



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
CENTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO SOCIOAMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido
utilizando *Aspergillus niger*, a partir de Resíduos de *Croton
linearifolius***

Juliana Antunes da Luz

ITAPETINGA – BAHIA
2018

**Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido
utilizando *Aspergillus niger*, a partir de Resíduos de *Croton
linearifolius***

Autora: Juliana Antunes da Luz

Orientadora: Prof^a. D.sc. Janaína
Silva de Freitas

Coorientadores: Prof^a. D.sc. Simone Andrade Gualberto
Prof^o D.sc. Marcelo Franco

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS, no programa de Pós-Graduação *Stricto
Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual
do Sudoeste da Bahia. Área de Concentração: Meio
Ambiente e Desenvolvimento”

ITAPETINGA – BAHIA
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a força para continuar e nunca desistir.

Aos meus pais, Sivaldo e Anita, pelo amor, carinho e apoio; a meu filho Pedro, me mostrou que nunca é tarde para recomeçar, ensinando o significado do amor incondicional todos os dias; as minhas irmãs: Patrícia, Poliana e Karoline, pelo apoio.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB pelo apoio técnico e administrativos e a todos os docentes, técnicos e colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais-PPGCA.

A FAPESB (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia) pela concessão da bolsa de mestrado. A minha orientadora, Prof^a Dra. Janaína Silva de Freitas, pela oportunidade, paciência, e incentivo durante a realização desse trabalho.

A minha Coorientadora, Prof^a Dra. Simone Andrade Gualberto, pelos conselhos, respeito, amizade e colaboração.

Ao Prof^o Dr. Marcelo Franco pela disponibilidade, sua participação foi muito importante para a realização desse trabalho científico.

À toda a equipe do laboratório Abdias Neto, Dhiéssica Ribeiro, Jabson Meneses, Matheus Andrade, Rennan, Thatiana Carneiro, Thamille Moreira pela companhia, incentivo, amizade, em especial a Dhiéssica, muito importante em todas as etapas desse trabalho. Obrigada a Matheus Andrade do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LAPRON pelos os resíduos das folhas de *C. linearifolius* cedidos para o trabalho.

A minha amiga Virginia Pires, secretária do CEDETEC, pelo apoio e incentivo.

Romário Santana, obrigada por me auxiliar nos experimentos.

Aos professores Danilo Leão, Kátia Iro, Nívio Batista, Modesto Chaves e Paulo Bonomo pelo apoio, incentivo.

“Torne o resto de sua vida tão significativo quanto possível. Consiste apenas em agir levando os outros em consideração. Assim, encontrará paz e felicidade para si mesmo”.

(Dalai Lama).

LUZ, J. A. **Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido utilizando *Aspergillus niger*, a partir de Resíduos de *Croton linearifolius*.** Itapetinga- Ba: UESB, 2018. 81 p. (Dissertação Mestrado em Ciências Ambientais - Área de concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento). *

RESUMO

O *Croton linearifolius* é uma planta nativa da região semiárida e tem sido empregada para diversos fins na medicina popular. É conhecida como “velame pimenta” e apresenta atividade inseticida contra o *Aedes aegypti*. É uma espécie produtora de óleo essencial e demonstra importância econômica para as indústrias de fármacos. Apesar da relevância ainda são incipientes os estudos de investigação da espécie sob outros aspectos, sobretudo as publicações com dados associados ao reaproveitamento de resíduos gerados após a extração de óleos essenciais. A fermentação em estado sólido (FES) apresenta-se como uma tecnologia capaz de propor o reaproveitamento de resíduos gerados de forma sustentável. Esse trabalho objetivou-se avaliar a produção das enzimas α -amilase, celulasas e invertases pelo fungo *Aspergillus niger*, a partir de resíduos das folhas gerados após a extração de óleo essencial da espécie *C. linearifolius*. Inicialmente as condições de FES foram de 30 °C, com umidade 75%. A atividade enzimática ótima ocorreu em 13 dias, para todas as enzimas estudadas. Para produção de α -amilase a atividade enzimática foi de $44,05 \pm 1,5 \text{ Ug}^{-1}$; celulase $24,05 \pm 1,14 \text{ Ug}^{-1}$ e invertase $21,99 \pm 3 \text{ Ug}^{-1}$. A partir dos resultados obtidos foi feita a otimização da produção de α -amilase, celulasas e invertases, sob a matriz de Doehlert. A enzima α -amilase com atividade enzimática de $122,88 \pm 0,07 \text{ Ug}^{-1}$ se adequou melhor ao modelo experimental em todas as variáveis (temperatura, umidade e tempo). Para celulasas e invertases a superfície de resposta apresentou ponto de sela. Na caracterização da α -amilase, o extrato enzimático bruto foi utilizado para avaliar o efeito da temperatura e pH com maior atividade no pH 5 e temperatura 50 °C. Para termoestabilidade, os resultados indicaram que a enzima α -amilase é termoestável até 60 °C, pois manteve mais de 90% da atividade. Com relação ao efeito da adição de sais, os cátions que mais influenciaram a atividade da enzima foram o carbonato de sódio, cálcio, ferro e o cobalto aumentando atividade enzimática, enquanto que os cátions de potássio e cloreto de sódio atuaram como inibidores enzimáticos diminuindo a atividade da enzima. Em relação à estabilidade de congelamento, nos primeiros 30 dias houve uma redução da atividade de 23,15% e nos 60 dias finais do congelamento do extrato enzimático houve uma redução de 18,69% considerando o início das análises. Os parâmetros cinéticos tiveram os respectivos valores K_m e $V_{m\acute{a}x}$ 0,04 mg/mL e 46,95 $\mu\text{mol/min/mL}$. Pode-se mostrar com o trabalho que os resíduos gerados após a extração de óleo das folhas do *C. linearifolius* pode ser usado para a produção de enzimas, apresentando-se como uma alternativa de aproveitamento sustentável para os resíduos gerados.

Palavras-chave: Bioprocessos, Catálise, Cinética enzimática, Resíduos.

* Orientadora: Janaína Silva de Freitas, D.sc. UESB. Coorientadores: Simone Andrade Gualberto e Marcelo Franco, D.sc. UESB.

LUZ, J. A. **Enzyme production by solid state fermentation using *Aspergillus niger*, from waste *Croton linearifolius***. Itapetinga – Ba: UESB, 2018. 81 p. (Dissertation Master of Science in Environmental Sciences). State University of Southwestern Bahia. Area of concentration in Environment and Development.

ABSTRACT

The *Croton linearifolius* is a plant native to the semi-arid region and has been employed for various purposes in folk medicine. Is known as "canopy pepper" and features activity insecticide against the *Aedes aegypti*. Is a species producing essential oil and demonstrates economic importance for the drug industries. Despite the relevance are still incipient research studies of the species under other aspects, especially the publications with data associated with the reuse of waste generated after extraction of essential oils. The solid state fermentation (FES) presents itself as a technology able to propose the reuse of waste generated in a sustainable way. This work aimed to evaluate the production of α -amylases enzymes, cellulase and invertases by the fungus *Aspergillus niger*, from leaf waste generated after the extraction of essential oil from the species *C. linearifolius*. Initially the conditions of FES were 30 °C, with 75% humidity. Enzyme activity great occurred in 13 days, for all the enzymes studied. For production of α -amylase enzyme activity was $44.05 \pm 1.5 \text{ Ug}^{-1}$; cellulase $24.05 \pm 1.14 \text{ Ug}^{-1}$ and invertase $21.99 \pm 3 \text{ Ug}^{-1}$. From the results obtained was made to optimize the production of α -amylases, cellulases and invertases, under the array of Doehlert. The enzyme α -amylases enzyme activity of $122.88 \pm 0.07 \text{ Ug}^{-1}$ if has adapted better to the experimental model in all the variables (temperature, humidity and time). For cellulase and response surface invertases presented saddle stitch. On characterization of α -amylase, the enzyme raw extract was used to evaluate the effect of temperature and pH with higher activity at pH 5 and 50 °C temperature. For termoestabilidade, the results indicated that the enzyme α -amylase is thermostable until 60 °C, maintained more than 90% because of the activity. With respect to the effect of the addition of salts, cations that most influenced the activity of the enzyme were sodium carbonate, calcium, iron and cobalt increasing enzyme activity, whereas the potassium cations and sodium chloride acted as inhibitors decreasing the enzyme activity of the enzyme. In relation to the freezing stability within the first 30 days there has been a reduction in the activity of 23.15% and 60 days end of freezing the enzymatic extract there was reduced by 18.69% considering the start of analysis. The kinetic parameters have corresponding values K_m and V_{max} 0.04 mg/mL, 46.95 $\mu\text{mol/min/mL}$. Can you show the work that the waste generated after the extraction of oil from the leaves of *C. linearifolius* can be used for the production of enzymes, presenting itself as an alternative of sustainable use for the waste generated.

Keywords: Bioprocesses, Catalysis, Enzymatic kinetics, Residues.

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1	Espécies do gênero <i>Croton</i> com propriedades medicinais 19
Tabela 2	Estudos realizados com o <i>C. linearifolius</i> 22
Tabela 3	Microrganismos utilizados para produção de enzimas por FES 28
Tabela 4	Enzimas produzidas por <i>A. niger</i> com relevância comercial e suas aplicações 31
Tabela 5	Preparo das diluições para fazer a curva do DNS 42
Tabela 6	Matriz de Doehlert para a otimização das enzimas α -amilases, celulase e invertases sob FES, a partir de <i>A. niger</i> cultivada em resíduo de <i>C. linearifolius</i> . Os fatores avaliados foram temperatura ($^{\circ}\text{C}$), umidade (%) e tempo (dias), em seus valores reais e codificados (entre parêntese) 46
Tabela 7	Otimização do efeito do pH e temperatura na atividade da α -amilase 47
Tabela 8	Composição química das folhas de <i>C. linearifolius</i> antes da extração de óleo essencial (a) e após a extração do óleo essencial (b) 49
Tabela 9	Avaliação da melhor umidade para produção de enzimas, no processo de FES, com o resíduo das folhas de <i>C. linearifolius</i> por um período de sete dias 50
Tabela 10	Matriz Doehlert com os resultados do planejamento para a otimização das enzimas α -amilase, celulasas e invertases 53
Tabela 11	Análise de Variância (ANOVA) para a atividade da α -amilase para a matriz Doehlert 54
Tabela 12	Análise de Variância (ANOVA) para a atividade da celulase para a matriz Doehlert 58
Tabela 13	Análise de Variância (ANOVA) para a atividade da invertase para a matriz Doehlert 61

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 Árvores que representam a diversidade de espécies da Caatinga. (A) Umbuzeiro (<i>Spondias tuberosas</i>); (B) Juazeiro (<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart); (C) Xiquexique (<i>Pilosocereus gounellei</i>); (D) Mandacaru (<i>Cereus jamacaru</i>). Fonte: http://rosadacaatinga.blogspot.com.br/2013/04/arvores-do-piaui.html .	15
Figura 2 Painel ilustrativo de diferentes espécies de <i>Croton</i> : (A) <i>C. campestris</i> ; (B) <i>C. heliotropiifolius</i> (C) <i>C. flavens</i> , (D) <i>C. sellowii</i> Baill. Fonte: http://picssr.com/photos	17
Figura 3 <i>C. linearifolius</i> em seu habitat natural da Caatinga (Arquivo pessoal).	20
Figura 4 Fermentação em estado sólido (Fonte: Autora).	25
Figura 5 Esporos do <i>A. niger</i> Fonte: SPIER (2005).	30
Figura 6 Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas Fonte: Santana (2012).	34
Figura 7 Ação das celulasas sobre a molécula de celulose (modificado de WRIGHT et al., 1988).	36
Figura 8 Esquema de reação catalisada pela invertase (RUSTIGUEL, 2009).	37
Figura 9 Fluxograma da extração da extração do óleo essencial das folhas de <i>C. linearifolius</i>	39
Figura 10 Curva analítica de glicose.	43
Figura 11 Atividade de α -amilases em função do tempo de fermentação.	51
Figura 12 Atividade de celulasas em função do tempo de fermentação.	51
Figura 13 Atividade de invertases em função do tempo de fermentação.	52
Figura 14 Diagrama de Pareto demonstrando a significância das variáveis, sob a FES no modelo ajustado para a produção de α -amilase por <i>A. niger</i> (ATCC 1004), com o resíduo do <i>C. linearifolius</i> .	55
Figura 15 Gráficos de superfície de resposta e curva de contorno para a atividade da α -amilase em relação às variáveis: a) Tempo x temperatura b) Tempo e umidade, c) Temperatura x umidade.	57
Figura 16 Diagrama de Pareto para a produção de celulase por <i>A. niger</i> (ATCC 1004), em o resíduo do <i>C. linearifolius</i> .	59
Figura 17 Gráfico de superfície de resposta tendo-se como atividade a celulase com ponto de sela: (A) umidade x temperatura, (B) tempo x umidade, (C) tempo x temperatura.	60
Figura 18 Diagrama de Pareto demonstrando a significância das variáveis: temperatura, umidade e tempo, sob FES no modelo ajustado para a produção de invertase por <i>A. niger</i> (ATCC 1004), com o resíduo <i>C. linearifolius</i> .	61
Figura 19 Gráfico de superfície de resposta tendo-se como atividade a invertase (A) umidade x temperatura; com ponto de sela o (B) tempo x temperatura e (C) tempo x umidade.	62

Figura 20	Temperatura e pH ótimo de α -amilase de <i>A. niger</i> . O círculo central em vermelho intenso indica o ponto central de pH 5,0 e temperatura ótima em 50°C.	63
Figura 21	Efeito da termoestabilidade de α -amilase produzida por <i>A. niger</i> .	64
Figura 22	Efeito da influência de sais na atividade de α -amilase produzida por <i>A. niger</i> .	65
Figura 23	Atividade enzimática da α -amilase após o congelamento do extrato enzimático.	66
Figura 24	Gráfico de Lineweaver e Burk demonstrando o efeito da concentração de substrato na atividade amilásica do extrato enzimático de resíduos de <i>C. linearifolius</i> após extração de óleos essenciais.	67

LISTA DE ABREVIATURA

AE	Atividade específica
a_w	Atividade de água
BA	Bahia
<i>C</i>	<i>Croton</i>
°C	Grau Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
DNS	Ácido dinitrosalicílico
EEB	Extrato enzimático bruto
Fc	F calculado
FES	Fermentação em estado sólido
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
Flona	Floresta Nacional de Contendas do Sincorá
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Ft	F tabelado
g	Grama
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LABRA	Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais
m	Metro
M	Molar
ML	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Matéria Seca
nm	Nanômetro
NT	Nitrogênio total
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Relação peso por volume
R ²	Coefficiente de determinação múltipla
rpm	Rotação por minuto
Tr	Tempo de reação
T	temperatura
TP	Tempo
Trat	Tratamento
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
U	Umidade
Ug ⁻¹	Unidade por grama
Va	Volume de amostra
Ve	Volume de água para extração
V _{máx}	Velocidade máxima
Vs	Volume de substrato
X	Concentração de açúcares redutores

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Bioma Caatinga	14
2.1.1 Gênero <i>Croton</i>	16
2.1.2 <i>C. linearifolius</i> Müll. Arg.	20
2.2 Óleo essencial: Aspectos gerais e perspectivas em espécies de <i>Croton</i>	24
2.3 Fermentação em estado sólido (FES)	25
2.4 <i>Aspergillus niger</i>	29
2.5 Enzimas	32
2.5.1 α -amilase.....	33
2.5.2 Celulases.....	35
2.5.3 Invertases	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Coleta do material vegetal	38
3.2 Extração do óleo essencial das folhas do <i>C. linearifolius</i>	38
3.3 Composição química do resíduo de <i>C. linearifolius</i>	40
3.4 Obtenção do microrganismo.....	40
3.5 Preparo do inóculo para fermentação em estado sólido	40
3.6 Avaliação da umidade para o crescimento do fungo <i>A. niger</i>	40
3.7 Determinação de açúcares redutores	41
3.8 Curva analítica de glicose.....	41
3.9 Fermentação em estado sólido (FES)	43
3.10 Obtenção do extrato enzimático bruto.....	44
3.11 Determinação da atividade enzimática da α -amilase.....	44
3.12 Determinação da atividade enzimática de celulase	44
3.13 Determinação da atividade enzimática da invertase.....	45
3.14 Análise estatística	45

3.15	Caracterização enzimática da α -amilase.....	46
3.15.1	Determinação da estabilidade às variações de pH.....	46
3.15.2	Determinação da termoestabilidade.....	47
3.15.3	Efeito da adição de sais	47
3.15.4	Efeito do congelamento	48
3.15.5	Estimativa dos parâmetros cinéticos.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Composição química do resíduo das folhas do <i>C. linearifolius</i>	49
4.2	Avaliação da umidade para o crescimento do fungo <i>A. niger</i>	50
4.3	Perfil fermentativo para as enzimas α -amilase, celulasas e invertase	50
4.4	Otimização da produção das enzimas: α -amilase, celulasas e invertase	52
4.5	Caracterização enzimática da α -amilase.....	63
4.5.1	Efeito do pH sobre a atividade da enzima α -amilase	63
4.5.2	Termoestabilidade	64
4.5.3	Efeito dos sais	65
4.5.4	Efeito do congelamento	66
4.5.5	Parâmetros Cinéticos	66
5	CONCLUSÃO	68
6	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é o único bioma considerado exclusivamente brasileiro, ocupando 12% do território nacional. É um mosaico de vegetação arbustiva e trechos de floresta seca, que vem sendo desprezado cientificamente há alguns anos. Sabe-se que 50% de todo território da Caatinga tem sido negligenciado e ainda não se tem uma estimativa da riqueza total de alguns grupos taxonômicos. Dentre essas, algumas espécies nativas da flora medicinal estão sendo modificadas através de coleta irregular. Essa prática provoca o desaparecimento de diversas espécies (SANTOS et al., 2011).

Apesar de todas as adversidades do clima, como os longos períodos de seca, a flora do bioma Caatinga consegue sobreviver e adaptar-se as condições climáticas severas do semiárido, por possuir metabolitos secundários, como as essências, que funcionam na defesa de herbívoros, na atração de polinizadores e na ação protetora em relação a estresses abióticos (SILVA, 2013).

