

## *Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas*

### *Forager palm as raw material for the production of cellulolytic enzymes*

*Tamires Carvalho dos Santos<sup>1\*</sup>, George Abreu Filho<sup>2</sup>, Thiago José Honório Rocha<sup>3</sup>, Sandro Freitas Fonseca<sup>4</sup>, Marcelo Fran<sup>5</sup>*

**Resumo** - O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização da palma forrageira como principal substrato para a produção de enzimas celulolíticas, através da fermentação em estado sólido com o auxílio do fungo filamentososo *Aspergillus niger*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resíduos Agroindustriais, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. A palma foi desidratada até atingir aproximadamente 2% de umidade. As variáveis estudadas no processo fermentativo foram, a atividade de água (0,827, 0,892, 0,949, 0,988, 0,993) e o tempo de fermentação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Os resultados demonstraram a elevação na produção enzimática até o terceiro dia de fermentação, independentemente da atividade de água em todos os ensaios, após esse tempo de fermentação, a redução da atividade enzimática foi observada em todos os experimentos. Através dos modelos estatisticamente ajustados a otimização para a produção da CMCase (7,47 U/mL) ocorreu em 72,38 h e 0,949 de atividade de água enquanto que para a FPase (9,42 U/mL) o tempo de fermentação foi de 74,64 horas e 0,986 de atividade de água.

**Palavras-chave:** atividade de água, fermentação em estado sólido, *Nopalea coccinellifera*, tempo de fermentação

**Abstract** - This study aimed to evaluate the use of cactus as main substrate for the production of cellulolytic enzymes by solid state fermentation with the aid of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The experiments were conducted at the Laboratory of Agro-industrial waste, the State University of Southwest Bahia - UESB. The palm was dried up to about 2% moisture. The variables studied were the fermentation process, the water activity (0.827, 0.892, 0.949, 0.988, 0.993) and fermentation time (24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h). The results showed high enzyme production until the third day of fermentation, regardless of water activity in all trials, after the fermentation time, the reduction of enzyme activity was observed in all experiments. Through the optimization models statistically adjusted for the production of CMCCase (7.47 U/mL) occurred at 72.38 h and water activity of 0.949 while for FPase (9.42 U/mL) fermentation time was 74.64 hours and 0.986 water activity.

**Keywords:** Water Activity, Solid State Fermentation, *Nopalea coccinellifera*, Fermentation Time

## INTRODUÇÃO

O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do Século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, o crescimento econômico, a igualdade social e a sustentabilidade ambiental. (PINTO ET AL., 2005). Consequentemente o desenvolvimento de tecnologias limpas visando à produção de compostos orgânicos com aplicações industriais, a partir de recursos renováveis deve se tornar a nova matriz da produção industrial como é o caso da biomassa vegetal. Normalmente a composição da biomassa pode ser dividida em várias frações, como os açúcares, os lipídeos e outras frações mais complexas, como os carboidratos e as fibras, estes últimos constituem a maior parte da biomassa e

necessitam de rotas mais complexas para sua conversão. (GALEMBECK, 2009; GÓMEZ ET AL., 2008; CHAMPAGNE, 2008).

Normalmente essa composição da biomassa pode variar de acordo com a espécie vegetal, porém, a composição média consiste em 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Dentre os vegetais disponíveis no semi-árido nordestino a palma forrageira ou palma doce (*Nopalea cochenillifera*), tem sua aplicação limitada à alimentação animal (CHIACCIO ET AL., 2006). Essa planta é resistente, à seca, sobrevivendo com pluviosidade mínima, esta é amplamente difundida na região semiárida da Bahia, onde residem 48% da população estadual. O semiárido é caracterizado por solos rasos, pedregosos ou arenosos e além de pouca matéria orgânica. As precipitações pluviométricas são irregulares.

\*autor para correspondência

Recebido para publicação em 11/01/2012; aprovado em 26/07/2012

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Praça Primavera, 40, CEP 45700-00 Itapetinga. E-mail tamicarvalhods@gmail.com\*

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Praça Primavera, 40, CEP 45700-00 Itapetinga. E-mail georgeabreu16@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Praça Primavera, 40, CEP 45700-00 Itapetinga.

