 2006; AIMIN et al., 2005; LOJEWSKA et al., 2005).

Existem bandas características do material celulósico como estiramento de ligação OH na região entre 3300-3700 cm^{-1}, estiramento assimétrico da ligação CH na região de 2900 cm^{-1}, deformação angular da ligação CH de 1290 a 1350 cm^{-1} e estiramento da ligação CO na região de 950 a 1200 cm^{-1} e as ligações COC, CCO e CCH em 900 cm^{-1}. Essas ligações são especialmente importantes para a caracterização das regiões amorfas e cristalinas da celulose, pois praticamente todas as modificações na estrutura da celulose são expressas no valor de absorbância de cada pico (SILVA et al., 2011; YOUN OH et al., 2005). Podem ser encontradas ainda: as bandas 896 cm^{-1}, característica de regiões amorfa da celulose (CAO; TAN, 2006), resultantes da vibração de estiramento no plano do anel sacarídeo e deformação em CH (COSTA JR; MANSUR, 2008).

Pode-se observar que todos os espectros apresentam as mesmas bandas de absorção que a polpa de celulose, embora estas estejam em intensidades diferentes. No espectro produzido pelo controle (Figura 5, NFC controle) foi possível observar as bandas de absorção das ligações de OH (3347 cm^{-1}), estiramento assimétrico da ligação CH na região de 2916 cm^{-1}, deformação angular da ligação CH na região de 1325 cm^{-1}, o estiramento da ligação CO na região de 1038 cm^{-1} e pequenas bandas referentes à hemicelulose e a região amorfa da celulose em 1248 cm^{-1} e 885 cm^{-1}, respectivamente.

Os espectros produzidos por hidrólise enzimática (Figura 6 NFC1 a NFC3) apresentam comportamento semelhante entre si e em relação ao controle há um deslocamento das bandas para comprimentos de ondas maiores ou menores. As bandas de absorção das ligações de OH estão em 3403 e 3413 cm^{-1}, estiramento assimétrico da ligação CH na região de 2898 e 2908 cm^{-1}, deformação angular da ligação CH na região em 1193 cm^{-1}, o estiramento da ligação CO na região entre 1051 a 1072 cm^{-1} e as bandas em 896 cm^{-1} característica da presença de material amorfo da celulose.

Foi observado também nestes espectros a presença de uma pequena banda em 1248 cm^{-1}, essa banda é característica de hemiceluloses referente a grupos acetil o que indica a presença de material ainda não hidrolisado. Essa banda tende a decrescer em

função dos pré-tratamentos a que a polpa de eucalipto é submetida degradando a hemicelulose e facilitando a liberação da lignina (LORENTZ, 2005).

Os espectros produzidos por hidrólise enzimática usando pré-tratamento com ácido diluído (Figura 6, NFC4 a NFC7) apresentaram algumas pequenas variações no comprimento de onda onde as bandas aparecem. As bandas de absorção das ligações de OH estão entre 3004 e 3393 cm^{-1}, estiramento assimétrico da ligação CH na região de 2908- 2087 cm^{-1}, deformação angular da ligação CH na região em 2087-2908 cm^{-1}, o estiramento da ligação CO aparece na região em 1076 e 1061 cm^{-1} (Figura 6, NFC5 e NFC7) e há um deslocamento para menores comprimentos de onda de 743 e 752 cm^{-1} (Figura 6, NFC4 e NFC6).

A banda característica da presença de material amorfo da celulose aparece em NFC5 e NFC7 nas regiões em 896 cm^{-1} e uma pequena banda referente à hemicelulose aparece em NFC5 e NFC7 em 1248 cm^{-1}. Independente da concentração do ácido usado (0,5% ou 1,0%) as bandas com o tempo de pré-tratamento de 15 minutos apresentaram-se em regiões próximas, entretanto as bandas com pré-tratamento de 30 minutos apresentaram maiores deslocamentos nos comprimentos de ondas indicando que o fator tempo exerceu mais influência nos comprimentos de onda de aparecimento das bandas do que a concentração de ácido já que a concentração da polpa utilizada foi à mesma.

3.5.3. Massa Molecular dos hidrolisados de celulose de eucalipto

Os cromatogramas GPC CLAE-IR obtidos pela injeção dos padrões de dextranas estão demonstrados na Figura 7.

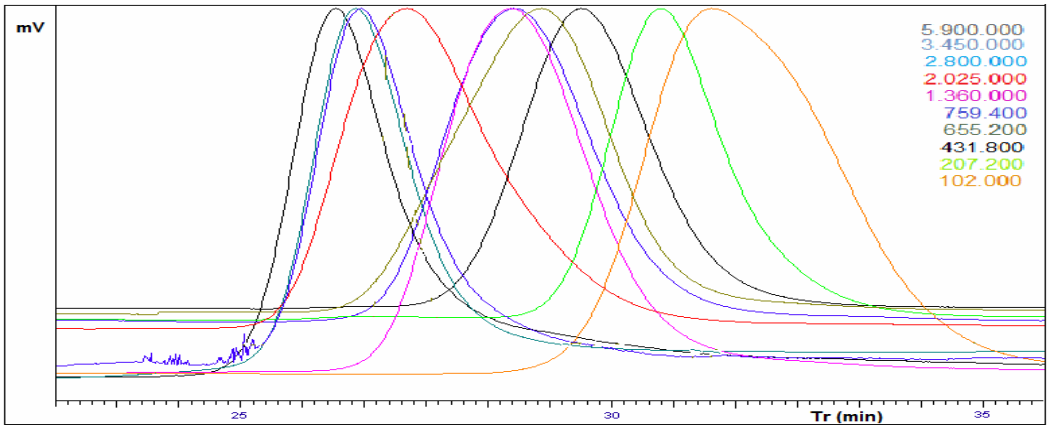


Figura 7: Cromatograma CLAE GPC-IR do perfil de eluição de padrões de dextranas com diferentes pesos moleculares em GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 em série.

A curva de calibração de padrões de dextranas construída pelo log_{PM} versus o t_R (Tabela 9) obtidos por GPC CLAE-IR resultou na equação da reta (y = -0,301x + 14,56; R^2 = 0,9700) (Anexo).

Tabela 9: Tempos de retenção (t_R) dos padrões de dextranas com diferentes pesos moleculares obtidos por GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 em série.

Massas Moleculares Dextranas	t_R (min)
102.000	31,56
207.200	30,83
431.800	29,75
655.200	29,2
759.400	28,83
1.360.000	27,29
2.025.000	27,22
2.800.000	26,91
3.450.000	26,68
5.900.000	26,43

As soluções resultantes da hidrólise enzimática usando somente enzimas celulases de *Aspergillus niger* (NFC1 a NFC3), enzimática com pré-tratamento com ácido diluído de 0,5 a 1,0% (NFC4 a NFC7) e hidrólise ácida (H_2SO_4 64%, controle) da polpa de celulose de eucalipto, foram separadas no sistema GPC CLAE-IR, nas mesmas condições cromatográficas dos padrões (Figuras 8, 9 e anexo 1).

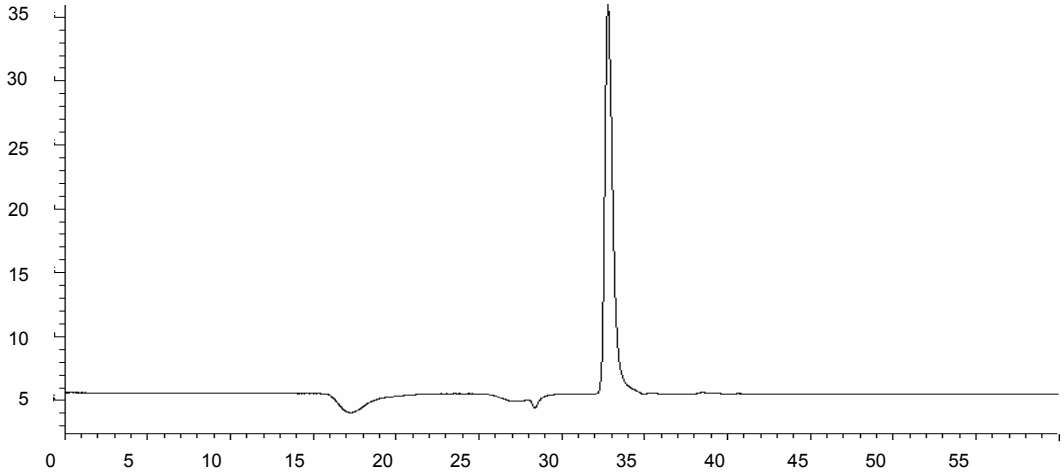


Figura 8. Cromatograma GPC CLAE-IR do perfil de eluição do NFC (hidrólise ácida).

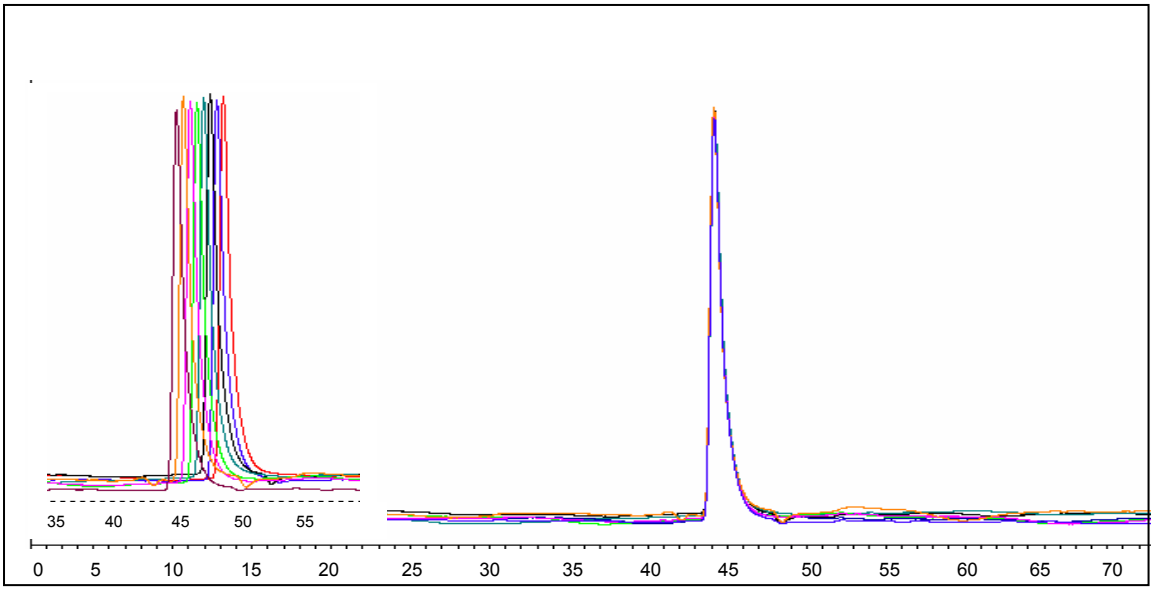


Figura 9. Cromatograma GPC CLAE-IR do perfil de eluição dos hidrolisados celulósicos de polpa de eucalipto obtidos em diferentes condições com extrato bruto da enzima fúngica (NFC1 a NFC3) e enzimática com pré-tratamento ácida (NFC4 a NFC7).

As massas moleculares e limites de distribuição das massas moleculares dos hidrolisados celulósicos de polpa de eucalipto obtidos em diferentes condições, constam no quadro 3.

Quadro 3. Massas moleculares (MM) e limites de distribuição das massas moleculares (LDMM) dos hidrolisados celulósicos de polpa de eucalipto obtidos em diferentes condições.

Hidrólise	Condição		Tr Médio (min.)	MM médio (Da)	Tr (min.)		LDMM (Da)	
	Acido	Enzimática[2]			mínimo	máximo	mínimo	máximo
NFC[1] Controle	H_2SO_4 64%/17min	-	32,80	48.663,12 <100.000	32,24	34,89	71.739,77 <100.000	11.431,67 <100.000
NFC1	-	10% Enz/90 min	43,19	<< 100.000	47,17	42,56	<< 100.000	<< 100.000
NFC2	-	90% Enz/120 min	43,19	<< 100.000	45,93	42,45	<< 100.000	<< 100.000
NFC3	-	90%Enz/240 min	43,20	<< 100.000	46,14	42,56	<< 100.000	<< 100.000
NFC4	0,5% ác/15 min	40% Enz/30 min	43,18	<< 100.000	45,93	42,46	<< 100.000	<< 100.000
NFC5	0,5% ác/30 min	40% Enz/30 min	43,18	<< 100.000	45,93	42,56	<< 100.000	<< 100.000
NFC6	1,0% ác/15 min	40% Enz/30 min	43,19	<< 100.000	46,04	42,56	<< 100.000	<< 100.000
NFC7	1,0% ác./30 min	40% Enz/30 min	43,20	<< 100.000	45,93	42,56	<< 100.000	<< 100.000

[1]Hidrólise convencional da polpa de celulose de eucalipto realizada com H_2SO_4 concentrado.
[2]Hidrólise da polpa de celulose de eucalipto realizada com celulases fúngicas (NFC1 a NFC3) e enzimática com pré-tratamento ácido (NFC4 a NFC7).

O limite de exclusão é a massa molar da menor molécula, que é incapaz de penetrar quaisquer dos poros da matriz que compõe a fase estacionária (COLLINS, 2006). Considerando que as colunas SB 803, 804, 805 e 806 apresentam limites de exclusão estimados em 100.000, 1.000.000, 4.000.000 e 20.000.000 Da, respectivamente (SHODEX, 2010), pode-se constatar que as massas moleculares e a distribuição de massas moleculares dos hidrolisados são menores do que 100.000 Da, independente da condição da hidrólise, enzimática (NFC1 a NFC3) ou ácida/enzimática (NFC4 a NFC7).

Entretanto, em função dos tempos de retenção médios das nanofibras obtidas com ácido concentrado (32,80 min) ter sido menor do que os obtidos para as nanofibras resultantes da hidrolise enzimática (43,16 a 43,20), (Quadro 3), pode-se estimar que a primeira nanofibra apresenta maior massa molecular quando comparada as segundas. Mesma suposição pode ser realizada para as distribuições de massas moleculares das nanofibras obtidas por hidrólise ácida comparada às enzimáticas. Para confirmar estas suposições análises de microscopia MET seriam necessárias, visando determinar o tamanho e diâmetro médio dos nanocristais. A massa molecular da celulose varia muito (50.000 a 2.500.000) dependendo da origem da celulose (BARUD, 2006). Os tipos de tratamento a que as fibras são submetidas associadas aos processos de hidrólise causam uma diminuição da massa molecular das fibras.

DE PAULA et al., (2010) analisando o efeito da hidrólise ácida em fibras de sisal para obtenção de nanofibras observou uma diminuição da massa molecular da celulose nativa (115000 $gmol^{-1}$) depois de ser submetida a um processo de marceirização (98200 $gmol^{-1}$). Os resultados obtidos mostraram que o processo de mercerizacao levou a uma degradação das cadeias celulósicas. Isso significa que pode ter ocorrido quebra de ligacões glicosídicas das cadeias, levando a uma diminuicao das massas molares médias das moléculas de celuloses. Outro fato que pode estar relacionado com a diminuicao de massa molecular corresponde à presença de hemiceluloses no sisal, que em parte é eliminada durante o tratamento alcalino. Outros pesquisadores concordam que a hidrólise acarreta uma diminuição da massa molecular das fibras, sendo este parâmetro utilizado como indicativo do grau de eficiência da hidrólise, embora a literatura não expresse em termos numéricos (KLUNGNESS; CAULFIELD, 1982; ERHARDT, 1990).

3.6 Difração de raio X (DRX)

Os difratogramas da polpa de celulose de eucalipto e das nanofibras produzidas por hidrólise com ácido concentrado (controle), enzimática (NFC1 a NFC3) e enzimática com pré-tratamento ácido diluído (NFC4 a NFC7) estão representadas na Figura 10.

O índice de cristalinidade (Ic) das amostras foi calculado pela integração das áreas amorfas e cristalinas de cada amostra, utilizando a equação de Buschle-Diller e Zeronian [2], e apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Índice de cristalinidade (Ic) da polpa de eucalipto e nanofibras produzidas na por hidrólise ácida (controle) e enzimática com e sem pré-tratamento.

Amostras	Hidrólise		Ic (%)
	Acida	Enzimática[1]	
Polpa de eucalipto	-	-	60,00
NFC Controle	H_2SO_4 64%/17min	-	70,00
NFC1	-	10% Enz/90 min	63,95
NFC2	-	90% Enz/120 min	75,58
NFC3	-	90% Enz/240 min	54,12
NFC4	0,5% ác/15 min	40% Enz/30 min	54,60
NFC5	0,5% ác/30 min	40% Enz/30 min	61,93
NFC6	1,0% ác/15 min	40% Enz/30 min	60,60
NFC7	1,0% ác./30 min	40% Enz/30 min	45,48

[1]Concentração da enzima em percentual e tempo da hidrólise a 30°C a 180 rpm.

Todos os difratogramas apresentaram principais reflexões em torno de 2θ = 22º, 16º e 34º relativas á estrutura da celulose (GUIMARÃES et al., 2010). O pico em torno de 2θ = 22º é associada a regiao cristalina da celulose, e o pico em trono 2θ = 18º refere-se a região amorfa (CHEN et al., 2009). De acordo com SPINACÉ et al., (2009) e GUIMARÃES et al., (2010) o pico em 2θ = 16° corresponde ao plano cristalográfico (101) e os picos em 2θ = 22° e 34° correspondem aos planos (002) e (023) ou (004), respectivamente. O plano cristalográfico (002) corresponde à celulose nativa, denominada celulose I (TROEDEC et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2009). De PAULA et al., (2009) citam que difratogramas da forma polimórfica da celulose I apresentam difrações em torno de

2θ: 23° (plano 002), 20° (plano 021) e 15° (plano 101) e da celulose II apresentam difrações em torno de 2θ=20° (plano 101) e 2θ= 12° (plano 101), mas também em 2θ= 22° e 15°, o que indica que a conversão de celulose I para II não foi total.