Nesse contexto, a exploração das atividades desses compostos secundários pode ser vista como uma alternativa para o controle de fitopatógenos, formulação de fármacos e coadjuvantes. No gênero *Croton* estão alocadas espécies que apresentam potencial medicinal, já comprovado cientificamente, a exemplo de *C. linearifolius*, espécie endêmica do Brasil, reconhecida popularmente por sua propriedade inseticida, apresentando importância ecológica e econômica (SILVA et al., 2010). Segundo Brito (2014), a atividade inseticida do *C. linearifolius* deve-se aos compostos β -cariofileno e óxido de cariofileno encontrado após extração dos óleos essenciais.

Apesar da relevância são incipientes os estudos do gênero sob outros aspectos, sobretudo as publicações com dados associados ao reaproveitamento de resíduos gerados após a extração de óleos essenciais de espécies de *Croton* (GIOVANETT, 2014).

Tendo em vista que a indústria de óleos essenciais no Brasil ainda é pequena, apesar da demanda, pesquisas que atuem no reaproveitamento de resíduos vegetais, gerados após a extração do óleo essencial, tem como finalidade prevenir problemas ambientais, descartes ou manejos inadequados, aliados, a produção de produtos economicamente atrativos, como a produção de enzimas (GONÇALVES FILHO, 2011).

De acordo com Pinto et al. (2005), uma das técnicas de bioconversão que tem se mostrado importante dentro desse contexto é a fermentação em estado sólido (FES), a qual se

mostra relevante por apresentar baixos custos, reprodutibilidade e obtenção de produtos de importância comercial. Nessa perspectiva, a FES associada à produção, otimização e purificação de extratos enzimáticos, produzidos através da reutilização de resíduos agroindustriais e vegetais se tornam atrativos junto à comunidade científica, como uma alternativa para produção de biomoléculas e minimizar os impactos ambientais (MONTEIRO & SILVA, 2009).

Na literatura ainda são insipientes trabalhos que cite o reaproveitamento de resíduos após a extração de óleos essenciais, em espécies do gênero *Croton*, para a produção de enzimas. Os estudos relatados estão associados ao seu potencial inseticida (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2014); anatomia foliar (BRITO et al., 2011); diversidade genética (SCALDAFERRI et al., 2013) e avaliação da atividade antioxidante (BRITO, 2014).

Assim, o presente trabalho objetivou-se a produção das enzimas α -amilases, celulasas e invertases, a partir da fermentação em estado sólido, utilizando o fungo filamentoso *A. niger*, através do reaproveitamento de resíduos das folhas de *C. linearifolius*, após a extração do óleo essencial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioma Caatinga

Caatinga é um tipo de vegetação a origem do seu nome vem do Tupi-guarani (CAA= mata e TINGA = branca), mata branca, por apresentar um aspecto esbranquiçado em sua paisagem (PRADO, 2003; GIULIETTI et al., 2004).

Esse bioma possui uma área aproximadamente de 844.453 mil quilômetro quadrado é considerado exclusivamente brasileiro. Ocupa cerca de 11% do território nacional, sendo 60% localizado na região nordeste do Brasil, estendendo-se entre os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Piauí, Bahia e uma parte do norte de Minas Gerais (AB´SABER, 1977; IBGE, 2004; ANDRADE et al., 2005).

O clima desse bioma é semiárido, conhecido também por “Polígono das secas” (MAIA, 2004), com temperatura anual variando entre 24 °C e 30 °C, insolação o ano todo (SAMPAIO, 2010). A Caatinga tem duas estações do ano bem definidas: uma com chuvas irregulares que dura de três a cinco meses; e a outra de seca, com uma duração maior, de sete a nove meses (ANDRADE et al., 2005). Segundo Drumond et al. (2000), a precipitação na Caatinga varia de 250 a 1000 mm por ano.

Apesar das restrições quanto à disponibilidade de água, a maioria das terras da Caatinga possui reservatórios de águas subterrâneos. Seus rios podem ser intermitentes, com pouco volume de água, e secam nos períodos de seca (DRUMOND et al. 2000), ou perenes, como a bacia do rio São Francisco que atravessa de norte a sul o estado da Bahia (SAMPAIO, 2010).

Dessa forma, é importante destacar que a água é um fator essencial para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas, por isso as mesmas procuram se adaptar à falta de água. Com o estresse hídrico frequente, essas plantas diminuem seu crescimento, como também sua produtividade e tentam se adaptar ao ambiente, sofrendo alterações morfológicas e metabólicas, para sobreviver nesse ambiente hostil (BLUM, 1996).

De acordo com Velloso et al. (2002) e Alves et al. (2009), o solo desta região apresenta uma formação espacial complexa. Com algumas exceções, o solo é pouco desenvolvido, pedregoso, rico em minerais, mas com baixa capacidade de retenção de água.

O solo do semiárido, de uma forma geral não é profundo, com boa fertilidade química, ricos em nutrientes e com boas características físicas. Foram identificados 15 classes de solos

(ARAÚJO FILHO, 2002). Entre esses estão os latossolos, argissolo, neossolos, litólicos, planossolos, quartzarênicos (SAMPAIO, 1995; JACOMINE, 2002).

Segundo Sampaio (2010), somente alguns solos dispõem de nitrogênio e carbono, dois elementos importantes para dinâmica dos ecossistemas, esse fato ocorre devido ao uso contínuo do solo para agropecuária aliado ao desmatamento, sendo que essas práticas ocorrem há décadas. O efeito desse comportamento leva a redução de carbono e consequentemente ocorre o aumento de CO₂ na atmosfera do semiárido (GIONGO, 2011).

Ainda sobre o bioma Caatinga ressalta-se que também é marcado pelo alto grau de endemismo florísticos (Figura 1), isto é, espécies que só ocorrem em determinada região, com características peculiares dos diferentes tipos de vegetação. Uma justificativa para essa particularidade está na capacidade de espécies que habitam essa região disporem de adaptações sem decorrência das intensas variações ecológicas deste ambiente; como as espécies umbuzeiro (*Spondias tuberosas*); juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart); xiquexique (*Pilocereus gounellei*); mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C) (SILVA et al., 2016).

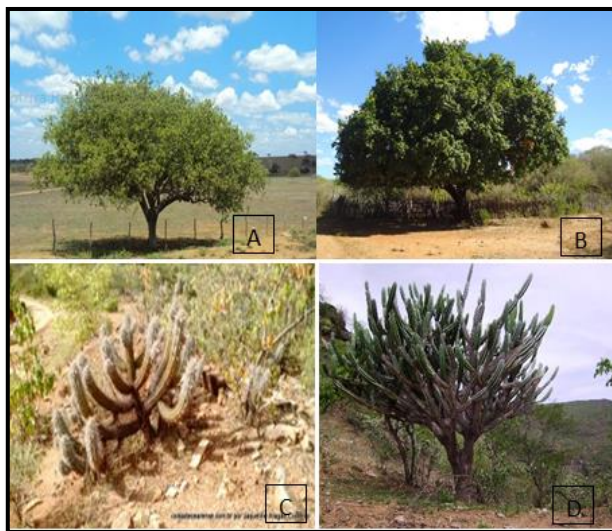


Figura 1- Árvores que representam a diversidade de espécies da Caatinga.
(A) Umbuzeiro (*Spondias tuberosas*); (B) Juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart);
(C) Xiquexique (*Pilosocereus gounellei*); (D) Mandacaru (*Cereus jamacaru*).
Fonte: <http://rosadacaatinga.blogspot.com.br/2013/04/arvores-do-piaui.html>.

A vegetação da Caatinga é bastante diversificada (ALVES et al. 2009), e contém uma gama de espécies vegetais (GIULIETTI et al., 2004). Está subdividida em ecorregiões que são definidas a partir de fatores abióticos (características do solo, relevo, solo, altitude) e bióticos (distribuição de espécies), como: complexo de Campo Maior, Complexo Ibiapaba-Araripe, Planalto da Borborema, Depressão Sertaneja Setentrional, Depressão Sertaneja Meridional,

Dunas do São Francisco, Complexo da Chapada Diamantina, Raso da Catarina (VELLOSO et al., 2002).

Acredita-se que pelo menos 932 espécies vegetais já foram registradas nessas regiões (GIULIETTI et al. 2004 E ALVES et al. 2009), sendo constituídas por plantas caducifólia, xerófila por vezes espinhosas, variando com os tipos de solos, as quais são adaptadas ao clima seco e à baixa disponibilidade de água, caracterizando sua heterogeneidade (DRUMOND et al., 2000).

Drumond et al. (2000) e Alves et al. (2009), relatam que a vegetação da Caatinga é de pequeno porte. Isso porque são espécies vegetais que apresentam folhas pequenas, o que evita maior transpiração, perde suas folhas no início da estação seca (espécies caducifólias).

Considerando a diversidade de espécies de plantas da Caatinga algumas são vistas como medicamentosas por parte da população, como velame (*Croton heliotropiifolius*) que é utilizado para dor de estômago, vômitos e atenuar a febre (SCALDAFERRI, 2013); marmeleiro (*Croton blanchetianus* Ball) são antifebris; pau-ferro (*Caesalpinia leiostachya*) antiasmática e anticéptica, Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) tem efeito adstringente; Angico (*Anadenanthera macrocarpa* Benth) adstringente; catingueira (*Caesalpinia bracteosa* Tull) antidiarreica, entre outras (DRUMOND et al., 2000).

Apesar de tantas características importantes esse bioma ainda necessita de incentivo e do empenho de pesquisadores, órgãos governamentais e políticas públicas, o bioma Caatinga tem muito a ser descoberto, mais precisa que as mesmas estejam atreladas ao uso sustentável de seus recursos, focando na preservação de espécies ameaçadas. Assim, os potenciais econômicos e biológicos das espécies encontradas na Caatinga ainda não retornam para o semiárido como investimento, para sanar os desequilíbrios gerados pela ação humana, há vários anos. Dessa forma urge a necessidade de ações que venham a proteger e resguardar a biodiversidade do local (GIULLIETT et al., 2004).

2.1.1 Gênero *Croton*

O gênero *Croton*, pertencente à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Crotonea. São mais de 1.200 espécies localizadas em regiões diferentes, só no Brasil são 350 espécies de árvores, arbustos e ervas catalogadas (BERRY, 2006) e os estudos de Feliu (2011), 70 espécies dessas são conhecidas na Caatinga (Figura 2).

Esse gênero é o segundo maior da família Euphorbiaceae concentrado principalmente nas regiões tropicais, podendo ser encontrado também em áreas subtropicais. Muitas das

espécies que compõe esse gênero são usadas na medicina tradicional e também em produtos medicinais comercializados internacionalmente (LIMA & PIRANI, 2008).



Figura 2- Paineil ilustrativo de diferentes espécies de *Croton*:
(A) *C. campestris*; (B) *C. heliotropiifolius*; (C) *C. flavens*;
(D) *C. sellowii* Baill. Fonte: <http://picsr.com/photos>.

Segundo Mueller (1873), esse gênero é considerado um grupo de alta complexidade taxonômica. Sua vasta distribuição geográfica, o número de espécies juntamente com sua grande diversidade morfológica, potencializa problemas de nomenclatura e de tipificação (DOURADO & SILVEIRA, 2005).

Sabe-se que as plantas desse grupo apresentam morfologia diversificada, que variam desde pequenas ervas até árvores robustas. A maioria delas pode ser encontrada em áreas abertas, matas úmidas e florestas secas. Algumas crescem em beira de estradas, lugares perturbados ou nas margens de rios (BERRY et al., 2005).

Os estudos de Torres (2009) demonstram que todas as espécies de *Croton* são perenes, plantas que desenvolvem próximas umas das outras, que chegam a medir de trinta centímetros a cinco metros de altura, são monóicas, nas inflorescências apresentam flores femininas na base e masculinas no ápice. São espécies de plantas importantes para comunidades que vivem longe dos centros urbanos devido as suas propriedades medicinais.

Ressalta-se que antes da colonização, o uso de plantas com fins medicinais no Brasil já era recorrente. As utilizações das mesmas eram feitas como encontradas na natureza, direcionando vários estudos de fitoterápicos em comunidades. Alguns projetos de pesquisas

que contribuíram para o conhecimento dessas plantas nativas da Caatinga (SILVA et al., 2010; 2014; TRINDADE & LAMEIRA, 2014; SANTOS-LIMA et al., 2016).

As espécies do gênero *Croton* são conhecidas por suas propriedades químicas e farmacológicas. Bastante utilizadas pelo seu potencial fitoterápico e/ou biológico (LIMA & PIRANI, 2008), são produtoras de substâncias com potencial cicatrizante, gastroprotetor, anti-inflamatório e antioxidante (SALATINO et al., 2007; SILVA et al., 2010).

A partir da premissa de suas propriedades medicinais (Tabela 1), partes dessas plantas como folhas, caules e raízes são comercializadas no mercado informal, como uma fonte de renda para a população que vive no sertão. Assim a partir da divulgação dos vários estudos de prospecção e identificação de metabolitos secundários, diversas espécies do gênero *Croton* se tornaram alvo de estudos que visam o conhecimento e ação, procurando ensinar a comunidade uma forma de uso sustentável (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Conforme Filho et al. (2013), a medicina veterinária também tem intensificado o uso de plantas no controle de ectoparasitas e de endoparasitas, como o marmeleiro (*Croton blanchetianus* Baill), uma vez que o uso de inseticidas químicos além de contaminar o ambiente, prejudica a carne, ovos, leite. Essa ação tem contribuído para melhora na produção de alimentos de origem animal (SILVA et al., 2010).

As plantas desse gênero se destacam por produzirem metabólicos secundários como terpenóides, alcalóides, flavonóides. São encontrados e identificados em caules, folhas e raízes. Esses constituintes podem garantir a sobrevivência das espécies, protegendo a planta contra herbívoros, ataques de patógenos, além de favorecer a atração de polinizadores através de seus aromas, encontrados nos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2010; PEREIRA & CARDOSO, 2012; BRITO, 2014; SANTOS, 2015).

Tabela 1 - Espécies do gênero *Croton* com propriedades medicinais

Espécies	Parte da planta	Uso popular	Referências
<i>C. linearifolius</i>	Caule	Efeito inseticida	Silva et al., 2014
<i>C. zehntneri</i>	Folhas e casca do caule	Atividade antimicrobiana, sedativo, distúrbios gastrointestinais	Alves, 2009
<i>C. heliotropiifolius</i>	Cascas do caule e folhas	Dores de estômago, vômito, diarreia.	Randau, 2001
<i>C. lechleri.</i>	Casca	Antidiuréticos, cicatrizante	Jones, 2003
<i>C. caryophyllus</i>	Entrecascas do tronco	Potencial inseticida, anti-inflamatório, antisséptico cicatrizante.	Cavalcante et al., 2004
<i>C. cajucara</i>	Casca do caule	Tratamento diabetes, da malária, doenças hepáticas, controle do colesterol.	Silva et al., 2012
<i>C. urucurana</i>	Folhas e cascas do caule	Anti-hemorragico, antisséptica, anticancerígeno, anti-inflamatório.	Monteiro, 2015
<i>C. nepetaefolius</i>	Folhas	Distúrbios gastrintestinais, Anti-inflamatório	Fontenelle, 2008
<i>C. sellowii Baill</i>	Raízes	Ação antibacteriana	Palmeira-Junior et al., 2006

2.1.2 *C. linearifolius* Müll. Arg.

Conhecido popularmente como “velame pimenta, o *C. linearifolius* (Figura 3) é uma espécie encontrada no nordeste do Brasil, é considerada uma espécie restrita ao bioma da Caatinga. Trata-se de um arbusto de porte variável (0,5m – 2,0m), que ocorre em áreas de baixa drenagem, são monóicos, apresentam caules lepidoto e tricomas, folhas estreitas e flores ocorrendo nos meses de janeiro, fevereiro, abril, outubro e novembro, variando de lanceoladas a estreitamente elípticas (LIMA & PIRANI, 2008).

Brito et al. (2011), complementaram as definições de Lima e Pirani (2008) ao dizer que a caracterização anatômica de órgão de plantas pode fornecer dados importantes para uma melhor descrição de algumas espécies, principalmente quando se trata de plantas com potencial bioinseticida e farmacológico.

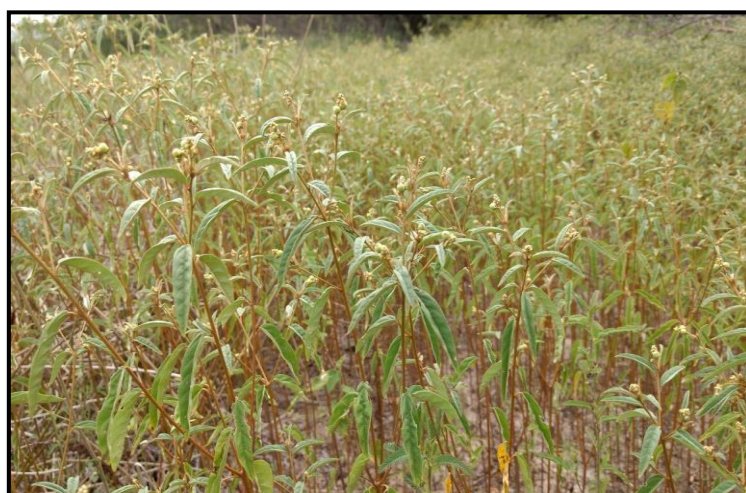


Figura 3 - *C. linearifolius* em seu habitat natural da Caatinga (Arquivo pessoal).

No Brasil, a espécie *C. linearifolius* ocorre no norte de Minas Gerais, Piauí, Bahia e sul do Tocantins, sendo encontrado na Caatinga arbustiva e cerrado, sob solo arenoso, com altitude entre 200 e 750 m (Torres, 2009). De acordo com Lima e Pirani (2008), essa espécie está mais concentrada no sul do país, principalmente, em locais como campos úmidos próximos a brejos, e também nas bordas de matas degradadas.

Silva et al. (2010), afirma que um levantamento etnobotânico realizado junto a curandeiros e mateiros do município de Contendas do Sincorá, região do semiárido baiano, indica que o extrato etanólico do caule do *C. linearifolius* tem um efeito inseticida sob os adultos de *Cochliomyia macellaria*.