<sup>4</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Praça Primavera, 40, CEP 45700-00 Itapetinga.

A cobertura vegetal é constituída por plantas que suportam longos períodos de estiagem (CHIACCIO ET AL., 2006).

Devido a sua composição essa biomassa vegetal apresenta potencial biotecnológico para a produção de compostos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas, compostos de aroma, entre outros (SOCCOL ET AL., 2010). Entre esses biocompostos as enzimas são aplicadas em diversos processos industriais. Esse setor apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de diversos produtos além melhoramento dos processos e do desempenho dos produtos já existentes no mercado. No entanto, o custo de produção dessas enzimas é o principal fator que determinam a economia de um processo o que limita sua aplicação em grande escala. Reduzir os custos de produção é fundamental para amplificação dessa aplicação (SOCCOL ET AL., 2010). Nesse sentido estudar a aplicação da palma forrageira como matéria-prima para bioprocessos, pode viabilizar essa aplicação (ARAÚJO ET AL., 2008; DUBEUX JÚNIOR ET AL. 2010; GHORAI ET AL., 2009).

A palma forrageira é uma cactácea de origem mexicana, rústica, resistente e adaptada a regiões secas. No semi-árido brasileiro, essa forrageira é aplicada nos diversos sistemas de produção pecuário, no entanto, é uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades, podendo ser usada na alimentação humana, na produção de medicamentos, cosméticos e corantes, na conservação e recuperação de solos, como cercas vivas e paisagismo. Sua composição química relativa possui alto valor de nutrientes digestíveis totais. Os níveis de carboidratos solúveis também são elevados, bem como os teores de cinza, vitaminas e ferro, devem ser destacados os teores de cálcio (3%); potássio (2,5%) e fósforo (0,15%) além de baixos teores de matéria seca ( $11,69 \pm 2,56\%$ ), proteína bruta ( $4,81 \pm 1,16\%$ ), fibra em detergente neutro ( $26,79 \pm 5,07\%$ ), fibra em detergente ácido ( $18,85 \pm 3,17\%$ ) (CHIACCIO, 2006).

O uso comercial das enzimas esta relacionado a diversas indústrias, na de alimentos as enzimas são aplicadas na clarificação de sucos de frutas, esse processo melhora a sacarificação do suco, reduz os gastos com a energia durante o processo de produção, além de melhorar a cor e o aroma do suco, prevenir a formação de gel e aumentar o rendimento do suco (BON, 2008). Na indústria cervejeira as enzimas convertem os substratos a açúcares antes da fermentação alcoólica, além disso, controlam a turbidez durante a produção de cervejas livres de dextrinas, denominadas cervejas de baixa caloria ou cervejas light (WAINWRIGHT, 1995). Outro mercado de aplicação das enzimas é o processo de fabricação dos cereais para alimentação infantil, tais como farinha láctea (à base de trigo), mingau de milho, arroz e misturas de cereais e/ou na formulação de rações animais, essas enzimas são adicionadas para diminuir a viscosidade da mistura de cereais durante o processo de pré-gelatinização facilitando o escoamento pela tubulação (BON, 2008). Na

indústria de papel e, as enzimas são utilizadas no pré-tratamento de polpas celulósicas, melhorando a eficiência do branqueamento químico convencional e diminuindo a demanda de cloro, de modo que auxilia no controle da poluição por compostos organoclorados (BON, 2008). Na indústria de detergentes e produtos de limpeza, as enzimas aumentam a eficiência da lavagem a temperaturas mais baixas, as enzimas são utilizadas em detergentes em pó desde 1975, atualmente, 90% de todos os detergentes líquidos as contém (BON, 2008; MENDES ET AL. 2011).