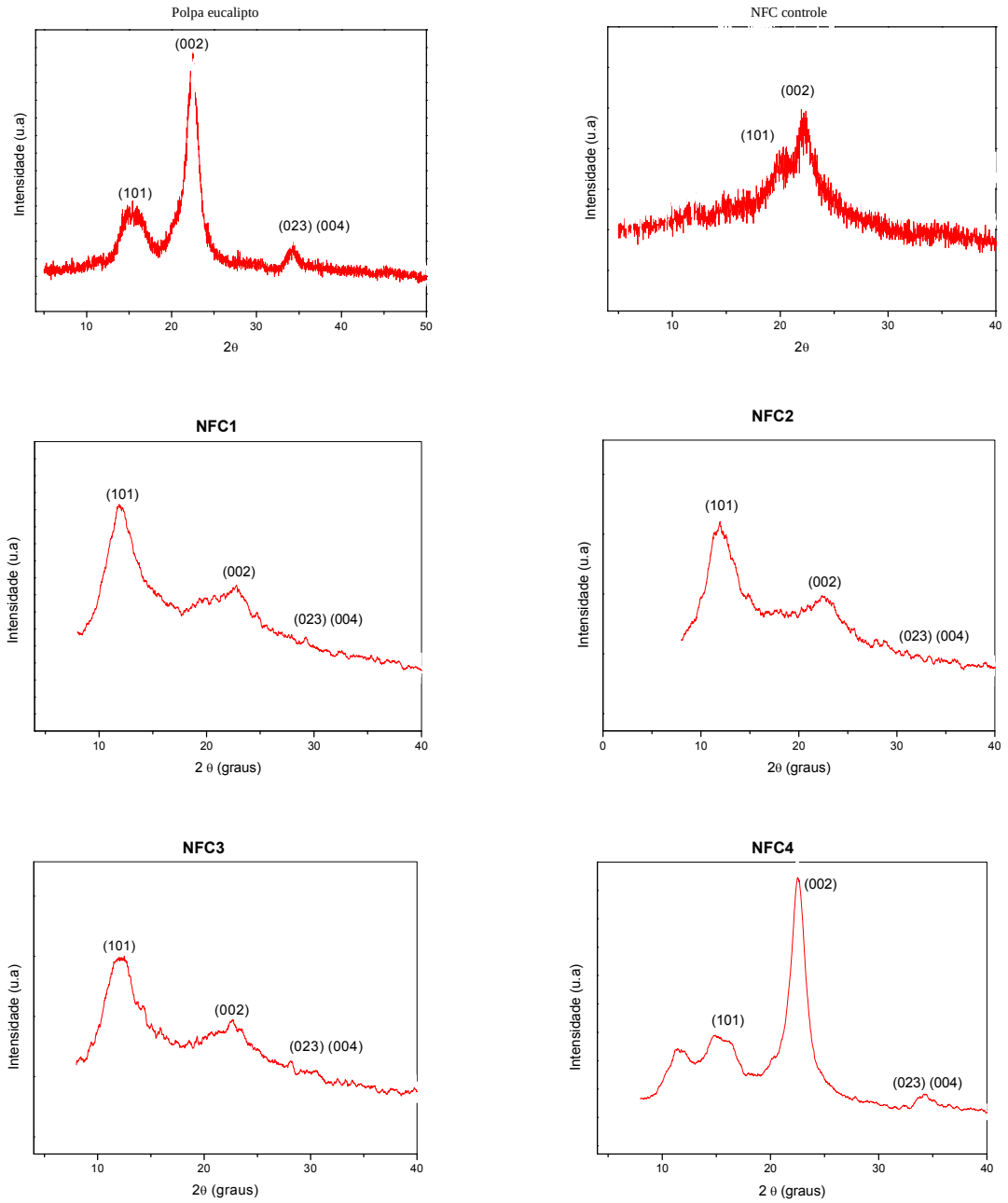
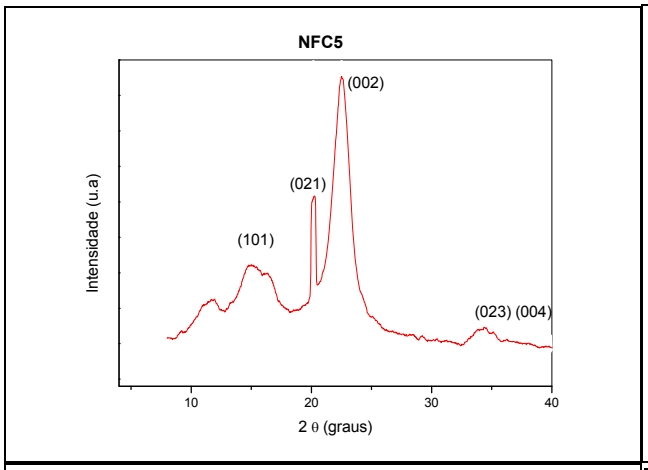
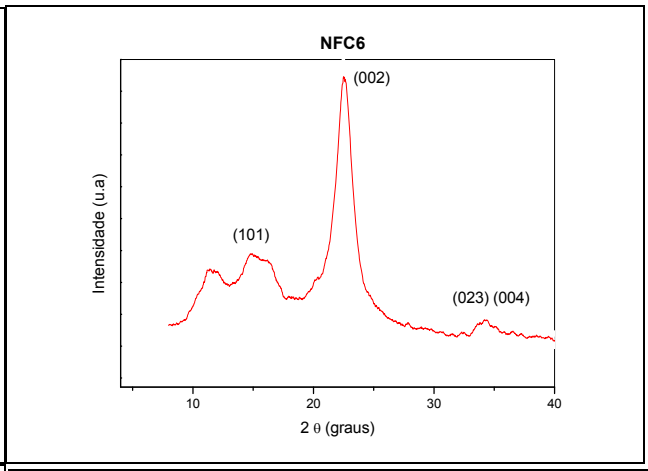
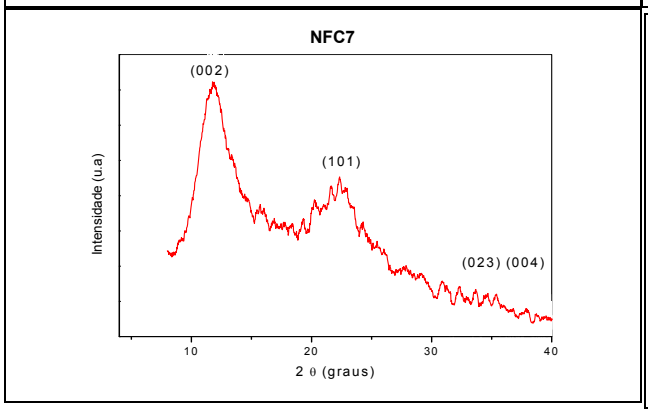


Figura 10. Difratogramas de Raios-X da polpa e nanofibras de polpa de eucalipto e nanofibras obtidas por hidrólise ácida (controle), enzimática (NFC1 a NFC3) e enzimática com pré-tratamento ácida (NFC4 a NFC7).







Continuação da Figura 10. Difratogramas de Raios-x da polpa e nanofibras de polpa de eucalipto e nanofibras obtidas por hidrólise ácida (controle), enzimática (NFC1 a NFC3) e enzimática com pré-tratamento ácida (NFC4 a NFC7).

O Ic da polpa de celulose de eucalipto foi de 60,0 (Figura 10, Tabela 10). O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua origem e processamento. A celulose de algodão possui cadeias ordenadas, apresentando cristalinidade de aproximadamente 70%, enquanto a celulose de árvores apresenta índice de cristalinidade entre 40 a 63 % (ARAÚJO et al., 2008). Sob condições controladas, a hidrólise consiste na destruição das regiões amorfas ao redor e entre as microfibrilas, enquanto os segmentos cristalinos continuam intactos, pois a cinética da hidrólise da região amorfa é mais rápida do que da região cristalina, em virtude da sua maior permeabilidade (SAMIR et al., 2005).

No difratograma obtido da amostra resultante da hidrólise com ácido concentrado (NFC controle) observa-se 2θ = 22,3º e 2θ = 18º, com Ic maior (Ic=70,0) do que o da polpa de celulose (Ic=60), indicando uma remoção parcial das regiões amorfas devido a hidrólise ácida da polpa e a formação de nanofibras, confirmadas pela análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 11), que revelou comprimento de 145 ± 25 nm e diâmetro de 6 ± 1,5 nm, portanto com razão L/D de aproximadamente 24

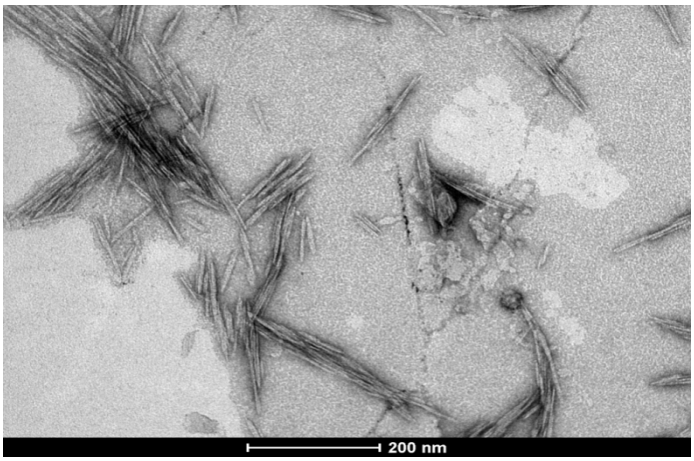


Figura 11. Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanofibras resultante da hidrólise com ácido concentrado (controle).

Nos difratogramas referentes à polpa de celulose submetida à hidrólise enzimática (NFC1, NFC2, e NFC3) notam-se diferenças dos obtidos para a polpa de celulose e NFC, com ICs variando de 54,12 a 75,58 (Figura 10, Tabela 10), portanto valores de Ic maiores para NFC2 e NFC1 quando comparado ao controle, e menor para a NFC3. A condição de 90% de enzima extraída de *Aspergilus niger* agindo por 120 minutos sobre a polpa de celulose de eucalipto a 30°C, pH 5,0 e 180 rpm resultou em nanofibras e/ou microfibras com maior Ic do que os das nanofibras resultantes da hidrólise com ácido concentrado.

A combinação do pré-tratamento ácido diluído seguido de hidrólise ácida enzimática resultou numa diminuição do Ic em relação à da polpa de celulose, indicando que o pré-tratamento da celulose com ácido pode resultar em adsorção da base conjugada sobre a superfície da fibra, ou seja, as fibras de celulose podem carregar grupos sulfatos adsorvidos a superfície, impedindo a ação da enzima devido à repulsão eletrostática ou encaixe no sitio ativo, sendo este efeito proporcional a concentração do ácido e tempo de hidrólise (BOMMARIUS et al., 2008). O pré-tratamento com hidrólise ácida pode ter também alterado a estrutura altamente ordenada da celulose, resultando numa redução no Ic, ou seja, perda da cristalinidade, devido à mudança da forma cristalina, de celulose I para celulose II, sem causar hidrólises acentuadas das cadeias.

A análise dos resultados apresentados nos difratogramas de raios X (Figura 10, Tabela 10) indicou que o tratamento enzimático por um tempo intermediário foi adequado para a remoção de parte do material amorfo constituinte da fibra da polpa de eucalipto. ROSA et al., (2009) relatam valores de 38,9% e 65,9% para a cristalinidade da fibra de

coco e nanofibras, respectivamente. CHERIAN et al., (2008) relatam valores de cristalinidade para nanofibras de fibras de banana tratadas com explosão a vapor (35,97%) e tratadas com explosão a vapor e 9% de ácido oxálico (72,58%). Entretanto, o processo utilizado nesse estudo além de ser menos poluente apresentou resultados superiores aos relatados.

WOEHL (2009) ao estudar a preparação de nanofibras de celulose bacteriana utilizando desagragação mecânica e celulases comerciais não observou aumento da cristalinidade das nanofibras em relação ao controle (celulose bacteriana não tratada com celulases). O controle apresentou 76,20% de cristalinidade e o melhor resultado foi obtido com o tratamento por 30 minutos com uma cristalinidade de 77,1%. Nenhum dos tratamentos utilizados contribui para uma melhoria significativa na cristalinidade, no entanto, as nanofibras obtidas foram efcazes em melhorar as propriedades mecânicas dos nanocompósitos, o que indica que elas apresentaram boa dispersão na matriz (amido) em que foram incorporadas.

Pode ser constatado que a hidrólise enzimática usando ou não pré- tratamentos químicos empregados na polpa de eucalipto afetaram o grau de cristalinidade da celulose e das nanofibras de celulose. Embora esse aumento não tenha sido equivalente para os dois processos empregados, sendo que os maiores percentuais de aumentos da cristalinidade foram obtidos com o uso de enzima. De maneira geral, existem vários fatores que podem influenciar a conversão da hidrólise enzimática da celulose, tais como área superficial, porosidade, cristalinidade, grau de polimerização e adsorção, tanto da enzima quanto do substrato (BOMMARIUS et al., 2008).

Apesar da hidrólise com ácido concentrado ocorrer em 17 minutos, e a hidrólise enzimática demora de 90 a 120 minutos, quando se faz hidrólise química, os efluentes gerados são mais tóxicos, gerando lignina sulfurosa, corrosão de equipamentos, afetando toda a cadeia de produção. Portanto, a hidrólise enzimática representa uma alternativa tecnológica limpa para a produção de nanofibras ou microfibras de celulose.

3.7 Caracterização dos nanobiocompósitos reforçados com nanofibras de celulose de eucalipto (filmes)

Os nanobiocompósitos elaborados com amido de mandioca, açúcar invertido, e sacarose como plastificante, e as 7 nanofibras de polpa de eucalipto (0,2% m/v) obtidas

das diferentes condições de hidrólise foram investigados quanto à análise termogravimétrica (TG) e as propriedades mecânicas de resistência a tração, módulo, porcentagem de alongamento e a espessura das formulações. As análises tiveram por fim verificar a influência da adição de nanofibras de polpa de eucalipto numa matriz polimérica de amido de mandioca plastificada com sacarose, sobre estes parâmetros.

3.7.1Transparência e espessura dos nanobiocompósitos (filmes)

A transparência dos nanobiocompósitos foi avaliada através de análise visual e está ilustrada na Figura 12. Independente do tipo de tratamento a que as nanofibras foram submetidas, todos os nanobiocompósitos apresentaram transparências semelhantes.

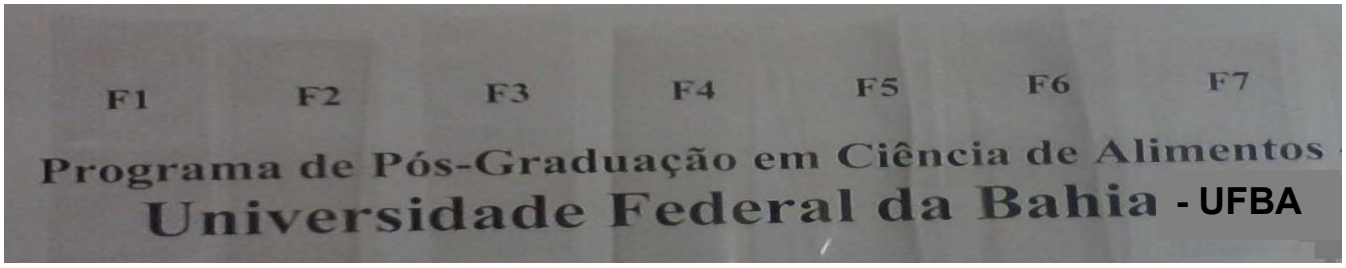


Figura 12. Ilustração da transparência dos 7 nanobiocompósitos (filmes) contendo a mesma concentração de nanofibras de celulose de eucalipto.

Para elaboração dos nanobiocompósitos (filmes) foram pesadas para todas as formulações 40 gramas de solução filmogênica em placas de Petri (Figura 13), que os deixaram com espessuras semelhantes depois da secagem (Tabela 11).

Para análises das espessuras dos filmes foram elaboradas 4 amostras de cada formulação. Os filmes mostraram espessuras semelhantes (0,08-0,07 mm), isto já era esperado já que o único parâmetro que foi alterado foi à condição de preparação das nanofibras. Vários estudos de filmes elaborados por *casting* com a mesma matriz e contendo açúcar invertido e sacarose, com incorporação de polpa de manga e acerola (SOUZA et al., 2011), extrato e azeite de dendê (GRISI, 2008), cacau e extrato de café (SILVA, 2009), relatam espessuras que variaram de 0,123mm a 0,141mm, 0,125 a 0,160 mm e de 0,113 a 0,143 mm, respectivamente.

SHIMAZU et al., (2007), formularam por *casting* filmes de amido de mandioca em diferentes concentrações do plastificante glicerol e verificaram que este parâmetro variou de 0,07 a 0,10 mm nos filmes. Os autores também comprovaram que os filmes sem

plastificante apresentaram espessura de 0,07 mm e, à medida que o teor de plastificante aumentou, as espessuras dos filmes chegaram a 0,10 mm. Os valores encontrados neste estudo são semelhantes aos relatados por SHIMAZU e colaboradores (2007).

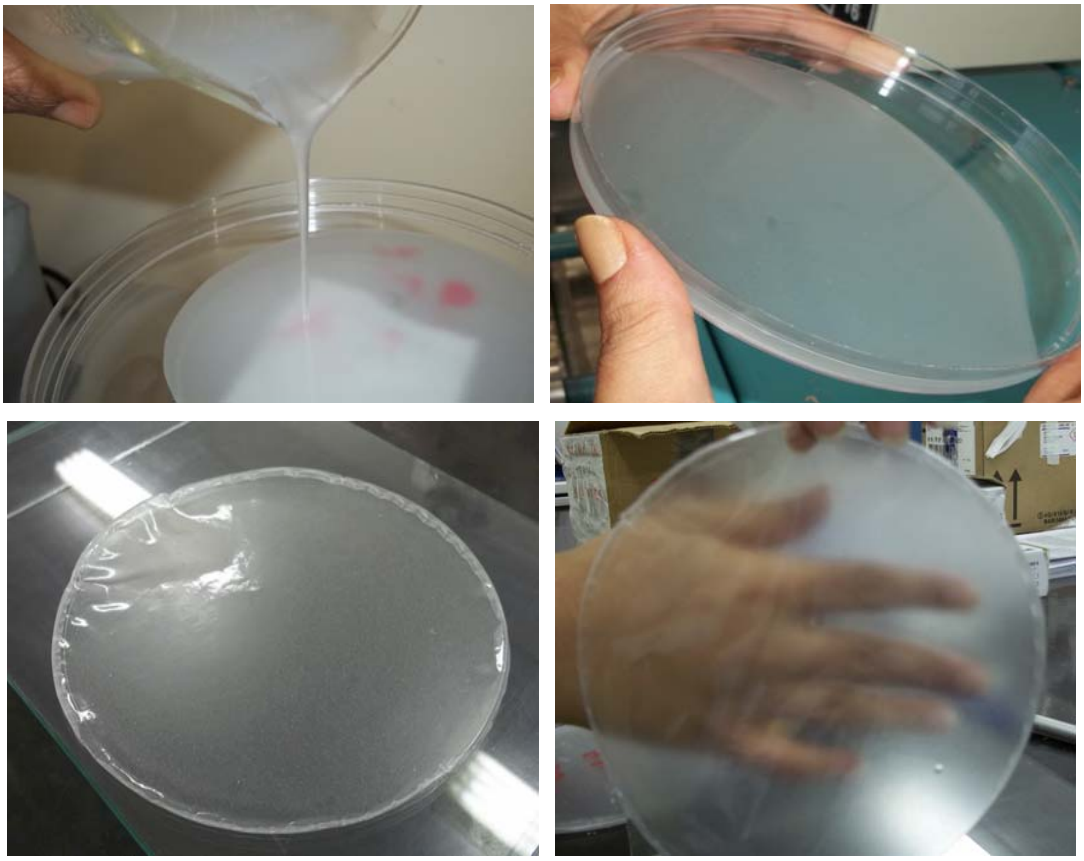


Figura 13. Nanobiocompósitos de amido incorporados com nanofibras de polpa de eucalipto em placas de Petri.

Tabela 11. Médias (± desvio padrão) das análises de espessura dos filmes (F) e da referência (R).

Formulações	Espessura (mm) ± dp
Referência	0,077± 0,005
F1	0,080 ± 0,004
F2	0,074 ± 0,01
F3	0,081 ± 0,01
F4	0,073 ± 0,01
F5	0,081 ± 0,01
F6	0,084 ± 0,01
F7	0,075 ± 0,01

3.7.2 Propriedades mecânicas dos nanobiocompósitos

A incorporação da solução de nanofibras de polpa de eucalipto em concentração de 0,2% a matriz de amido de mandioca, plastificadas com sacarose e açúcar invertido resultou em filmes com alteração das propriedades mecânicas em todas as formulações estudadas (Tabela 12). A tensão de ruptura é caracterizada pela maior tensão que o filme é capaz de suportar e a porcentagem de elongação, referente à máxima elongação do filme até sua ruptura. As nanofibras de celulose de polpa de eucalipto foram eficazes nos aumentos de módulo de *young* (E = elasticidade) nos filmes F2, F3, F4, F6 e F7 em 18,5%, 19%, 21%, 61% e 53%, respectivamente, quando comparados ao filme usado como referência (filme de amido sem nanofibras).