Outras espécies do gênero *Croton* também têm demonstrado atividade larvicida sob o *Ae. aegypti* entre elas *C. heliotropiifolius* Kunth, *C. pulegioidorus* Baill, *C. argyrophylloides* Muell, *C. nepetaefolius* Baill, *C. sonderianus* Muell, *C. zehntneri* Pax e *C. bonplandianum* Bail, utilizando-se óleos essenciais, extraídos de diferentes partes do vegetal. A partir disso o uso de inseticidas químicos vem sendo substituído pelo uso de bioinseticidas, menos impactantes ao meio ambiente (DORIA et al., 2010).

O *C. linearifolius*, também apresenta potencial inseticida contra o *Ae. aegypti* (SILVA et al., 2014). Lima e Pirani (2008) relatam que a espécie apresenta metabólitos secundários vegetais voltados para aplicações terapêuticas, alimentícias, perfumaria entre outros; motivo pelo qual tem despertado atenção e interesse econômico. Assim, esses metabólitos secundários vêm ganhando destaque em pesquisas, desde que novas descobertas sobre suas funções começaram a surgir, sobretudo no que se refere às condições ambientais em que essas plantas vivem em temperaturas extremas, estresse hídrico, além da sua defesa contra herbívoros e patógenos.

São poucos os estudos encontrados na literatura com a espécie *C. linearifolius*, o que pode estar relacionado à ocorrência específica em certas regiões geográficas e, também, ao fato de ser encontrado apenas em estações chuvosas, período em que na região nordestina, vai de novembro ao final de março (SILVA et al., 2010). Alguns desses estudos estão demonstrados na Tabela 2.

Para Silva et al. (2010), são incipientes os estudos voltados a investigação do gênero *Croton* sob diversos aspectos, sobretudo as publicações com dados associados a geração/reaproveitamento de seus resíduos aliados a extração de óleo essencial.

Tabela 2 - Estudos realizados com *C. linearifolius*

Título	Área de estudo	Referências
Bioatividade do extrato etanólico do caule de <i>Croton linearifolius</i> Müll. Arg. (Euphorbiaceae) sobre <i>Cochliomyia macellaria</i> (Diptera: calliphoridae)	Bioprospecção	Silva, L.C.; Carvalho, M. G.; Gualberto, S. A.; Torres, D.S.C.; Vasconcelos, K.C.F.; Oliveira, N.F. 2010.
Anatomia foliar de <i>Croton linearifolius</i> Müll. Arg.	Genética	Brito, M. S.; Fries, D.D.; Gualberto, S. A.; Silva, S.L.C. 2011.
Influência do estresse hídrico sobre a produção de enzimas antioxidantes do <i>Croton linearifolius</i> (Euphorbiaceae)	Bioquímica	Brito, M. S. 2012.
Comparison of protocols for genomic DNA extraction from "velame pimenta" (<i>Croton linearifolius</i>), a native species to the Caatinga, Brasil	Biologia molecular	Scaldaferri, M. M.; Freitas, J. S.; Santos, E. S. L.; Vieira, J. G. P.; Gonçalves, Z. S.; Cerqueira-Silva, C. B. M. 2013.
Diversidade genética em velame pimenta (<i>Croton linearifolius</i>) e Cassutinga (<i>Croton heliotropiifolius</i>) em ambientes silvestres no Sudoeste da Bahia	Diversidade genética	Scaldaferri, M. M. 2013.
<i>Croton linearifolius</i> : Produção de mudas e respostas fisiológicas ao estresse hídrico	Bioquímica	Pereira, I. S. 2013.
Comparison of methods for estimates of molecular genetic diversity in genus croton: influence of coefficients, clustering strategies and data projection	Genética	Scaldaferri, M. M.; Freitas, J. S.; Vieira, J. G. P.; Gonçalves, Z. S.; Cerqueira-Silva, C. B. M. 2014.

Continuação - Estudos realizados com C. linearifolius

Avaliação da atividade larvica de extratos obtidos do caule de <i>Croton linearifolius</i> Müll. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: culicidae)	Prospecção fitoquímica	Silva, S. L. da C.; Gualberto, S. A.; Carvalho, K. Da S.; Fries, D. D. 2014.
Atividade larvica do extrato etanólico da raiz de <i>Croton linearifolius</i> sobre <i>Aedes aegypti</i>	Bioquímica	Oliveira, G. P.; Silva, S. L. C ; Gualberto, S. A.; Cruz, R. C. D. ; Carvalho, K. S. 2014.
Prospecção química e avaliação da atividade antioxidante de extratos de caules de <i>Croton linearifolius</i> (Euphorbiaceae)	Prospecção	Brito, M. S. 2014.
Determinação da composição química e avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de <i>Croton linearifolius</i> (Euphorbiaceae)	Prospecção	Brito A. V. R. 2014.
Estudos genético moleculares em Cassutinga (<i>Croton heliotropiifolius</i>) e velame pimenta (<i>Croton linearifolius</i>) com vistas à caracterização da diversidade	Genética	Rocha, T. de O. 2015.
Estimativas genéticas em <i>Croton linearifolius</i> Müll. Arg. (Euphorbiaceae) por Meio de marcadores moleculares.	Genética	Silva, T. S. S. 2016.

2.2 Óleo essencial: Aspectos gerais e perspectivas em espécies de *Croton*

Os óleos essenciais são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e odoríferas, que integram o metabolismo secundário das plantas, podendo ser encontrado em diferentes partes das plantas, como folhas, flores, caules, sementes, cascas, frutos, raízes (BRITO, 2014). Esses metabolitos são de grande interesse devido as suas propriedades aromáticas e farmacológicas, com aplicações terapêutica, cosmética e tecnológica. Óleo essencial é definido pela Internacional Standard Organization (ISO) como óleos voláteis ou simplesmente essências (VITTI & BRITO, 2003).

Na antiguidade o povo egípcio fazia uso de óleos essenciais como agentes medicinais, esses óleos eram usados em práticas religiosas, associados à cura de males e, durante a Idade Média, esse processo foi sendo aprimorado pelos árabes e egípcios e persas que através do processo de destilação, começaram comercializar produtos aromáticos, utilizados na conservação de alimentos, anestésico local, anti-inflamatório e sedativo (SANTOS, 2008; VIDO, 2009).

Desde então, o mercado de fitoterápicos vem aumentando e se consolidando mundialmente. Os maiores consumidores de óleos essenciais do mundo são os Estados Unidos com 40% de consumo, a União Europeia apresenta um crescimento de 11% ao ano. O Brasil se destaca como um dos maiores fornecedores de óleos essenciais com 5% ficando em destaque com relação a outros países como a Índia, China e Indonésia. Apesar da demanda, o Brasil ainda se encontra em processo de desenvolvimento e consolidação a cerca desse cenário, devido a problemas como a falta de qualidade, baixo investimento governamental (STEFFERS, 2010).

Diante do conhecimento popular, várias plantas têm sido utilizadas por comunidades rurais como fitoterápicos. Algumas espécies do gênero *Croton*, que produzem óleos essenciais, apresentam propriedades biológicas comprovadas, entre elas, o *C. linearifolius* com atividade inseticida (SILVA et al., 2010), *C. zehntneri*, para tratamento de distúrbios gastro intestinais (ALVES, 2009), *C. argyrophyllus* com atividades antimicrobiana, antioxidante e também propriedades farmacológicas de analgésica, antisséptica e anti-inflamatória (ANGÉLIGO et al., 2012), *C. celtidifolius* com atividade antioxidante (FONTENELLE, 2008), *C. sonderianus* com atividade antifúngica e *C. nepetaefolius* com atividade antimicrobiana (OLIVEIRA, 2008).

A concentração das substâncias que compõe os óleos essenciais pode ser influenciada pela temperatura, radiação, ventos fortes, solo, período de colheita, fertilizantes e estresse.

São conhecidos 3000 tipos de óleos essenciais atualmente, 300 apresentam importância comercial (VIDO, 2009). A busca por novos aromas faz crescer a demanda por produtos originais obtidos diretamente de espécies do gênero *Croton* (VITTI & BRITO, 2003; FONTENELLE, 2008; BASTO, 2014).

Assim como os estudos de Cruz et al. (2017), que visam a toxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* em *Ae. aegypti* (Diptera: culicidae e *Mus musculus* (Rodentia: muridae); Araújo Filho (2017) pesquisou o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e citronelal sobre isolados de *Haemonchus contortus*; Carvalho et al. (2017) avaliou a toxicidade do óleo essencial de *Croton tetradenius* em *Ae. aegypti*; Ribeiro e colaboradores (2018) analisou o efeito de óleos essenciais e seus compostos no controle de nematoides gastrointestinais em pequenos ruminantes.

2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES (Figura 4) pode ser definida como uma técnica onde o crescimento dos microrganismos acontece no interior de partículas porosas úmidas, na qual o líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água, que assegure o crescimento e metabolismo celular; desde que não ultrapasse a capacidade máxima de retenção de água na matriz (PANDEY, 2003).



Figura 4 - Fermentação em estado sólido (Fonte: Autora).

Desde a antiguidade a FES têm sido desenvolvida para a produção de alimentos e bebidas fermentadas, como o molho de soja, que já se preparava na China a 3000 a. C. (ARAÚJO, 2004).

Práticas religiosas, como no budismo em países como China e Japão impulsionaram o uso da FES, com a proibição de consumo de carne, incentivava, o consumo de vegetais como o arroz, a soja. Até o século XVIII a preparação de alimentos fermentados restringia apenas as famílias, que se tornaram a base de grandes indústrias do oriente hoje. Após alguns anos o enriquecimento proteico de ração animal tornou-se a principal atividade que motivou os países ocidentais a continuar com a FES (PANDEY, 2003).

De acordo com Reid (1989), a deslignificação biológica utilizando fungos para liberar celulose a partir da fermentação em estado sólido, pode ajudar na alimentação de animais, tornando esses custos mais atrativos.

Segundo Pandey (2003), depois da 2ª Guerra Mundial com a criação da Penicilina pelo método da fermentação submersa, a FES começou a desaparecer nos países ocidentais, começando a retornar 1940, quando resíduos agroindustriais eram aproveitados para o enriquecimento protéico de rações animais, agregando valor a um material de baixo custo, além de ajudar a reduzir a poluição causada por esses resíduos.

Assim seus benefícios têm se estendido ao interesse das indústrias farmacêuticas, bioquímica e ao desenvolvimento de tecnologias como na produção de enzimas, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, agentes de biorremediação, entre outros (HESSELTINE, 1987; PANDEY, 2003). Segundo Zuñiga et al. (2011), a técnica é vantajosa, pois além de simular o *habitat* microbiano apresenta uma taxa maior na produção enzimática, menor susceptibilidade à inibição e estabilidade das enzimas, frente a variações de temperatura e pH.

Os resíduos vegetais constituem matéria prima de baixo custo, com grande disponibilidade no Brasil (PEREZ, 2017) e segundo Gonçalves Filho (2011) vem sendo aproveitado como fonte de energia renovável (solar, biomassa, etanol, etc.).

O elevado número de espécies endêmicas no Brasil, aliado a extração insustentável dos recursos naturais pela população conduz a degradação do bioma Caatinga, também implica em um cenário preocupante quanto à produção de resíduos. Essa situação demonstra urgência na aplicação de medidas/técnicas que venham a mitigar esses impactos gerados no ambiente (FRANCISCO et al., 2013). A FES se apresenta como estratégia no que tange o reaproveitamento desses resíduos para produção de biocompostos, agregando-lhes valor (PANDEY et al., 1999).

Nessa perspectiva, Singhanian et al. (2010), afirmam que a utilização de técnicas para o reaproveitamento de resíduos, como a FES é amplamente discutida para aprimoramento da

produção enzimática e redução dos custos, visto que, é uma técnica barata, onde se utiliza resíduos agroindustriais ou vegetais como substrato para o crescimento microbiano.

Assim, uma intensa conscientização iniciou-se no fim do século XX, a partir da produção de resíduos, onde foi demonstrada à humanidade a necessidade de se adequar o descarte dos subprodutos gerados (PINTO et al., 2005). A partir dessa questão, o estudo do uso de substratos provenientes de resíduos agroindustriais tornou-se frequente na literatura, a exemplo a casca de mandioca (SANTANA, 2012), farelo de trigo e bagaço da cana-de-açúcar (GRAJALES et al. 2016), casca de café (GUSMÃO et al. 2014), casca de arroz e casca de amendoim (BRITO, 2015).

Santos (2007), afirma que a FES apresenta muitas vantagens, especialmente porque nesse processo não há necessidade de enriquecimento do meio, utiliza apenas água, substrato e a solução de esporos do microrganismo, o que viabiliza sua utilização. Bon et al. (2008), complementam as vantagens da FES quando dizem que esse processo apresenta um baixo consumo de energia e necessita de equipamentos mais simples para o processo.

Entretanto, esse processo apresenta como principais desvantagens a dificuldade de medida e controle da aeração, temperatura e umidade. Essas variáveis são diretamente afetadas pelo tamanho das partículas do substrato. Partículas maiores aumentam a aeração e impedem o aquecimento do sistema pela respiração do fungo, porém limitam a superfície do substrato a qual o microrganismo tem acesso (HONG et al., 1988; RODRIGUES & SANT'ANNA, 2001).

Em relação ao microrganismo utilizado na FES deve-se selecionar o mais adequado, para a produção de enzimas, visto que cada espécie apresenta maior ou menor afinidade por determinado substrato, secretando metabólitos em maior ou menor escala (LOPES et al., 2013) como descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Microrganismos utilizados para produção de enzimas por FES

Enzimas	Fungos	Resíduos	Referências
Amilase	<i>Rhizopus</i>	Bagaço de mandioca	Soccol et al., 1994
Amilase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	Nandakumar et al., 1999
Celulases	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de arroz	Rocha, 2010
Endoglucanase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	Jecu, 2000
Glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de mandioca	Dalsenter, 2000
Poligalacturonase celulase, xilanase, protease	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo, Casca de Manga	Couri et al., 2000
Lipase	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu	Palma et al., 2000
Lipase	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Farelo de trigo	Ul-Haq et al., 2002
Invertase	<i>Aspergillus casingii</i>	Farelo de soja	Novaki et al., 2010

Fonte: Palma (2003, pg. 20).

2.4 *Aspergillus niger*

Aspergillus é o gênero mais comum dentre os fungos filamentosos, pertencente ao filo Ascomycota. As espécies desse gênero podem viver na água, ar, em espécies vegetais ou animais e em superfícies; além de estarem associados com a deterioração de alimentos e materiais vegetais, encontrados especialmente em regiões de clima quente. São economicamente importantes para produção de produtos de interesse industrial, como biossurfactantes, ácidos orgânicos e na produção de enzimas entre elas amilase, celulase, pectinase, proteases, lactases, peroxidases, xilanase, naringinase, β -galactosidase e α -galactosidase (PANDEY et al., 1999; SANTOS, 2010).

Ainda sobre os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* destaca-se que são importantes bioprodutores de metabólitos, apresentando relevância para a indústria biotecnológica. Sua primeira função na indústria de alimentos foi datada no ano de 1919, apresentando alta produtividade na formação do ácido cítrico. Somente a partir de 1960 que a espécie ficou conhecida como produtor de enzimas (BRITO, 2015; Abud SCHUSTER et al., 2002). Wainwright (1995) já indicava o conhecimento de 200 espécies de *Aspergillus* empregadas na biotecnologia, entre elas: *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulan*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. versicolor*, *A. flavus*.

A espécie *A. niger* (Figura 5) normalmente tem um crescimento rápido e seu desenvolvimento começa com micélio de cor clara, inicialmente. Após alguns dias a coloração se altera para marrom ou preto, sendo essa sua característica mais comum. Essa particularidade está ligada diretamente a sua nomenclatura, uma vez que seu nome origina do latim, “*niger*”, que significa “preto” (WAINWRIGHT, 1995; SANTANA et al., 2012).

Vale salientar que os microrganismos precisam ser armazenados e preservados de forma adequada para conservar suas características originais, garantindo uma maior credibilidade aos resultados obtidos nos ensaios biológicos, visto que os mesmos podem sofrer mutação ou mesmo perder a viabilidade de crescimento (COLEN, 2006; FARINAS & BARBOSA, 2012).

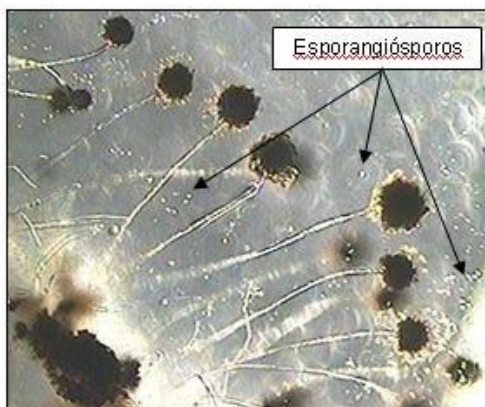


Figura 5 - Esporos do *A. niger*
Fonte: SPIER, (2005).

O *A. niger* é um fungo filamentoso importante economicamente, atende em diversas exigências a produção comercial de enzimas. Esse fato se dá pela facilidade do microrganismo em crescer em substratos de baixo custo, variações de pH e temperatura; e produção de aproximadamente 19 enzimas diferentes, (amilase, celulase, invertase, xilanase, pectinase, naringinase, β -galactosidase, α -galactosidase, poligalacturonase, glucoamilase, entre outras), como descrito na Tabela 4 (PANDEY et al., 1999; COSTA, 2011).

Tabela 4 - Enzimas produzidas por *A. niger* com relevância comercial e suas aplicações

Classe de enzimas	Setor da indústria	Aplicação	Referência
Poligalacturonase	Alimentação	Clarificação de sucos de fruta, extração de óleo de azeitona	Santos & Macedo, 2008.
Celulase	Detergente; Têxtil	Limpeza, clarificação Amaciamento de tecido de algodão	Cardoso et al., 2008.
Celulase	Detergentes, Papel e celulose	Descoloração. Remoção de tintas	Aguiar et al., 2008.
Lactase	Farmacêutica Bebidas	Fabricação de cápsulas de lactase Produção de doce	Cardoso et al., 2008
Invertase	Panificação Saúde	Produção de açúcar invertido higiene bucal	Cardoso et al., 2008
Pectinases	Papel Alimentação	Degomagem de fibras; Clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas.	Patil & Dayanand, 2006.
Naringinase	Bebidas	Remoção do amargor do suco cítrico	Bram & Solomons, 1965.
Protease	Detergentes Papel celulose Couro	Remoção de manchas de proteínas Remoção de biofilms Purga do couro	Paranthaman et al., 2009.
Amilase	Detergentes Panificação Bebidas	Remoção de manchas de amido Maciez volume do pão Tratamento de sucos	Gupta et al., 2008.