O objetivo deste trabalho foi investigar a utilização da palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas através do processo de fermentação em estado sólido com auxílio do fungo filamentososo *Aspergillus niger*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Após a higienização e corte foram secos em estufa de secagem a 70°C por 24 horas (SOLAB), e triturados moinho tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulométrica aproximada de 2 mm. O teor de água inicial do substrato estudado foi de 2% foi obtido a partir do determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200). A massa seca foi quantificada em 12%, determinada em estufa de secagem a 105 °C (DELEO-A3 SEDT) por 24 horas. A atividade de água inicial foi 0,457.

O microrganismo utilizado na fermentação foi o fungo filamentososo *Aspergillus niger*, proveniente do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA-UESB). A espécie fungica foi inoculada em Agar batata dextrose (PDA HIMEDIA pH 5,02), a cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 VETEC a 0,01%, onde foi efetuada a contagem do número de esporos em suspensão utilizando câmara de Neubauer com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000). As fermentações foram realizadas em erlenmeyers contendo 10 g de resíduo, com a adição de  $10^8$  esporos por grama de substrato seco. Foram adicionados volumes de água estéril até os seguintes valores de atividade de água aproximada de 0,963, 0,976 e 0,983. Os cultivos foram conduzidos a 30°C em estufa bacteriológica (SL 101 SOLAB).

Após o processo fermentativo, foi adicionada a biomassa 50 mL de solução tampão citrato de sódio (VETEC) com o pH 4,8 a 50 mM, as amostras foram filtradas por processo de mecânico e o extrato enzimático bruto foi armazenado em tubos de polipropileno. Posteriormente esse extrato enzimático foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos em centrífuga (CETRIBIO modelo 80-2B) (SANTOS ET AL. 2011).

A atividade da enzima CMCase (endoglucanases) foi quantificada por meio da dosagem dos açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC) a 2% p/v diluído previamente na solução citrato de sódio. No controle da reação foram adicionados 0,5 mL da solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. O

branco da análise continha 0,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) solução de e 0,5 mL de solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 50°C por 10 minutos. Após esse tempo as reações foram interrompidas com a adição de 0,5 mL da solução de DNS. Os tubos foram submergidos a água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (GHOSE, 1987).

A atividade FPase (exoglucanases e endoglucanases) foi determinada por meio da dosagem açúcares redutores liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 x 6,0cm. Foram adicionados 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. No controle da reação foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, enquanto que no controle do substrato foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro. Após 1 hora incubados em estufa foram adicionados 3 mL de solução de DNS aos tubos reações e controles, com posterior fervura em banho-maria. A posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (GHOSE, 1987).

A curva de calibração padrão para determinação enzimática foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L pelo método do DNS (Miller, 1959). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U/g de resíduo fermentado. A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

A otimização da produção de enzimas foi realizada analisando duas variáveis independentes a atividade enzimática e a atividade de água, com três repetições amostrais. Para determinar o efeito dessas variáveis sobre a produção de enzimas, foi conduzido um experimento em esquema fatorial 5 X 5, no qual cinco níveis foram de atividade de água (0,827, 0,892, 0,949, 0,988, 0,993) e cinco níveis para o tempo de fermentação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h). Os dados foram ajustados a um modelo quadrático completo (todos os efeitos linear e quadrático principal e todas as interações de duas vias),

Representam o efeito constante no processo foi elaborado sobre o modelo de regressão não linear ajustado sobre os dados experimntais encontrados. O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System*® (SAS) versão 8.0, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software gráfico *Sigma Plot*® versão 11.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de FES ocorre a biotransformação do meio de cultivo em biomassa fungica através da produção de proteína microbiana e a excreção de enzimas. A celulose é hidrolisada inicialmente pelas endoglucanases, essas enzimas ao decomporem os polissacarídeos, de forma aleatória, produzem terminais para as exoglucanases atuarem (BALAT & BALAT, 2008). A tabela 1 encontra-se os resultados da para os modelos reduzidos para cada atividade de água bem como os coeficientes de variação para cada equação. Os dados indicam que todos os modelos são estatisticamente significativos (F> valor crítico, valor P <0,001).

**Tabela 1** – Modelo de ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA. Equações quadráticas obtidas através de regressão não linear.