Tabela 12. Médias (± desvio padrão) das análises de propriedades mecânicas dos filmes e referência. σ (Tensão - MPa); ε (Deformação - %); E (Módulo de *young* - MPa).

Formulação	**σ (MPa)**	**↑ σ (%)**	**ε (%)**	**↓ ε (%)**	**E (MPa)**	**↑E (%)**
Referência	7,29 ± 1,02	-	129,34 ± 3,77	-	64,67 ± 17,89	-
F1 (NFC1**)**	6,19 ± 1,70	-15,08	36,46 ± 4,57	-71, 81	64,08 ± 29,30	-1,0
F2 (NFC2**)**	7,36 ± 1,20	+0,96	51,62 ± 3,59	-60,08	76,59 ± 20,66	+18,5
F3 (NFC3**)**	6,85 ± 1,51	-6,03	53,72 ± 2,89	-58,46	76,74 ± 23,27	+19
F4 (NFC4**)**	7,63 ± 1,42	+4,66	33,38 ± 2,94	-74,19	78,37 ± 27,48	+21
F5 (NFC5**)**	5,30 ± 1,95	-27,29	37,1 ± 5,71	-71,31	52,91 ± 15,93	-18
F6 (NFC6**)**	7,11 ± 1,38	-2,46	46,62 ± 4,94	-63,95	104,3 ± 32,96	+61
F7 (NFC7**)**	7,87 ± 1,55	+7,95	51,9 ± 4,46	-59,87	98,63 ± 30,51	+53

Referência=filme de amido e plastificantes sem incorporação de nanofibras de celulose de eucalipto.
Filmes (F); ↑ ou ↓: aumento ou diminuição do parâmetro em relação à referência.

Embora esses aumentos não tenham sido tão expressivos, deve-se salientar a baixa concentração de nanofibras incorporadas e o fato de ter havido micropartículas precipitadas que podem ter interferido nos resultados encontrados. Outra hipótese que não pode ser descartada é que a ausência de birrefringência da solução, indicativo de uma má dispersão em suspensão, pode ter contribuído para a pouca melhoria nas propriedades mecânicas. O valor de tensão máxima (σ=Tensão) aumentou em alguns

filmes com a incorporação das nanofibras de polpa de eucalipto. Os filmes F2, F4 e F7 apresentaram aumentos de 0,96%, 4,66% e 7,95 %, respectivamente, quando comparados ao filme usado como referência.

Entretanto, como já era esperado, houve uma diminuição na deformação na ruptura (ε) de todos os filmes contendo as nanofibras, provavelmente devido ao aumento da rigidez destes filmes, o que reflete uma diminuição da capacidade dúctil do nanomaterial, comportamento geralmente esperado quando um componente mais rígido, no caso as nanopartículas de celulose, é adicionado a outro material mais flexível, o amido. Esse efeito pode ser atribuído ao fenômeno de percolação mecânico das nanofibras de celulose e a formação de uma rede contínua da nanofibras, ligadas por ligações de hidrogênio, ou a uma boa dispersão das nanofibras na matriz, o que indicaria uma boa interação entre os componentes do filme.

Todos os filmes apresentaram um alto percentual de deformação em relação à referência, sendo que o filme F4 apresentou uma maior diminuição no percentual de deformação, 74,19%, e o filme F3 apresentou uma menor diminuição, 58,46%, quando se compara com o filme controle (deformação de 129,34%), (Tabela 12).

Por comparação dos parâmetros mecânicos obtidos no filme referência (compósitos) e dos nanobiocompósitos F1 a F7, (nanobiocompósitos de nanofibras de celulose de eucalipto resultante da hidrolise enzimática ou enzimática com pré-tratamento (ácido diluído), pode-se supor que as diferentes condições de hidrólises resultaram não somente em nanofibras, mas também em microfibras, justificando os aumentos de tensão e módulo, e consequente diminuição da elongação. O fato de não se saber ao certo a proporção de nano e microfibras contida em 0,2% da solução incorporadas aos filmes (dependendo da condição de hidrólise) pode justificar a heterogeneidade nos valores dos parâmetros mecânicos. Para confirmação desta hipótese os comprimentos (L), diâmetros (D) e razões L/D das polpas de eucalipto submetidas às hidrólises deveriam ser determinadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

SAMIR et al., (2005), relata que as nanofibras de celulose devido a sua alta pureza e estrutura altamente ordenada pode conferir alta resistência, mas também mudanças significativas em algumas propriedades importantes de materiais, tais como elétrica, óptica, magnética, ferromagnética, dielétrica e de condutividade.

Os gráficos (Figura 14) apresentam os valores de tensão e de deformação, respectivamente, para a referência e os nanobiocompósitos contendo nanofibras de polpa de eucalipto, de forma a ilustrar os comportamentos mecânicos destes filmes.

A boa dispersão das nanofibras na matriz em que estes são incorporados é de extrema importância para que as propriedades mecânicas, como, tensão máxima e módulo de *Young*, sejam melhoradas. CAO et al., (2008) notaram esta tendência quando formularam e caracterizaram mecanicamente filmes biodegradáveis de amido termoplástico e nanofibras de fibras de cânhamo como material de reforço. O módulo de *Young* passou de 31,9 MPa para 823,9 MPa quando o teor de nanofibras passou de 0% para 30% . A resistência (tensão máxima) aumentou de 3,9 MPa para 111,5 MPa para as mesmas concentrações de nanofibras.

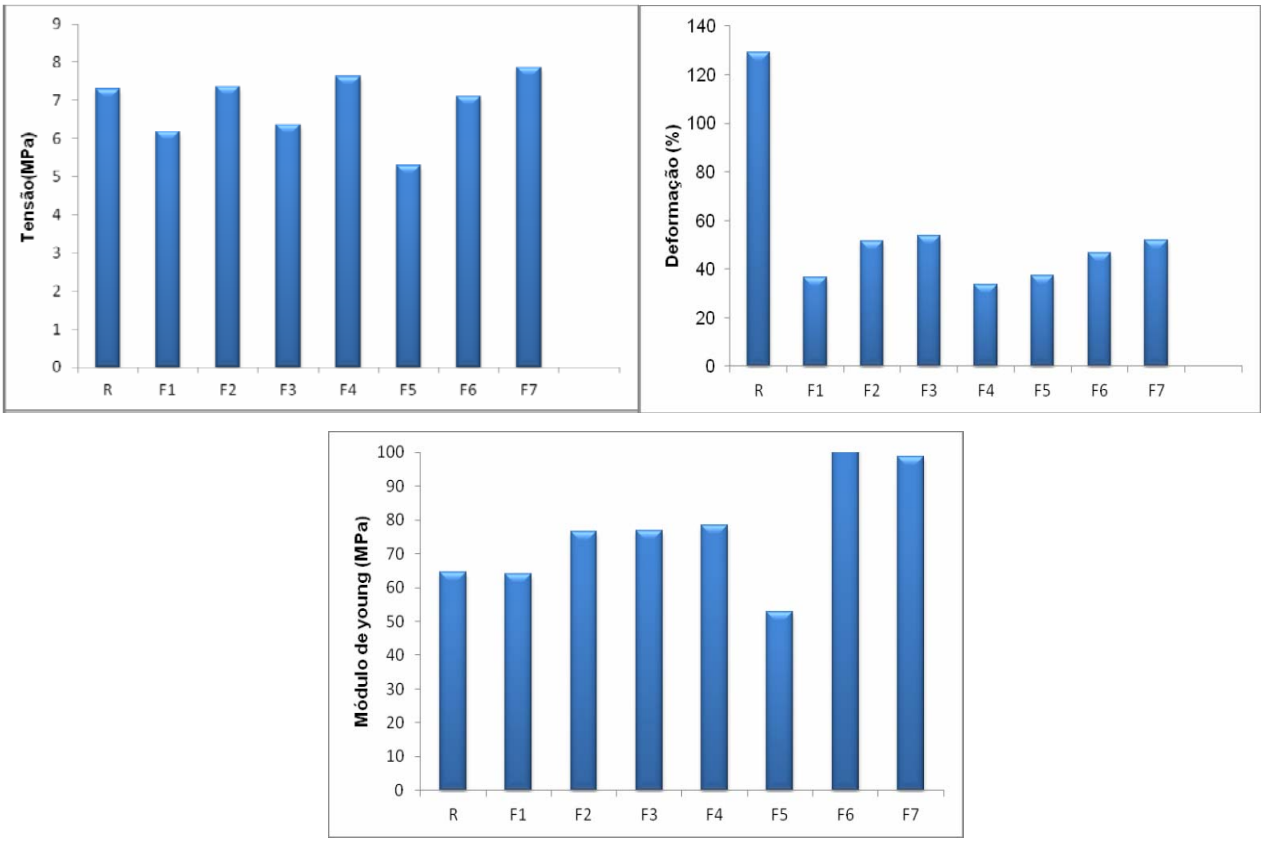


Figura 14. Comportamento da tensão (σ-MPa), deformação (ε-%) e módulo de *Young* dos nanobiocompósitos e referência.

Filmes biodegradáveis de amido, plastificado com glicerol e incorporados com nanofibras de línter de algodão (1 a 30%) foram avaliados e resultaram em aumento no módulo de *Young*, de 36 para 301 MPa e na resistência mecânica, de 2,5 para 7,8 MPa (LU et al., 2005). FANG et al. (2010), desenvolveram por *casting* nanobiocompósitos de

amido, contendo poliuretano com concentrações variadas de nanofibras e avaliaram as propriedades mecânicas de módulo de *Young* , resistência à tração e tensão na ruptura dos materiais. A incorporação de 1% de nanofibras na matriz aumentou o módulo de *Young* de 0,5 para 1,8 MPa, a resistência à tração dos nanobiocompósitos de 5,4 para 12,7 MPa e a tensão de ruptura foi aumentada de 35,8 para 84,6 MPa, em comparação com controle, tendo portanto um aumento significativo em percentual de 135%, 252% e 136%, respectivamente.

SOUZA (2010) produziu por *casting* nanocompósitos com matriz sintética de PVA incorporadas com nanofibras de caruá. Os nanocompósitos com adição de 4% em peso de nanofibras apresentaram um módulo de *Young* 67% superior ao do filme de PVA puro, enquanto que com a adição de 5% de nanofibras, o aumento foi de até 450%. Um aumento significativo foi observado também na tensão máxima de 36 e 44% com a adição de 4% e 5% de nanofibras, respectivamente.

Neste estudo os valores que indicam melhorias nas propriedades mecânicas não foram tão expressivos quanto aos citados mais apresentaram melhorias quando comparados a referência. Módulo de *Young* aumentou de 64,67 MPa para 104,3 MPa e a tensão de ruptura aumentou de 7,29 para 7,87 MPA. É importante salientar que a proporção de nanofibras (e/ou microfibras) incorporadas foi bem inferior às relatadas pelos escritores citados.

3.8 Análise Termogravimétrica dos nanocompósitos

A Análise Termogravimétrica e a Análise Termogravimétrica Diferencial fornecem informações sobre o comportamento de materiais diante de um aumento progressivo de temperatura. Com a caracterização por termogravimetria foi possível estabelecer as temperaturas de degradação e avaliar, o efeito da adição das nanofibras de celulose de polpa de eucalipto e a estabilidade térmica dos nanobiocompósitos (Figura 15).

Nas curvas TGA/DTG da referência e dos os filmes de amido incorporados com 0,2% de nanofibras de polpa de eucalipto podem ser observados dois eventos de perda de massa para todas as amostras e pequena mudança na temperatura de velocidade máxima de degradação. A perda de massa gradual das amostras é atribuída à evaporação da água, decomposição da sacarose e da matriz (SIQUEIRA et al., 2009).

Com a análise da curva de TGA observou-se que todas as formulações são termicamente estáveis no intervalo aproximado de temperatura entre 160°C e 205°C. O comportamento de estabilidade térmica do filme sem adição de nanofibras de polpa de eucalipto (referência) ocorre praticamente os mesmos decaimentos de massa que os observados para os filmes incorporados com as nanofibras. O primeiro evento de decomposição para todas as amostras de filmes inicia-se em torno de 190° C e termina em torno de 258°C com uma temperatura de velocidade máxima de degradação de cerca de 230-240°C.

O segundo evento inicia-se em torno de 260°C e termina em torno de 340°C quando a curva começa a apresentar uma fase constante. A temperatura máxima de decomposição térmica entre 309-322°C. Nesse caso, o primeiro estágio está associado à decomposição do plastificante e das nanofibras, enquanto que o segundo estágio está associado à decomposição da matriz. Evidenciando que nessas formulações não houve uma perfeita homogeneidade e interação dos seus constituintes. As curvas de DTG apresentaram comportamento semelhante para as diferentes formulações, com dois eventos de perda de massa e pouca mudança na temperatura de degradação.

De acordo com BONA (2007) na curva de TGA característica do amido de mandioca ocorre a presença de dois estágios de decomposição. O primeiro estágio ocorre em torno de 60 a 70ºC e se encerra à temperatura em torno de 183,8 ºC, característico da umidade presente na amostra. A partir desta temperatura inicia-se o segundo estágio, que consiste na variação de massa, que é concluído na faixa de temperatura de 595,2 ºC, quando a curva apresenta praticamente uma fase constante onde não há não variação de massa. A temperatura da taxa máxima de decomposição térmica do amido é em torno de 354,0 ºC.

SILVA et al., (2011) avaliaram por TGA filmes de amido de mandioca contendo nanofibras de celulose de eucalipto e relatam que a presença de elevadas concentrações dessas nanofibras (3,0 a 5,0%) promove a ocorrência de mais um evento térmico, quando comparado aos filmes contendo menores percentuais das nanofibras (0,1 a 2,0%) e ainda sugerem que a estabilidade térmica dos filmes diminuiu com o aumento da incorporação destas nanopartículas. Desta maneira, os valores da temperatura inicial de decomposição térmica são importantes à medida que eles indicam o limite máximo da temperatura de processo ou manufatura térmica dos materiais.

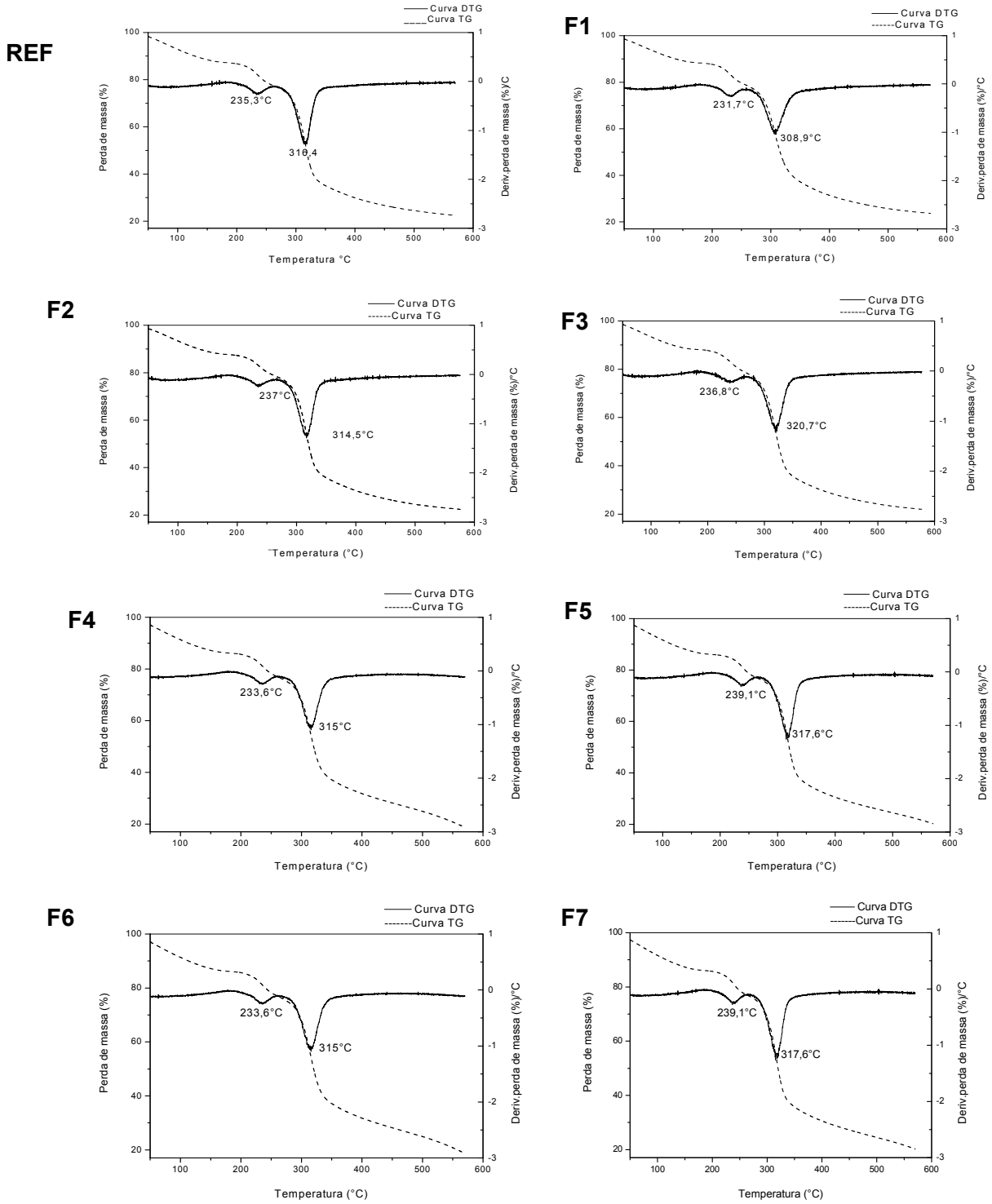


Figura 15. Curvas TGA e DTG da referência e dos nanobiocompósitos formulados com amido de mandioca, açúcar invertido, sacarose e nanofibras de polpa de eucalipto.

4.0 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o fungo *Aspergillus niger* foi capaz de produzir celulases pelo método “cup plate”. As melhores condições para a produção do extrato enzimático bruto foi obtida por ação do fungo sobre substrato bagaço de cana de açúcar a 35°C por 7 dias e pH 6,0 que resultou em uma atividade especifica de 12,18 U/µg de proteínas. Por ação deste extrato enzimático bruto nas condições ótimas de atividade (30°C e pH 5,0) sobre polpa de celulose de eucalipto foi possível obter nanofibras e/ou microfibras. A hidrólise enzimática sem pré-tratamento com ácido sulfúrico, resultou em maior grau de cristalinidade (NFC2 = 75,58%), reduzindo os custos do processo Considerando que quanto menor o tamanho da partícula maior o índice de cristalinidade, o tratamento da polpa de celulose de eucalipto com as celulases produzidas pelo fungo *Aspergilus niger* a 90 % por 120 minutos resultou em nanofibras e/ou microfibras de celulose menores do que as obtidas por hidrólise convencional com H_2SO_4 a 64%. A incorporação das nanofibras em filmes de amido de mandioca, açúcar invertido, plastificados com sacarose (nanobiocompósitos), contribuiu para melhorar as propriedades mecânicas, como módulo de *Young* e tensão máxima, e diminuir o percentual de elongação dos nanobiocompósitos. Portanto, estes filmes podem ter suas propriedades alteradas pela incorporação de nanofibras resultantes da hidrólise enzimática da polpa de eucalipto. Apesar da hidrólise com ácido concentrado ocorrer em menor tempo, resulta em efluentes mais tóxicos, afetando toda a cadeia de produção. Portanto, a hidrólise enzimática representa uma alternativa tecnológica limpa para a produção de nanofibras e/ou microfibras de celulose.