Fonte: ROCHA (2010).

2.5 Enzimas

Enzimas são proteínas com função catalisadora, produzidas por células, estimulando ou desencadeando reações químicas. Os estudos com esta biomolécula se iniciaram a partir do século XVIII, com pesquisas sobre a digestão da carne no estômago. A primeira teoria sobre enzimas foi postulada por Jons Berzelius, em 1835 (BERZELIUS & PAYEN, 1848).

No início do século XX, em 1926 houve um grande avanço nos estudos sobre enzimas, com as pesquisas de James Sumner's, que isolou e cristalizou a primeira enzima (urease) (NELSON & COX, 2014).

A indústria alimentícia é uma das principais beneficiárias do uso das enzimas, fazendo com que os alimentos fiquem mais atrativos ao paladar, como exemplo a enzima amilase maltogênica, que deixa os pães com um aspecto mais volumoso, macio e permanece fresco por muito mais tempo (BERZELIUS & PAYEN, 1848). A quimiosina usada na produção de laticínios, a protease tem sido muito utilizada para diminuir o tempo de cura queijos diminuindo assim o custo na produção (ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas podem ser de origem microbiana (amilases, celulasas, invertase, proteases, pectinases, proteases, fitases), vegetal (papaína do mamão, ficina do figo, bromelina do abacaxi), animal (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) ou bacteriana (DALLA-VECCHIA & NASCIMENTO, 2004; SANTANA, 2012 *Apud* HARGER, 1982).

Na lista da Comissão Internacional de Enzimas (E.C.), os números de enzimas empregadas e identificadas são de 3000, entretanto, apenas 3,0% (em valores aproximados), desse quantitativo é aplicável industrialmente (COELHO et al., 2008).

Dessa maneira, a produção de enzimas vem sendo um campo promissor apresentando um alto valor agregado a produtos de baixo valor comercial como resíduo agroindustrial e vegetais. A aplicação dessas enzimas pode ser feita em diversos segmentos, como: medicamentos, cosméticos, alimentação animal, entre outras finalidades. Suas aplicações estão ligadas a áreas da biotecnologia, como a Bioquímica, Genética, Engenharia química, Microbiologia, buscando com essas aplicações melhoria das características físico-química de produtos e matéria prima, garantindo um produto final com qualidade e menores custos (ORLANDELLI et al., 2012).

2.5.1 α -amilase

As α -amilases (EC 3.2.1.1, α -1,4-D-glicano glicanoidrolase), estão entre as principais enzimas industriais e apresentam grande importância na biotecnologia. Ocorrem naturalmente em plantas, animais e microrganismos, sendo esses os mais utilizados na produção de biocompostos, devido à facilidade de manipulação e menor tempo de produção (ORLANDELLI et al., 2012; EL-FALLAL et al 2012).

Segundo Santana (2012) uma grande quantidade de amilases de origem microbianas está presente no mercado devido a sua aplicação na hidrólise do amido em indústrias de processamento. Os mecanismos que estimulam a produção destas enzimas estão associados ao meio e substrato usado como fonte de carbono (OLIVEIRA et al., 2007).

Essas enzimas são conhecidas como amilolíticas, por promover a degradação do amido, com aplicações em diversos segmentos industriais, como exemplo, indústria de papel, panificação, produção de xaropes, bebidas destiladas, aditivos em detergentes, entre outras. A indústria de papel usa a α -amilase para diminuir a viscosidade da goma de amido empregada no papel durante seu processamento, contribuindo também na qualidade do papel. São utilizadas em 90% dos detergentes líquidos ajudando a reduzir a agressividade na lousa (SLIVINSKI, 2007).

Indústrias como as cervejeiras, produção de bebidas alcoólicas, processos de modificação de farinhas empregadas em panificação se utilizam de enzimas que degradam o amido na obtenção de açúcares fermentescíveis (SANTANA, 2012).

Podem-se dividir as amilases em três grupos: α -amilases, encontradas em plantas, animais e microrganismos; β -amilases, encontradas em plantas especialmente trigo, soja, batata doce, e culturas de microrganismos (*Bacillus*, *polymyxa*, *B. cereus*); e amiloglicosidases conhecidas como glucoamilases ou γ amilase uma exoenzima que catalisa a reação de hidrólise das reações α (1-4) e α (1-6) das extremidades não redutoras do amido, transformando em glicose (REED, 1975). A ação destas enzimas estão descritas na Figura 6.

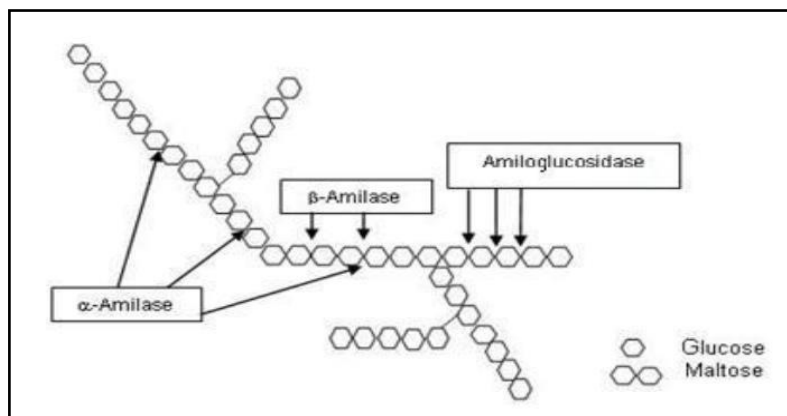


Figura 6 – Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas
Fonte: Santana (2012).

Dentre as hidrólises, a amilase se classifica como catalisadora no desdobramento do amido e glicogênio ingeridos na dieta. Estruturalmente, o glicogênio assemelha-se a amilopectina, com maior número de ramificações. A α -amilase catalisa a hidrólise das ligações α (1-4) das amiloses e amilopctina (MOTTA, 2003).

Já a β -amilase é uma enzima importante para a degradação do amido nas folhas, sendo o amido um dos compostos de reservas existentes nas plantas, servido de fonte de energia na cadeia alimentar dos ecossistemas (AMARAL et al., 2007).

Muitos fatores podem influenciar para uma boa produção de amilase, desde o crescimento do microrganismo até fatores que afetam a atividade da enzima. Os catalisadores necessitam de condições ótimas de temperatura e pH do meio para conseguir a estabilidade e um potencial máximo de atividade; como os mesófilos, que utilizam um faixa de temperatura entre 25-37 °C. As α -amilases das indústria de alimento devem ser estáveis em pH baixo, já na indústria de detergentes por outro lado utilizam o pH mais alto (GARCIA, 2013).

Uma característica importante para amilase é a termoestabilidade. O efeito da temperatura numa reação enzimática é observado pela velocidade de formação do produto. Existe uma temperatura limite para cada enzima, a partir daí acontece gradativamente à desnaturação da proteína pelo calor. Quando a produção é em escala industrial, as temperaturas mais altas são mais vantajosas, diminuindo o risco de contaminação e o tempo de reação (GUPTA et al., 2003; CARVALHO, 2007).

2.5.2 Celulases

As celulases (EC 3.2.1.4) são enzimas que compõem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Essas enzimas são biocatalizadores altamente específicos que atuam simultaneamente sobre substratos para liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de conversão em etanol (CASTRO & JÚNIOR, 2010).

Sendo usada em diversos segmentos industriais como, químico e alimentício. Essa enzima é aplicada em conjunto com hemicelulases e pectinases melhorando a extração, clarificação e filtração dos sucos. Na indústria têxtil as celulases degradam as fibras superficiais tornando os tecidos mais lisos e macios. Podem ser usadas também no processamento de ração animal (ROCHA, 2010).

A celulase começou a ser estudada durante a segunda Guerra Mundial, quando os soldados norte americanos buscavam alguma coisa para resolver a deterioração de barracas, farda, sacolas, entre outros objetos. Assim as forças armadas montaram um laboratório liderado pelo Dr. Elwyn T. Reese e oito colaboradores, que conseguiram em suas pesquisas encontrar fungos filamentosos, como o *Trichoderma viride*, que secretam enzimas capazes de degradar a celulase (CASTRO & JÚNIOR, 2010).

As celulases são classificadas em três grandes grupos: a) Endoglucanases (Endoenzimas) são enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose; b) Exoglucanases (Exoenzimas) atuam na região externa da celulose micro cristalina, liberando unidades de celobiose; e c) β -glicosidases (β -gli), convertem oligossacarídeos solúveis a glicose (LYND & ZHANG 2002). Atuando conjuntamente essas as enzimas do complexo celulósico podem apresentar um rendimento melhor do que a soma individualmente. A ação destas enzimas estão representadas na Figura 7.

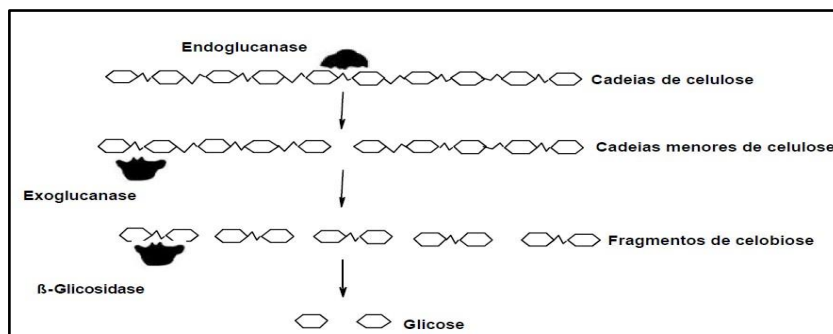


Figura 7- Ação das celulases sobre a molécula de celulose (modificado de WRIGHT et al., 1988).

2.5.3 Invertases

As invertases (EC 3.2.1.26) conhecida também por β -frutofuranosidase agem como catalizador da reação. Essa enzima catalisa a hidrólise da sacarose (NOVAKI et al., 2010), seu principal substrato, em uma mistura de quantidades iguais em glicose e frutose (Figura 8). Essa mistura recebe o nome de açúcar invertido (PARIS, 2008).

As principais aplicações da enzima invertase são na fabricação de alimentos, como balas, geleias, xaropes e doces (MOURA, PINTO & RODRIGUES, 2007). Ainda segundo os autores, frutas como mamão, manga, banana, e tubérculos como batata, apresentam atividade de invertase, ajudando em processos de amadurecimento e também em apodrecimento.

A sacarose é um açúcar natural presente na cana-de-açúcar. Existe um grande interesse em produzir açúcar invertido (xarope de glicose-frutose) que pode ser usado nas indústrias de bebidas ou alimentos, como também diretamente na mesa pelo consumidor (GOULART et al., 2003).

Na indústria alimentícia o açúcar invertido pode ser usado na panificação, fabricação de confeitos, geleias, entre outros. A invertase também está sendo aplicada na produção de mel de sacarose, produtos de higiene bucal e produção de licores (ALMEIDA et al., 2014). Ainda segundo o autor, a enzima invertase pode ser encontrada em diversos organismos, como em vegetais, algas verdes, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), bactérias e no fungo filamentoso *Aspergillus sp.*

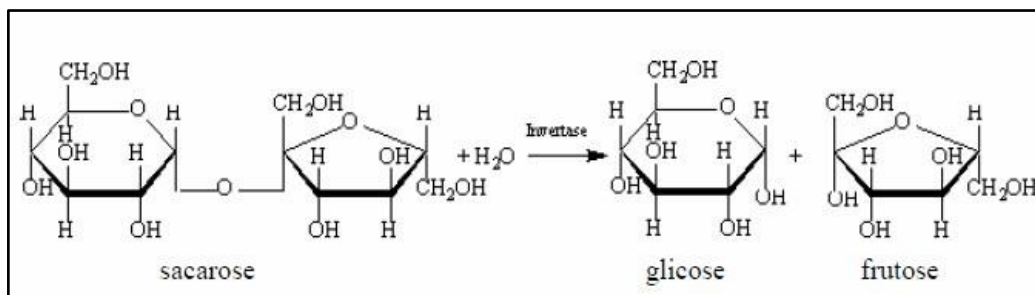


Figura 8 - Esquema de reação catalisada pela invertase (RUSTIGUEL, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

As folhas do *C. linearifolius* foram coletadas, nos meses de maio de 2016 e fevereiro de 2017, na Floresta Nacional de Contendas do Sincorá (FLONA), município de Contendas do Sincorá, Bahia (13°58'10.8"5:41°07'.6W). O depósito da exsicata fica no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana na Bahia, sob o registro HUEFS 146620.

3.2 Extração do óleo essencial das folhas do *C. linearifolius*

O material vegetal foi previamente selecionado, pesado e em seguida seco em estufa de circulação de ar (modelo SL 101 SOLAB), a uma temperatura de 40 °C, por um período de 12 horas. Em seguida, as folhas foram trituradas manualmente e submetidas à extração do óleo essencial pela técnica de hidrodestilação, em extrator de Clevenger (Mod. SL – 76, SOLAB), no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LAPRON (UESB); como apresentado no fluxograma (Figura 9).

Após a extração do óleo essencial, os resíduos das folhas que seriam descartados, foram cedidos pelo LAPRON para seu reaproveitamento. Em sequência, o resíduo foi seco em estufa de circulação de ar, temperatura de 40 °C, por 12 horas e triturado em moinho de faca tipo Wiley (ACB LABOR), com granulometria aproximada de 2 mm.

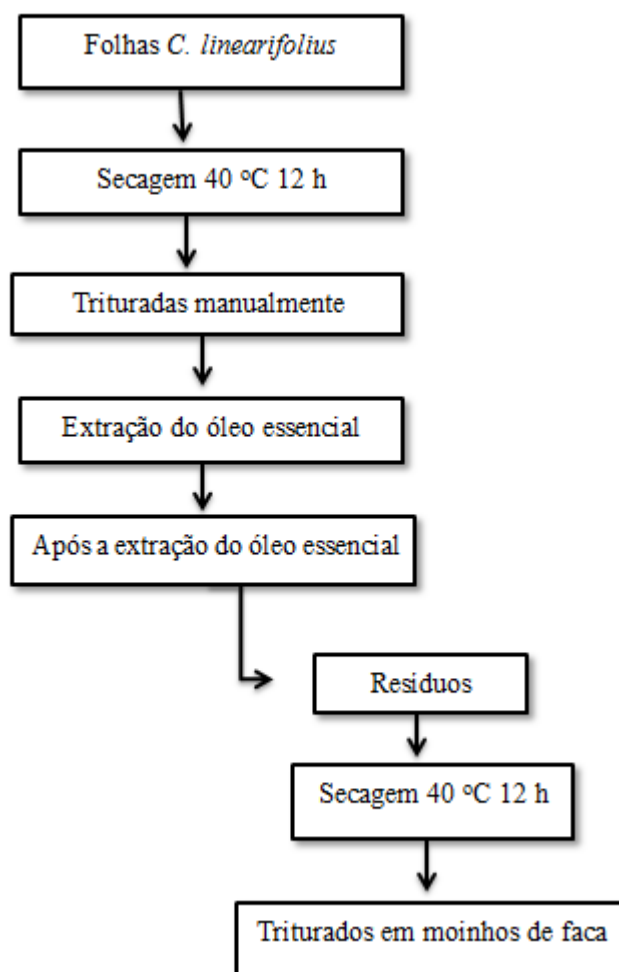


Figura 9 – Fluxograma da extração do óleo essencial das folhas do *C. linearifolius*.

3.3 Composição química do resíduo de *C. linearifolius*

A análise do resíduo foi feita no Laboratório de Forragicultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga-Ba. As folhas de *C. linearifolius* foram submetidas às seguintes análises: Concentração do nitrogênio total (NT), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, celulose, hemicelulose, material mineral e extrato etéreo e lipídios totais. Todas as análises foram feitas com base na matéria seca (SILVA & QUEIROZ, 2012).

3.4 Obtenção do microrganismo

O fungo utilizado no presente trabalho foi o *A. niger* (ATCC 1004), o qual se obteve da coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS) 40018, Lote 068840018, cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil). A coleção é mantida no Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA), preservados em sílica. Todos os experimentos foram realizados no LABRA, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Itapetinga-BA.

3.5 Preparo do inóculo para fermentação em estado sólido

O microrganismo *A. niger* foi inoculado em erlenmeyer de 250 mL, a 30 °C, por sete dias, em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose Ágar) HIMEDIA. Após o período de incubação, os esporos foram recuperados em solução de água destilada estéril contendo solução Tween 80 (VETEC), a 0,01% e pérolas de vidro, previamente esterilizados, em autoclave vertical modelo Prismatec a 121 °C, por 15 minutos. A suspensão foi coletada em erlenmeyer e uma alíquota de 0,1 mL foi tomada e diluída em tubo de ensaio para a contagem dos esporos, realizada em câmara de Neubauer e observada em microscópio binocular (BIOVAL). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/grama (SANTOS et al., 2011).

3.6 Avaliação da umidade para o crescimento do fungo *A. niger*

Cinco gramas do resíduo previamente seco foram acondicionados em erlenmeyer de

125 mL e logo depois de esterilizados em autoclave vertical modelo Prismatec a 121 °C, por 15 minutos. Em seguida, foi inoculado a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/grama da biomassa (TUNG et al., 2004). Inicialmente foi realizado um teste para verificar a melhor umidade (70, 75 e 80%). O cálculo do volume de água adicionado para se chegar à umidade desejada foi realizado mediante o conteúdo da matéria seca da biomassa vegetal, através do determinador de umidade infravermelho MARTE ID2000. As fermentações foram conduzidas em estufa (SOLAB), com a temperatura em 30 °C, por um período de sete dias.

3.7 Determinação de açúcares redutores

O preparo da solução DNS utilizou-se duas soluções A e B, solução A: para um volume final de 1000 mL, 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico foram adicionados a 200 mL de uma solução de hidróxido de sódio (0,002 mM); solução B: 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos em 500 mL de água destilada, após o preparo das duas soluções, a solução A foi adicionada na B, sob aquecimento (50 °C) e agitação constante no agitador magnético com aquecimento (SOLAB SL 91), até a dissolução completa do DNS. Após resfriamento, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi aferido com água destilada. A solução de DNS foi armazenada em frasco de vidro âmbar, etiquetado e datado.