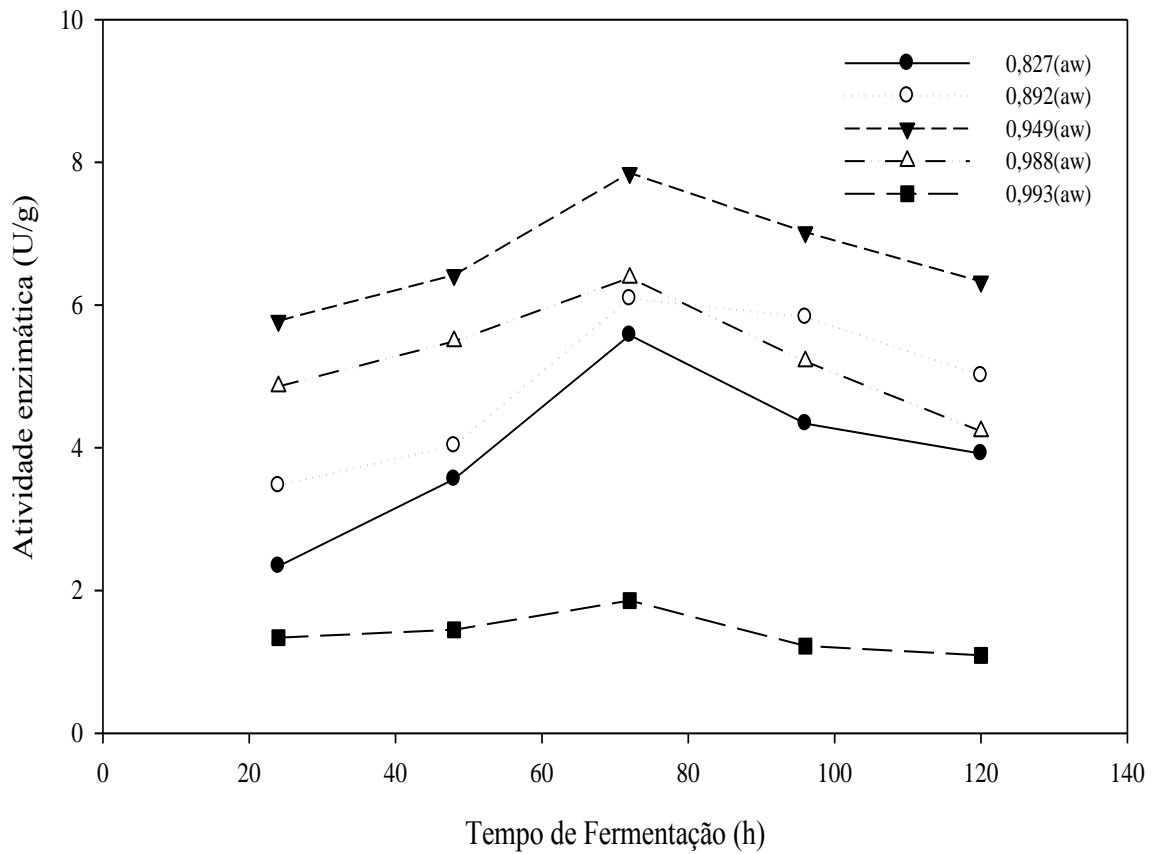
Atividade de água	Equação	R <sup>2</sup>	F	P	CV %
CMCase					
0,827	-238,269 +148,942 x -16,634x <sup>2</sup>	0,739	2,54	0,0005	1,83
0,892	-785,734 + 348,064x - 33,863x <sup>2</sup>	0,888	3,76	0,0003	7,92
0,949	-2090,005 + 622,311x - 44,217x <sup>2</sup>	0,880	1,23	<0,0001	1,32
0,988	1076,147 -369,482x + 33,323x <sup>2</sup>	0,805	4,31	<0,0001	5,48
0,993	1089,182 -1365,559x +440,332x <sup>2</sup>	0,798	2,22	0,0007	3,94
FPase					
0,827	-661,087 +252,527x -21,213x <sup>2</sup>	0,903	1,09	0,0002	2,37
0,892	-915,142 +319,773x -25,420x <sup>2</sup>	0,711	2,93	0,0004	1,25
0,949	1457,357 -401,347x +28,404x <sup>2</sup>	0,784	4,38	<0,0001	2,16
0,988	2270,225 -546,861x +33,747x <sup>2</sup>	0,988	3,44	<0,0001	3,80
0,993	1,287 +1,102 x -0,00631x <sup>2</sup>	0,967	1,57	0,0005	4,51