Referências

AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger.* 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) universidade estadual do oeste do Paraná, Toledo.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *aspergillus niger* IZ 9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.

AGUIAR FILHO, J. M. M. Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade de São Paulo, Piracicaba.

AIMIN, T.; HONGWEI, Z.; GANG, C.; GUOHUI, X.; WENZHI, L. Influence of ultras ound treatment on accessibility and regiosel ective oxidation reactivity of cellulose. **Ultimate Sonoch**, v. 12, p. 467, 2005.

AKHTAR, M. S.; SALEEM, M.; AKHTAR, M. W. Saccharification of lignocellulosic materials by the cellulases of *Bacillus subtilis*. **International Journal of agriculture & biology**, v. 3, n. 2. 2001.

ARAUJO, J. R.; WALDMAN, W. R.; DE PAOLI, M. A. 2008. Polymer degradation.Stab. v. 93. p.1770.

BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Mc Graw-Hill Itnl Editions, 2 ed., 1986, 928 p.

BARUD, H. S. Preparação e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana. 2006,114 p. Dissertação (Mestrado em química) Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

BOMMARIUS, A. S.; KATONA, A.; CHEBEN, S. E.; PATEL, A. S.; RAGAUSKAS, A. J.; KNUDSON, K.; PU,Y. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v.10, p. 370-381, 2008.

BONA, J. C. Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de blendas de amido com polietileno. 2007, 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CAO, Y.; TAN, H. Preparation and properties of microporous cellulose membranes from novel cellulose/aqueous sodium hydroxide solutions. **Journal of applied Polymer Science**, v. 102, n. 1, p. 920-926, 2006.

CAO, X.; CHEN, Y.; CHANG, P. R.; STUMBORG, M.; HUNEAULT, M. A. Green Composites Reinforced with Hemp Nanocrystals in Plasticized Starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 3804-3810, 2008.

CARDOSO, A. A.; MACHADO, C. M. D.; PEREIRA, E. Alfabetização Científica no Ensino de Química: Uma Análise dos Temas da Seção Química e Sociedade da Revista Química Nova na Escola. **Química Nova na Escola**, n. 28, p. 9, 2008.

CASTILLO, M. R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; LINDEN, J. C.; TENGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 967-972, 1994.

CAZAL, C. M. Métodos de quantificação de grupos carboxílicos e carbonílicos em polpa de celulose *Kraft* branqueada. 2006, 121 p. Dissertação (*Magister Scientiae*) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 85–89, 2007.

CHERIAN, B. M.; POTHAN, L.A.; NGUYEN-CHUNG, T.; MENNIG, G.; KOTTAISAMY,M.; THOMAS, S. A Novel Method for the Synthesis of Cellulose Nanofibril Whiskers from Banana Fibers and Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5617–5627, 2008.

COELHO, T. **Alimentos: Propriedades Físico-Químicas**. 2. ed. Rio de Janeiro:Cultura Médica, p. 44-55, 2002.

COELHO, M. A. Z. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir de casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, v. 19, p. 33-42, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 2 ed. Campinas, UNICAMP, 2006.

COSTA Jr, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blenda de quitosana poli (álcool vinilíco) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 160-1466, 2008.

DA SILVA, R., YIM, D. K., PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 109-111, 1994.

DAVANÇO, T. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina,triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes. 2006, 155 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) UNICAMP, Campinas.

DE PAULA, H. C. B.; OLIVEIRA, E. F.; ABREU, F. O. M. S.; DE PAULA, R. C. M.; DE MORAIS, S. M.; FORTE, M. M. C. Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, 2010.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II- Application of the cup plate assay to the estimation of enzymes. **Journal Science Agriculture.** v. 4, p. 149-155, 1953.

DRUZIAN, J. L. Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma *Bradyrhizobium* isolados do solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna inguiculta* L). 2000, 198 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

EMBRAPA. MATTOS, P. L. P.; CARDOSO, E. M. R. Cultivo da Mandioca para o Estado do Paraná: Importância Econômica. Embrapa: Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção, n. 13, p. 1-2, 2003.

ERHARDT, D. Paper degradation: A comparison of industrial and archival concerns, in: Paper Preservation: Current Issues and Recent Developments.**Tappi**, p. 63-68, 1990

EICHHORN, S. J.; DUFRESNE, A.; ARANGURE, M.; MARCOVICH,N. E.; CAPADONA, J. R.; ROWAN, S. J.; WEDER, C.; THIELEMANS, W.; ROMAN, M.; RENNECKAR, S.; GINDL,

W.; VEIGEL, S.; KECKES, J.; YANO, H.; ABE, K.; NOGI, M.; NAKAGAITO, A. N.; MANGALAM, A.; SIMONSEN, J.; BENIGHT, A. S.; BISMARCK, A.; BERGLUND, L. A.; PEIJS,T. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal Mater Science**, v. 45, p. 1–33, 2010.

ELAZZOUZI-HAFRAOUI, S; NISHIYAMA, Y; PUTAUX, J.L; HEUX, L; DUBREUIL, F., ROCHAS, C. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. **Biomacromolecules**. v. 9, p. 57-65, 2008.

FILHO, A. J. F.; CARVALHO, A. J. F.; MENEZES, A Jr.; MAGALHÃES, D.; SILVA, M. P. Preparação e caracterização de nanocristais de Celulose a partir de polpa de eucalipto e sisal. In: 8° JORNADA CIENTÍFICA E BIOTECNOLÓGICA DA UFSCAR, 2009, Sorocaba. **Tópicos temáticos**...Sorocaba: Universidade Federal de São Carlos, 2009.

FURIGO Jr., A. **Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001.

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

GRISI, C. Utilização de derivados do dendê (*elais guineesis jaquim*) em embalagens ativas à base de fécula de mandioca com função antioxidante. 2008,156 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

GUIMARÃES, J. L.; WYPYCH, F.; SAUL, C. K.; RAMOS, L. P.; SATYANARAYANA, K. G. Studies of the processing and characterization of corn starch and its composites with banana and sugarcane fibers from Brazil. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 130–138, 2010.

HABIBI, Y.; FOULON, L.; AGUIÉ-BÉGHIN, V.; MOLINARI, M.; DOUILLARD, R. Langmuir Blodgett films of cellulose nanocrystals: Preparation and characterization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 316, p. 388-397, 2007.

HASAN, F.; AHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

LOJESWSKA, J.; MISKOWIEC, P.; LOJEWSKI, T.; PRONIEWICZ, L. M. Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, p. 512, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein mensurement with the Folin phenol reagents. **The Journal of Bioogical Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

LORENTZ, R. H. Seleção de isolados de p*aenibacillus* SSP com atividade enzimática e antimicrobiana. 2005, 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Biocomposites of Plasticized Starch Reinforced with Cellulose Crystallites from Cottonseed Linter. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, p. 1101-1107, 2005.

KLUNGNESS, J. H.; CAULFIELD, D. F. Mechanisms affecting fiber bonding during drying and aging of pulps. **Tappi** , v. 65, p. 94-97,1982.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 63-67, 1997.

KRISHNA S. H.; PRABHAKAR, Y.; RAO, R. J. Saccharification studies of lignocellulosic biomass from Antigonium leptopus Linn. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 1, p. 39-42, 1997.

MACHADO, B. A. S. Desenvolvimento e caracterização de filmes flexíveis de amido de mandioca reforçados pela incorporação de nanocelulose de coco. 2011, 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MENEZES, T. J. B.; MAKINO, Y.; GRILLO, R. L. M. Produção de celulase: efeitos do tratamento do bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulase. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 1, p. 29-44, 1991.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical. Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 19, p. 78-81, 1988.

NOVO NORDISK. **Celluclast 1,5 L**: Ficha técnica, p. 3, 1996.

OJUMU, T. V.; SOLOMOM, B. O.; BETIKU, E.; LAYOUKUN, S. K.; AMIGUN, B. Cellulase production by *Aspergillus flavus* linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corn cob. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 150-152, 2003.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by Trichoderma reesei Rut C–30. **Enzyme and Microbial Technology**. doi:10.1016/S01410 229(03)001819, 2003.

ORTEGA, A.; BAILLIE, D. Fiber-Reinforced Plastic Parts Made With Untreated Embossed Surfacing Veils With No Whitening Agents. **Patente protocolizada no Espacenet,** US 2011236638, 2011.

PARIS, L. D. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. 2008, 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.

PEREIRA, A. L. S. Extração de nanocelulose de fibras vegetais. 2010, 54 p. Monografia (Graduação em Engenharia Química) Universidade federal do Ceará, Fortaleza.

PEIXOTO, A.B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. 2006, 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PRINCI, E.; VICINI, S.; PEDEMONTE, E.; GENTILE.; COCCA, M.; MARTUSCELLI,E. Synthesis and mechanical characterization of cellulose based textiles grafted with acrylic monomers. **Polymer Journal**, v. 42, p. 51, 2006.

RASTOGI, G.; STETLER, L. D.; PEYTON, B. M.; SANI, R. K. Molecular analysis of prokaryotic diversity in the deep subsurface of the former Homestake gold mine. **Journal Microbiology**, v. 47, p. 371–384, 2009.

RIGO, L. N. Desenvolvimento e Caracterização de filmes comestíveis. 2006, 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Ciências Agrárias, URI Campus Erechim, Rio Grande do Sul.

ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; IMAN, S. H.; NASCIMENTO, D.M.; MONTEIRO, A. K.; MALMONGE, J. A.; MATTOSO, L. H. C. Nanocelulose de fibras de coco imaturo para aplicações m nanocompósitos. V Woekshop de Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, São Carlos, 2009.

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

SAMIR, M.A.S. A.; ALLOIN, F; DUFRESNE, A. Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005.

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN JR., A. E; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, p. 786–794, 1959.

SHARROCK, K. R. Cellulase assay methods: a review. **Journal Biochemistry Biophys Methods**, v. 17, p. 81–105, 1988.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SHODEX. HPLC Columns and instruments 2008-2010. Disponível em http://www.laserchrom.com/.../SHODEX_catalogue_2008-2010. Acesso em março de 2012.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering – Basic Concepts. **Prentice Hall Int**. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

SILVA, R.; SHIRANI, K.; HARAGUCHI, E. C.; RUBIRA, M. F.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009

SILVA, J. B. A.; SANTOS, A. V.; VARGAS, F. P.; DRUZIAN, J. I**.** Preparação e caracterização de filmes de fécula de mandioca e nanowhiskers de celulose. In: 11

CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2011, Campos do Jordão. **Tópicos temáticos**...Campos de Jordão: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SIQUEIRA, G.; ABDILLAHI, H.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from Syngonanthus nitens. **Cellulose**, v. 17, p. 289-298, 2009.

SOUZA LIMA, M. M., BORSALI, R. Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, and Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 25, p. 771-787, 2004.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116-124, 2008.

SOUZA, C. O; SILVA, L. T.; SILVA, J. R.; LOPEZ, J. A.; VEIGA-SANTOS, P.; DRUZIAN, J. I. Mango and Acerola Pulps as Antioxidant Additives in Cassava Starch Bio-based Film. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 1, 2011.

SOUZA, S. F. Obtenção de nanofibras de curauá e aplicação como reforço em compósitos baseados em PVA. 2010, 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SPINACE, M. A. S.; LAMBERT, C. S.; FERMOSELLI, K. K. G.; DE PAOLI, M. A. Characterization of lignocelulosic curaua fibers. **Carbohydrate Polymer**, v. 77, n. 1, p. 47-53, 2009.

TEIXEIRA, M. F. S.; FERNANDES, O. C. C.; HERRERA, A. M.; DURÁN, N. Determinação qualitativa de proteases: método de cup plate modificado. **Universidade Federal de Amazonas**, Série: Ciências da Saúde, v. 4/5, n. 1, p.39-45, 1996.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.

TROEDEC, M. L.; SEDAN, D.; PEYRATOUT, C.; BONNET, J. P.; SIMITH, A.; GUINEBRETIRRE, R.; GLOAGUEN, V.; KRAUSZ, P. Influence of various chemical treatments on the composition and structure of hemp fibres. **Composites**, v. 39, p. 514-522, 2008.

VAN-DEN-BERG, O.; CAPADONA, J. R.; WEDER, C. Preparation of Homogeneous Dispersions of Tunicate Cellulose Whiskers in Organic Solvents. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1353-1357, 2007.

YOUN OH, S.; YOO, D.I.; SHIN, Y.; SEO, G. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. **Carbohydrate Polymers**, v. 340, p. 417-418, 2005.

WOEHL, M. A. Bionanocompósitos de amido plastificado com glicerol reforçados com nanofibras de celulose bacteriana. 2009, 99 p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Paraná.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 3-11, 1988.

ZANDONA FILHO, A. Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas. 2001, 193 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos)- Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

ZHANG, P.; LYND, R. L. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Wiley Periodicals**, Inc., 2004.

Capítulo III

Biomassa extracelular obtida por fermentação com o fungo isolado do cacau apresentando morte descendente: produção e caracterização.

CAPITULO III

Biomassa extracelular obtida por fermentação com o fungo isolado do cacau apresentando morte descendente: produção e caracterização.

Resumo

As indústrias de alimentos e farmacêuticas têm demonstrado grande interesse em pesquisas envolvendo manipulação de microrganismos para fins biotecnológicos. Neste contexto vem aumentando o interesse por macromoléculas fúngicas, como os polissacarídeos e as proteínas. Os polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, em forma de gomas, ligados ou não a proteínas e lipídios tem aplicabilidade como gelificantes, espessantes, texturizantes, excelente valor nutricional e podem apresentar atividades biológicas como ação antitumoral, antiviral e anti-inflamatória. Concomitante a produção da goma, o fungo produz também biomassa residual, que tem despertado interesse para isolamento de seus principais constituintes, tais como enzimas, nucleotídeos, proteínas e principalmente polissacarídeos, além de lipídios, pois estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e, conseqüentemente, de grande valor agregado. O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar biomassa extracelular obtida por fermentação em agitador orbital pelo fungo isolado do fruto cacau apresentando morte descendente. O fungo isolado do cacau infectado por patógeno foi identificado taxônomicamente como *Lasidioplodia theobromae* no estágio anamorfo (assexuado), e utiliza preferencialmente a sacarose comercial a 40 g/L como a melhor fonte de carbono, e 4,0 como melhor pH para produção da fração precipitável em álcool etílico, resultando em 8,64 g/L. Para a produção de biomassa residual as melhores condições do meio fermentativo foram sacarose comercial a 50 g/L e pH 5,0, resultando em 23,69 g/L. A composição centesimal mostrou que as duas frações são bastantes semelhantes mostrando-se fontes em carboidratos (30,16 e 37,96%), proteínas (19,88 e 29,45%) e lipídios (11,07 e 28,79%). Os espectros de infravermelho (FT-IR) demonstraram que as frações produzidas pelo *L. theobromae* contem os mesmos agrupamentos amino, polióis e ésteres. As duas frações apresentaram cinzas entre 3,55 e 3,88%, além de traços de açúcares redutores, sendo as partes polissacarídicas compostas de glicose e manose, portanto tratando-se de glucomananas. Estes parâmetros são importantes para caracterizar as frações da biomassa. Conclui-se que as duas frações possuem propriedades desejáveis para ampla utilização em processos biotecnológicos de alta relevância cientifica. Vale salientar que não existem relatos cientifico sobre a produção e caracterização das frações da biomassa fermentativa de *Lasidioplodia theobromae,* fungo típico de regiões tropicais e subtropicais e que tem sido responsável por doenças de inúmeras plantas cultivadas causando perdas significativas de produção, notadamente no Nordeste brasileiro.

Palavras – chaves: goma, *Lasidioplodia theobromae*, biomassa residual.

Biomassa extracellular obtained by fermentation with the fungus isolated from cacoa with descending death: production and characterization.

Abstract

The industries of food and pharmaceutical has shown great interest in research involving manipulation of microorganisms for biotechnological purposes. In this context has been increasing interest in fungal macromolecules, such as polysaccharides and proteins. The extracellular polysaccharides, produced by some fungi and bacteria, assuming the form of gums, connected or not to proteins and lipids have applicability as gelling agents, thickeners, texturizantes, excellent nutritional value and may have biological activities as action anti-tumoral, antiviral and anti-inflammatory. Concurrent with the production of gum preciptable in alcohol, the fungus also produces residual biomass, which has aroused interest for the isolation of its main constituents, such as enzymes, nucleotides, proteins and polysaccharides mainly, in addition to lipids, because these substances have specific properties of biotechnological interest and, therefore, of great value. The objective of this work was producing and characterize gum precipitable in organic solvents and residual biomass by fermentation in orbital shaker of different carbon sources with the fungus isolated from cocoa with descebding death. The isolate of the fruit of cocoa infected by pathogen was identified taxonomically as *Lasidioplodia theobromae*, stage anamorph (assexual), and preferably use the sucrose commercial to 40 g/L as the best carbon source, and 4.0 as the best pH for production of fraction precipitable into ethyl alcohol, resulting in 8.64 g/L. For the production of residual biomass the best conditions of fermentation medium were sucrose commercial 50 g/L and pH 5.0 , resulting in 23.69 g/L. The percentage composition showed that the two fractions are quite similar showing sources in carbohydrates (30.16 -37.96 %), protein (19.88 -29.45 %) and lipids (11.07 - 28.79 %). Also the spectra of infrared (FT-IR) demonstrated that the fractions produced by *L. theobromae* contains amino groups, polyols and esters. The two fractions showed ash between 3.55 and 3.88 %, in addition to traces of reducing sugars, and the parties polysaccharide composed of glucose and mannose, therefore being glucomananas. These parameters are important to characterize the fractions of biomass. It is concluded that the two fractions have desirable properties for wide use in biotechnological processes of high scientific relevance. It is worth pointing out that there is no scientific report on the production of biomass fermentation by *Lasidioplodia theobromae*, fungus typical of tropical and subtropical regions and that has been responsible for diseases in numerous cultivated plants causing significant losses of production, especially in the Brazilian Northeast.

keys words: gum, *Lasidioplodia theobromae*, residual biomass.

1.0 Introdução

Os biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos, representam os mais abundantes compostos orgânicos da biosfera, exibindo importantes propriedades e diferentes aplicações, relacionadas com suas características químicas (FUKUDA et al., 2009; GERN et al., 2008). Os polissacarídeos são uma classe de biopolímeros produzidos por todos os organismos vivos e exibem diferentes tipos de estruturas químicas, funções fisiológicas e aplicações (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

Nos organismos vivos, os polissacarídeos podem estar sozinhos ou covalentemente combinados com outros compostos de diferentes classes biológicas, principalmente proteínas e lipídeos, constituindo os glicoconjugados. Em combinação ou livres, essas moléculas têm importantes funções biológicas e a fração marjoritária normalmente define a identificação do polímero (NELSON; COX, 2002).

Fungos, bactérias e plantas vêm sendo pesquisados como potenciais fontes dessas macromoléculas, principalmente de polissacarídeos. Os fungos constituem um grupo microbiano cosmopolita extremamente diverso, com uma ampla variedade de morfologias, metabolismo e habitats (HAWKSWORTH,1991). No ambiente terrestre têm um papel importante nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio ou fósforo (BOSWELL et al., 2003). A utilização desses micro-organismos pode ser através do seu material celular (biomassa) ou então de macromoléculas isoladas (FUKUDA et al., 2009).

