

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

RAFAEL SANTOS DREHER

**ESTUDO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE
Trichoderma reesei NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA DA CASCA DO CARÁ
(*Dioscorea alata*).**

João Pessoa - PB

2025
RAFAEL SANTOS DREHER

**ESTUDO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE
Trichoderma reesei NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA DA CASCA DO CARÁ
(*Dioscorea alata*).**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação de
Engenharia Química do Centro de
Tecnologia da Universidade Federal da
Paraíba em cumprimento aos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.

Orientador

:

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D771e Dreher, Rafael Santos.

ESTUDO DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA DE EXTRATO
ENZIMÁTICO DE *Trichoderma reesei* NA HIDRÓLISE DE
BIOMASSA NA CASCA DO CARÁ (*Dioscorea alata*). / Rafael
Santos Dreher. - João Pessoa, 2025.

32 f. : il.

Orientação: Carlos Alberto Bispo de Sousa.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Fermentação em Estado Sólido. 2. Amilase. 3.
Cará. 4. *Trichoderma reesei*. 5. Hidrólise Enzimática.
I. de Sousa, Carlos Alberto Bispo. II. Título.

UFPB/CT/BSCT

CDU 66.01(043.2)

2025

RAFAEL SANTOS DREHER

**ESTUDO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE
Trichoderma reesei NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA DA CASCA DO CARÁ
(*Dioscorea alata*).**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação de
Engenharia Química do Centro de
Tecnologia da Universidade Federal da
Paraíba em cumprimento aos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.

:
Aprovado em 28 de abril de 2025

BANCA EXAMINADORA



**Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa - DEQ/CT/UFPB
(Orientador)**



**Profa. Dra. Rebeca Tibau Aguiar Dias - DEQ/CT/UFPB
(Avaliadora)**

Documento assinado digitalmente



JOSE ELSON SOARES FILHO

Data: 06/05/2025 13:50:32-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. José Elson Soares Filho - DEQ/CT/UFPB
(Avaliador)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais: ao meu pai Marlon, por ser minha figura de calma e segurança, estando sempre pronto para me ouvir e apoiar; à minha mãe, Roselia, por ser meu porto seguro, fazendo o que quer que seja em prol da minha felicidade. Sem a presença deles, jamais teria chegado aqui, tudo é para eles.

Agradeço ao meu irmão, Samuel, pela companhia e por estar ao meu lado durante todos esses anos. Te admiro.

Agradeço à minha tia Reijane (in memoriam) pelos cuidados e por me ensinar tanto sobre o amor e o poder da união. Saudade.

Agradeço aos meus colegas de faculdade pela companhia em todos os desafios da graduação. Em especial à Maria Luisa, Lucas e Carlos pela amizade de anos, por todas as noites viradas fazendo trabalhos e por estarem sempre disponíveis a ouvir e ajudar. Por isso sou eternamente grato.

Agradeço aos meus amigos por tornarem essa jornada mais divertida, leve e inesquecível.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Bispo, por toda a paciência, disponibilidade e conhecimento compartilhado.

Agradeço ao LPFD, e todos aqueles envolvidos, pela ajuda fornecida e por me acolherem de braços abertos.

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba, em especial aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química por todo o auxílio e orientação.

A prática é o critério da verdade.

Karl Marx

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação do extrato enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* na conversão da biomassa da casca do cará em açúcares fermentescíveis. Para isso, foi realizada a produção de amilases por meio de fermentação em estado sólido (FES), utilizando um meio composto por sabugo de milho e farelo de trigo. O microrganismo foi cultivado em substrato umidificado e incubado por sete dias, seguido da extração do extrato enzimático bruto com tampão citrato de sódio. A atividade amilolítica foi determinada por meio da quantificação de açúcares redutores, utilizando o método do ácido dinitrossalicílico (DNS). Um planejamento fatorial 2² foi aplicado para investigar o efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima, sendo observada maior influência do pH nas condições testadas. A melhor condição (pH 4,8 e 50 °C) foi utilizada para a realização da hidrólise enzimática da biomassa da casca do cará, monitorando a liberação de açúcares redutores ao longo do tempo. Os resultados demonstraram a viabilidade do processo, com aumento gradual da concentração de açúcares e alta produtividade nos minutos iniciais. Conclui-se que a utilização do extrato enzimático proveniente da FES é uma alternativa promissora e de baixo custo para a conversão de resíduos agroindustriais em compostos de valor agregado, como os açúcares fermentescíveis, com potencial aplicação na produção de bioetanol de segunda geração.

Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido; Amilase; Cará; *Trichoderma reesei*; Hidrólise Enzimática.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the application of the enzymatic extract produced by the fungus *Trichoderma reesei* in converting yam peel biomass into fermentable sugars. Amylase production was carried out through solid-state fermentation (SSF), using a substrate composed of corn cob and wheat bran. The microorganism was incubated on the moistened substrate for seven days, and the crude enzymatic extract was obtained using sodium citrate buffer. Amylolytic activity was determined by quantifying reducing sugars through the dinitrosalicylic acid (DNS) method. A 2² factorial design was applied to assess the effects of pH and temperature on enzymatic activity, with pH showing the most significant influence under the tested conditions. The best combination (pH 4,8 and 50 °C) was used to perform the enzymatic hydrolysis of yam peel biomass, monitoring the release of reducing sugars over time. The results demonstrated the feasibility of the process, with a gradual increase in sugar concentration and high productivity in the initial minutes. It is concluded that the enzymatic extract produced via SSF is a promising and low-cost alternative for converting agro-industrial residues into value-added compounds, such as fermentable sugars, with potential application in second-generation bioethanol production.

Keywords: Solid-State Fermentation; Amylase; Yam; *Trichoderma reesei*; Enzymatic Hydrolysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Objetivo Geral	11
1.2. Objetivos Específicos	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. Biomassa Amilolítica	12
2.1.1. Casca do Cará	12
2.2. Amido	14
2.3 Fermentação em Estado Sólido	15
2.4 Hidrólise Enzimática	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Obtenção do extrato enzimático	17
3.1.1. Preparo do Inóculo	17
3.1.2 Fermentação em estado sólido (FES)	18
3.2 Determinação da atividade enzimática das amilases.	19
3.2.1 Amilase	20
3.3 Planejamento experimental.	21
3.4 Hidrólise Enzimática	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Análise do planejamento experimental	23
4.2 Hidrólise Enzimática da biomassa.	26
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

Com o passar do tempo, a demanda por combustíveis provenientes de fontes renováveis, como os materiais lignocelulósicos (bagaço de cana, farelo de trigo, sabugo de milho, entre outros), tem aumentado consideravelmente. Esse crescimento é impulsionado por diversos fatores, incluindo as mudanças climáticas, a necessidade de segurança energética e preocupações com a qualidade do ar, agravadas pelo uso contínuo de combustíveis fósseis. Entre os biocombustíveis mais requisitados pela indústria, destaca-se o bioetanol. No entanto, para que sua produção a partir de materiais lignocelulósicos seja viável, é indispensável o uso de enzimas.