Os valores ótimos de tempo e atividade de água para a ajustados estão relacionados na Tabela 2. CMCCase, FPase, obtidos através da interação dos modelos

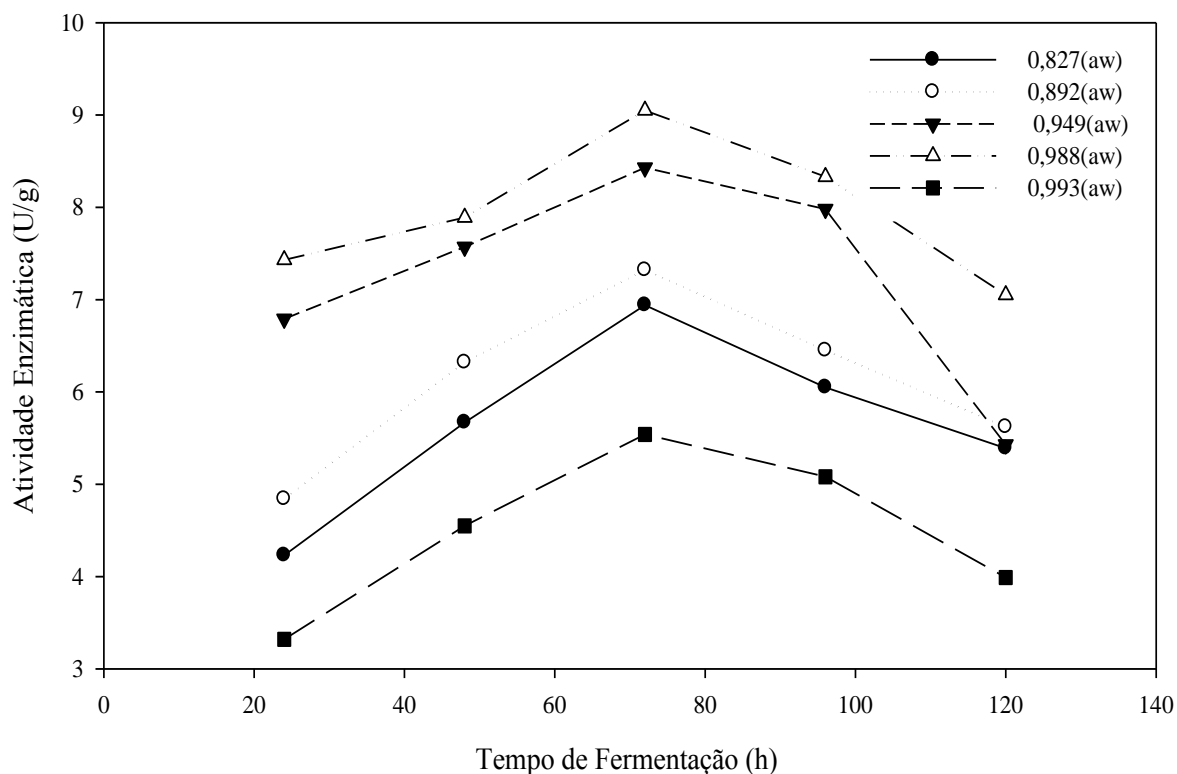
**Tabela 2** – Otimização do efeito da atividade de água com tempo de fermentação

Enzimas	Tempo de Fermentação (h)	$a_w$	Atividade Enzimática (U/mL)
CMCase	72,38	0,949	7,47
FPase	74,64	0,986	9,42

O efeito da umidade e do tempo de fermentação sobre as atividades das enzimas estudadas estão demonstradas nas Figuras 1 e 2.