Entre alguns dos fitopatogénos primários e secundários do cacaueiro (*Theobroma cacao*) estão os fungos *Moniliophthora perniciosa* (Vassoura-de-bruxa), *Phytophthora* (Podridão Parda), *Diplodia theobromae* (morte súbita), *Lasidioplodia theobromae* (cancro), (OLIVEIRA; LUZ, 2005). Como fitopatógenos, estes organismos possuem mecanismos de adesão ao hospedereiro, onde as moléculas de reconhecimento e união são, na maior parte dos casos, de natureza protéica ou glicoprotéica (SUGUI et al., 1998; XIAO et al., 1994) e, por isso, a produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares têm sido associadas à capacidade do micro-organismo causar doenças em plantas (GILAD et al., 2001; LEITE et al., 2001).

O fato de os produtos serem secretados para o meio extracelular confere a essas macromoléculas grandes vantagens, uma vez que estes não necessitam de processos complexos para extração como lise celular e ao mesmo tempo são livres de contaminantes celulares (GUIMARÃES et al., 2009). Além das características únicas dos

biopolímeros fúngicos, esta classe microbiana também se destaca por apresentar maior resistência a mutações e crescimento em maior diversidade de fontes de nitrogênio, carbono e pH (MAZIERO et al.,1999; HWANG et al., 2003).

A possibilidade de aplicação desses compostos na saúde humana e em ampla variedade de áreas industriais, incluindo farmacêutica, petrolífera, cosméticos e alimentos, assim como em outras áreas, tem levado a intensivos estudos relacionados à sua extração e caracterização (GERN et al., 2008). Na indústria de alimentos os exopolissacarídeos têm sido usados no revestimento de alimentos retendo sabor e aparência, preparação de filmes e fibras, agentes emulsificantes, espessantes, gelificantes e texturizantes (BARBOSA et al., 2004; CANUTO, 2009).

Durante um processo fermentativo para a produção de exopolissacarídeos microbianos, um grande percentual de biomassa residual também é obtido. Entretanto, as quantidades de biomassa (massa micelial) e exopolissacarídeos (macromoléculas precipitáveis em solvente orgânico) não são necessariamente proporcionais, sendo dependentes dos diferentes fatores utilizados no cultivo, tais como fontes de carbono, nitrogênio, microelementos, pH, temperatura, agitação, aeração, entre outros (BARBOSA et al., 2004). Estes parâmetros podem interferir tanto na produção da biomassa quanto dos componentes isolados desses substratos.

Segundo alguns autores (BARBOSA et al., 2004; SEVIOUR et al., 1992; WANG; MCNEILL, 1995) o resultado esperado no final do processo fermentativo, se maior rendimento de biomassa residual ou de exopolissacarídeos, determinará como as variáveis serão aplicadas no cultivo microbiano.

Há uma forte tendência em se explorar comercialmente também a biomassa fúngica para isolamento de seus componentes celulares e consequentemente de seus principais constituintes, tais como enzimas (invertases, glucosidades), nucleotídeos, proteínas (manoproteínas) e principalmente polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas), além de lipídeos, como fosfolipídios e ergosterol, pois estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e, conseqüentemente, de grande valor agregado (BEROVIČ et al., 2003; CAMERON et al., 1988; KOLLÁR et al., 1992; PAVLOVA et al., 2005).

O interesse neste tipo de material celular se justifica pela facilidade de obtenção, velocidade de crescimento muito maior do que em animais ou vegetais por, não sofrer

interferência de condições ambientais, e pelo alto valor nutricional, sendo boa fonte de aminoácidos essenciais e vitaminas (SEVIOUR et al., 1992).

O objetivo deste trabalho foi produzir macromoléculas extracelulares precipitáveis em solventes orgânicos e biomassa residual por fermentação submersa utilizando o fungo isolado do fruto do cacau apresentando a doença conhecida com morte descendente.

2.0 Material e Métodos

2.1 Material

Foram utilizados como materiais: Amido de mandioca (doada pela Cargill Agrícola SA), e Potato Dextrose Agar (PDA, Himedia), sulfato de cobre (Synth), selenito de sódio (Qhemis), sulfato de sódio (Vetec), ácido sulfúrico (98,08%, Vetec), clorofórmio (Qhemis), metanol (Synth), solução de sulfato de sódio 1,5%, Agar malt (Acumedia), Agar yeast (Acumedia), Peptona (Acumedia), Sacarose grau analítico (Fmaia), sacarose comercial (João), D-glicose anidra (Synth), padrão glicose e manose (Sigma) e Membrana de celulose para diálise D9777 - 100 FTO (Sigma).

2.2 Micro-organismo: Isolamento e identificação Taxônomica

O micro-organismo utilizado foi isolado de um cacau apresentando morte descendente cedido pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLC-Itabuna). Nesse processo uma pequena parte do cacau infectado pelo fungo foi transferida assepticamente para uma placa de BDA (Batata Dextrose Agar) e incubada em estufa BOD por a 28°C ± 2°C por 7 dias. Foram realizados repiques sucessivos até se obter uma linhagem aparentemente pura (AGUIAR, 2010 adaptado). A identificação taxonômica do fungo foi realizada pela própria CEPLC pela técnica de identificação molecular e também nas características morfológicas dos esporos (NOVAIS et al., 2010).

2.3 Fermentação submersa para seleção da fonte de carbono

2.3.1 Manutenção e repicagem do fungo

O fungo isolado do cacau, com linhagem aparentemente pura, foi repicado em meio contendo BDA e mantido em crescimento em estufa BOD a 28°C ± 2°C por 7 dias.

Após o crescimento foram mantidos a 4°C com repiques mensais (AGUIAR, 2010 adaptado).

2.3.2 Preparo do inóculo

2.3.2.1 Inóculo preparado com esferas colonizadas

Foram transferidas para frascos Erlemeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio fermentativo (Tabela 1) com a fonte de carbono a ser testada e ajsutado o pH, 3 esferas de 0,5 cm de diâmetro, contendo meio de cultivo com micélio. Os frascos Erlemeyers foram mantidos em uma incubadora refrigerada com agitação (Modelo Tecnal) a 28°C ± 2°C por 72 horas, a 180 rpm (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2007, com adaptações).

2.3.2.1 Preparo do inóculo com homogeneização micelial

O inóculo foi preparado utilizando 100 mL do meio fermentativo (Tabela 1) com adição de 10 g/L de sacarose comercial e o pH do meio foi ajustado em 5,0. 3 esferas de 0,5 cm de diâmetro, contendo meio de cultivo com o micélio foram colocadas em liquidificador (previamente autoclavado) juntamente com o meio líquido e homogeneizadas por 1 minutos (STELUTI et al., 2004).

Os frascos erlemeyers foram mantidos em uma incubadora refrigerada com agitação (Modelo Tecnal) a 28°C ± 2°C por 24 horas, a 180 rpm). Após esse período, quantidades diferenciadas do inóculo (1, 2, 3, 4, 5, e 20 mL) foram colocadas em frascos Erlemeyer de 250 mL, ajustado o volume para 100 mL com meio fermentativo (Tabela 1) e os frascos Erlemeyers foram mantidos em uma incubadora refrigerada com agitação (Modelo Tecnal) a 28°C ± 2°C por 72 horas, a 180 rpm (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2007, com adaptações).

2.3.3 Fermentação submersa para a seleção das melhores condições do processo

Foram realizadas primeiramente fermentações para determinar a melhor fonte de carbono para a produção da goma e da biomassa residual pelo fungo isolado do cacau. Foram testadas a sacarose grau analítico, sacarose comercial, glicerina e glicose na concentração de 10g/L e os outros constituintes do meio fermentativo (tabela 1).

Após os preparo do meio o pH foi ajustado para 5,0 e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata e a melhor fonte de carbono foi selecionada para a produção final da goma e biomassa. Após a determinação da melhor fonte de carbono para a fermentação, os ensaios foram preparados para definir a melhor concentração da fonte de carbono (10g/L; 20g/L; 30g/L; 40g/L e 50g/L) e o pH (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0) do meio, buscando avaliar a influência destes fatores na produção das macromoléculas precipitáveis em álcool e da biomassa residual (STELUTI et al., 2004 adaptado).

Tabela 1. Composição do meio fermentativo para a produção da fração I e II da biomassa.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	2
K_2HPO_4	2
$MgSO_4$	2
Peptona	10
Extrato de malte	2

STELUTI et al., 2004 com adaptações.

2.3.4 Separação do micélio fúngico do caldo Fermentado

Os cultivos foram submetidos à ultracentrifugação (Ultracentrífuga, Marca Hitachi) refrigerada a 5°C por 30 minutos a 3500 rpm. O caldo fermentado foi recolhido em provetas de 100 mL para medição do volume obtido e posterior precipitação em etanol gelado, a biomassa residual foi recolhida em placas de Petri (previamente pesadas) onde os discos de BDA envolvidos pelo micélio fúngico foram separados com o auxílio de um bastão de vidro e descartado. Ambas as frações foram coletadas para determinações analíticas (STELUTI et al., 2004 com adaptações).

2.3.5 Precipitação e quantificação das frações de biomassa do caldo fermentado

O caldo fermentado foi tratado com três volumes de etanol anidro gelado (4°C). A fração I (goma) precipitada foi filtrada, lavada com água destilada e quantificada

gravimetricamente após secagem em estufa (Marca Nova Etica) com circulação de ar a 35°C até peso constante. A biomassa residual (fração II), separada por ultracentrifugação, livre do micélio fúngico, foi determinada por gravimetria (STELUTI et al., 2004).

2.4 Caracterização das frações da biomassa do ensaio selecionado

2.4.1 Composição centesimal das frações

A umidade das duas frações da biomassa foi obtida por secagem, em equipamento infravermelho (Marca Mettler LTJ), ajustando-se a intensidade da radiação emitida de modo que a amostra atingisse 180ºC.

Os teores de proteína bruta e cinzas, nas amostras foram determinados segundo metodologia AOAC (1984) por Kjedall (Modelo TE-036/1, Marca tecnal) e mufla (modelo 402 D, marca Lavosier Fornos). O teor de lipídios totais foi determinado pelo método BLIGH DYER (1959) e o percentual de carboidratos foram calculados por diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, proteína bruta, lipídios totais e cinzas.

2.4.2 Determinação de açúcares redutores das frações da biomassa

Os açúcares redutores da fração precipitável em álcool e da biomassa residual foram determinados pelo método DNS (ácido 3-5-dinitrossalicílico) e as análises foram feitas segundo MILLER (1959). Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm, utilizando uma curva padrão de glicose cuja concentração variou de 0,2 até 1,5 mg/mL e os resultados foram expressos em ART (açúcares redutores).

2.4.3 Determinação de composição monossacarídica da porção polissacarídica das frações da biomassa

2.4.3.1 Preparo das frações da biomassa para caracterização cromatográfica

As frações foram, separadamente, dialisadas em membrana de celulose, contra água destilada com trocas de água periódicas, por 72 h, para remoção de resquícios do meio de cultura e, então liofilizadas e estocadas em dessecador (DRUZIAN, 2000).

2.4.3.2 Estudo de espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

Os grupos estruturais da biomassa (goma e biomassa residual) produzidas pelo *L. theobromae* foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. O espectro FT-IR das frações foi obtido pelo método de refletância total atenuada em espectrofotômetro (Modelo Spectrum 100, Marca Perkin Elmer) com varredura na região de 4000 e 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} (SILVA et al., 2011).

2.4.4. Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas das frações da biomassa foram realizadas em um analisador térmico (Modelo DTG-60, Marca Shimadzu). Nos ensaios foram usadas massas de aproximadamente 8 mg, cadinho de alumínio, atmosfera inerte de nitrogênio de 20 mL min^{-1}, com taxa de aquecimento de 10 ºC min^{-1}, no intervalo de temperatura de 25 a 600 ºC (KOCK et al., 2009) .

2.4.5 Determinação da composição de monossacarídeos das frações por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-IR)

Para análise dos monossacarídeos das frações (goma e biomassa residual), alíquotas de 10 mg das frações liofilizadas, foram hidrolisadas com 1 mL TFA 1M a 100°C, por 10h. O ácido foi removido por evaporação com N_2 gasoso até secagem total restando somente o hidrolisado sólido. Os hidrolisados foram liofilizados por 10 horas á 100°C. Os hidrolisados foram dissolvidos em água cromatográfica tipo I, e filtrados em membrana de celulose regenerada com poros de 0,2 µm. Frações contendo cerca de 5 µL dos hidrolisados foram injetadas em CLAE (Modelo série 200, Marca Perkin Elmer) equipado com um detector de índice de refração. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente, usando uma coluna analítica Polypore Ca (30 mm x 4,6 mm x 10 µm) e uma pré-coluna Polypore Ca (220 mm x 4,6 mm x 10 µm) com fluxo de 0,1 mL / min a 80°C (DRUZIAN, 2000).

Para a identificação dos monômeros, soluções aquosas de padrões de açúcares foram injetadas nas mesmas condições cromatográficas. A quantificação foi realizada por

construção de curvas de calibração (Área pico x concentração) de injeções de soluções de diferentes concentrações dos açúcares identificados como monômeros.

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Identificação taxonômica do fungo isolado do cacau

O fungo isolado do fruto de cacau apresentando morte descendente foi identificado taxonomicamente pela CEPLC como *Lasidioplodia theobromae*. A definição e a identificação taxonômica de algumas espécies em fungos são baseadas quase que exclusivamente em caracteres morfológicos dos esporos, e pouco se tem avançado na taxonomia molecular desse grupo de fungos. Apesar das espécies apresentarem variações fenotípicas, como cor, forma, dimensão do esporo e detalhes da parede e espessura das camadas dos esporos (WALKER; VESTBERG, 1998), essas diferenças não são sempre evidentes, o que demanda tempo e experiência em taxonomia para a identificação. Além disso, algumas espécies apresentam dimorfismo, ou seja, a formação de dois tipos diferentes de esporos, usualmente glomoide e acaulosporoide, e nem sempre os esporos obtidos de uma cultura apresentam todas as características necessárias para sua identificação morfológica (NOVAIS et al., 2010).

Portanto o fungo *Lasidioplodia theobromae* (sin.= *Botryodiplodia theobromae* Pat. (SUTTON, 1980) pertence à família da Botryosphaeria, pode ser encontrados tanto no estágio anamorfo (assexuado), denominado *Lasidioplodia theobromae* ou *Botryodiplodia theobromae*, quanto no estágio telemorfo (sexuado), denominado *Botryosphaeria* . É um fungo típico de regiões tropicais e subtropicais, sendo patogênico a numerosas espécies vegetais como: Coqueiro, Mangueira, Goiabeira, cacau, Videira, entre outras (NISHIJIMA et al., 2004; FREIRE et al., 2004). Estes micro-organismos infectam diferentes partes da planta como caule, folhas e frutos, em diferentes estágios do desenvolvimento. As colônias de *L. theobromae* são de coloração acinzentada a negras (a cor varia de acordo com o substrato), com abundante micélio aéreo (PEREIRA et al., 2006).

O interesse biotecnológico neste fungo tem sido devido a sua produção de enzimas como lacases, pectinases, glucanases, celulases, hemicelulase e amilases e também porque este fungo secreta no meio de cultivo um exopolissacarídeo que pode ser empregado em processos industriais (SALDANHA, 2007). O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, como as baseadas na reação em cadeia da

polimerase (PCR), têm permitido identificá-los, distinguir diferenças entre isolados de uma mesma espécie (AVIO et al., 2009) e perceber as relações entre espécies e populações, num grau de confiança que usualmente os estudos fenotípicos clássicos não permitem (STUKENBROCK; ROSENDAHL, 2005).

3.2 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo tem grande relevância nos processos fermentativos visto que a quantidade de células pode influenciar no bioprocesso. Esta etapa consiste na separação de uma população de micro-organismos que irão atuar no meio fermentativo (Figura 1).

Em cultivos com fungos filamentosos para a produção de biopolímeros a literatura cita duas maneiras de preparar o inóculo: a partir de esferas de meio BDA colonizadas pelo fungo de interesse (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2007) e o emprego de homogeneizado micelial obtido por triturar as esferas colonizadas com o fungo no meio de cultivo e a partir daí transferir uma quantidade padronizada para o meio fermentativo (STELUTI et al., 2004).

Embora as duas metodologias tenham sido testadas optou-se pela que emprega esferas colonizadas devido à facilidade de remoção das esferas fúngicas da biomassa após o período de fermentação por centrifugação do caldo fermentativo (Figura 1).

A goma recuperada do caldo fermentado por precipitação em etanol gelado apresentou uma coloração transparente e elevada viscosidade, o que são características bastante desejáveis para a indústria de alimentos (Figura 2).

O emprego de homogeneização micelial foi considerado mais adequado que as esferas colonizadas, pois se conseguiu obter uma melhor padronização da quantidade de inóculo. Nos testes realizados segundo esta metodologia à pH 5,0 e 10 g/L de sacarose comercial foi observado que a quantidade de inóculo exerceu uma influência na produção das frações. Uma quantidade de inóculo de 2 mL favoreceu maior produção da goma (5,24 g/L).

Para a biomassa residual pode-se observar que 20 mL de inóculo resultou em maior produção (18,24 g/L). Logo dependendo do foco do trabalho, se produção de goma

ou da biomassa residual, a quantidade de inóculo vai influenciar significativamente nos resultados encontrados (Tabela 2).

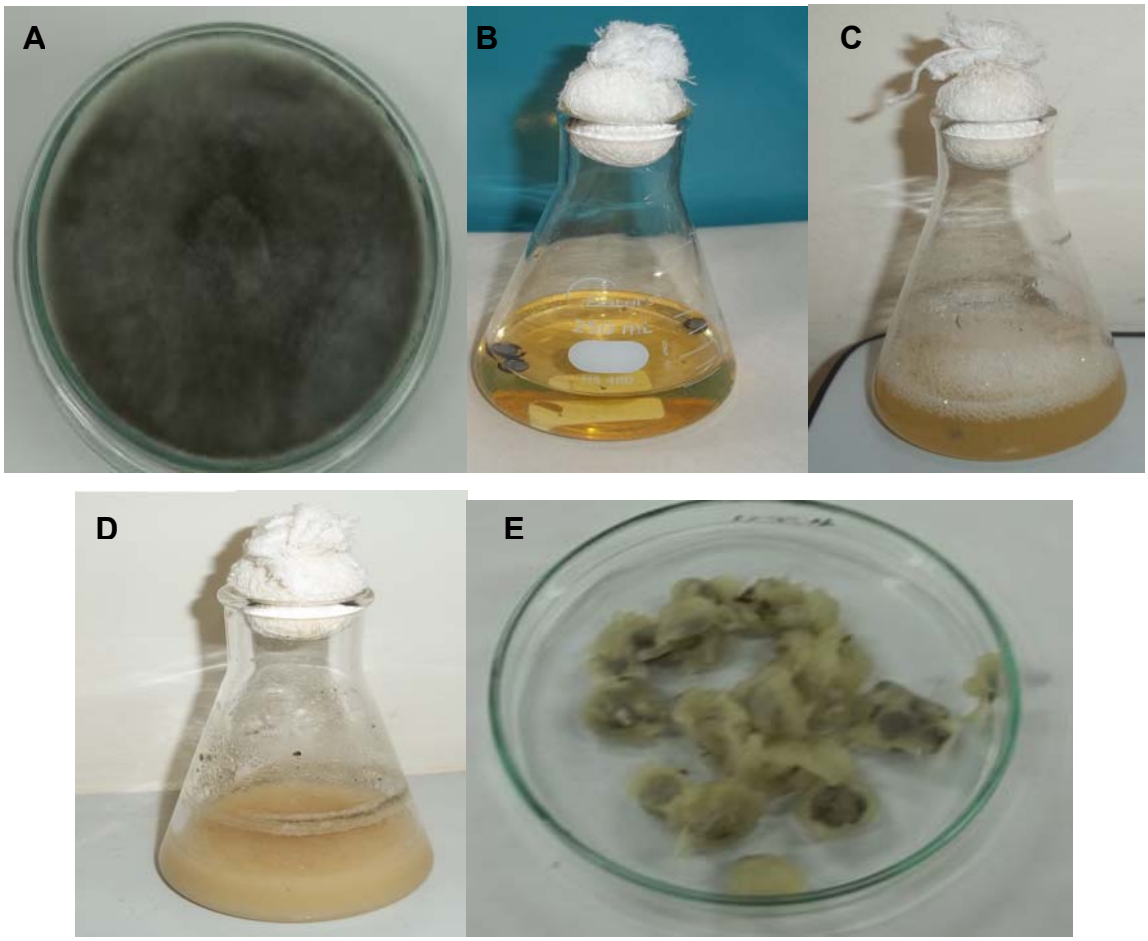


Figura 1: Constituintes do bioprocesso: (A) Fungo *L. theobromae*; (B, C, D) Meio líquido antes, durante e após fermentação com esferas colonizadas; (E) Colônias colonizadas recuperadas após a centrifugação.