As enzimas são proteínas que desempenham a função de regular e acelerar as reações químicas que ocorrem nos organismos. Muitas delas possuem ação catalisadora, aumentando significativamente a velocidade dessas reações. Além disso, as enzimas apresentam alta especificidade, ou seja, cada uma atua sobre um substrato determinado em uma reação específica. Atualmente, já foram identificadas mais de 2000 enzimas, sendo que cada uma delas participa de um tipo particular de reação.

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande interesse na biotecnologia atual. Embora elas possam ser derivadas de diversas fontes, as de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias. (OLIVEIRA et al., 2007). O amido, principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, é degradado por enzimas amilolíticas de vários microrganismos.(LIN; HSU; CHU, 1997). As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande importância na biotecnologia atual. Além de serem usadas como aditivos em detergentes, elas podem ser empregadas na sacarificação do amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil. Com o advento de novas fronteiras biotecnológicas, o espectro de aplicação das amilases têm se expandido para muitas outras áreas, incluindo a clínica, farmacêutica, médica e químico-analítica.(PANDEY et al., 2000).

Processos que utilizam enzimas são mais eficientes, rápidos e sustentáveis. Visto que as enzimas ajudam a controlar e acelerar reações químicas, esses compostos se tornaram mais atrativos para a indústria. Aumentando cada vez mais sua produção laboratorial e industrial. Produção essa que pode se dar por meio de fontes vegetais, como resíduos industriais, animais e microbiana (SOUZA SILVA et al., 2021).

A produção de enzimas microbianas é realizada a partir de processos fermentativos, onde se destaca a fermentação em estado sólido. O custo de produção de enzimas microbianas é fortemente ligado à sua produtividade (SHELDON e PELT, 2013). O custo dos substratos e as variações de rendimento enzimático são problemas economicamente determinantes para produção de enzimas, prejudicando seu potencial para aplicação em escala industrial (LIMAYEM e RICKE, 2012). Para que o processo se torne viável é necessário que os parâmetros de otimização do processo como a seleção do microrganismo ideal para a enzima de interesse, o meio de cultivo, pH, temperatura, aeração e agitação sejam definidos para se obter uma alta eficiência de produção enzimática (MONTEIRO e SILVA, 2003).

A Fermentação em estado sólido consiste em um processo de crescimento microbiano em um substrato sólido com pouca ou nenhuma água livre aparente, de biorreatores simples, baixo custo de matéria-prima e de produção, requisitos de energia reduzidos, mínima produção de águas residuais, alta produtividade e alta eficiência recuperação do produto (SOCCOL et al., 2017).

Resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, milho e etc., são uma alternativa promissora para redução de custos e aumento da sustentabilidade nos processos fermentativos para produção de enzimas (SALAZAR et al., 2019). Estes resíduos são compostos pela chamada biomassa lignocelulósica (ZHOU et al., 2017). Neste contexto, devido ao seu rico conteúdo orgânico, baixo custo e alta disponibilidade, os resíduos agrícolas podem ser substratos ideais para a fermentação (FALKOSKI et al., 2013; EL-BAKRY et al., 2015).

Diversos resíduos possuem amido que é um polímero composto por unidades de glicose repetidas denominadas ligações glicosídicas α (1,4) e está dentre as biomassas que são utilizadas para obtenção do etanol.

As enzimas, essenciais para a quebra da amilase presente na biomassa e geração de açúcares fermentescíveis, possuem um custo elevado, tornando a produção de bioetanol sofrá economicamente, custos esses que estão diretamente relacionados à eficiência da produção das enzimas produzidas por fungos, além da quantidade de atividade enzimática recuperada no extrato bruto após a fermentação. Diante disso, a produção das enzimas amilase se faz crucial para a hidrólise dos materiais amilolítico que acarretará na viabilização da conversão de biomassa amilolítica em bioetanol.

1.1. Objetivo Geral

Avaliar a aplicação do extrato enzimático produzido pelo *Trichoderma reesei* na hidrólise da biomassa da casca do cará e na produção de etanol pela fermentação do caldo obtido.

1.2. Objetivos Específicos

- Produzir o extrato enzimático por cultivo em estado sólido usando o *Trichoderma reesei*
- Estabelecer as melhores condições de pH e temperatura para hidrólise enzimática;
- Realizar a hidrólise da biomassa da casca do cará in natura;

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biomassa Amilolítica

Biomassas amilolíticas correspondem a materiais orgânicos resultantes da ação de microrganismos capazes de produzir enzimas do tipo amilases, as quais promovem a degradação do amido — um polissacarídeo — em açúcares mais simples. Essa capacidade enzimática é fundamental em diversas aplicações biotecnológicas, como na produção de bioetanol a partir de fontes ricas em amido e no aproveitamento de resíduos agroindustriais como base para o crescimento microbiano. Isso se deve ao fato de que muitos subprodutos da agroindústria, apesar de apresentarem baixo valor comercial, possuem alto teor de carboidratos, o que os torna substratos viáveis para processos fermentativos (MEINHARDT et al., 2005).

2.1.1. Casca do Cará

O Cará de São Tomé (Figura 1) é o nome dado a esse tubérculo do gênero *Dioscorea spp.* Originário da África, Cará de São Tomé foi trazido das ilhas de Cabo Verde e São Tomé para o Brasil pelos portugueses e encontrou condições ideais para se desenvolver. Seu nome provém de uma palavra de origem senegalesa que significa “para comer”. Os Carás são tubérculos de formato irregular e tamanho variado. Ele possui uma polpa esbranquiçada, fibrosa e comestível, revestida por uma casca de textura rugosa que apresenta uma coloração que vai do esbranquiçado ao castanho-escuro.