3.8 Curva analítica de glicose

Para a construção da curva analítica da glicose, pesou-se 0,180 g de glicose P.A. Adicionou-se 50 mL de água destilada para diluição do reagente. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume até o menisco, para obtenção da solução estoque na concentração de 10 mM.

Adicionou-se em tubos de ensaios volumes diferentes da solução de glicose, água e 1 mL da solução de DNS, para obtenção das soluções diluídas de glicose. Posteriormente, os tubos foram mantidos em banho maria, a 100 °C, por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 mL de água destilada e realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV – VIS, a 540 nm.

A curva analítica da glicose foi construída através da análise de regressão linear

para obtenção do gráfico da resposta de absorvância (eixo Y) em função da concentração de glicose (eixo X) como mostra a Figura 10.

A equação de regressão linear obtida através da curva da glicose (Tabela 5) foi utilizada para se determinar os valores da atividade enzimática nos ensaios realizados.

Onde Y é o valor da absorvância e X é o valor que se deseja obter (Equação 1). O valor de X é substituído na Equação 2 para obter-se o valor da atividade enzimática em Ug^{-1} .

$$Y = 0,0967X - 0,0182$$

(1)

Tabela 5 - Preparo das diluições para fazer a curva do DNS

Concentração (mM)	Glicose (mL)	Água (mL)	DNS (mL)
0	0,0	1,0	1,0
1	0,1	0,9	1,0
2	0,2	0,8	1,0
3	0,3	0,7	1,0
4	0,4	0,6	1,0
5	0,5	0,5	1,0
6	0,6	0,4	1,0
7	0,7	0,3	1,0
8	0,8	0,2	1,0
9	0,9	0,1	1,0

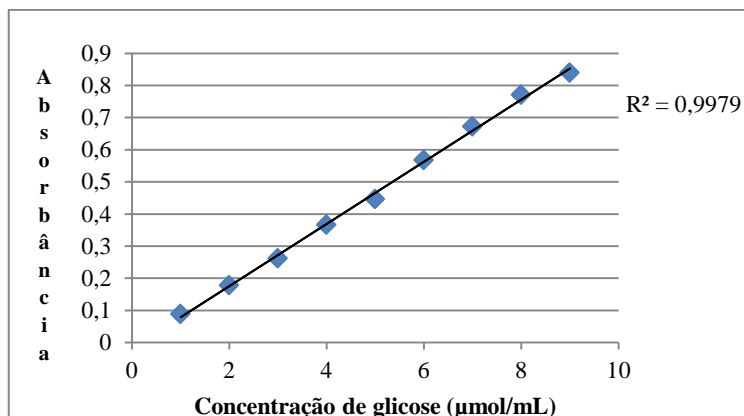


Figura 10 - Curva analítica de glicose.

A partir da equação 2 calculou-se a atividade enzimática da α -amilase, celulase e invertase. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar $1 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{m}^{-1}$ de produto (GHOSE, 1987). A atividade enzimática foi expressa em Ug^{-1} .

$$\text{Atividade enzimática Ug}^{-1} = (X.Tr.Va.Vs)/(Ve/g) \quad (2)$$

Onde:

X = Concentração de açúcares redutores

Tr = Tempo de reação

Va = Volume de amostra

Vs = Volume de substrato

Ve = Volume de água para extração

g = gramas de resíduo

3.9 Fermentação em estado sólido (FES)

Após análise para verificar a melhor umidade, as fermentações foram feitas em frascos de erlenmeyer de 125 mL como biorreatores. Cada frasco contendo 5 g do resíduo foram previamente esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. Para o resfriamento, o material foi disposto em cabine de segurança biológica sob a incidência de luz ultravioleta (Fluxo laminar vertical-Filterflux). Em seguida, foram inoculados a 10^7 esporos por grama de substrato e água destilada esterilizada até atingir umidade desejada. As fermentações foram conduzidas em estufa (SOLAB), a 30°C e umidade do resíduo em 75%. A amostragem para determinação da atividade enzimática foi realizada

durante 15 dias a cada 24 horas.

3.10 Obtenção do extrato enzimático bruto

Finalizado o respectivo tempo de fermentação, a cada ensaio foi adicionado 25 mL de água destilada estéril para a solubilização das enzimas. Esta suspensão permaneceu sob agitação orbitalar em incubadora SHAKER (SOLAB), a 30 °C, a 160 rpm, por 30 minutos. Posteriormente, a remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica em gaze para separar o sólido do extrato enzimático. O filtrado foi coletado em tubo Falcon (TECNAL) e centrifugado a 6000 rpm, por 15 minutos.

3.11 Determinação da atividade enzimática da α -amilase

A atividade amilolítica foi determinada como descrito por Okolo et al. (1995), com adaptações. A mistura de reação foi constituída de amido solúvel a 1% (p/v) (dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0). Os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), conforme Miller (1959).

Os ensaios reacionais foram conduzidos em tubos de ensaio com de 0,25 mL de solução de amido solúvel 1% (p/v), 0,35 mL de extrato enzimático bruto. O ensaio branco continha 0,35 mL de extrato enzimático e 0,25 mL de solução tampão acetato de sódio, pH 5. Todas as amostras foram incubadas em banho maria (Cientec CT-266), a 50 °C, durante 15 minutos. A interrupção da reação foi realizada com a adição de 0,6 mL de DNS. Em seguida os tubos foram submersos em água fervente a 100 °C, por 5 minutos e posteriormente foram adicionados 6,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro (BEL Photonics SP 2000 UV). Segundo Ghose (1987) uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{m}^{-1}$ de produto. A atividade enzimática foi expressa em Ug^{-1} .

3.12 Determinação da atividade enzimática da celulase

A atividade da enzima celulase foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) a 1%, (p/v), dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Os açúcares redutores liberados foram

determinados utilizando o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959).

Os ensaios reacionais foram conduzidos em tubos de ensaio com 0,35 mL de extrato enzimático bruto sem diluição e 0,25 mL de solução de CMC a 1%. O ensaio branco continha 0,35 mL de extrato enzimático e 0,25 mL de solução tampão acetato de sódio, pH 5. Todas as amostras foram analisadas como descreve o item 3.11.

3.13 Determinação da atividade enzimática da invertase

A atividade enzimática da invertase foi determinada utilizando uma solução de 2% de sacarose, (p/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Os açúcares redutores liberados foram estimados utilizando o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), Miller (1959).

Os ensaios reacionais foram conduzidos em tubos de ensaio com 0,35 mL de extrato enzimático bruto e 0,25 mL de solução de sacarose a 2%. O ensaio branco continha 0,35 mL de extrato enzimático bruto e 0,25 mL de solução tampão acetato de sódio, pH 5. Todas as amostras foram analisadas como descreve o item 3.11. A atividade espectrofotométrica foi expressa em Ug^{-1} .

3.14 Análise estatística

A otimização das variáveis experimentais (temperatura, umidade e tempo) desse estudo foi realizado utilizando a matriz de Doehlert, com treze condições experimentais diferentes. Foi realizado em triplicata com os valores do ponto central (33 °C , 70% e 14 dias) para possibilitar uma estimativa de erro. As variáveis (temperatura, umidade e tempo) foram estudadas em diferentes níveis (-1, 0 e 1) e escolhidos com base nos resultados do planejamento realizado, onde a temperatura variou de (26 °C a 40 °C), a umidade de (60% a 80%) e o tempo entre (7, 14 e 21 dias).

A partir da análise de variância (ANOVA) a qualidade do ajuste dos modelos gerados foi avaliada pelo teste Fisher (teste F) por meio da significância de regressão, falta de ajuste e o coeficiente de determinação múltipla. Os efeitos foram considerados significativos quando ($P < 0,05$). A metodologia de superfície de resposta (MSR), a qual demonstra a relação entre as variáveis estudadas. Utilizou-se o Software STATISTIC

versão 6.0, para análise dos dados e elaboração dos gráficos. Os valores reais e codificados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz de Doehlert para a otimização da produção das enzimas α -amilase, celulasas e invertase em FES, a partir de *A. niger* cultivada em resíduo de *C. linearifolius*. Os fatores avaliados foram temperatura ($^{\circ}\text{C}$), umidade (%) e tempo (dias), em seus valores reais e codificados (entre parêntese)

Ensaio	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Umidade (%)	Tempo (dias)
1	33 (0)	70 (0)	14 (0)
2	33 (0)	60 (-1)	14 (0)
3	40 (1)	70 (0)	14 (0)
4	33 (0)	80 (1)	14 (0)
5	26 (-1)	70 (0)	14 (0)
6	29,5 (-0,5)	65 (-0,5)	21 (0,707)
7	36,5 (0,5)	65 (-0,5)	21 (0,707)
8	36,5 (0,5)	75 (0,5)	21 (0,707)
9	29,5 (-0,5)	75 (0,5)	21 (0,707)
10	29,5 (-0,5)	65 (-0,5)	7 (-0,707)
11	36,5 (0,5)	65 (-0,5)	7 (0,707)
12	36,5 (0,5)	75 (0,5)	7 (0,707)
13	29,5 (-0,5)	75 (0,5)	7 (0,707)

Ensaio 1: Ponto central

3.15 Caracterização enzimática da α -amilase

3.15.1 Determinação da estabilidade às variações de pH

As interações dos efeitos de pH e temperatura ótima sobre a atividade da α -amilase foram obtidas através da realização de 9 experimentos de atividade (Tabela 7). A avaliação do pH foi realizada utilizando solução tampão acetato de sódio 100 mM, para pH: (3, 4, 5, 6 e 7). Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 3.11. Para cada ensaio foi utilizado três repetições.

Os dados experimentais foram plotados e ajustados em componentes e a significância estatística de cada um dos termos avaliada através da análise de variância a (ANOVA) realizado pelo software *STATÍSTICA* 6,0.

Tabela 7 – Otimização do efeito do pH e temperatura na atividade da α -amilase

Ensaio	pH	Temperatura (°C)
1	3	50
2	4	30
3	4	70
4	5	50
5	5	50
6	5	50
7	6	30
8	6	70
9	7	50

3.15.2 Determinação da termoestabilidade

A estabilidade térmica foi determinada, incubando-se a enzima em diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80 e 90 °C), em períodos de 10, 20 e 30 minutos. O extrato bruto foi submetido a cada temperatura em tubos de ensaio tampado, e imediatamente acondicionados em banhos de gelo para posterior atividade. Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 3.11.

3.15.3 Efeito da adição de sais

O efeito da presença de sais (cloreto férrico, cloreto de cálcio, cloreto de cobalto, cloreto de potássio, cloreto de sódio, carbonato de sódio), foi avaliado em diferentes concentrações (0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 M). Diluiu-se separadamente cada sal em água destilada e homogeneizou num balão volumétrico de 25 mL. Posteriormente foi colocado cada concentração em tubos de ensaio, distribuído à concentração de 0,25 mL de solução de amido solúvel 1%, 0,25 mL do sal, 0,35 mL de extrato enzimático. Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 3.11.

3.15.4 Efeito do congelamento

Os extratos enzimáticos brutos foram mantidos a -4°C por 60 dias, para avaliar a estabilidade enzimática. As amostras foram coletadas e analisadas em 14, 30 e 60 dias.

3.15.5 Estimativa dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) foram estimados utilizando o extrato enzimático bruto. As análises foram feitas utilizando de cinco soluções de amido em diferentes concentrações, sendo estas (0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 M). A constante de Michaelis-Menten K_m (mg/mL) e $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) foram estimadas pelo método de regressão de Lineweaver-Burk (1934).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química do resíduo das folhas do *C. linearifolius*

Na Tabela 8 são apresentados os valores para os componentes do resíduo das folhas de *C. linearifolius* antes e após a extração do óleo essencial.

Tabela 8 - Composição química das folhas de *C. linearifolius* antes da extração de óleo essencial (a) e após a extração do óleo essencial (b)

Componentes	Antes (a)	Após (b)
Proteína Bruta (%)	16,78	13,68
Extrato etéreo (%)	1,91	1,07
Material mineral (%)	10,52	10,35
Fibra em Detergente Neutro (%)	69,68	64,03
Fibra em Detergente Ácido (%)	49,14	51,55
Cinzas (%)	0,06	0,37
Lignina (%)	29,91	25,03
Celulose (%)	19,23	26,52
Hemicelulose (%)	20,54	12,47

Com base nos dados da análise da composição química do resíduo, pode-se inferir que o fato do resíduo de *C. linearifolius* possuir uma quantidade significativa de fibra bruta (64,03%), eleva a dificuldade do fungo em hidrolisar o resíduo, apresentando dessa forma um período mais longo para se obter as enzimas em questão.

Na composição química pode-se observar que após a extração do óleo essencial, houve uma diminuição em alguns componentes, isso favorece o desenvolvimento do fungo e produção das enzimas α -amilase, celulasas e invertases.

4.2 Avaliação da umidade para o crescimento do fungo *A. niger*

O teste de crescimento e umidade revelou que o *A. niger*. cresce no substrato utilizado e apresentou melhor crescimento e produção enzimática com teor de 75% de umidade, como descrito na Tabela 9. Nessa condição foi observada atividade enzimática para α -amilase ($20,91 \pm 1,7 \text{ Ug}^{-1}$), celulases ($1,77 \pm 0,33 \text{ Ug}^{-1}$) e para invertases ($0,46 \pm 0,07 \text{ Ug}^{-1}$), por um período de sete dias.

Tabela 9 - Avaliação da melhor umidade para produção de enzimas, no processo de FES, com o resíduo das folhas de *C. linearifolius* por um período de sete dias

Umidades	α -amilases (Ug^{-1})	Celulases (Ug^{-1})	Invertases (Ug^{-1})
70%	$19,42 \pm 1,5$	$0,48 \pm 0,19$	$0,10 \pm 0,1$
75%	$20,91 \pm 1,7$	$1,77 \pm 0,33$	$0,30 \pm 0,2$
80%	$16,38 \pm 0,5$	$0,19 \pm 1,2$	$0,12 \pm 0,5$

4.3 Perfil fermentativo para as enzimas α -amilases, celulases e invertases

A Figura 11 demonstra a atividade da enzima α -amilase produzida por *A. niger*, em resíduo de *C. linearifolius*, em função do tempo. Observa-se que no décimo terceiro dia de fermentação foi obtido maior valor de atividade enzimática de $44,05 \pm 1,5 \text{ Ug}^{-1}$ de resíduo fermentado. Após esse período houve um declínio da atividade enzimática.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram ser superiores ao encontrado por Santana et al. (2012), no qual a produção de amilase foi de $24,98 \text{ Ug}^{-1}$, realizada a partir de *A. niger*, utilizando farelo de cacau como substrato. Estudos de Gusmão et al. (2014), demonstraram aos 12 dias de fermentação, utilizando a casca de café, uma atividade enzimática de amilase $178,36 \text{ Ug}^{-1}$, utilizando o fungo *Aspergillus spp.* Já os estudos de Spier (2005), apresentaram atividade enzimática para amilase de $530,55 \pm 11,85 \text{ Ug}^{-1}$, usando fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar, a partir de *A. niger*. Rocha (2010), obteve atividade enzimática de $10,67 \text{ Ug}^{-1}$ para amilase utilizado o *A. niger* e o arroz com resíduo. Nas pesquisas de Correa et al. (2009), a produção de amilase com tempo de fermentação de quatro dias, utilizando a mistura da casca do maracujá com o farelo de arroz, obteve para a enzima amilase uma atividade máxima de $5,5 \text{ Ug}^{-1}$.

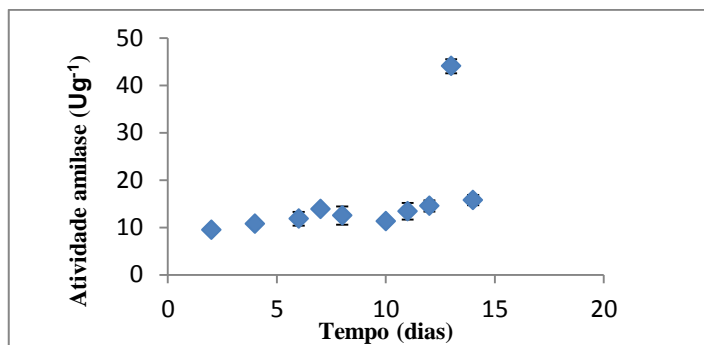


Figura 11 - Atividade de amilase em função do tempo de fermentação.

A Figura 12 demonstra a atividade da enzima celulase produzida por *A. niger*, em resíduo de *C. linearifolius*, em função do tempo. Observa-se que no décimo terceiro dia de fermentação foi obtido um tempo ótimo de atividade enzimática de $24,05 \pm 1,14 \text{ Ug}^{-1}$ de resíduo fermentado. A produção de celulase estudada por Santos et al. (2016), demonstrou ser superior a encontrada nesse trabalho, com uma atividade enzimática de $29,38 \text{ U/mL}$, a partir de *A. niger*, utilizando a palma forrageira como resíduo. Nas pesquisas de Correa et al. (2009), a produção de celulase com tempo de fermentação de quatro dias, utilizando a mistura da casca do maracujá com o farelo de arroz, obteve para a enzima celulase uma atividade enzimática de $4,7 \text{ Ug}^{-1}$. Ambos os resultados foram inferiores aos encontrados no presente trabalho, o que demonstra que se pode obter bons resultados utilizando apenas o resíduo *C. linearifolius*.

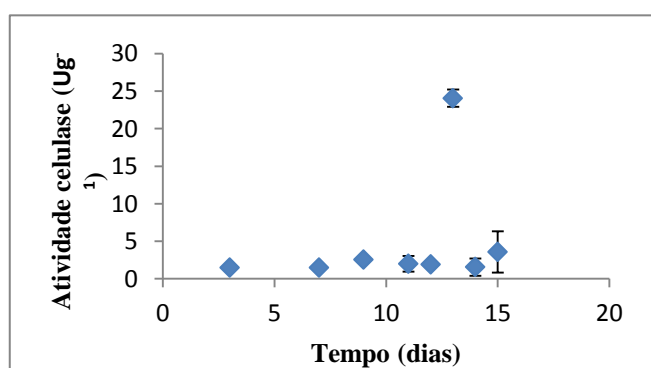


Figura 12 - Atividade de celulase em função do tempo de fermentação.