Tabela 2: Efeito da quantidade de inóculo na produção da fração I e II da biomassa.

Quant de Inóculo (mL)	Fração I (g/L)	Fração II (g/L)
1	1,90	9,42
2	5,24	9,80
3	2,40	10,93
4	1,72	9,84
5	1,59	10,67
20	___	18,24

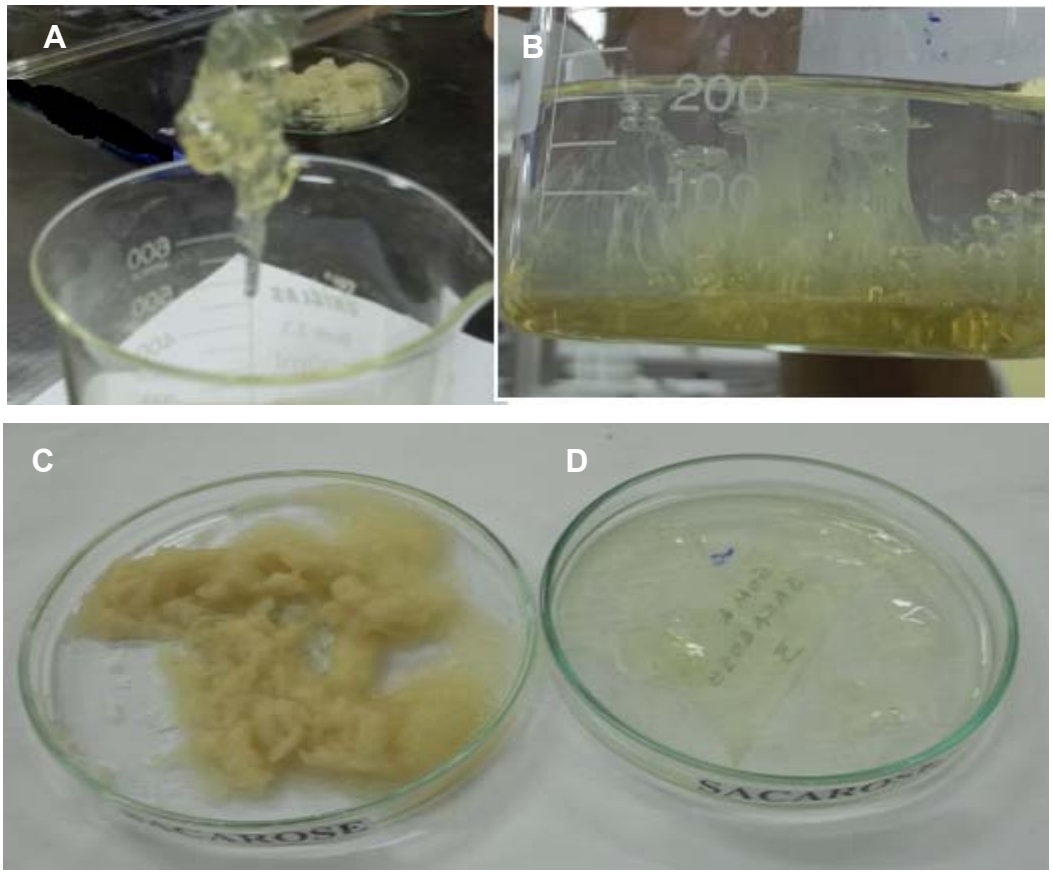


Figura 2: Precipitação da fração I em álcool (A, B) e fração II (C) e I (D) produzidas em meio com sacarose comercial.

É relevante citar que dependendo do pH do meio fermentativo pode haver formação, o que interfere no rendimento final devido a dificuldade de produção das frações de interesse. No pH 4,0 houve uma pequena formação de espuma após 24 horas de cultivo (Figura1). Essa formação de espuma não foi observada em pH 5,0. A formação de espuma pode estar relacionada à possível produção de material protéico. A produção de espuma no meio fermentativo não é algo desejável, já que pode reduzir a transferência de oxigênio às células microbianas, o que pode limitar a produção de biopolímero e também restringir o crescimento micelial do fungo. BARROSO (2010) relata intensa formação de espuma nos ensaios em pH 7,0 inviabilizando a produção de exopolissacarídeos nesse pH. A síntese de exopolissacarídeos geralmente ocorre apenas quando o micro-organismo é crescido aerobicamente, e é usualmente sobre condições de não limitação de oxigênio que um polímero com elevado peso molecular é produzido. Essa formação de espuma não foi observada com o uso de esferas colonizadas com fungos em nenhum dos pH testados.

Outra particularidade observada foi que a biomassa formada quando é empregada homogeneização micelial apresentou uma intensa pigmentação escura, o que não é desejável devido ao interesse em caracterizar as duas frações devido seu alto valor nutricional. FLORA e colaboradores (2010) nos seus ensaios fermentativos com o fungo *Lasidioplodia theobromae* relata a presença de pigmentação escura ao variar a aeração do meio. BARROSO (2010) também encontrou situação semelhante ao trabalhar com o mesmo fungo embora tendo como variável o pH de cultivo. Ambos os autores associaram a pigmentação escura à produção de melanina, um pigmento de cor marrom a negro, característico de *Lasidioplodia theobromae* quando submetido à condição de estresse.

3.3 Seleção da fonte de carbono para produção das frações I e II da biomassa

Pode-se observar na tabela 3 que o tipo de fonte de carbono e o grau de pureza interferem na produção da goma e biomassa residual. Embora estas não sejam produzidas nas mesmas proporções, a sacarose (comercial e grau analítico) mostrou ser a melhor fonte para a produção pelo fungo *Lasidioplodia theobromae* quando comparada as outras fontes como glicose e glicerina. A glicerina foi testada, visto ser um rejeito abundante em fábricas de biodiesel que precisa de uma destinação não poluente. Quando comparada as duas fontes de sacarose (grau analítico e comercial) pode-se notar produção da goma similares (2,65 g/L e 2,26 g/L) embora a pureza da sacarose grau analítico favorecesse uma maior produção. No entanto quando observada a produção da biomassa residual houve uma maior produção com a sacarose comercial (13,12 g/L) quando comparada a sacarose grau analítico (12,02 g/L), embora não seja uma diferença significativa. Apesar da sacarose (grau analítico) ter resultado em maior produção da goma, foi selecionada para os demais testes a sacarose comercial em razão de ter um custo mais acessível e ter conduzido a uma boa produção de ambas as frações.

A grande influência de diferentes fontes de carbono na produção das diferentes frações era esperada já que muitos micro-organismos produtores de polissacarídeos respondem de maneiras diferentes a esses fatores de crescimento e para alguns, a fonte de carbono é a principal determinante da quantidade e qualidade do polissacarídeo formado. Diferentes fontes de carbono podem dar origem a polímeros bioativos similares, com diferentes graus de ramificação e polimerização (DA SILVA et al., 2006).

Tabela 3. Produção da fração I e II da biomassa em função da fonte de carbono.

Fonte de carbono	Peso seco Fração I (g)	Produção Fração I (g/L)	Peso seco Fração II (g)	Produção Fração II (g/L)
Sacarose comercial	0, 20	2, 26	1, 18	13,12
Sacarose grau analítico	0, 24	2, 65	1, 08	12, 02
Glicose	0, 19	2, 13	0, 94	10, 49
Glicerina	0, 05	0, 56	0, 40	4,44

STELUTI e colaboradores (2004) estudaram a produção de goma pelo fungo *Botryosphaeria rhondina*, a forma telemorfa do fungo *Lasidioplodia theobromae*, com diferentes fontes de carbono. A melhor produção da goma foi com sacarose, sendo a produção da goma (em torno de 3,5 g/L) e da biomassa residual (17,7 g/L) tanto para sacarose grau analítico quanto para a comercial, indicando que a pureza do açúcar não interferiu nos resultados. Essas diferenças podem está relacionadas ao fato de as condições de cultivo e constituintes do meio serem diferentes dos utilizados neste estudo.

3.4 Efeito da variação do pH e da concentração da fonte de carbono na produção das frações I e II da biomassa

O fungo *Lasidioplodia theobromae* apresentou um bom desenvolvimento e bioconversão de sacarose comercial resultando maiores quantidades e goma e de biomassa residual, em todas as condições de pH e concentração testadas (Tabela 4). No entanto, nível de produção as melhores condições para produção de goma foram pH 4,0 e 40 g/L de sacarose comercial o que resultou em 8,64 g/L, e para biomassa residual, pH 5,0 com 50 g/L de sacarose comercial, resultando em 23,69 g/L.

IVANOVI e colaboradores (2011) produziram goma precipitável em álcool por *Lasidioplodia theobromae* variando a concentração de glicose de 20g/L a 60g/L encontrando a produção máxima de fração precipitável em álcool de 7,01g/L e de biomassa residual de 17,2 g/L. Na literatura foram observadas para produção de fração precipitável em álcool pelo fungo fungo*Phanerochaete chysosporium* ATC24725 (LEISOLA et al.,1982) concentrações de glicose que variam de 1,6 g/L até 60 g/L pelo fungo *Ganoderma lucidum* (HISIEH et al., 2006 apud CUNHA, 2008). Entretanto para a sacarose, têm sido observadas variações desde 30 g/L, para a produção de

exobiopolímeros pelo *Paecilomyces japonica* (BAE et al., 2000) até 150 g/L para escleroglucana por *Sclerotium rolfsii* ATCC201126 (FARIÑA et al., 1998).

Tabela 4. Efeito da variação da concentração de sacarose comercial e do pH na produção das frações I e II da biomassa pelo fungo *Lasidioplodia theobromae*.

Ensaio	pH	Sacarose (g/L)	Fração I ± dp (g)	Produção Fração I ± dp (g/L)	Fração II ± dp (g)	Produção Fração II ± dp (g/L)
1	4,0	10	0, 30 ±0,03 [b]	3,39± 0,4 [b]	1, 08±0,11 [a]	12, 01± 1,26 [a]
2	4,0	20	0,21 ±0,002 [c]	2,33 ± 0,38 [c]	1,15±0,12 [b]	12,81± 1,37[b]
3	4,0	30	0,31 ±0,02 [d]	3,45 ± 0,23 [d]	1,30±0,10 [c]	14,4± 1,15 [c]
4	4,0	40	0,78 ±0,01 [e]	8,64± 0,04 [e]	1,56±0,09 [d]	17,33± 0,94 [d]
5	4,0	50	0,62 ±0,06 [f]	6,86± 0,43 [f]	1,94±0,02 [e]	21,55± 0,26 [e]
6	5,0	10	0, 20 ±0,06 [g]	2,26± 0,12 [g]	1, 18±0,02 [f]	13, 12 ± 0,23 [f]
7	5,0	20	0,53 ±0,11 [h]	5,89 ± 1,33 [h]	1,64±0,13 [g]	18,25 ± 1,45 [g]
8	5,0	30	0,38 ±0,04 [i]	4,18± 0,53 [i]	1,40±0,22 [h]	15,58± 2,44 [h]
9	5,0	40	0,33 ± 0,06 [a]	3,69 ± 0,40 [a]	1,68±0,06 [i]	18,71± 0,40 [i]
10	5,0	50	0,61 ±0,04 [j]	6,74 ± 0,37 [j]	2,13±0,19 [j]	23,69 ± 2,09 [j]
11	6,0	10	0,17 ±0,04 [l]	1, 95 ± 0,22 [l]	1, 15±0,02 [l]	12,96± 0,26 [l]
12	6,0	20	0,16 ±0,02 [m]	1,73 ± 0,11 [m]	1,31±0,13 [m]	14,51± 1,46 [m]
13	6,0	30	0,38 ±0,03 [n]	4,22± 0,27 [n]	1,39±0,03 [n]	15,41± 0,31 [n]
14	6,0	40	0,42 ±0,05 [o]	4,64± 0,20 [o]	1,81±0,04 [o]	20,11± 0,46 [o]
15	6,0	50	0,37 ±0,04 [p]	4,07± 0,33 [p]	1,68±0,01 [p]	18,68± 0,11 [p]
16	7,0	10	0, 23 ±0,05 [q]	2, 52 ± 1,03[q]	1, 09±0,08 [q]	12,14± 0,91 [q]
17	7,0	20	0,49 ±0,06 [r]	5,45± 1,15 [r]	1,74±0,02 [r]	19,35± 0,29 [r]
18	7,0	30	0,41 ±0,02 [s]	4,59± 0,15[s]	1,21±0,08 [s]	13,42± 0,93 [s]
19	7,0	40	0,30 ±0,08 [t]	3,34± 1,61 [t]	2,04±0,04 [t]	22,68 ± 0,49 [t]
20	7,0	50	0,46 ±0,10 [u]	5,09± 1,13 [u]	1,82±0,04 [u]	20,25± 0,49 [u]
21	8,0	10	0,26 ±0,01 [v]	2,86± 0,06 [v]	1,06±0,04 [v]	11,75± 0,79[v]
22	8,0	20	0,27±0,05 [x]	2,98± 0,48 [x]	1,43±0,24 [x]	15,93±2,69 [x]
23	8,0	30	0,33 ±0,05 [x]	3,68± 0,52 [x a]	0,75±0,01 [z]	8,36 ± 0,15[z]
24	8,0	40	0,44 ±0,02 [w]	4,89 ± 0,69 [w]	1,36±0,23 [w]	15,06± 3,05 [w]
25	8,0	50	0,74 ±0,05 [k]	8,27± 0,48 [k]	1,20±0,01 [k]	13,33 ± 0,08 [k]

Média ± desvio padrão de análises em triplicata. * Valores que apresentam a mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas (p>0,05) pelo Teste de Tuckey a 95% de confiança.

Os gráficos (Figura 3) permitem visualizar a produção das frações quando o pH é testado em variadas concentrações de fonte de sacarose.

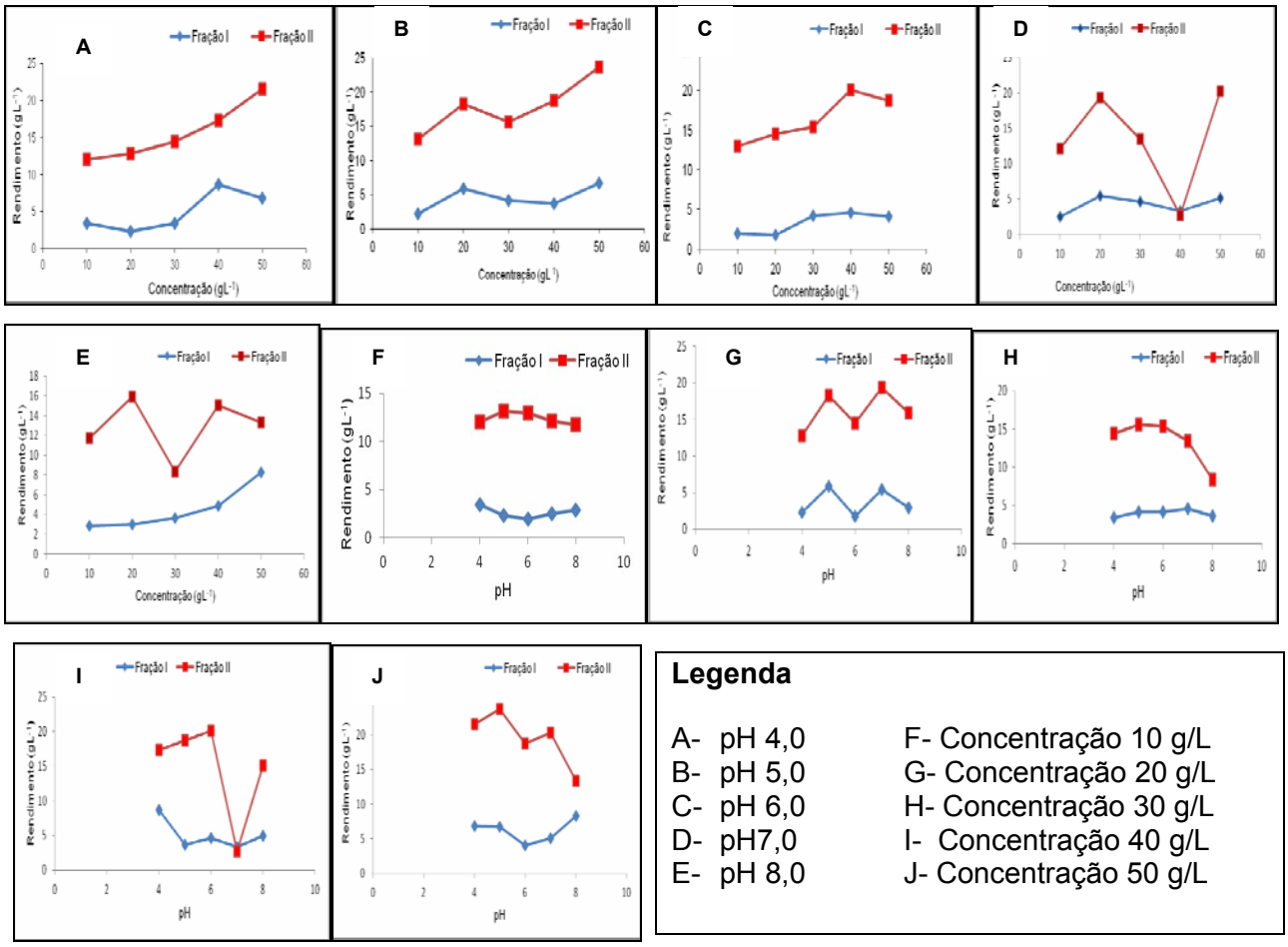


Figura 3. Efeito da concentração de sacarose comercial e do pH no meio fermentativo na produção da fração I e II da biomassa pelo fungo *Lasidioplodia theobromae*.

Pode-se notar que no pH 4,0 a goma apresenta a maior produção na concentração 40 g/L e depois há um decréscimo com o aumento da concentração. Comportamento diferente é observado no pH 8,0 que apresenta um crescimento a medida que o meio é a concentrado. A biomassa residual apresenta potencial de crescimento dos cultivos em pH 4,0 e 5,0. Nos demais cultivos há uma tendência para o decréscimo de biomassa residual à medida que o meio fermentativo é concentrado. Testes nas demais concentrações seriam necessários para confirmar essa tendência.

3.5 Composição centesimal das frações I e II da biomassa produzidas por *Lasidioplodia theobromae* do ensaio 10

A composição química da goma (Fração I) e biomassa residual (Fração II) produzida pelo *L. theobromae* é semelhante (Tabela 5) sendo fonte de carboidratos,

proteínas e lipídios. A goma apresenta maior teor de lipídios (28,79%) do que a biomassa residual (11,07%). Entretanto a biomassa residual é mais rica em proteínas e carboidratos (29,45 e 37,96% respectivamente) do que a goma (19,88 e 30,16%).