Figura 1 - Cará De São Tomé



Fonte: Faz Feira (2025)

Esse alimento desempenha um papel significativo na alimentação humana em regiões tropicais, principalmente devido à sua resistência e adaptabilidade. Ele se destaca pela

tolerância a temperaturas elevadas, capacidade de suportar períodos de seca, alta eficiência na absorção de nutrientes e longa durabilidade após a colheita em condições ambientais normais. Além de ser consumido “in natura”, seus rizomas possuem grande potencial para a industrialização, sendo utilizados na produção de farinha e amido. Estudos indicam que esses derivados apresentam algumas vantagens em relação aos produtos obtidos da mandioca e do milho (Hurtado et al., 1997), podendo até substituir parcialmente a farinha de trigo na panificação, trazendo benefícios econômicos (Matossian, 1979). Dados da FAO de 1998 e 1999 apontam que cerca de 96% da produção mundial de cará provém de países africanos. No Brasil, a produção atingiu 225 mil toneladas, com uma produtividade média de 9.799 kg por hectare. Os estados da Paraíba, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pernambuco, Espírito Santo, Bahia e São Paulo são responsáveis por aproximadamente 90% da produção nacional. A casca do cará embora contenha menos amido que o tubérculo ainda contém amido residual que pode ser aproveitado em processos enzimáticos para obtenção de açúcares fermentescíveis. A Figura 2 mostra a casca do cará.

Figura 2 - Casca do Cará



Fonte: Autor (2025)

2.2. Amido

O amido se destaca entre os carboidratos por suas propriedades físicas e químicas únicas. Ele é a principal forma de reserva energética dos vegetais e responde por cerca de 70 a 80% das calorias consumidas globalmente. Tanto o amido quanto seus produtos de hidrólise são compostos majoritariamente por carboidratos que podem ser digeridos ou fermentados. Os amidos comercialmente utilizados são extraídos principalmente de sementes de cereais como o milho comum, milho ceroso, milho com alto teor de amilose, trigo e arroz, além de tubérculos e raízes, especialmente batata e mandioca (FENNEMA, 2010). Já os amidos modificados têm uma ampla gama de aplicações industriais e alimentícias, sendo usados como agentes de adesão e ligação, espessantes, gelificantes, estabilizantes, texturizantes, formadores de filmes de cobertura, polvilhos, reforçadores de espuma, vitrificantes, retentores de umidade e para promover turbidez (MORAES, 2004; DENARDIN & SILVA, 2008).

Do ponto de vista estrutural, o amido é classificado como uma homoglucana (ou homopolissacarídeo), pois é formado exclusivamente por unidades de glicose, como visto na figura 3 (FENNEMA, 2010).

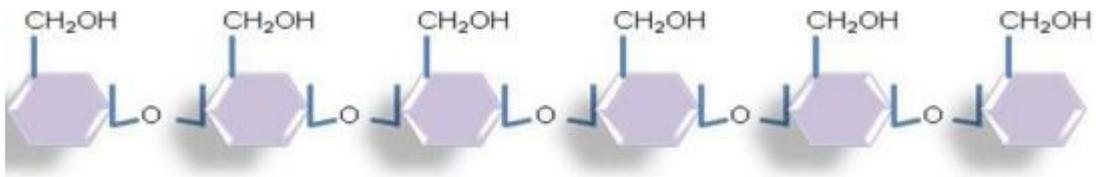


Figura 3: Estrutura Química do Amido (FENNEMA, 2010)

O amido se diferencia dos demais carboidratos por estar presente na natureza sob a forma de partículas específicas chamadas grânulos. Esses grânulos são insolúveis em água e apresentam baixa capacidade de hidratação em temperaturas frias. Por isso, é possível dispersá-los em água, originando uma suspensão de baixa viscosidade que pode ser facilmente misturada ou bombeada, mesmo em concentrações superiores a 35%. No entanto, a propriedade espessante do amido só é ativada quando essa suspensão é submetida ao calor. Ao aquecer uma suspensão contendo 5% de grânulos de amido nativo a 80 °C, sob agitação, ocorre o processo de gelatinização, resultando em uma dispersão espessa conhecida como goma. (DENARDIN & SILVA, 2008).

2.3 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo de crescimento microbiano realizado em substratos sólidos que contêm pouca ou nenhuma água livre visível. Esse tipo de fermentação apresenta diversas vantagens, como o uso de biorreatores simples, baixo custo tanto de matéria-prima quanto de produção, menor demanda energética, reduzida geração de efluentes e elevada produtividade. Além disso, a FES se destaca pela eficiência na recuperação dos produtos obtidos ao final do processo (Soccol et al., 2017). Nesse sistema, os microrganismos se desenvolvem na superfície ou entre as partículas do material, utilizando os nutrientes disponíveis para sua multiplicação e a produção de diversos metabólitos e enzimas (Rodrigues et al., 2015)

Dentre os organismos utilizados, os fungos filamentosos são considerados os mais adequados para a FES, em razão de suas características morfológicas, que favorecem a colonização e penetração do substrato. Suas hifas apresentam crescimento eficiente mesmo sob condições de baixa umidade, fator característico desse tipo de fermentação (Abdullah et al., 2014). Ademais, a aplicação de aeração forçada no processo contribui para o aumento da atividade celular, promovendo, conseqüentemente, uma maior produtividade enzimática (Farinas, 2015).

2.4 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é uma etapa fundamental no aproveitamento da biomassa amilolítica, sendo responsável pela conversão das cadeias poliméricas complexas em açúcares fermentáveis de menor peso molecular, como a glicose. Esse processo utiliza enzimas específicas, como as celulases, que atuam na quebra da celulose e da hemicelulose. Na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, as leveduras tradicionalmente utilizadas na fermentação alcoólica não são capazes de metabolizar diretamente essas macromoléculas. Por isso, é necessário transformá-las previamente em açúcares simples, permitindo assim a realização da fermentação alcoólica (Souto et al., 2017).

A modificação enzimática, que apresenta muitas vantagens, entre as quais a especificidade das enzimas, que proporciona a obtenção de produtos com propriedades químicas e físicas mais bem definidas (Severo et al. 2010). O uso de enzimas na modificação de materiais amiláceos apresenta vantagens significativas em relação aos processos químicos convencionais. As reações enzimáticas ocorrem sob condições brandas de temperatura e pH, além de apresentarem elevada especificidade, o que contribui para a redução de reações indesejadas e para a menor geração de resíduos ao longo do processamento. As enzimas estão

inseridas no contexto de tecnologias limpas, com potencial para substituir gradualmente muitas reações químicas atualmente empregadas na indústria. Essa característica evidencia o papel das enzimas na mitigação de impactos ambientais (FELLOWS, 2006).