A Figura 13 mostra a atividade da enzima invertase produzida por *A. niger*, em resíduo de *C. linearifolius*, em função do tempo. Observa-se que no décimo terceiro dia de fermentação foi obtido um tempo de maior atividade enzimática de $21,99 \pm 3 \text{ Ug}^{-1}$ de resíduo fermentado. Rocha (2010) utilizou casca de maracujá e arroz para produzir invertase, a partir

do *A. niger* e apresentou um resultado inferior ao encontrado nesse trabalho, com uma atividade enzimática de $17,2 \text{ Ug}^{-1}$, em sete dias. Já para Novaki et al.(2010), a atividade de invertase produzida por *Aspergillus cascadeus* após 72 horas de fermentação, utilizando o farelo de soja, sem adição de qualquer nutriente foi de $1029,75 \text{ Ug}^{-1}$.

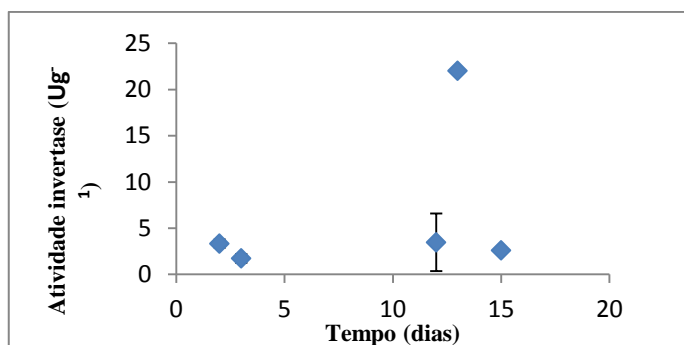


Figura 13 - Atividade de invertase em função do tempo de fermentação.

Os processos fermentativos associados a fungos filamentosos para produção de bioprodutos envolvem processos celulares regulados sensivelmente pelo meio ambiente em que se encontram. São muitas as variáveis inseridas no processo e que podem atuar de maneira determinante no rendimento do produto. Dessa forma é imprescindível à otimização de variáveis como temperatura, umidade, concentração de esporos e fonte de nutrientes para que o processo fermentativo tenha êxito.

4.4 Otimização da produção das enzimas: α -amilases, celulasas e invertase

Os resultados obtidos a partir da matriz Doehlert demonstraram que em todas as condições experimentais houve produção das enzimas (α -amilases, celulasas e invertases), sendo que a α -amilase mostrou-se melhor resultado nas condições (temperatura, umidade e tempo) propostas. Os resultados para a atividade de α -amilase variaram entre 20,98 a $122,88 \text{ Ug}^{-1}$. A condição do experimento um resultou numa maior produção de α -amilase, onde as variáveis temperatura, umidade e tempo foram mantidas em 33°C , 70% e 14 dias respectivamente.

Uma possível explicação é que as folhas dos vegetais são importantes fontes de amido nas regiões tropicais (JUDD et al., 2009).

Os resultados obtidos a partir das condições do planejamento Doehlert podem ser observados na Tabela 10. Os valores das respostas são o resultado médio da triplicata realizada nos ensaios de determinação da atividade enzimática.

Pode se observar numa análise preliminar que o fungo *A. niger* foi capaz de sintetizar as enzimas estudadas de acordo com o planejamento, uma possível explicação para a demora de 14 dias para se atingir o tempo ótimo seja pelo substrato ter uma natureza fibrosa.

Tabela 10 - Matriz Doehlert com os resultados do planejamento para a otimização das enzimas α -amilase, celulasas e invertase

Tra	Temp	Um	T	α -amilases (Ug ⁻¹)	Celulasas (Ug ⁻¹)	Invertases (Ug ⁻¹)
1	33	70	14	122,88 \pm 0,07	10,67 \pm 0,15	171,98 \pm 0,08
1	33	70	14	122,74 \pm 0,04	10,44 \pm 0,17	172,13 \pm 0,11
1	33	70	14	121,05 \pm 0,05	7,05 \pm 0,09	172,83 \pm 0,06
2	33	60	14	75,25 \pm 0,09	9,43 \pm 0,57	138,5 \pm 0,15
3	40	70	14	36,27 \pm 0,16	6,78 \pm 0,13	77,68 \pm 0,12
4	33	80	14	76,15 \pm 0,06	8,58 \pm 0,17	113,97 \pm 0,95
5	26	70	14	20,98 \pm 0,13	7,22 \pm 0,27	78,67 \pm 0,08
6	29,5	65	21	48,17 \pm 0,10	6,95 \pm 0,07	104,99 \pm 0,52
7	36,5	65	21	47,75 \pm 0,17	6,69 \pm 0,22	83,07 \pm 0,52
8	36,5	75	21	71,39 \pm 0,08	6,11 \pm 0,12	88,73 \pm 0,09
9	29,5	75	21	74,19 \pm 0,16	5,87 \pm 0,27	116,74 \pm 0,56
10	29,5	65	7	56,78 \pm 0,22	7,98 \pm 0,40	294,54 \pm 0,33
11	36,5	65	7	61,40 \pm 0,25	11,55 \pm 0,29	302,70 \pm 2,19
12	36,5	75	7	72,14 \pm 0,21	9,88 \pm 0,08	273,64 \pm 3,55
13	29,5	75	7	42,42 \pm 0,08	16,99 \pm 0,49	258,42 \pm 2,43

Trat- tratamento / Temp- temperatura (°C) / Um- Umidade (%) / T- tempo (dias)

Tratamento 1: Ponto central

Os valores experimentais encontrados foram utilizados para elaborar ajustes estatísticos com a finalidade de gerar modelos significativos.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 11, foi possível observar que o modelo matemático foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$), para a α -amilase o valor R^2 de 98% indicou que o modelo se ajustou bem aos resultados experimentais. O valor para falta de ajuste foi não significativo.

Tabela 11 - Análise de Variância (ANOVA) para a atividade específica da α -amilase pela matriz Doehlert

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
(1)Temperatura(L)	236,75	1	236,75	228,21	0,004353
Temperatura(Q)	10512,40	1	10512,40	10133,09	0,000099
(2)Umidade (L)	143,88	1	143,88	138,69	0,007133
Umidade (Q)	2597,12	1	2597,12	2503,41	0,000399
(3)Dias (L)	9,93	1	9,93	9,57	0,090507
Dias (Q)	2880,23	1	2880,23	2776,30	0,000360
1Lby 2L	65,40	1	65,40	63,04	0,015495
1Lby 3L	174,97	1	174,97	168,66	0,005877
2Lby 3L	353,07	1	353,07	340,33	0,002925
Falta de ajuste	218,63	3	72,88	70,25	0,014068
Puro Erro	2,07	2	1,04		
Total SS	13797,10	14			
R ²	0,98				

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R² = Coeficiente de Determinação.

A significância estatística dos termos quadráticos, lineares e sua interação está apresentada no Diagrama de Pareto (Figura 14), com um nível de confiança de 95%, representada pela linha vertical, onde somente o tempo no modelo linear foi não significativo. Todas as variáveis no modelo quadrático foram significativas principalmente à temperatura para a produção de α -amilase.

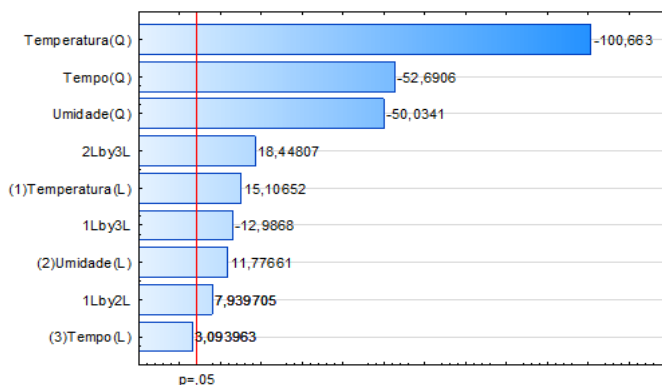


Figura 14 - Diagrama de Pareto demonstrando a significância das variáveis, sob a FES no modelo ajustado para a produção de α -amilase por *A. niger* (ATCC 1004), com o resíduo do *C. linearifolius*.

Nas pesquisas de Cruz et al.(2011), avaliou a produção de α -amilase por *A. niger*, em resíduos da casca de mandioca. O modelo estatístico linear que mais se adequou aos dados demonstra que não houve influência significativa do tempo, sendo a variação da atividade enzimática influenciada em maior parte pela umidade.

Spier (2005) utilizou como resíduo a fécula de mandioca para produção da α -amilase com atividade enzimática com variação de 366,40 a 1352,42 Ug⁻¹ nos ensaios realizados, a produção de α -amilase foi maior com o aumento da umidade inicial acima de 85%. Nos resultados da análise de variância, as variáveis de temperatura no modelo quadrático e umidade, no modelo linear, foi significativas $p < 0,05$.

Pereira (2015) na produção da α -amilase por fermentação em estado sólido, a partir do *A. niger*, usando o resíduo de mandioca, pode-se observar que a análise de variância para a regressão foi significativa $P < 0,05$ e que a análise estatística obteve uma equação polinomial de segunda ordem com R^2 de 0,929, com o ponto máximo de 35 horas de fermentação, e umidade de 47,7%, sem adição se nenhum outro nutriente.

Santana (2012) utilizou meios de cultura alternativos (farelo de cacau e palma forrageira), para obtenção de enzimas amilolíticas, através da fermentação em estado sólido, o tempo não foi significativo para a produção da enzima e os fatores temperatura e umidade foram significativos para a produção enzimática, com 24 horas de fermentação a 35 °C e a umidade considerada significativa foi de 65%. Já para a palma forrageira a umidade não foi significativa, enquanto que a temperatura de 35 °C e o tempo de 24 horas foram considerados significativos para a produção de amilase.

Na equação 3 é apresentado o modelo matemático proposto para determinar a atividade específica da α -amilase.

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-amilase (Ug}^{-1}\text{)} = 122,22 - 23,40 (T^2) + 3,85 (T) - 11,63 (U^2) + 3,00 (U) - 27,93 (Tp^2) + 2,85 (T) * (U) - 4,68 (T) * (Tp) + 6,64 (U) * (Tp) \quad (3)$$

Onde: T^2 = temperatura modelo quadrático; T = temperatura modelo linear; U^2 = Umidade modelo quadrático; U = umidade modelo linear; Tp^2 = tempo modelo quadrático; Tp = tempo modelo linear.

Os gráficos de superfície de resposta e de contornos estão dispostos na Figura 15, ilustrando o efeito das variáveis e suas interações. A partir destes gráficos foi possível confirmar que, dentro do domínio experimental investigado todas as variáveis (temperatura, umidade e tempo) exerceram influência na produção de α -amilase.

A princípio, a produção da enzima é lenta, a atividade específica da α -amilase obteve um valor ótimo de $122,88 \text{ Ug}^{-1}$ em um período de 14 dias de fermentação. Depois de alcançar o pico, a atividade enzimática decresce devido ao esgotamento de nutrientes. A utilização do resíduo da folha do *C. linearifolius* nas condições dos experimentos do ponto central resultou numa maior produção de α -amilase, com as variáveis (temperatura, umidade e tempo) em 33°C , 70% e 14 dias respectivamente.

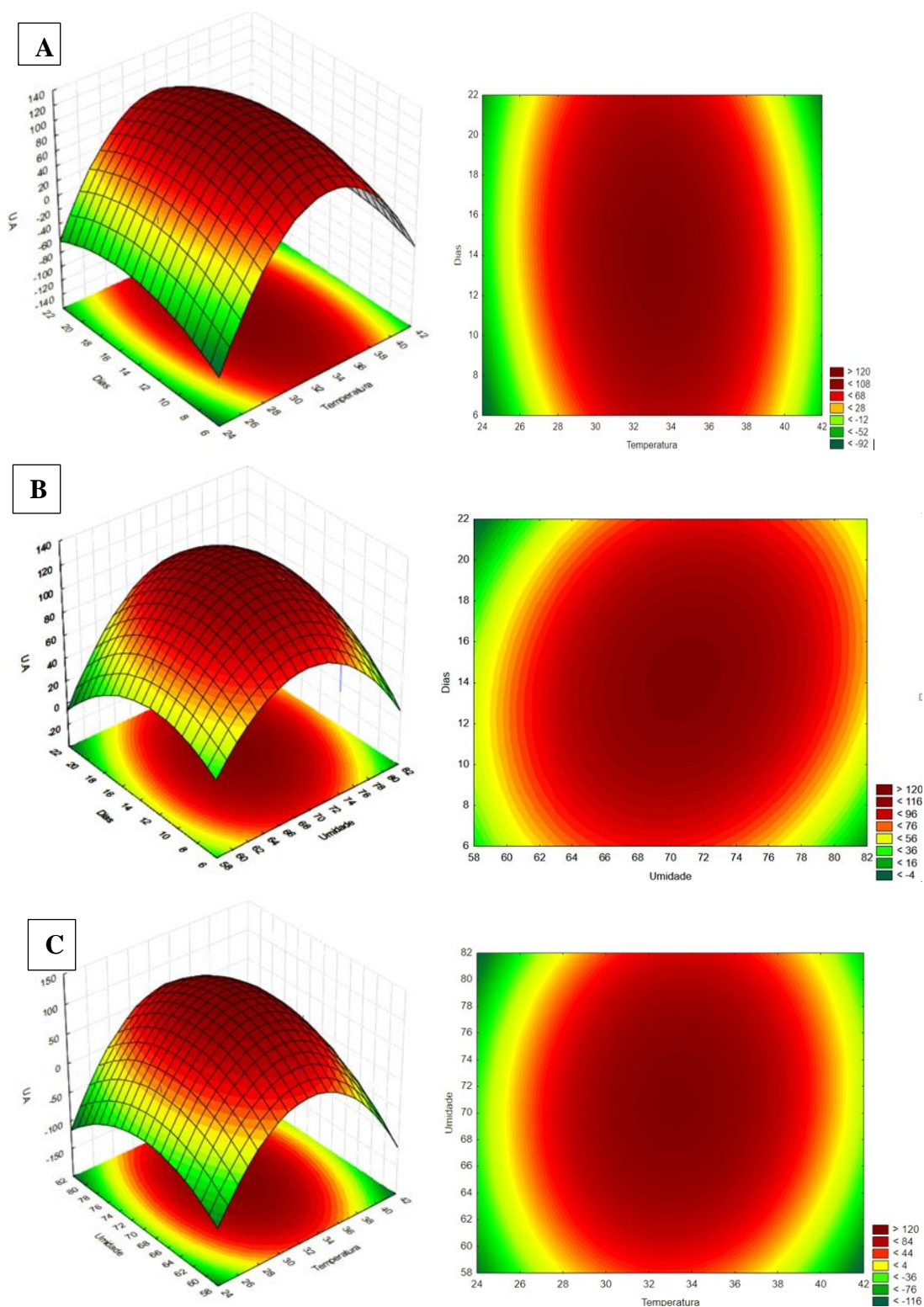


Figura 15 - Gráficos de superfície de resposta e curva de contorno para a atividade da α -amilase em relação às variáveis: A) Tempo x temperatura B) Tempo e umidade, C) Temperatura x umidade.

Pereira (2015), utilizando resíduo de mandioca sob fermentação em estado sólido, as variáveis independentes de tempo e umidade exerceram influencia na produção de α -amilase sendo observado o ponto ótimo para a variável de resposta em um tempo de 35 h e um teor de umidade de 47,7%, com presença de nutrientes no substrato, contribuindo para a multiplicação dos microrganismos.

Em resposta a atividade ótima de celulasas, a média da atividade enzimática foi de 9,38 Ug^{-1} . A Tabela 12 descreve os dados obtidos da ANOVA para a celulase. A falta de ajuste foi não significativa, a maioria das variáveis não se adequou aos resultados, como mostrou no Diagrama de Pareto (Figura 16), somente o componente linear da variável tempo foi significativo.

Tabela 12 - Análise de Variância (ANOVA) para a atividade específica da celulase para a matriz Doehlert

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
(1)Temperatura(L)	0,0035	1	0,00350	0,00085	0,979363
Temperatura(Q)	6,7973	1	6,79728	1,65455	0,327143
(2)Unimade (L)	4,6908	1	4,69083	1,14181	0,397153
Unimade (Q)	0,1687	1	0,16875	0,04108	0,858138
(3)Dias (L)	80,9628	1	80,96281	19,70745	0,047180
Dias (Q)	2,9411	1	2,94113	0,71591	0,486581
1Lby 2L	3,7767	1	3,77667	0,91929	0,438838
1Lby 3L	0,1653	1	0,16531	0,04024	0,859562
2Lby 3L	23,3358	1	23,33583	5,68026	0,140005
Falta de ajuste	14,6094	3	4,86981	1,18538	0,487955
Puro erro	8,2165	2	4,10823		
Total SS	146,6994	14			
R ²	0,84				

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R² = Coeficiente de Determinação.

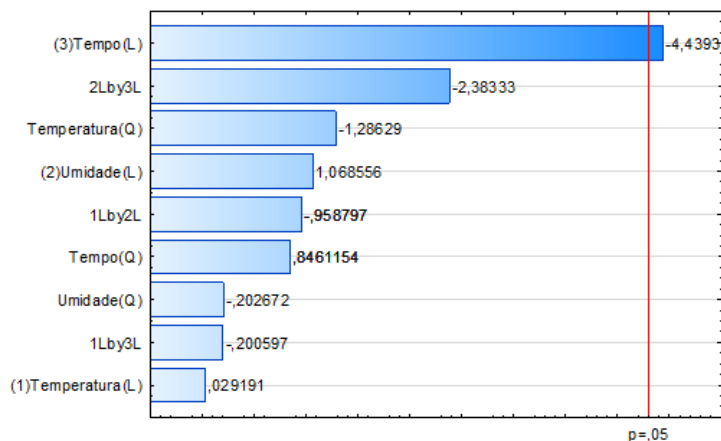


Figura 16 - Diagrama de Pareto para a produção de celulases por *A. niger* (ATCC 1004), em o resíduo do *C. linearifolius*.