Tabela 5. Composição centesimal (%) da Fração I e II em base seca.

Composição	**Fração I**	**Fração II**
Umidade	17,29[a]	17,97[a]
Lipídio	28,79[b]	11,07[c]
Cinzas	3,88[d]	3,55[d]
Proteínas	19,88[e]	29,45[f]
Carboidratos	30,16[g]	37,96[h]
TOTAL	100	100

Valores que apresentam a mesma letra não apresentam diferenças significativas (p>0,05) pelo Teste de Tukey a 95% de confiança.

A literatura carece de dados sobre a composição centesimal de gomas e biomassa residual mas, devido à similaridade de constituintes existentes, parece haver uma correlação entre os componentes da parede celular microbiana e as frações que elas excretam em meio fermentativo. A parede celular compreende cerca de 20-30% do peso seco da célula fúngica (SMITH et al., 1999), e sua composição química, estrutura e dimensão variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o ciclo celular (KLIS et al., 2006). A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são mais freqüentes, embora a quantidade varie entre as espécies de fungos (ADAMS, 2004).

Segundo ANUPAMA & RAVINDRA (2000) a biomassa residual de bactérias é boa fontes de proteínas (50~83%) e ácidos nucléicos (15~16%), a de algas é boa fontes de proteínas (40~60%) e gorduras (5~10%) enquanto que a de fungos são boas fontes de proteínas (30~70%) e ácido nucléico (6~12%). CAMPIONI et al., (2010) analisando a composição centesimal da biomassa residual do fungo *Lasidioplodia theobromae* e *B. rhodina* cultivados em meio mínimo de Vogel e sacarose como única fonte de carbono (50g/L) por 96 horas observaram que a biomassa residual de ambos os fungos apresentam composição semelhante com relação à matéria seca, proteína bruta e extrato

etéreo. A porção de carboidratos foi 22,90% para *B. rhodina* e 28,76% para *L. theobromae.* A fração de lipídeos e gorduras dos fungos testados *B. rhodina* (5,16%) e de *L. theobromae* (5,33%). Os valores de proteínas brutas de *B. rhodina* (18,65%) e *L. theobromae* (18,03%) foram inferiores aos de 30-70% encontrados por ANUPAMA & RAVINDRA (2000). A medida de cinzas fornece indicação da riqueza da amostra em elementos minerais, embora não especifique quais tipos de minerais contêm na amostra. Foi verificado um valor 5% maiorde cinzas na biomassa residual de *B. rhodina,* 17,91% de minerais, contra 13,80% de *L. theobromae* (CAMPIONI et al., 2010). A exceção das cinzas, todos os constituintes da composição centesimal mostraram valores superiores aos encontrados por CAMPIONI e colaboradores (2010) para o fungo *L. theobromae*.

3.6 Análise por FT-IR

A espectroscopia FT-IR com transformada de Fourier permite uma avaliação estrutural de polímeros sintetizados por micro-organismos. A estrutura química de cada polímero, bem como os grupos substituintes que possui determina suas características reológicas e, portanto suas aplicações (PACE, 1991). Polissacarídeos contêm um significativo número de grupos hidroxilas, os quais exibem bandas acima do número de onda 3000 cm^{-1} (WANG et al., 2008).

Os espectros FTIR produzidos pela biomassa de *L. theobromae* estão demonstrados na Figura 8, mostrando a presença dos mesmos grupos funcionais, portanto de acordo com a composição centesimal (Tabela 5). A absorção na região próxima a 3400 cm^{-1} nas frações I e II é típica de grupos hidroxilas, o que sugere que a substancia tem carboidrato. Os sinais em 1643 e 1655 cm^{-1} para fração I e II, respectivamente, podem ser referentes às carboxilas dos grupos ésteres dos triglicerídeos da fração lipídica (VUYST; DEGEEST, 1999). Bandas em 885 e 896 cm^{-1} presentes na região de impressão digital do espectro (Figura 4) indicam a presença de ligações glicosídicas do tipo β em ambos. O sinal em 1060 e 1061 cm^{-1} corresponde ao estiramento dos grupos C-O presentes nos açúcares (OSIRO, 2002).

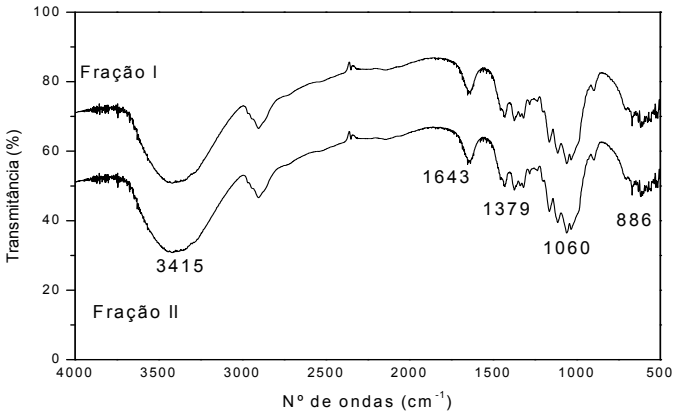


Figura 4. Espectros de FT-IR das frações I e II da biomassa do fungo *L.theobromae*.

HORN (2008) encontrou os mesmos sinais para espectros de goma xantana, embora possa haver deslocamento das bandas para frequências maiores ou menores. MONTEIRO et al., (2012) nos estudos sobre géis produzidos por bactérias encontrou os mesmos grupos característicos ao de HORN (2008) e aos encontrados neste trabalho.

3.7 Análise Termogravimétrica

Na figura 5 estão apresentadas as curvas de termogravimetria (TG) da fração I e II da biomassa produzidas pelo fungo *L. theobromae*, mostrando ambas três eventos, entretanto em temperaturas diferentes e com intensidades diferentes.

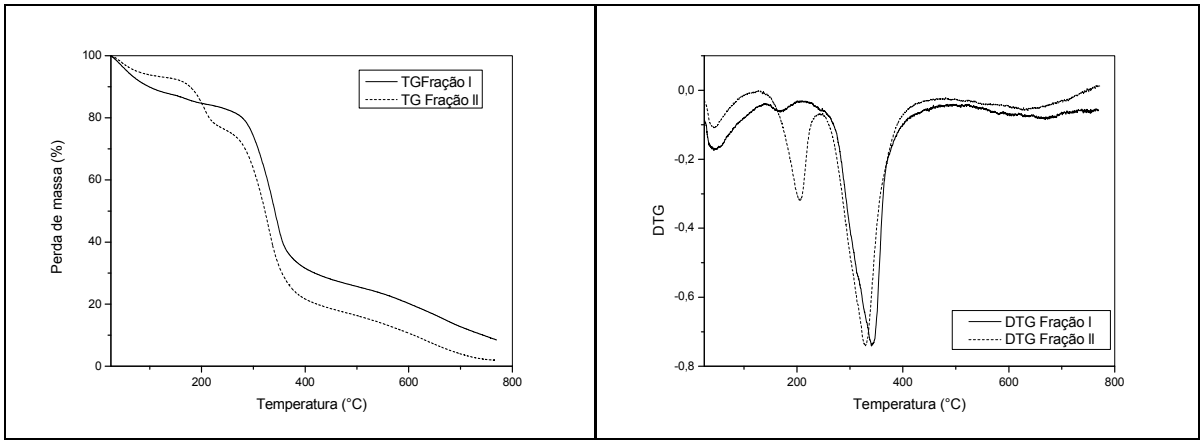


Figura 5. Curvas de termogravimetria (TG) e DTG da Fração I e II da biomassa produzida pelo fungo *L. theobromae.*

As curvas de termogravimetria (TG) apresentam perdas de massa em três estágios. O primeiro, entre 40-150°C, corresponde à perda de água do material, o segundo, entre 150-250°C está relacionado à decomposição dos constituintes das frações da biomassa e o ultimo estágio, entre 250-400°C à decomposição e carbonização do material (HONG et al., 2007). HORN (2008) analisando a perda de massa da quitosana e xantana também encontrou 3 eventos de perda de massa, sendo que os eventos para goma xantana ocorreram em temperaturas similares aos relatados neste estudo.Considerando que o maior percentual encontrado na Fração I e II foi de carboidratos (Tabela 6), a composição de monômeros desta fração foi realizada.

3.8 Composição monomérica de açúcares das Frações I e II

A concentração de glicose das amostras foi calculada através da equação da reta obtida pela curva padrão de glicose (y= 0,3716x + 0, 3741) e os resultados foram expressos em ART (açúcares redutores totais), visto que, além de glicose, podem ser quantificados também açúcares redutores como oligossacarídeos e celobiose.

Os teores de açúcares redutores totais para a Fração I (2,7%) e para Fração II (4,3%) encontram-se na Tabela 6. Comparado com outros estudos, este percentual de açúcar redutor se mostra alto, podendo indicar alto grau de ramificação das moléculas polissacarídicas, ou que nem todos os carboidratos presentes nas amostras se encontram na forma de polissacarídeo. SELVERIO et al., (2010) analisando o efeito de adição de sal sobre as propriedades reológicas da goma produzida por bactérias do gênero *Rhizobium* encontrou valores bem inferiores aos deste estudo (0,10-0,12%).

MONTEIRO e colaboradores (2011) em estudos sobre a caracterização de géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobim* encontrou para a goma (0,1%) resultados semelhantes aos de SELVERIO et al., (2010). Ambos os autores não determinaram a composição monomérica da biomassa residual. Entretanto, vale salientar que a comparação não pode ser direta uma vez que ambos os autores fizeram a separação e caracterização da Fração I, e que são gomas produzidas por micro-organismos diferentes. Por meio das análises por CLAE-IR foram obtidos os cromatogramas dos padrões de açúcares e das amostras das Frações I e II hidrolisadas (Figura 6 e 7).

Por comparação dos tempos de retenção dos padrões de glicose (t_R = 19,64 min), e manose (t_R = 21,87 min) com os tempos de retenção das amostras hidrolisadas consta-se que as frações são compostas unicamente por monômeros de glicose e manose (Figura 6 e 7), portanto ambas galactomananas com diferentes teores destes monômeros.

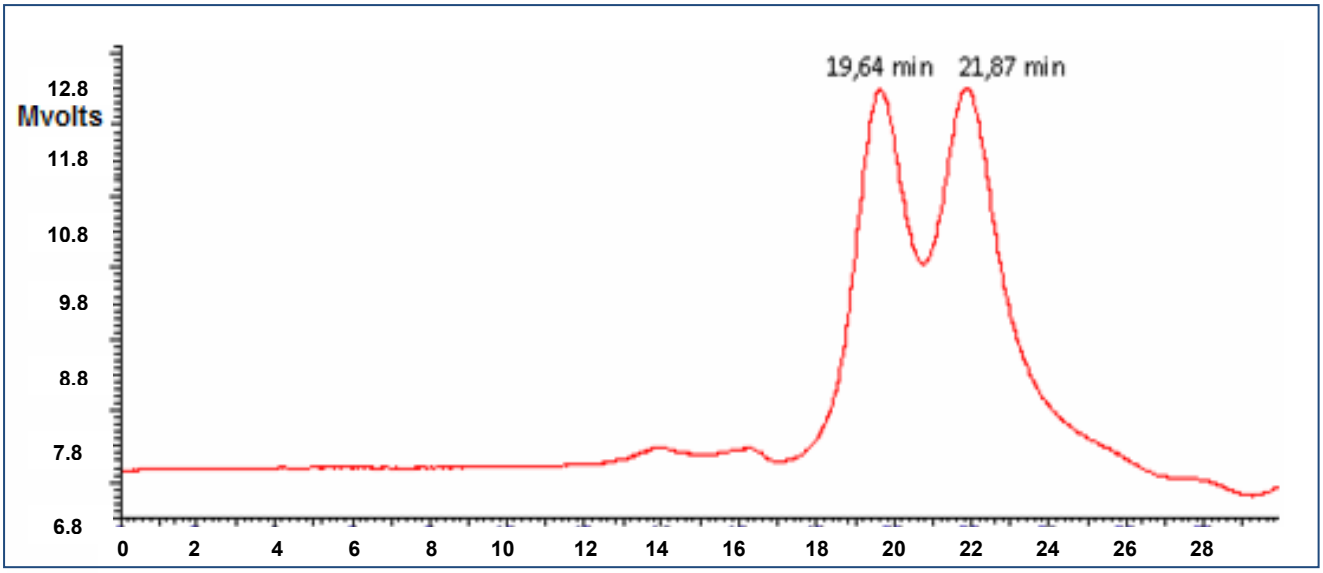


Figura 6. CLAE-IR dos padrões de glicose (19,64 min) e de manose (21,87 min).

Os coeficientes de determinação (Glicose: R^2=0,987; Manose: R^2=0,998) das curvas de calibração (Figura 6, Glicose: y=30551x + 13277; Manose: y=39606x - 5628), estão dentro dos parâmetros estabelecidos ($R^2 \geq 0,90$, INMETRO, 2003). A quantificação dos teores de glicose e manose que compõem a parte polissacarídica das Frações I e II constam na tabela 6.

Os resultados da hidrólise ácida, para açúcares neutros (Figura 8, Tabela 6), indicam uma semelhança na composição monomérica da goma e da biomassa residual produzidas por *Lasidioplodia theobromae*. A goma e a biomassa residual apresentaram glicose e manose nas relações molares aproximadamente de 1:2 e 3:1, respectivamente, podendo ser a fração II mais ramificada que a fração I, devido maior teor de ART. Micro-organismos de linhagens diferentes ou com diferenças apenas nas condições de cultivo produzem polissacarídeos semelhantes nos quais a cadeia principal, normalmente é a mesma, com variação apenas no grau de ramificação (SELVERIO et al., 2010).

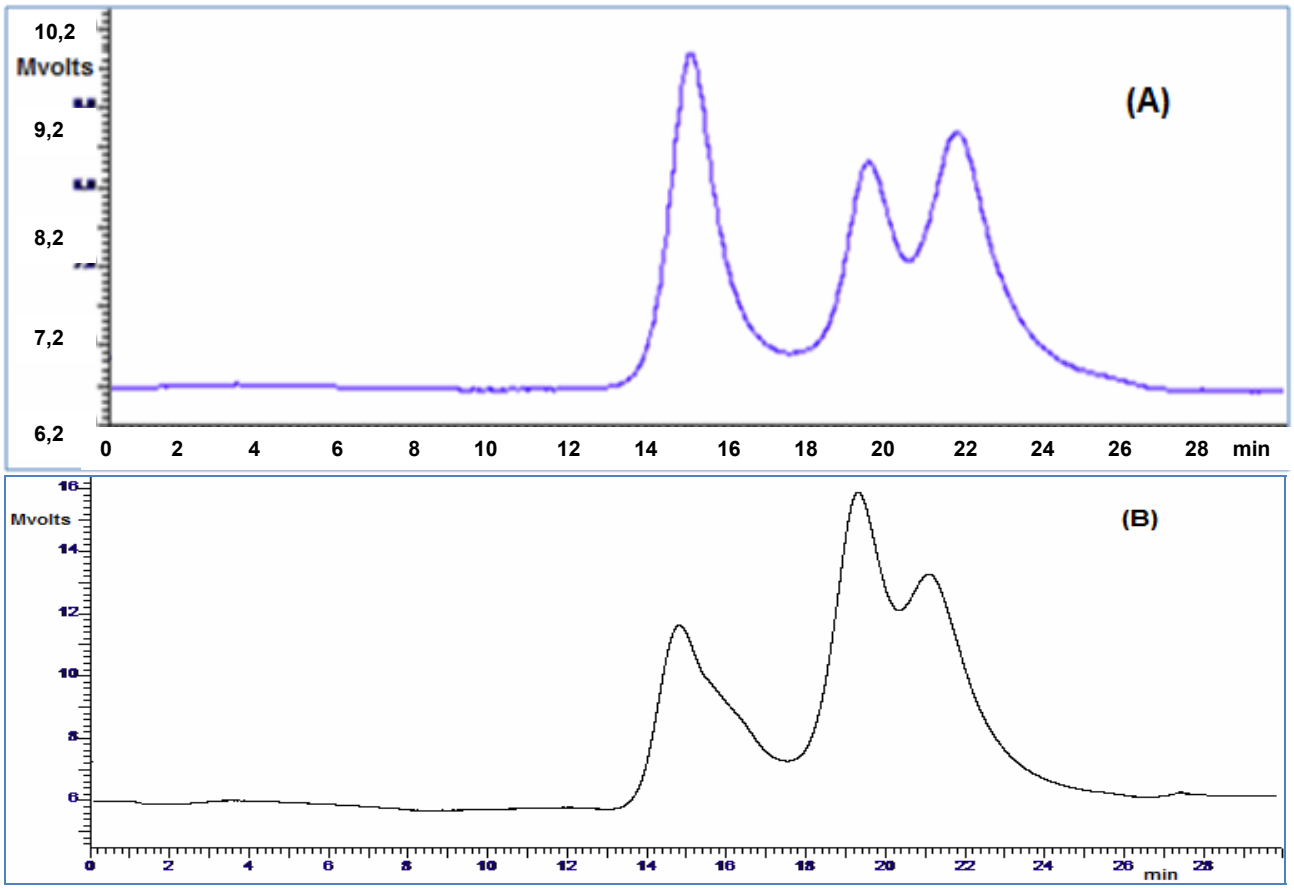


Figura 7. Cromatogramas CLAE-IR dos hidrolisados das Frações I (A), e fração II (B).

CASTELLANE e colaboradores (2007) analisando a composição em monossacarídeos dos exopolissacarídeos produzidos pelas estirpes de *Rhizobium tropici*, SEMIA 4077 e SEMIAAA 4080 cujo meio fermentativo consistia de RDM (*Rhizobium Definied Medium*) com vitaminas e glicerol com diferentes fontes de carbono (galactose, glicose e sacarose), na concentração de 10 g /L e incubadas em agitador rotatório por 144 horas a 140 rpm e 28°C, observaram que consistiam predominantemente de galactose e glicose, embora fossem observados traços de manose, ramnose, ácido glucurônico e ácido galacturônico, na composição do EPS das estirpes.

SELVERIO e colaboradores (2010) estudando a composição de monossacarídeos de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium* (dados da composição e condição do meio fermentativo não são descritos) também encontraram uma cadeia principal composta basicamente de glicose e galactose com traços de manose.

BONGIOVANI (2008) em estudos sobre as características reológicas do exopolissacarídeo botriosferana produzido pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em três fontes de carbono (glucose, frutose e sacarose) na concentração de 50g/L e meio de

Vogel sob agitação constante a 180 rpm, por 72 horas, à 28 ºC encontrou uma composição de monossacarídeos composta basicamente de glicose, embora os valores não tenham sido quantificados.

Tabela 6. Açúcares redutores e neutros e composição monomérica das frações de biomassa produzidas por *L. theobromae*.

Fração	Açúcar redutor (mg/mL)	Açúcar redutor (%)	Composição monomérica (mg/mL)		Composição monomérica (%)	
			Glicose	Manose	Glicose	Manose
Fração I	0,41[a]	2,70[c]	0,59[e]	0,94[g]	5,90[i]	9,40[l]
Fração II	0,65[b]	4,30[d]	1,27[f]	0,45[h]	12,70[j]	4,50[m]

Valores que apresentam a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey a 95% de confiança.