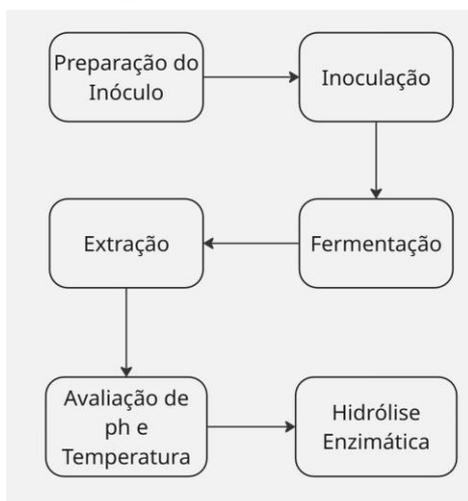
As amilases têm substituído, progressivamente, o uso de ácidos no processamento industrial de hidrolisados de amido, representando atualmente a maior fatia do mercado global de enzimas (GUPTA et al., 2003). As α -amilases, classificadas como endoenzimas, catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 presentes na estrutura do amido de maneira aleatória, resultando na formação de compostos de peso molecular intermediário, como a glicose, a maltose e outros oligossacarídeos (PANDEY et al., 2005).

O uso de enzimas amilolíticas visa tanto a modificação de matérias-primas amiláceas quanto a produção de compostos específicos. Entre as principais aplicações, destacam-se os processos nas indústrias de alimentos — como a modificação de farinhas utilizadas em panificação e a produção de bebidas fermentadas —, bem como suas utilizações na etapa de degomagem na indústria têxtil, na fabricação de papel e nas indústrias química e farmacêutica (SPIER et al., 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Produtos Fermento-Destilados, no Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba. O trabalho foi realizado com base no fluxograma da figura 4:

Figura 4 - Fluxograma com os processos realizados



Fonte: Autor (2025)

3.1. Obtenção do extrato enzimático

A metodologia usada para a obtenção do extrato enzimático foi feita com base nos estudos de Santos (2021) e Vasconcelos (2017).

3.1.1. Preparo do Inóculo

Para preparar o meio de cultivo à base de arroz, utilizou-se uma metodologia baseada em protocolos da EMBRAPA/CPATSA, com adaptações realizadas por Mélo (2016). Inicialmente, cerca de 30 g de arroz foram umedecidos com água destilada, em quantidade suficiente para cobri-los completamente. O arroz permaneceu de molho por aproximadamente 30 minutos. Após esse tempo, o excesso de água foi removido. Em seguida, 10 g do arroz umedecido foram transferidos para frascos de 250 mL (erlenmeyers). Após o resfriamento completo do arroz esterilizado, a 121°C por 15 minutos, procedeu-se à inoculação do microrganismo.

Para inocular o *Trichoderma reesei* no arroz, uma solução surfactante (Tween 80 a 0,3%, v/v) foi adicionada em erlenmeyers. Os esporos presentes no meio de cultivo foram cuidadosamente desprendidos, formando uma suspensão homogênea. Utilizando um pipetador automático, 1 mL dessa suspensão de esporos foi transferido para cada erlenmeyer contendo o arroz previamente esterilizado.

Os frascos foram fechados com tampão de gaze e algodão, e incubados à temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) por um período de 7 dias. Após o cultivo, os frascos

foram mantidos sob refrigeração, podendo ser armazenados por até três meses, antes de serem utilizados na preparação do inóculo para os ensaios de fermentação.

Foi realizada a suspensão dos esporos do fungo *Trichoderma reesei* cultivados em meio contendo arroz hidratado. A suspensão foi feita sob agitação manual, utilizando 40 mL de solução surfactante (Tween 80 a 0,3%, v/v), suficiente para cobrir o arroz. Em seguida, o inóculo foi filtrado em algodão e reservado para iniciar a fermentação.

Para quantificar a suspensão, foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer espelhada, com o auxílio do microscópio. A quantidade da suspensão de esporos adicionada ao meio de fermentação foi ajustada para alcançar uma concentração de 10^5 esporos por grama de substrato sólido. O ajuste foi realizado a partir das Equações 1 e 2:

$$CI = \Sigma x \div 5 \times 10^5 \times f \quad (1)$$

Em que:

CI = concentração do inóculo (esporo/mL);

Σx : número de esporos na câmara de Neubauer (centro e as quatro extremidades);

5: multiplicação de expansão para os 25 quadrantes totais da câmara;

10^5 : conversão de mm³ para cm³ (já que cada quadrante da câmara apresenta dimensões 1x1x0,1 mm

f: fator de diluição da amostra (caso tenha ocorrido diluição)

$$V = \frac{Cd \times M}{C} \quad (2)$$

Em que:

Cd: concentração desejada (esporos/g);

V: volume do inóculo (mL);

C: concentração de esporos (esporos/mL)

M: massa do substrato (100 g).

3.1.2 Fermentação em estado sólido (FES)

Preparou-se o meio de cultivo, seguindo as condições mais adequadas apontadas por Santos (2021) para o *Penicilium FSDE 15*. O meio utilizado para realizar o cultivo foi 50% de sabugo de milho e 50% de farelo de trigo umedecido a 60%, o ensaio foi realizado em

triplicata, em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 40 g do meio umidificado e 2 mL do inóculo.

Para umedecer o meio de cultivo, utilizou-se água. Com isso, para preparar a solução, foi necessário calcular a quantidade de água para umedecer cada substrato, a partir do teor de umidade apresentada por cada substrato, como mostra a equação 3.

$$MA = \frac{MS \times (UI - US)}{1 - UI} \quad (3)$$

Em que:

MA: massa de água (g);

MS: massa de substrato (g);

UI: umidade ideal do substrato.

US: umidade real do substrato.

Os substratos umedecidos foram agitados para uniformização e dispostos em frascos Erlenmeyer de 500 mL para esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, os frascos com os meios de cultivo foram deixados em temperatura ambiente para resfriamento. Em seguida, foi realizada a inoculação com os esporos previamente suspensos e quantificados conforme a Equação 2. Foi necessário homogeneizá-los bem para garantir um crescimento uniforme do fungo. Após a inoculação, os meios de cultivo foram mantidos em estufa à temperatura ambiente por sete dias e, posteriormente, armazenados em geladeira para análises futuras.

3.2 Determinação da atividade enzimática das amilases.

O extrato enzimático foi obtido pela adição de 20 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 3,0, 4,8 e 6,3) para cada 1g do meio fermentado. Após homogeneização e repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, a amostra foi filtrada utilizando algodão, em seguida foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos, após isso foi armazenada em geladeira. A Figura 5 mostra o momento de filtração do extrato.

Figura 5 - Filtragem do extrato enzimático com tampão.