**Figura 1-** Atividade de enzimática das enzima CMCCase em função da atividade de água ( $a_w$ ) e tempo de fermentação.



**Figura 2** - Atividade de enzimática da enzima FPase em função da atividade de água (a<sub>w</sub>) e tempo de fermentação.

Constatou-se que nesse experimento o tempo de fermentação influenciou significativamente com a produção enzimática onde o tempo médio entre 70 a 75 horas ambas atividades enzimáticas. Uma hipótese para esta ocorrência seria que a presença dos nutrientes dispersos ao longo da fermentação pode ter contribuído para o crescimento do microrganismo, e o decaimento destes nutrientes ao longo do tempo pode ter interferido na atividade enzimática, e com isso houve o decaimento da produção microbiana e conseqüentemente a produção enzimática.

A umidade é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em estado sólido. O teor de água adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor (SANCHEZ, 2009). No presente estudo foi observado que abaixo da atividade de água de 0,95 e acima de 0,98, houve a diminuição na produção das enzimas. Fato que pode estar relacionado com a inibição do fungo, marcado pela extrapolção do nível de água ideal para o desenvolvimento da linhagem selecionada, o

que poderia estar influenciando no metabolismo responsável pela produção da enzima.

Durante o processo fermentativo as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular. As endoglucanases clivam as ligações β-(1-4)-glicosídicas em regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas. As exoglucanases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia. O melhor tempo de produção para as enzimas foi 72 horas de fermentação com a atividade de 7,85 U/g para CMCase em uma atividade de água quantificada a 0,949, já para FPase a melhor atividade enzimática encontrada foi de 9,05 U/g a 0,988 (a<sub>w</sub>).

O decréscimo na atividade da enzima com o aumento do tempo de incubação pode ser devido à produção de co-produtos resultante do metabolismo microbiano, além do esgotamento de nutrientes, inibindo o crescimento do fungo e a formação da enzima (GUPTA, 2010; SHAFIQUE, 2009). Enzimas geralmente apresentam mecanismo de controle da expressão que podem ser estimulados ou inibidos por produtos do meio. Os produtos finais de uma dada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Esse mecanismo é conhecido como *Feedback* negativo ou autoalimentação (WHITAKER, 1994). Biazus et al. (2006), observaram

que a produção de enzimas, à princípio, é lenta, acelerando até alcançar seu valor máximo, a partir desse momento, a presença de metabólitos secundários promove a inibição na excreção enzimática promovendo a redução na atividade enzimática (DANTAS, 2002; SANTANA 2002), este processo também foi observado no presente trabalho. Omemu et al., 2005 obtiveram maior rendimento

de hidrólise do amido de mandioca por *A. niger* após 72 horas de fermentação, concordando com Alva et al., 2007 que também relataram uma maior atividade enzimática por *Aspergillus*. Resultados similares ao presente trabalho.

Abaixo segue tabela (Tabela 5) comparativa dos resultados para as enzimas aqui estudadas expressas por valores quantificados por pesquisadores atuais.

**Tabela 5** – Valores comparativos encontrados em demais pesquisas para enzimas.

Autor	Enzima	Substrato	Microrganismo	Atividade
Jang e Chen, 2003.	CMCase	CMC e sulfato de amônio, uréia e peptona	<i>Actinomicetos</i> <i>Streptomyces</i>	40,3 U/mL
George et al., 2001.	CMCase	Farelo de trigo	<i>Thermomonospora sp.</i>	8,5 U/mL
Jorgensen & Olsson, 2006.	FPase	Pinheiro	<i>Penicilium brasilianum</i>	0,59 U/mL
Adsul et al., 2004.	FPase	Bagaço de cana	<i>Trichoderma viride</i>	0,4 U/mL

Em todos os trabalhos citados anteriormente os tempos de incubação variaram de 7 a 10 dias, bem maiores que aqueles utilizados que neste trabalho. Pode-se perceber que valores superiores nas atividades enzimáticas em trabalhos com suplemento de carbono e nitrogênio no que se diz respeito à CMCase, porém é possível notar que no experimento aqui realizado as atividades de FPase é superior a aqueles apresentados com outros substratos. É importante ressaltar que não foi utilizado nem um tipo de indutor, suprimento, além da palma *in natura*, ou pré hidrólise do substrato, demonstrando assim que as enzimas são constitutivas.