A equação 4 descreve o modelo matemático proposto para determinar a atividade específica da celulase.

$$\text{Atividade da celulase (Ug}^{-1}\text{)} = 9,38 + 0,01 (T) - 0,59 (T^2) + 0,54 (U) - 0,09 (U^2) - 3,18 (Tp) + 0,89 (Tp^2) - 0,68 (T) * (U) - 0,14 (T) * (Tp) - 1,70 (U) * (Tp) \quad (4)$$

Os resultados para atividade de celulase variaram entre 5,87 a 16,99 Ug⁻¹. Dispostos na Figura 17, os gráficos de superfície de resposta, mostram o efeito das variáveis e suas interações, todos apresentaram ponto de sela. A partir destes gráficos foi possível confirmar que, dentro do domínio experimental investigado somente o tempo no componente linear exerceu influência na produção de celulase, assim para se obter uma região ótima, precisa se adequar aos valores experimentais.

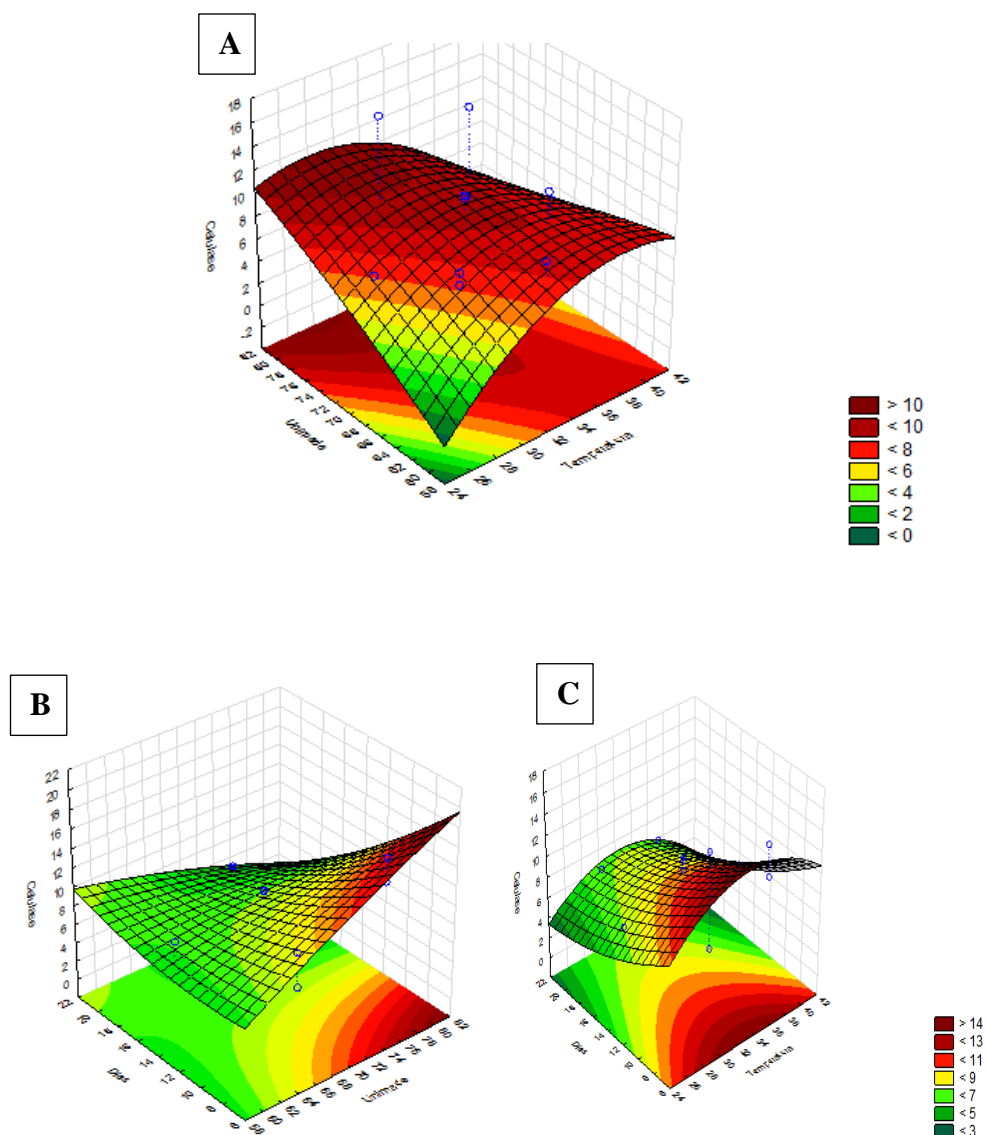


Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta tendo-se como atividade a celulasas com ponto de sela: (A) umidade x temperatura, (B) tempo x umidade, (C) tempo x temperatura.

Santana (2010) utilizou a matriz Doehlert para avaliar os efeitos do tempo de fermentação e concentração do indutor sobre a produção da enzima celulase, o tempo de fermentação estudado foi de três níveis (7 a 21 dias), observou-se que para produção de celulase de *M. perniciosus* a influência do tempo de fermentação e que os parâmetros estudados teve influência na atividade da celulase.

A Tabela 13 descreve os dados obtidos da ANOVA para a produção de invertase. Não houve falta de ajuste ($P = 0,003$), o modelo foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$), os valores R^2 de 99% indicaram que o modelo se ajustou bem aos resultados experimentais.

Tabela 13 - Análise de Variância (ANOVA) para a atividade específica da invertase para a matriz Doehlert

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
(1)Temperatura(L)	1429,8	1	1429,79	221,939	0,004476
Temperatura(Q)	40860,1	1	40860,11	6342,538	0,000158
(2)Unimade (L)	127,9	1	127,86	19,847	0,046871
Unimade (Q)	19497,3	1	19497,30	3026,482	0,000330
(3)Dias (L)	47593,8	1	47593,84	7387,785	0,000135
Dias (Q)	35,6	1	35,59	5,524	0,143151
1Lby 2L	1790,5	1	1790,51	277,934	0,003579
1Lby 3L	590,8	1	590,82	91,710	0,010729
2Lby 3L	163,3	1	163,29	25,347	0,037261
Falta de ajuste	5508,2	3	1836,06	285,004	0,003498
Puro erro	12,9	2	6,44		
Total SS	102431,3	14			
R ²	0,99				

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R² Coeficiente Determinação.

A significância estatística dos termos quadráticos, lineares e a interação entre umidade x tempo e temperatura x tempo no componente linear, foram significativos, sendo que a variável tempo no componente linear o mais significativo, como disposto no Diagrama de Pareto (Figura 18).

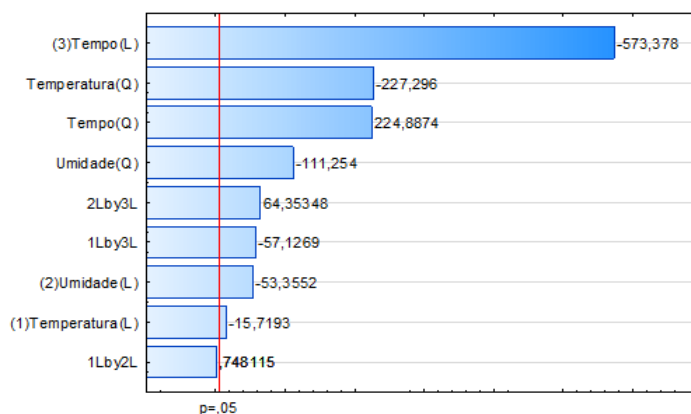


Figura 18 - Gráfico de Pareto demonstrando a significância das variáveis temperaturas, umidade e tempo, sob FES no modelo ajustado para a produção de invertase por *A. niger* (ATCC 1004), com o resíduo do *C. linearifolius*.

Na equação 5 é apresentado o modelo matemático proposto para determinar a atividade específica da invertase.

$$\text{Atividade da invertase (Ug}^{-1}\text{)} = 172,31 - 1,78 (T) - 23,5 (T^2) - 6,05 (U) - 11,5 (U^2) - 91,9 (Tp) + 53,09 (Tp^2) + 0,12 (T) * (U) - 9,16 (T) * (Tp) + 10,3 (U) * (Tp)$$

(5)

Os resultados para a atividade de invertase variaram entre 77,68 a 302,70 Ug^{-1} . Apesar dos dados se adequarem bem ao modelo estatístico o gráfico de superfície de resposta teve boa interação entre umidade e temperatura, os demais apresentaram ponto de sela nas interações entre tempo e umidade e tempo e temperatura, como demonstrados na Figura 19, ilustrando o efeito das variáveis e suas interações.

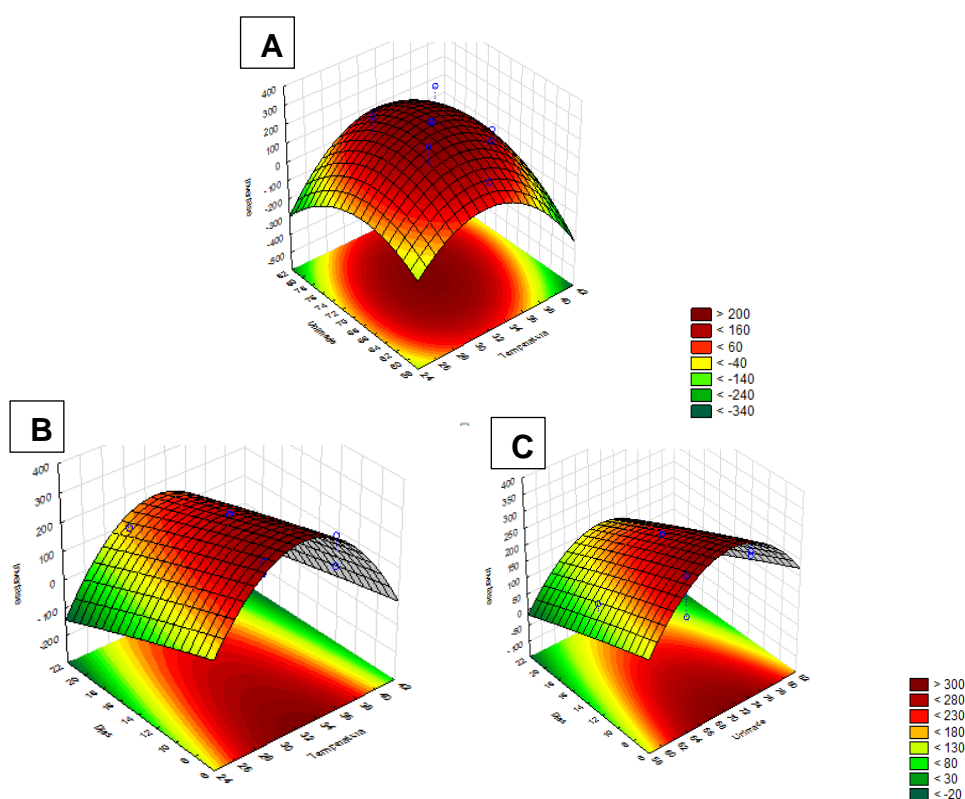


Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta para a atividade da invertase em função de (A) umidade x temperatura, com ponto de sela em (B) tempo x temperatura e (C) tempo x umidade.

Rustiguel (2009) através da fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e com adição suplementar de nitrogênio pode observar que a análise de variância para a resposta atividade enzimática da invertase em nenhum dos fatores lineares nem os quadráticos foram significantes ao nível de 90% de confiança.

Rocha (2010) na produção de invertase utilizando resíduos de arroz e maracujá a partir de *A. niger*, seus resultados para atividade invertásica variaram entre 5,88 e 108,82 Ug^{-1} , sendo os maiores valores obtidos foram no ponto central, de acordo com o Diagrama de Pareto todos os efeitos foram estatisticamente significativos para o nível de confiança 95%,

pode-se observar que a massa do arroz/massa total, a umidade e a concentração de inóculo influíram positivamente na produção de invertase.

4.5 Caracterização enzimática da α -amilase

4.5.1 Efeito do pH sobre a atividade da enzima α -amilase

A partir da construção dos gráficos dos ensaios de otimização de pH e temperatura ótimos das amostras contendo as enzimas, pode-se analisar os efeitos de pH e temperatura na atividade da α -amilase. Os dados indicaram que os valores de pH abaixo de 5,0 e acima de 6,0 apresentam redução da atividade da α -amilases. Com relação à temperatura ótima pode observar que as temperaturas abaixo de 40 °C e acima de 60 °C acarreta diminuição de atividade de α -amilases. O valor ótimo de pH 5,0 e temperatura 50 °C foi o melhor para a enzima estudada (Figura 20).

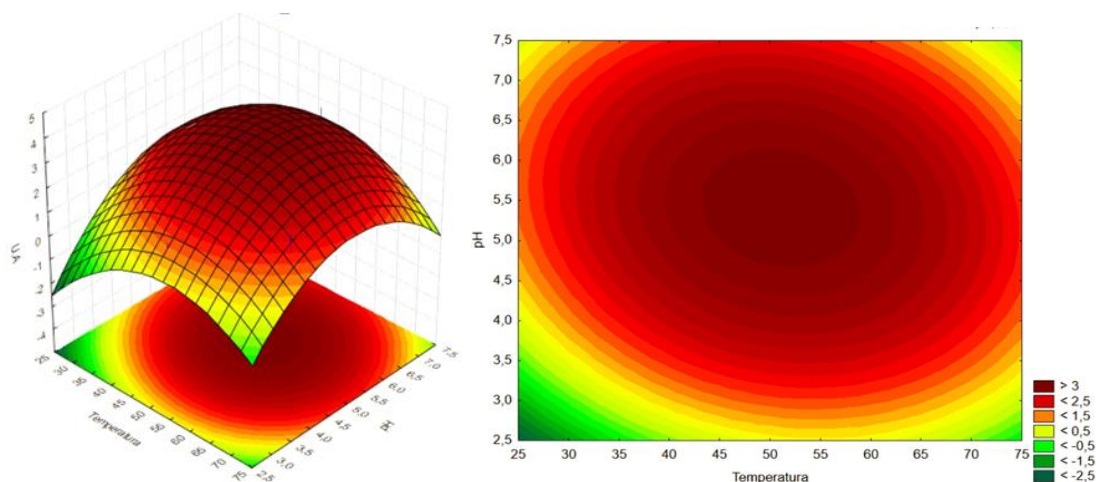


Figura 20 – Temperatura e pH ótimo de α -amilase de *A. niger*. O círculo central em vermelho intenso indica o ponto central de pH 5,0 e temperatura ótima em 50 °C.

Carvalho (2007) variou o pH entre 6 e 12, na atividade da amilase. O pH ótimo encontrado para a enzima foi de 8,5 e a atividade enzimática entre o pH de 7,0 a 11,0 foram de 72% e 81,4% respectivamente em relação ao pH 8,5. De acordo com Spier (2005), o pH ótimo para α -amilase fúngica fica entre 5,0 e 6,0 com caráter ácido e solvente na água, sua atividade diminui em temperaturas acima de 50 °C. Freitas (2014), a α -amilase do fungo

Syncephalastrum racemosum apresentou atividade entre pH 4,0 e 8,0, sendo que o pico ocorreu em pH 4,5. Nas pesquisas de Bernardes (2014), utilizando o fungo *Rhizomucor miehei* para a produção de α -amilase apresenta boas características para aplicação industrial com pH entre o 4,0 e 5,0. O pH ótimo para a enzima ficou em 5,0 e temperatura em 60 °C.

4.5.2 Termoestabilidade

Os resultados indicaram que a enzima α -amilase é termoestável até 60 °C, pois manteve mais de 90% da atividade, podendo ser visualizado na Figura 21.

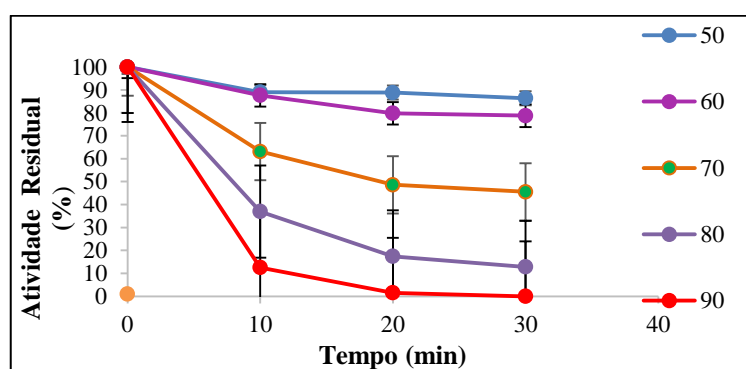


Figura 21 – Efeito da termoestabilidade de α -amilase produzida por *A. niger*.

Na pesquisa de Freitas (2014), a α -amilase de *S. racemosum* mostrou-se ser termofílica apresentando uma atividade melhor entre na faixa de temperatura entre 60 °C e 70 °C, com um melhor valor em 70 °C (98,3 U/g). A enzima mostrou mais de 91% de termoestabilidade até 55 °C. Para Bernardes (2014), a atividade enzimática aumentou gradativamente nas temperaturas de 45 °C a 75 °C, a melhor atividade aconteceu a 75 °C, decrescendo em seguida. Santana (2012) observou a estabilidade térmica da amilase no farelo de cacau a atividade enzimática manteve constante até 40 °C, a perda de atividade mais marcante acontece a partir de 70 °C e o pico da atividade enzimática ocorreu em 55 °C.

A temperatura é uma propriedade física que interfere na estabilidade da matéria. Suas moléculas podem perder ou ganhar energia, alterando o grau de agitação e muitas vezes perdendo a estabilidade, uma vez que enzimas expostas a altas temperaturas podem romper ou modificar ligações. Nos processos biotecnológicos as enzimas termoestáveis tem um potencial considerável para aplicações industriais por serem enzimas estáveis, enquanto a termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária (LEHNINGER; NELSON & COX, 2002).

4.5.3 Efeito dos sais

A influência de cloreto férrico, cloreto de cálcio, cloreto de cobalto, cloreto de potássio, cloreto de sódio, carbonato de sódio foram estudados sobre a atividade de α -amilase em diferentes concentrações. Como pode ser visto, os sais que mais influenciaram a atividade da enzima foi o carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de ferro e o cloreto de cobalto aumentando a sua atividade enzimática. O cálcio a partir da concentração de 0,1 M e o cobalto e ferro desde 0,05 M. Enquanto que os cátions de potássio e sódio oriundos dos seus cloretos serviram como inibidores enzimáticos diminuindo a atividade da enzima. O potássio em todas as concentrações e o cloreto de sódio até a concentração de 0,2 M, tendo um leve aumento na concentração de 0,25 M. O carbonato de sódio aumentou a atividade da enzima discretamente em todas as concentrações. Esses resultados estão descritos na Figura 22.