Fonte: Autor (2025)

O extrato enzimático foi armazenado em geladeira para posterior análise da atividade de amilase. A determinação da atividade enzimática foi conduzida conforme Sperotto *et al.* (2014), com adaptações.

3.2.1 Amilase

Para a análise da atividade de amilase, foi utilizado o método de Miller (1959) que baseia-se na determinação da atividade amiloítica pela quantificação dos açúcares redutores, liberados pela reação de hidrólise do amido catalisada por amilases.

Em tubos de ensaios foram adicionados tampão citrato-fosfato e solução de amido solúvel 1%; Em seguida foram incubados em banho-maria à 50 °C até atingir o equilíbrio térmico; Após isso foi adicionada a amostra a ser testada e deixada no banho por 15 minutos nas temperaturas estudadas (40°C, 50°C e 60°C). Parar a reação adicionando o reagente DNS, observando os intervalos estipulados para que o tempo de reação seja o mesmo em todos os ensaios. Em seguida foi fervido por 5 minutos em banho-maria e adicionar água destilada; Por fim resfriar e medir a absorbância em espectrofotômetro a 540 nm para determinar a concentração de açúcares redutores utilizando a curva de calibração de glicose.

Com isso, a quantificação de açúcares redutores (AR) foi realizada conforme o protocolo descrito por Vasconcelos et al. (2017). O extrato enzimático foi centrifugado antes da análise, uma vez que os esporos em suspensão dificultam a leitura de AR. A atividade enzimática foi calculada a partir da Equação 4.

$$Amilase\left(\frac{U}{g}\right) = \frac{AR_{\text{liberado}} \times 10^6}{180 \times 15} = \frac{(AR_{\text{com substrato}} - AR_{\text{branco}}) \times 10^6}{180 \times 15} \quad (4)$$

Em que:

ARcom substrato: leitura de açúcares redutores no tubo contendo o substrato, onde ocorreu reação enzimática (incluindo fator da curva padrão da glicose);

ARbranco: leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, onde não houve reação enzimática por não haver substrato (incluindo fator da curva padrão da glicose);

10^6 : fator de conversão que transforma grama em micrograma (portanto, mol em micromol);

180: massa molar da glicose (g/mol)

15: tempo de reação em minutos.

3.3 Planejamento experimental.

O planejamento teve como objetivo encontrar uma condição adequada para a ação da amilase sobre o amido. As análises de atividade enzimática de amilase foram realizadas em diferentes valores de pH e temperatura, como visto na tabela 1, para a extração do meio fermentado (extrato enzimático), utilizando tampão citrato de sódio 50 mM (pH 3,0, 4,8 e 6,3) e diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C). O ensaio foi conduzido conforme um planejamento experimental 2^2 para determinar a melhor condição para realizar a hidrólise enzimática. A Tabelas 1 exibe, os níveis e a matriz do planejamento. Os níveis foram definidos com base nos estudos de Santos (2021). As análises de atividade enzimática foram realizadas de acordo com os itens 3.2.1.

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central.

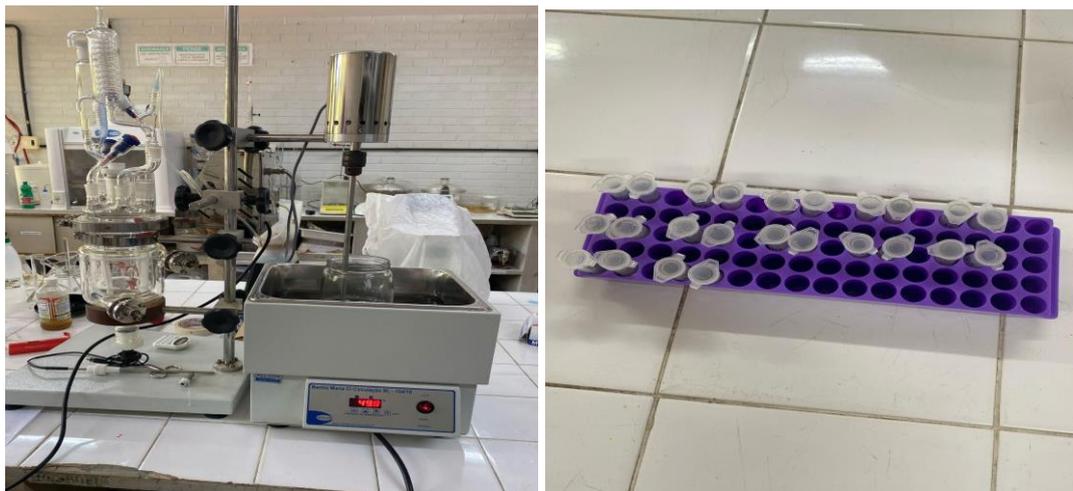
Ensaio	ph	Temperatura (°C)
1	-1 (3)	-1(40°C)
2	+1(6,3)	-1(40°C)
3	-1(3)	+1(60°C)
4	+1(6,3)	+1(60°C)
5	0(4,8)	0(50°)
6	0(4,8)	0(50°)
7	0(4,8)	0(50°)

3.4 Hidrólise Enzimática

Seguindo a metodologia usada por Oliveira (2017), foi pesado 20 g da biomassa de casca do cará *in natura*, em seguida foram adicionados 300 mL do extrato enzimático bruto

preparado com base no valor de pH que resultou melhor atividade, realizado no planejamento experimental, extraído na proporção de 30 mL para cada grama de meio fermentado (Santos, 2021). O ensaio foi conduzido num biorreator (Figura 6), sob agitação (nível 1 do equipamento), durante 120 minutos a 50°C (melhor temperatura segundo o planejamento experimental) com auxílio do banho maria. Nos primeiros 15 minutos, de 5 em 5 minutos, foram retiradas amostras de 1,5 mL e postas em tubos Eppendorf para realizar leitura de AR(açúcares redutores), também foi feito no ponto 0 e com extrato sem biomassa. Nos próximos 30 minutos foram retiradas amostras de 10 em 10 minutos, e por fim foram retiradas amostras nos minutos 60, 80, 100 e 120. Tendo assim 12 pontos em duplicata para realizar a leitura de AR, segundo a metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2017). A Figura 6 mostra o sistema utilizado e as amostras dispostas sobre a bandeja.

Figura 6- Sistema da hidrólise enzimática em biorreator do tipo CSTR, e amostras dispostas sobre bandeja.