A melhor atividade de enzimática foi 7,85 U/g para CMCase em uma atividade de água quantificada a 0,949, já para FPase a melhor atividade enzimática encontrada foi de 9,05 U/g a 0,988 ( $a_w$ ). Nesse trabalho o fungo sintetizou as enzimas sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além da celulose e outros nutrientes encontrados na palma forrageira e água em diferentes teores e da celulose existente no substrato, demonstrando que é uma enzima constitutiva.

## CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a estirpe *Aspergillus niger* é bastante promissora, no que se diz respeito à obtenção de enzimas celulósicas, a análise obtida indica o tempo de 72 horas como ponto ótimo para produção de celulasas na palma forrageira. Em relação à produção CMCase o teor de água mais representativo foi a 80% de teor de água o que representa uma atividade de água quantificada a 0,949, já para FPase indica que a otimização do bioprocessamento, a melhor atividade enzimática encontrada foi de 9,05 U/g a 0,988 ( $a_w$ ) o que representa 90% de teor de água.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de Iniciação

Tecnológica e Científica, e ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo apoio financeiro.

## LITERATURA CITADA

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y. Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B. S.; BHAVYAD, P. J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B. S.; VARALKSHMI, K. N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. African Journal of Biotechnology, v.6, p.576-581, 2007.

ARAÚJO, L. F.; SILVA, F. L. H.; BRITO, E. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S.; SANTOS, E. S. Enriquecimento proteico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.2, 401-407, 2008.

BALAT M.; BALAT H. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science. v.34, p.551-573, 2008.

BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.26, p.787-792, 2006.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S., Corvo, M. L., Vermelho, A. B., Paiva, C. L. A., Ferrara, M. A., & Coelho, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. Environmental Progress, n.27, p.51-57, 2008.

- CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. *Bahia Agrícola*, v.7, n.3, p.39-49, 2006.
- DANTAS, B.F. Atividade amilolítica e qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao alagamento. Botucatu: Programa de Pós Graduação em Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2002, 64p. Tese doutorado.
- DUBEUX JÚNIOR, J. C. B.; ARAÚJO FILHO, J. T.; SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; SANTOS, D. C.; PESSOA, R. A. S. Adubação mineral no crescimento e composição mineral da palma forrageira –Clone IPA-201. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.5, n.1, p.129-135, 2010.
- GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. *Química Nova*, v.32, p.571-581, 2009.
- GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal Biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, v.42, p.577-587, 2009.
- GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v.59, p.257-268, 1987.
- GUPTA, A.; GAUTAM, N.; MODI, D. R. Optimization of  $\alpha$ -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, v.1, p.1-8, 2010.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v.34 n.5, p.831-840, 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p.426-429, 1959.
- OMEMU, A. M.; AKPAN, I.; BANKOLE, M. O.; TENIOLA, O. D. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. *African Journal of Biotechnology*, v.4, p.19-25. 2005.
- PINTO, G. A. S.; BRITO E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. Comunicado Técnico 102, EMBRAPA, ISSN 1679-6535, Fortaleza CE, 2005.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v.27, n.21, 85-94, 2009.
- SANTANA, J. C. C. Recuperação das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/  $\text{CaCl}_2$  para uso como biocatalizador amiláceos. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002, 217p. Dissertação Mestrado.
- SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v.32, p.87-96, 2011.
- SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular  $\alpha$ -amylase activity. *Pakistan Journal of Botany*, v.41, p.897-905, 2009.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, v.101, p.4820-4825, 2010.
- WAINWRIGHT, M. Introduccion a la biotecnologia de los hongos. Zaragoza: Acribia. 1995, 228p.
- WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences. 2. ed. Dekker: Boca Raton, 1994, 270p.