A composição de monossacarídeos encontrada neste estudo diferiu das relatadas por CASTELLANE (2007) e SELVERIO (2010) e seus respectivos colaboradores com relação aos monômeros que compõe a cadeia principal de EPS e quantidades encontradas. É importante mencionar que ambos os autores trabalharam com bactérias e condições fermentativas diferentes das usadas neste experimento. BONGIOVANI usou o fungo *Botryosphaeria rhodina*, forma amorfa do *Lasidioplodia theobromae*, e com relação o meio fermentativo, a concentração da fonte de carbono não foi à mesma usada neste ensaio. Todos os autores concordam que o tipo do micro-organismo, condições, composição de cultivo e do meio fermentativo vão influenciar na composição monossacarídica do EPS, sendo que um mesmo micro-organismo pode apresentar diferentes composições dependendo da variação destes fatores. Embora a literatura descreva a composição monossacarídica de EPS de diferentes bactérias e fungos, a biomassa residual destes microorganismos normalmente não é analisada.

4.0 Conclusão

A fermentação submersa da sacarose comercial na concentração 40 g/L em pH 4,0 pelo fungo *L. theobromae* isolado do fruto do cacau resultou em máxima produção da fração I (8,64 g/L) precipitável em álcool etílico, e quando fermentado a 50 g/L, pH 5,0, da fração II de biomassa residual (23,69 g/L). A análise por FT-IR e da composição

centesimal mostraram que as duas frações são bastante semelhantes, sendo fontes em carboidratos, proteínas, cinzas e lipídios em diferentes proporções. As duas frações apresentaram traços de açúcares redutores e consistem predominantemente de glicose e manose, em diferentes proporções, não sendo encontrados traços dos demais açúcares, portanto glucomananas com diferentes teores dos dois açúcares. A termogravimetria mostrou 3 eventos de perda de massa relativos a perda de água do material, a decomposição das frações e a carbonização do material. Estes parâmetros são importantes para caracterizar as frações da biomassa. Conclui-se que as duas frações possuem propriedades desejáveis para ampla utilização em processos biotecnológicos de alta relevância cientifica. Vale salientar que não existe relato cientifico sobre a produção e caracterização da biomassa fermentativa produzida por *Lasidioplodia theobromae* isolado do fruto do cacau infectado com morte descendente que tem causado perdas significativas na produção, notadamente na Bahia e Nordeste brasileiro, sendo que a produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares tem sido associada à capacidade do micro-organismo causar doenças nas plantas.

Referências

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger.* 2010, 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) universidade estadual do oeste do Paraná, Toledo.

ANUPAMA, E.; VINDRA. P. Value-added food: single-cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 459-479, 2000.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. **Association of Official Agricultural Chemists**, 1984. 937 p.

AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 242-253, 2009.

BAE, J.; SINHA, J.; PARK, J. P.; SONG, P. H.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica.* **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 482-487, 2000.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exoplissacarídeos fúngicos. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 29-42, 2004.

BARROSO, R. R. Avaliação da influência do pH de cultivo na produção de biopolímero pelo fungo *Lasidioplodia theobromae* em bioreator de bancada. 2010. Relatório PIBIC/CNPq, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

BEROVI Č, M.; HABIJANI Č, J.; ZORE, I.; WRABER ,B.; HOD ŽAR , D.; BOH , B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 1, p.77-86, 2003.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BONGIOVANI, R. A. M. Características reológicas do exopolissacarídeo botriosferana produzido pelo *botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em três fontes de carbono: glucose, frutose e sacarose. 2008, 113p. Dissertação (Mestrado em Ciêcnias de Alimentos) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON , F. A.; GADD , G. M.; RITZ , K. Growth and Function of FungalMycelia in Heterogeneous Environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 65, n. 3, p. 447-477, 2003.

CANUTO, A. P. Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. 2009, 105 p. Dissertação (Mestrado em Processos biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná, Paraná.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* iseffective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CAMPIONI, T. S.; OLIVEIRA, K. S.; LIMA, V. M. G. Análise bromatológica da biomassa de *lasiodiplodia Theobromae* visando sua aplicação como suplemento Alimentar. In: XXII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2010, São José do Rio Preto. **Anais**... São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo, 2010.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.

DA SILVA, C M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização Química de Glucanas Fúngicas e suas Aplicações Biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

DHANDHUKIA, P. C.; THAKKAR, V. R. Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic acid. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 707-712, 2007.

DRUZIAN, J. I. Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma *de Bradyrhizobium* isolados do solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna inguiculta* L). 2000, 198 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FARIÑA, J. I.; SINERIZ, F.; MOLINA, O. E.; PEROTTI, N. I. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii:* Influence of medium composition. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 9, p. 825-831, 1998.

FLORA, A. B.; LIMA, G. L; NETO, P. O. Influencia da aeração na produção de β- glucana por *Botryosphaeria rhodina.* 2010. Disponível em: http://prope.unesp.br. Acesso em julho de 2010.

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS. A. A. Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará. Fortaleza: **Embrapa AgroindústriaTropical** (Comunicado Técnico, 91), p. 6, 2004.

FUKUDA, E. K.; VASCONSELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKERS, R. F. H.; DA SILVA, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GERN, R. M. M.; WISBECK , E.; RAMPINELLI , J. R.; NINOW , J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of Pleurotus ostreatus biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 76-82, 2008.

GILAD, N. L.; BARNUN, N.; MAYER, A. M. The possible function of glucan sheath of *Botrytis cinerea*: Effects on the distribution of enzyme activities. **Microbiology Letters**, v. 199, n. 1, p. 109-113, 2001.

GUIMARÃES, L. B.; SANTOS, V. Z. R.; COVIZZI, L. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum var. caulivora*. **Brazilian Journal Foood Technolygy**, Preprint Series, n. 13, 2009.

HAWKSWORTH, D. L. The biodiversity os microosganisms and invertebrates: its role in sustainable agiculture .Walingford :C.A.B.International , 1991.

HORN, M. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico. 2008, 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade São Paulo, São Carlos.

HONG, P. Z.; LI, S. D.; OU, C. Y.; LI, C. P.;YANG,L.;ZHANG, C. H. Thermogravimetric Analisys of chitosan. **Journal of applied Polymer Science**, v. 105, p. 547-551, 2007.

HWANG, H. J.; KIM, S. W.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 309-319, 2003.

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização, Qualidade Industrial. Portaria INMETRO nº, de de de 2003. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/legislacao. Acesso em março de 2012.

IVANOV, R. C. Produção de biopolímero sintetizado pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em fermentação submersa**.** In: IX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 1., 2009, Paraná. **Anais**... Paraná: Universidade Tecnológica do Paraná, 2009. v. 1. p. 1-4, 2009.

KOCK, F. V. C.; FILHO, E. S.; OLIVEIRA, A. S.; CASTRO, E. V. R. Obtenção e caracterização do biopolímero β-(1-4)-D-glucosamina. 10° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2009, Foz do Iguaçu. **Tópicos temáticos**…Foz do Iguaçu: Universidade Federal de São Carlos, 2009.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 31, n. 3, p. 185-202, 2006.

KOLLÁR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biothecnology**, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.

LEISOLA, M. M.; BROWN, C.; LAURILA, M.; ULMER, D.; FIETCHER, A. Polysaccharide synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* during degradation of kraft lignin. **European Journal of Applied Microbiolology and Biotechnology**, v.15, p. 180-184, 1982.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. In: Wilmar, C. L. (Org.), **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 119-157, 2001.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p.7, 1999.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analitycal Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428,1959.

MONTEIRO, N. K.; SELVERIO, G. A.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização Química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium sp*. **Química Nova**, p. 1-4, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, princípios de bioquímica.** 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NISHIJIMA, W.; ZHU, I. J. Developing a broad disease resistence in carica papaya against fungal diseases. **Projet Proposal**, 2004, 30 p.

NOVAIS, C. B.; SOUZA, F. A.; SIQUEIRA, J. O. Caracterização fenotípica de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 4, n. 8, p. 806-896, 2010.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p, 2005. Disponível em: http:// www.ceplac.gov.br. Acesso em março de 2012.

PACE, G. W. Polímeros microbianos. In: BU'LOCK, J & KRISTIASEN, B. **Biotecnologia Básica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. p. 449-462**.**

PAVLOVA, K.; PANCHEV , I.; HRISTOZOVA , T.S. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 279-283, 2005.

PEREIRA, A.L.; SILVA, G.S.; RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31. p. 572-578, 2006.

SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; AUER, D. P. F.; GIBBS, P. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 12, p. 279, 1992.

SELVERIO, G. A; PENNA, A. L. B; CAMPOS-SÁS, L. F; SANTOS Jr, O; VASCONSELOS, A. F. D; SILVA, M. L. C; LEMOS, E. G. M; CAMPANHARO, J.C; SILVEIRA, J. L. M. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 895-899, 2010.

SMITH, G. K.; KAPTEYN, J. C.; VAN DEN END, H.; KLIS, F. M.; Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in microbiology**, v. 2, n. 4, p. 348-352, 1999.

STELUTI, R. M.; GIESE, E.C.; PIGGATO, M. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus Botryosphaeria SP., grown on defferent carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. ***J*ournal of basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.

STUKENBROCK, E.H.; ROSENDAHL, S. Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 743-752, 2005.

SILVA, J. B. A.; SANTOS, A. V.; VARGAS, F. P.; DRUZIAN, J. I**.** Preparação e caracterização de filmes de fécula de mandioca e nanowhiskers de celulose. In: 11 CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2011, Campos do Jordão. **Tópicos temáticos**...Campos do Jordão: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SUGUI, J. A.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Partial characterization of the extracellular matrix released by *Colletotrichum graminicola* onto artificial hydrophobic surface. **Physiological and Mololecular Plant Pathology**, v. 52, n. 6, p. 411-425. 1998.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes. **Commonweath Mycological Institute**, Institute, Kew Surrey, 1980, 696 p.
VUYST, L. D; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria, FEMS **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153–177, 1999.

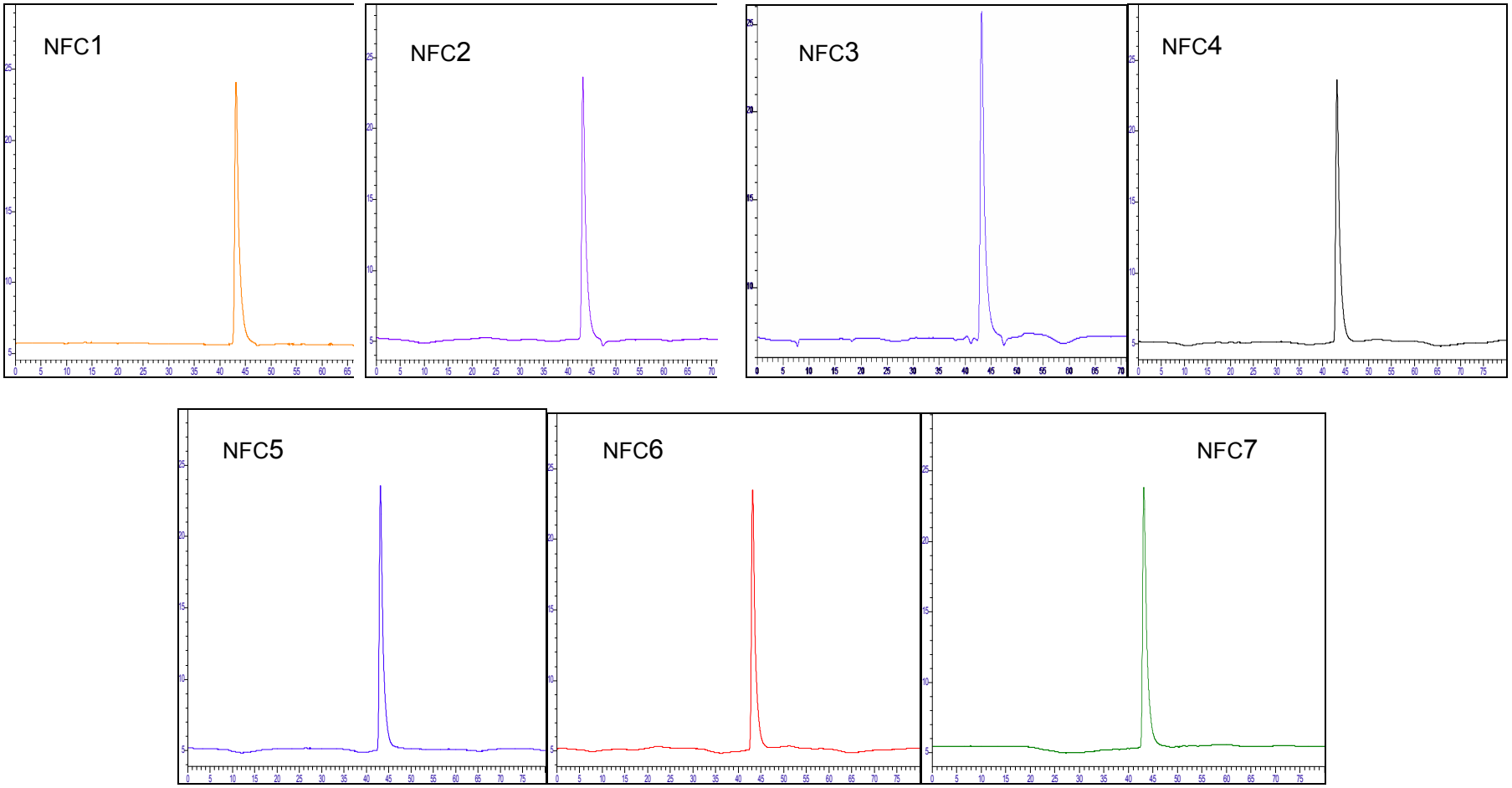
XIAO, J.; OHSHIMA, A.; KAMKURA, T.; ISHIYAMA, T.; YAMAGUSHI, I. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 7, n. 5, p. 639-644, 1994.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, n. 5, p. 575-579, 2004.

WANG, Y.; McNEIL, Production of the fungal exopolisaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium glucanicum* in an airlift reactor with an external loop. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 215-222, 1995.

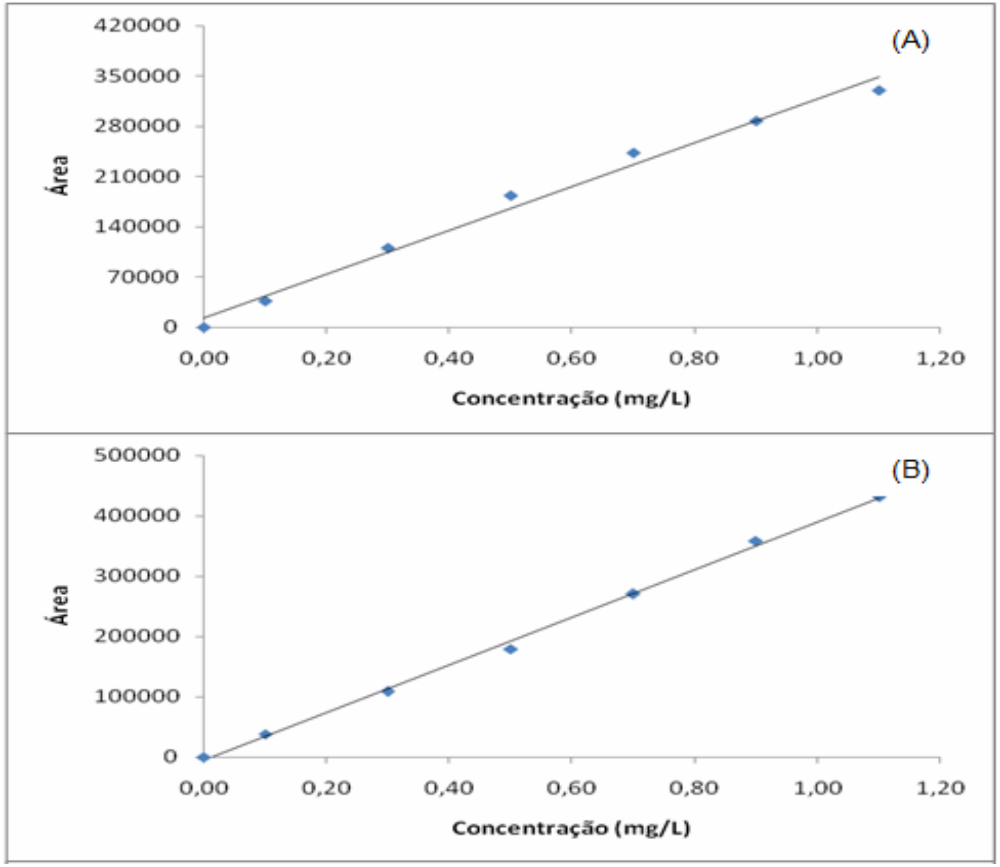
WALKER, C.; VESTBERG, M. Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*,*G. multisubstensum* and *G. fistulosum*. **Annals of Botany**, v.82, p.601-624, 1998.

ANEXO 1



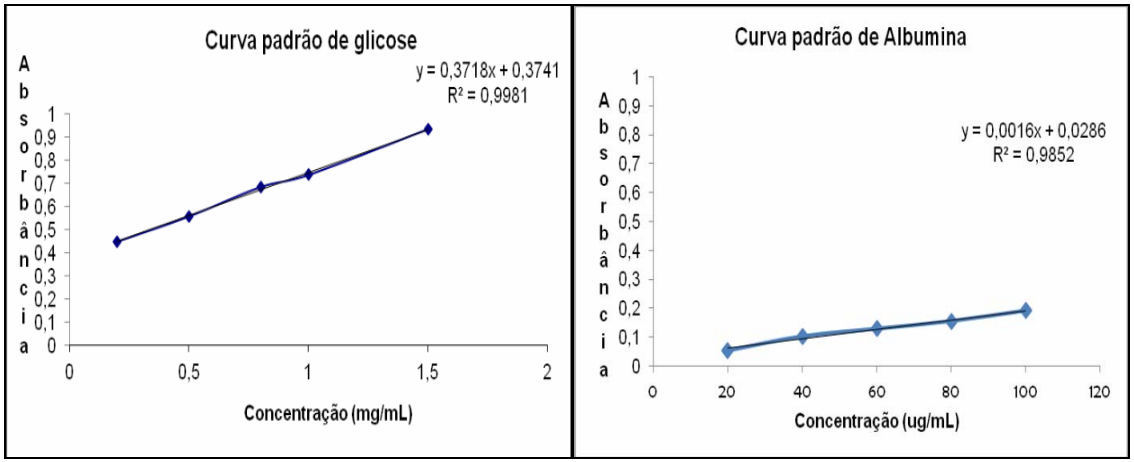
Cromatograma GPC CLAE-IR do perfil de eluição dos hidrolisados celulósicos de polpa de eucalipto obtidos em diferentes condições.

ANEXO 2

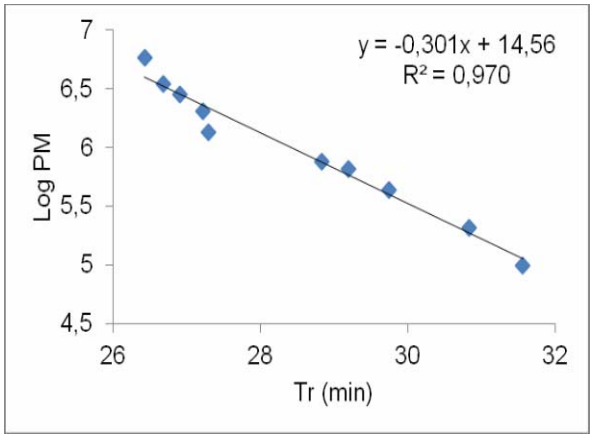


Curvas de calibração (área x concentração) dos padrões de (A) Glicose e (B) Manose (CLAE-IR) separadas por CLAE-IR.

ANEXO 3



Curva de calibração de glicose e albumina



Curva de calibração dos padrões de dextrana construída pelo $\log_{PM}$ versus o t_R obtidos por GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 em série.