Fonte: Autor, 2025

Por fim foi feita a leitura de AR com auxílio do espectrofotômetro, utilizando 0,25 mL da amostra de extrato com biomassa, 0,25 da solução tampão para diluição da amostra e 0,5 mL de DNS (Ácido dinitrosalicílico).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do planejamento experimental

O planejamento experimental fatorial foi feito para determinar os melhores valores para temperatura e pH para as atividades enzimáticas (amilase), e a influências das interações dessas variáveis na eficiência da atividade. Os níveis escolhidos tiveram como base o trabalho de Santos (2021). A tabela 2 mostra os valores de atividade em cada ensaio.

Tabela 2 - Atividade amilolítica em função da temperatura e do pH.

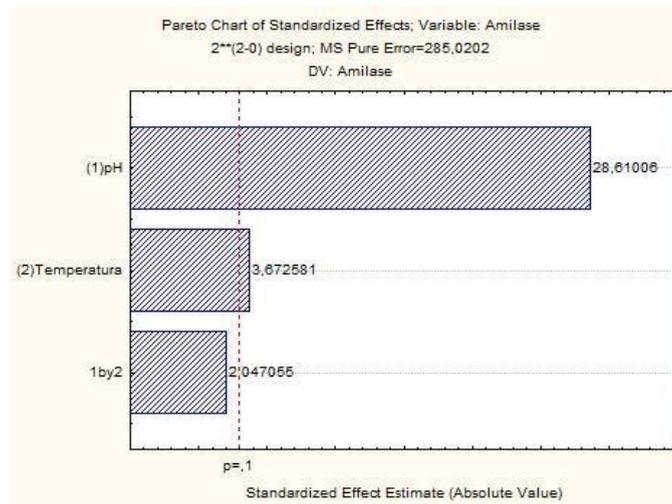
Ensaio	ph	Temperatura (°C)	Atividade de Amilase (U/g)
1	-1 (3)	-1(40°C)	29,997
2	+1(6,3)	-1(40°C)	478,448
3	-1(3)	+1(60°C)	57,44
4	+1(6,3)	+1(60°C)	575,01
5	0(4,8)	0(50°)	599,36
6	0(4,8)	0(50°)	626,98
7	0(4,8)	0(50°)	629,99

Fonte: Autor (2025)

O gráfico de Pareto, permite a visualização dos fatores mais influentes em uma análise de dados, permitindo a identificação das regiões de maior impacto. Neste ensaio, o gráfico mostra a influência dos efeitos e interações das variáveis independentes (pH e temperatura) e nas variáveis dependentes (atividades enzimáticas).

O gráfico representado na Figura 6, mostra o efeito dos parâmetros analisados, e da interação entre eles na resposta (Atividade). É possível observar que o pH possui efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança.

Figura 6 - Influência dos parâmetros pH e temperatura na atividade amilolítica



Fonte: Autor (2025)

Com base nos resultados observados na fase de planejamento fatorial, foi desenvolvido um modelo de regressão linear de primeira ordem para descrever o processo. O modelo relaciona as variáveis (pH e temperatura) com a atividade amilolítica. A equação 5 mostra o modelo encontrado. A análise do modelo não mostrou grande precisão, com um coeficiente de determinação R^2 de 55,47%. Mostrando também uma falta de ajuste com valor alto.

$$\text{Atividade Amilolítica} = 428,175 + 241,5053 PH + 31,0013 T + 17,2798 PH.T \quad (5)$$

A tabela 3 mostra a análise de variância dos resultados (ANOVA) relacionados a atividade amilolítica e o resultado do Teste F, indicando a relação entre o F calculado e o F tabelado. De acordo com Barros *et al.* (1995), se a razão for igual ou maior que 1, a regressão é estatisticamente significativa, inferindo que existe interação entre as variáveis dependentes e independentes. Entretanto para a regressão também ser considerada válida para as previsões, a razão deve ser superior a 4,0.

Dessa forma, ao observar um valor de 0,5697 para o teste F, considerando um R^2 de 55,47%, é possível indicar que o modelo proposto não representa adequadamente a influência da temperatura e do pH no processo.

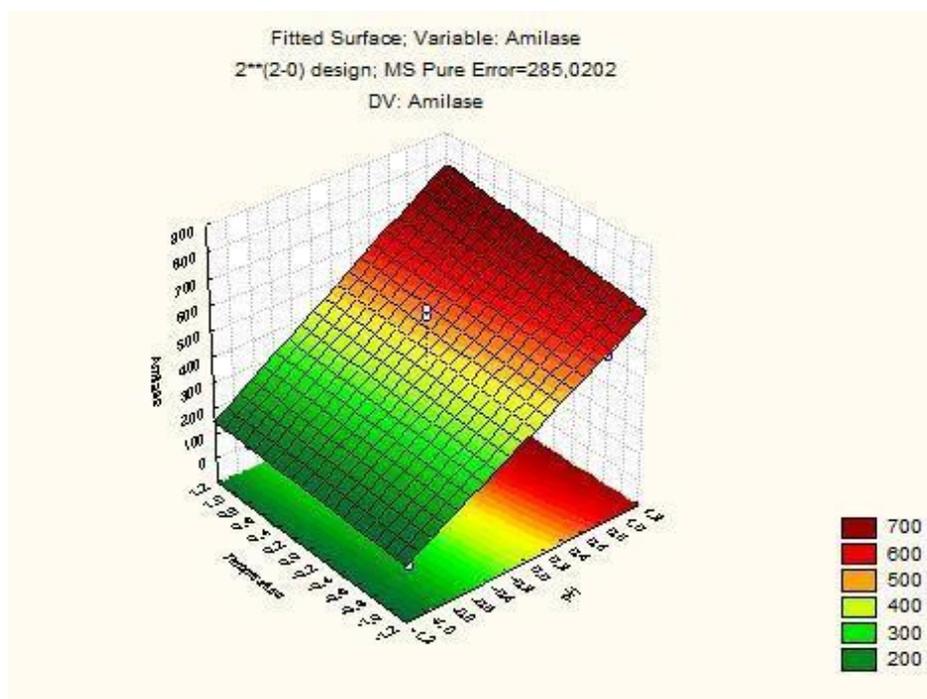
Tabela 3 - ANOVA do planejamento experimental

	SOMA QUAD	GRAU DE LIBER	MÉDIA QUADRÁ	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	237143,4	2	118571,7	2,46394	4,325	0,5697
Resíduo	192491,6	4	48122,9			
Falta de Ajuste	190727,2	1	190727,2			
Erro Puro	570	2				
Total	429635,1	6				
R ²	55,47%					

Fonte: Autor (2025)

Com base nos resultados foi plotado uma representação qualitativa gráfica do modelo, que mostra como se comportam os resultados de atividade amilolítica quando cada variável independente e suas interações variam. A superfície de resposta na figura 7, mostra que o pH é o parâmetro mais influente para a atividade amilolítica, também é possível observar que o valor da atividade enzimática para 629,99 U/g ocorre ao utilizar os valores máximos de pH e temperatura.

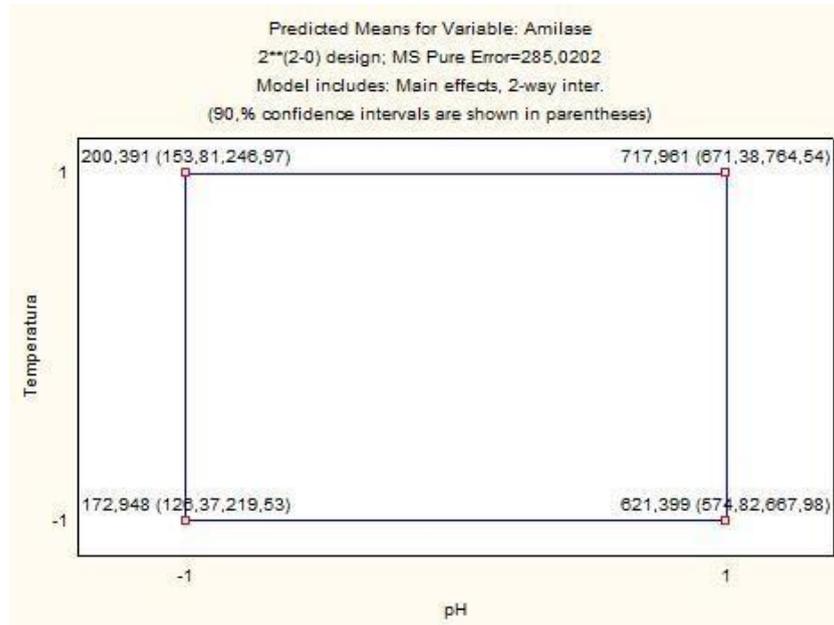
Figura 7 - Superfície de resposta para a atividade de amilase em função do pH e temperatura.



Fonte: Autor (2025)

A figura 8 mostra outra representação gráfica qualitativa que mostra as tendências dos valores de atividade para os valores de pH e temperatura seguindo o modelo.

Figura 8 - Médias previstas para os valores de Atividade de Amilase



Fonte: Autor (2025)

Com base nas informações obtidas através do planejamento experimental 2^2 , é possível observar que o pH é a variável mais influente para a atividade amilolítica. Entretanto, o estudo poderia ser aprimorado com a ampliação do delineamento experimental fazendo uso de um modelo quadrático (DCCR), incluindo mais níveis para pH, temperatura e tempo de fermentação, além da avaliação de diferentes métodos de extração e purificação do extrato enzimático, pois o fato do planejamento experimental seguir um modelo linear, pode ter restringido a capacidade de modelagem e a precisão estatística dos resultados.

Apesar disso o trabalho mostra o potencial amilolítico do *Trichoderma reesei*, uma vez que esse microorganismo é amplamente usado como produtor de celulases, como visto por Kahrin *et al.*, [s.d.] também mostrou boa produção de amilase, com uma liberação significativa de açúcares redutores.

4.2 Hidrólise Enzimática da biomassa.

A tabela 4 mostra os resultados da hidrólise enzimática da casca do cará.

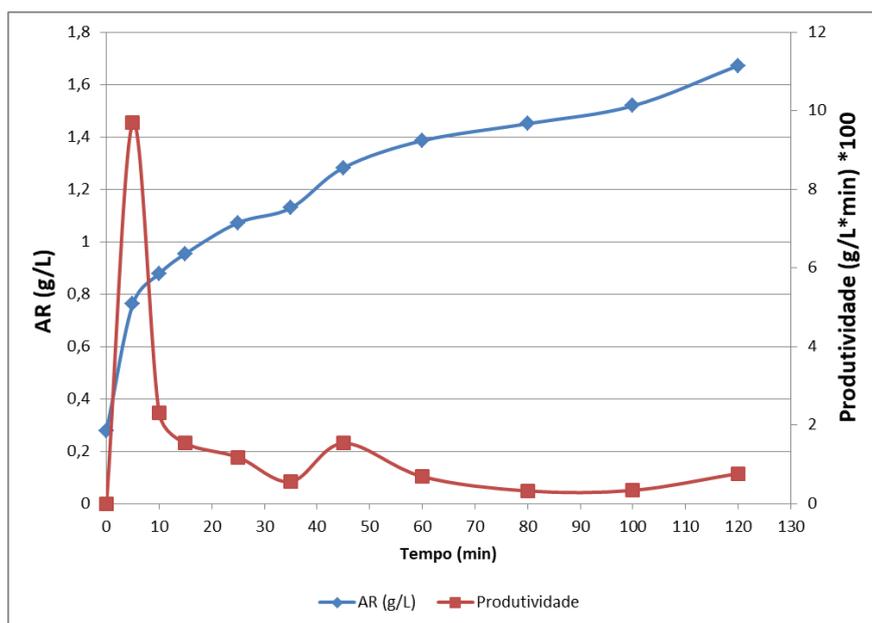
Tempo (minutos)	média das abs	DESVIO PADRÃO	AR (g/L)	Produtividade (g/L*min)*100
0	0,094	±0,003	0,2777136	0
5	0,258	±0,011	0,7622352	9,690432
10	0,297	±0,045	0,8774568	2,304432
15	0,323	±0,012	0,9542712	1,536288
25	0,363	±0,002	1,0724472	1,18176
35	0,382	±0,007	1,1285808	0,561336
45	0,434	±0,001	1,2822096	1,536288
60	0,469	±0,003	1,3856136	0,68936
80	0,491	±0,012	1,4506104	0,324984
100	0,514	±0,012	1,5185616	0,339756
120	0,566	±0,027	1,6721904	0,768144
fator dns=	1,4772			

Fonte: Autor (2025)

No início do processo de hidrólise enzimática foi quantificada uma quantidade de açúcares redutores de 0,277 g/L no ponto 0, ou seja, no momento em que a biomassa foi adicionada. Nos primeiros 5 minutos foi quantificado maior produtividade, mostrando o início da conversão de amido em glicose. Depois do pico inicial, a produtividade do processo tende a diminuir, mas a quantidade de açúcares redutores continua aumentando, indicando que a enzima ainda continua funcionando, quebrando as moléculas de amido.

É possível observar que a quantidade de açúcares continuava aumentando, e o tempo de ensaio não foi o suficiente para observar uma estabilização dos açúcares, que acontece pois conforme o meio se torna rico em açúcares, as enzimas sofrem inibição, estabilizando o crescimento e diminuindo a velocidade do processo de conversão enzimática (Cabiac et al., 2011). É possível observar na Figura 9 que o processo continua produzindo açúcares, e mesmo que a produtividade tenha diminuído bruscamente após o pico nos primeiros 5 minutos o crescimento na quantidade de açúcares redutores continuou.

Figura 9 - Gráfico da hidrólise enzimática da casca do cará.



Fonte: Autor (2025)

A hidrólise enzimática do amido ocorre principalmente por meio da ação das amilases, enzimas que catalisam a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 presentes nas cadeias de amilose e amilopectina. Dentre elas, a α -amilase atua internamente nas cadeias do polímero, reduzindo-as a açúcares de menor peso molecular, como maltose, maltotriose e glicose. Segundo Gupta et al. (2003), “as α -amilases são endoenzimas que clivam as ligações internas α -1,4 de cadeias de amido de maneira aleatória, resultando em oligossacarídeos solúveis de diferentes comprimentos”. A eficiência da reação depende de diversos fatores, como a estrutura do substrato, a temperatura, o pH e a presença de íons metálicos que podem atuar como cofatores enzimáticos.

5. CONCLUSÕES

- Foi produzido o extrato enzimático, e foi constatada a atividade enzimática amilolítica em quantidade considerável.
- A casca do cará de São Tomé se mostrou uma biomassa adequada para o processo de hidrólise enzimática, alcançando parâmetros semelhantes aos de outras biomassas utilizadas na produção de açúcares fermentescíveis, conforme relatado na literatura.
- A partir do planejamento experimental e das análises estatísticas feitas a partir do mesmo, foram encontrados valores de pH e temperatura para a realização do ensaio de hidrólise de forma satisfatória. Sendo esses, respectivamente, 4,8 e 50 °C. Entretanto, o estudo poderia ser aprimorado com a ampliação do delineamento experimental fazendo uso de um modelo quadrático (DCCR).
- O ensaio de hidrólise enzimática mostrou a capacidade das enzimas(amilases) em degradar a biomassa (casca do cará). Mostrando boa produtividade na produção de açúcares fermentescíveis.
- Portanto, embora os resultados obtidos sejam promissores, este trabalho representa apenas um passo inicial em uma linha de pesquisa com grande potencial. Com investimentos em estudos complementares e otimizações de processo, é possível avançar significativamente no aproveitamento de resíduos amilolíticos para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado.

6. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R. et al. Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by *Aspergillus niger* (BTM-26) in solid state fermentation. *Pak. J. Bot.*, v. 46, n. 3, p. 1071–1078, 2014.
- BARROS, B.; SCARMINIO, J. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 480 p.
- BOHN, L. R. *Produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica de milho*. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó-SC, 2018.
- CABIAC, A. et al. Cellulose reactivity and glycosidic bond cleavage in aqueous phase by catalytic and non catalytic transformations. *Applied Catalysis A: General*, v. 402, p. 1, 2011.
- COSTA, B. E. B. et al. Comparação entre a hidrólise química e enzimática da biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol: uma revisão. *Revista Virtual de Química*, 2021.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, 2008.
- EL-BAKRY, M. et al. (citada no texto, mas não listada — favor incluir referência completa se usada diretamente)
- FALKOSKI, D. L. et al. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 296-305, 2013.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 52, p. 179-188, 2015.
- FELLOWS, P. J. *Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.
- FENNEMA, O. R.; KIRK, L. P.; SRINIVASAN, D. *Química de alimentos de Fennema*. Traduzido por Adriano Brandelli. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.

HURTADO, J. J. et al. Processamiento de ñame (*Dioscorea alata*; *D. rotundata*). In: *Seminario Técnico sobre Raíces y Tubérculos Autóctonos*, 1997, Ibagué. Resumos... Ibagué: [s.n.], 1997. 14 p.

KAHRIN, F. et al. Biotecnologia Industrial Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* a partir de distintas fontes de celulose. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1158439/1/Producao-de-celulases.pdf>>.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LIN, L. L.; HSU, W. H.; CHU, W. S. A gene encoding for an α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 82, n. 3, p. 325–334, 1997.

MATOSSIAN, N. Efeito da adição de farinha de cará (*Dioscorea alata* L.) na qualidade tecnológica da farinha de trigo de alta extração. 1979. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1979.

MEINHARDT, S.; MEDEIROS, F.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Purificação de amiloglucosidase em sistema aquoso bifásico. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Recife, 2005.

MÉLO, B. C. A. de. *Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (Malpighia sp.) utilizando Trichoderma reesei*. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. v.31, p. 426-428, 1959.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy*, v. 56, p. 526–544, 2013.

MORAES, L. P. M. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Org.). *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 223–242.

NAZÁRIO DE AZEVEDO, J. et al. *Cultivo do cará*. Embrapa. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/49731/1/Cir18.pdf>.

OLIVEIRA, A. N. de et al. Produção de Amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 61–66, 2007.

- OLIVEIRA, C. Z. *Utilização do bagaço do malte para obtenção de enzimas amilolíticas por fermentação em estado sólido*. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 31, n. 2, p. 135–152, 2000.
- RODRIGUES, M. L. F. et al. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v. 4, p. 129–145, 2015.
- SALAZAR, L. N. et al. Production, partial characterization and application of cellulases by newly isolated *Penicillium* sp. using agro-industrial substrate solid-state fermentation. *Industrial Biotechnology*, v. 15, n. 2, p. 79–88, 2019.
- SANTANA, R. S. M. Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido. Itapetinga-BA: UESB, 2012. 73p.
- SANTOS, F. A. *Produção de celulases por Penicillium sp. FSDE15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UFPB, João Pessoa, 2021.
- SEVERO, M. G.; MORAES, K.; RUIZ, W. A. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 345–350, 2010.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.
- SOCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017.
- SOUZA SILVA, L. et al. Fermentação em estado sólido e submerso para produção de celulase: revisão bibliográfica. *Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria*, 2021.
- SOUTO, L. R. F. et al. Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis. *Food Science and Technology*, v. 37, n. 1, p. 19–24, 2017.
- VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5 dinitrossalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. *Embrapa Agroindústria Tropical*, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87, 2017.
- ZHOU, W. et al. Feasibility of lipid production from waste paper by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *BioResources*, v. 12, n. 3, p. 5249–5263, 2017.