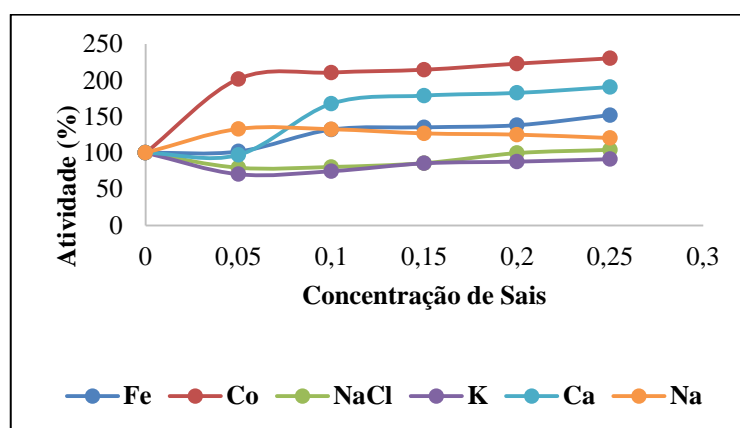


Figura 22- Efeito da influência de sais na atividade de α -amilase produzida por *A. niger*.

Nas pesquisas de Spier (2005), a fonte de nitrogênio, Nitrato de potássio (KNO_3) foi importante para a produção da α -amilase, enquanto o Carbonato de cálcio (CaCO_3) influenciaram negativamente a produção da enzima. Os estudos da solubilização são processos importantes para separação de misturas proteicas, assim as proteínas diferentes variam quanto à concentração de sais. Os sais neutros tem efeitos na precipitação das enzimas. Nas concentrações reduzidas os sais aumentam a solubilidade de algumas enzimas, mas à medida que a força iônica é aumentada, a solubilidade da proteína se reduz gradativamente (LEHNINGER, 1993).

4.5.4 Efeito do congelamento

A análise foi feita após 14, 30 e 60 dias para o extrato enzimático bruto (previamente diluído). Nos primeiros 30 dias houve uma redução gradativa da atividade enzimática em torno de 23,15% e nos 60 dias finais do congelamento do extrato enzimático houve uma redução de 18,69% considerando o início das análises (Figura 23).

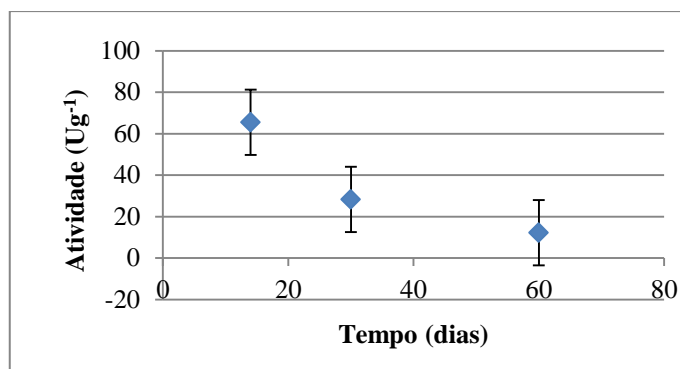


Figura 23 – Atividade enzimática da α -amilase após o congelamento do extrato enzimático.

Silva e colaboradores (2009) constataram que a estabilidade da enzima α -amilase se manteve em freezer por 72 horas, para eles esse pode ser o melhor meio para armazenamento, pois a enzima manteve sua atividade.

4.5.5 Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos de α -amilase foram estimados utilizando-se o método de linearização de Lineweaver e Burk (1934), tendo como substrato o amido. O perfil cinético é apresentado na Figura 24. Observando que os valores foram bons, pois quanto menor o K_m mais afinidade com o substrato a enzima apresenta. Os valores que foram encontrados para K_m 0,04 mg/mL e para $V_{máx}$ 46,95 μ mol/min/mL. Em outros trabalhos os valores de K_m e $V_{máx}$ mostram a diversidade de comportamento das enzimas amilásicas. Pires et al. (2002), encontrou os valores de K_m e $V_{máx}$ de 0,41 mg/mL e 1,11 μ mol/min/mL, respectivamente. Biazus e colaboradores (2006) fizeram a caracterização da atividade bioquímica das amilases do malte de milho (*Zea mays* L), e encontraram K_m e $V_{máx}$ para hidólises do amido 7,69 mg/mL e 7,69 μ mol/min/mL, respectivamente. No trabalho de Oliveira e Silva (2017), os resultados apresentaram valores dos parâmetros cinéticos de α -amilase de K_m 1,37 mg/mL e $V_{máx}$ 0,66 μ mol/min/mL demonstrando que a enzima não teve afinidade com o substrato.

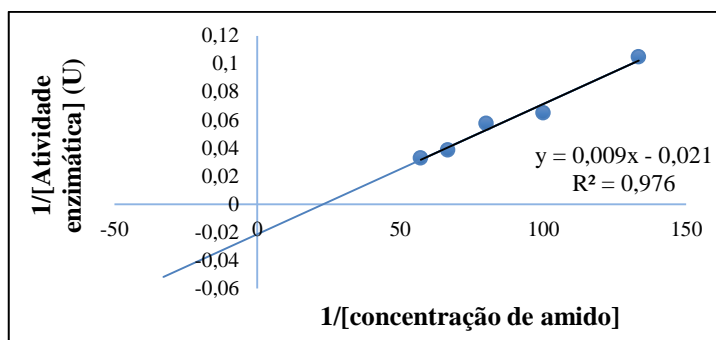


Figura 24 – Gráfico de Lineweaver e Burk demonstrando o efeito da concentração de substrato na atividade amilásica do extrato enzimático de resíduos de *C. linearifolius* após extração de óleos essenciais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que o estudo realizado foi possível obter α -amilases, celulasas e invertases a partir de *A. niger* (ATCC 1004), sob a fermentação em estado sólido, utilizando resíduos da folha de *C. linearifolius*, após a extração do óleo essencial, como única fonte de energia e nutrientes.

A otimização da produção enzimática foi realizada utilizando a matriz de Doehlert, com o uso da metodologia de superfície de resposta, entretanto a enzima que se adequou ao modelo e a todos os dados estatisticamente foi à α -amilase, assim pode dar segmento aos estudos a partir da caracterização enzimática da α -amilase.

Na caracterização enzimática, a α -amilase se mostrou uma enzima termoestável, sendo uma enzima eficiente para aplicação industrial devido sua estabilidade térmica. A enzima apresentou um pH 5,0 e temperatura 50 °C como ótimo de atividade, podendo ser comparado com outros resultados na literatura. Os estudos cinéticos mostraram grande afinidade pelo substrato α -amilase.

A enzima manteve sua atividade na presença de diferentes sais. Os que mais influenciaram a atividade da enzima foi o carbonato de sódio, cálcio, ferro e o cobalto aumentando a sua atividade enzimática.

Há poucos estudos em diversos segmentos com relação ao conhecimento sobre o gênero *Croton*. Em especial sobre o *Croton linearifolius*, esse é o primeiro trabalho com produção de enzimas utilizando resíduos dessa espécie. As informações encontradas até o momento indicam que o resíduo vegetal pode ser usado para a produção de enzimas, apresentando-se como uma alternativa sustentável para os resíduos gerados, atribuindo-os valor agregado sendo o mesmo atrativo para o mercado industrial.

6 REFERÊNCIAS

AB´SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira aproximação. **Geomorfologia**, 52: p 1-21. 1977.

ALMEIDA, E. S.; DIAS, E. C.; RIBEIRO, V. T.; SILVA., A. C. .; PADILHA, C. E. A.; SOUSA, F. C. J.; NÓBREGA, F. F. F.; VAZ, M. R. F Uma breve revisão sistemática da literatura sobre a produção de invertase por fermentação em estado sólido. **Revista saúde e ciência Online**, 2014; 3(3): set-dez, p 94-106. 2014.

ALVES, C. M. H. **Óleo essencial de *Croton zehntneri* seus principais constituintes químicos anetol e estragol inibem parâmetros contráteis do músculo liso traqueal do rato**. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará; 2009.

ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: Uma investigação ecogeográfica. **In: Revista Caatinga** - Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA): Mossoró - Brasil, v. 22, n.3, p. 126-135. 2009.

AMARAL, L. I. V; GASPARG, M; COSTA, P. M. F; AIDAR, M. P. M; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoeheneav**. 34. n. 4. São Paulo. <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062007000400001>. 2007.

ANDRADE, L. A.; PEREIRA, I. M; LEITE, U. T; BARBOSA, M. R. V. Análise da cobertura de duas fisionomias de Caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 3, jul./set. p. 253 – 262. 2005.

RIBEIRO, W. L. C; RONDON, F. C. M; MACEDO, I. T. F; BEVILAQUA, C. M L. Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Acta Scientieae Veterinaria**, 46: 1522. 2018.

ANGÉLICO. E. C; COSTA, J. M; GALVÃO, F. F. R; SANTOS, F. O; RODRIGUES, O. G. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (Sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. **BIOFAR Revista de Biologia e Farmácia**, v 07, n 01, p 57-61. 2012.

ARAÚJO FILHO, J. V. DE. **Efeitos do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e citronelal sobre isolados de *Haemonchus contortus* sensível e resistente a antihelmínticos sintéticos**. (Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará. 2017.

ARAÚJO FILHO, J. A. De. Histórico do uso dos solos da Caatinga. **In: 500 Anos de Uso do Solo no Brasil**. Quintino Reis de Araújo (Organizador). EDITUS - EDITORA DA UESC Ilhéus-Bahia, p 329-337. 2002.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento protéico do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P.DC) e palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) por fermentação semi sólida.** 195p. (Tese Doutorado em Engenharia de Processos Químicos). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande-PB. 2004.

BASTO, S. R. De. L. ***Croton nummularius* baill. (Euphorbiaceae): composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais.** 46 p. (Dissertação Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco-Recife. 2014.

BERRY P. ***Croton Research Network*.** Madison, University of Wisconsin Board of .2006.

BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN E. B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Croton (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. **American Journal of Botany.** doi: 10.3732/ajb.92.(8). p 1520- 1534. 2005a.

BERNARDES, A. V.; MARTINS, E. Da S.; MATA, J. F. Da.; FERREIRA, O. E.; Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de α -amilase por *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Industrial.** D.O.I. 10.3895/S1981-36862014000200012. p. 1439-1451. 2014.

BERZELIUS, J. & PAYEN, A. **Enzimas catalizadoras de reações químicas.** 1848.

BEZERRA, M. A. **Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de Pré-concentração em linha para determinação de cobre usando espectrometria de absorção atômica com chama.** (Dissertação Mestrado em Química) Universidade Federal da Bahia. Salvador-Ba. 2003.

BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. De.; TAMBOURGI, E. B. Caracterização da atividade amilásica do malte de milho (*Zeamays* L.). Sistema de informação de revista científica da America Latina Y El Caribe, España, Portugal. **Acta Sci Technol.** Maringá, V. 28, n.1, p 13-19. 2006.

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regulation** **20.** 1996. p. 135-148.

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

BRITO, A. R. **Otimização da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido sobre casca de arroz e casca de amendoim.** 102 p. (Dissertação Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.- UESB. 2015.

BRITO, A. V. R. **Determinação da composição química e avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial da folhas de *Croton linearifolius* (EUPHORBIACEAE).** 48

p. (Dissertação Mestrado em Ciências Ambientais) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. - UESB. 2014.

BRITO M. S.; FRIES, D.D.; SILVA, C. S.L. C.; GUALBERTO, S.A. Anatomia foliar de *Croton linearifolius* Mull. Arg. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 7, n. 13. p 77-83. 2011.

BRITO, S. M. **Prospecção Química e Avaliação da Atividade Antioxidante de Extratos dos Caules de *Croton linearifolius* (EUPHORBIACEAE)**. 47 p. (Dissertação Mestrado Ciências Ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2014.

CARVALHO, R. V. **Produção e caracterização de α -amilase por *Bacillus* Sp SMIA-2 termofílico utilizando a proteína do soro de leite, e algumas aplicações da enzima**. 113 p. (Tese Doutorado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias). Campos dos Goytacazes Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 2007.

CARVALHO, K. S; SILVA, S. L; SOUZA, I. A; GUALBERTO, S. A; CRUZ, R. C; SANTOS, F. R; CARVALHO, M. G. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **Parasitology Research**. p. 3441-3448. doi: 10.1007/s00436-016-5106-2. 2017.

CASTRO, A. M. & JÚNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188. 2010.

CAVALCANTI, E. S. B; MORAIS, S. M; LIMA, M. A; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L.. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz (online)**. v. 99, n. 5, p. 541-544. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000500015>. 2004.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Editora Epub. 288 p. 2008.

COLEN, C. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase**. (Tese Doutorado Ciências dos Alimentos). 206 p. Universidade Federal de Minas Gerais. Belorizonte –MG. 2006.

CORREA, S.L.; ROCHA, P.C.; FILHO, C. U.; CARDOZO, L. V. **Avaliação do tempo de fermentação para produção de enzimas empregando resíduos agroindustriais**. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.

COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato síntese**. 92 f. (Tese Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Federal Lavras; 2011.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M. De.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de Alfa- amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. **Cient Ciênc Biol Saúde**, P 245-249. 2011.

DALLA-VECHIA, R. & NASCIMENTO, G. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-630. 2004.

DÓRIA, G. A.; SILVA, W. J.; CARVALHO, G. A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutica Biology**. 48(6), p. 615–620. 2010.

DOURADO, R. C. M & SILVEIRA, E. R. Preliminary investigation on the volátil e constituents of *Croton sonderianus* Mull. Arg.: habitat, plant part and harvest time variation. **The Journal of essential oil research**.v.17, n.1, p.36-40. 2005.

DRUMOND, M. A.; KIILL, L. H. P.; LIMA, P.C. F. et al., Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga. **Pesquisadores da Embrapa Semiárido**. Petrolina-PE, p 330-340. 2000.

EL-FALAL, A; DOBARA, A; EL-SAYED, A; OMAR, N. Starchand Microbial α -amilases: From concepts to biotechnological Applications. **Biochemistry, Genetics and molecular Biology**. 2012.

FARINAS, C. S. & BARBOZA, C. D. Fungos Filamentosos de Interesse em Agroenergia: Avaliação de Diferentes Metodologias de Preservação do Fungo *Aspergillus niger*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Embrapa Instrumentação**. São Carlos - SP, 22 p. 2012.

FELIU, D. A. **Análise de Terpenóides de espécies de *Croton* Sect. *Laprocroton* (Müll. Arg.) Pax (EUPHORBIACEAE)**. 117 p. (Dissertação Mestrado em Botânica). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

FILHO, M. L. S.; SILVA, L. B.; FERNANDES, R. M.; LOPES, G. S. Efeito do extrato aquoso e etanólico do angico preto sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 65. n. 3, Belo Horizonte. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000300003> . 2013.

FONTENELLE, R. O. DOS S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. *Croton argyrophyllodes* Muell. *Croton zenhntneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e candida spp. isolados de cães**. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, FORTALEZA-CE. 2008.

FRANCISCO, P. R. M.; CHAVES, I. DE B.; CHAVES, L. H.A G.; LIMA, E. R. V. DE. Estimativa da degradação da biomassa da vegetação de caatinga através de índices de vegetação. **Polêmica**, v. 12, n. 2, abril/jun p 306-321. 2013.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. Da S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**. p 226-232. 2014.

GARCIA, R. C. **Produção e caracterização parcial das amilases de *Colletotrichum graminicola***. 62 p. (Monografia de Biologia) Universidade de São Paulo-SP. 2013.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. International union of pure and applied chemistry Prepared for publication by **Biochemical Engineering Research** Centre, Indian Institute of Technology, New Delhi-110016, India. 1987.

GIONGO, V.; CUNHA T. J. F.; MENDES A. S. M.; GAVA C. A. T. Carbono no Sistema Solo-Planta no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física** 06. p. 1233-1253. 2011.

GIOVANETTI. S. ELD. **Resíduos sólidos**: Perspectivas e desafios para gestão integrada. Recife. Editora Edufrpe, 393 p. 2014.

GIULIETTI, A. M; BOCAGE, A.L; DU CASTRO, A. A. J. F; GAMARRA-ROJAS, C.F.L; SAMPAIO, E.V.S.B; VIRGÍNIO, J; PAGANUCCI, L; FIGUEIREDO, M. A; RODAL, M. J. N; BARBOSA, M. R. V; LEY, R. 2004. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília-DF: **Ministério do Meio Ambiente**. Universidade Federal de Pernambuco. 2004.

GONÇALVES FILHO, L. C. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica**: Avaliação de diferentes processos de despolimerização. 98 f. (Dissertação Mestrado em Engenharia de Processos) Universidade da Região de Joinville – Univille-SC. 2011.

GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Purificação parcial de invertase a partir de *rhizopus spp* em fermentação semi-sólida. **Alim. Nutr.** Araraquara, v.14, n. 2 . 2003.

GRAJALES L. M, IGNÁCIO, E. O; THOMÉO, J. C. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido em biorreator rotativo**. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. COBEQ. XVI Encontro brasileiro sobre o ensino de engenharia química ENBEQ. Fortaleza, 2016.

GUSMÃO R. O; FERRAZ, L. M; RÊGO, A. P. B; ASSIS, F. G. V; P. L.E. A. Produção de enzimas por *Aspergillus spp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café. **SCIENTIA PLENA** vol. 10, n. 11. 2014.

GUPTA, R; GIGRAS, P; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, B. C. Microbial α -amilases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11. 2003.

HESELTIME, C. W. Solid State Fermentation – An Overview. Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, US. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, **International Biodeterioration**. USA. p 79-89.1987.

HONG, K; TANNER, R. D; CROOKE, P. S; MALANEY, G. W. Semisolid state fermentation of baker's yeast in an air-fluidized bed fermentor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.18, Dordrecht: EBSCO, p.3-17. 1988.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação. [online], Rio de Janeiro. 2004. IBGE. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm]. Acesso 04 de setembro, 2016.

JACOMINE, P. K. T. Caracterização do estágio atual dos solos sob Caatinga **In: 500 Anos de Uso do Solo no Brasil**. Quintino Reis de Araújo (Organizador). Editus - Editora da UESC Ilhéus-Bahia, p. 330-397. 2002.

JONES, K. Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*) – A south american tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**.p 877-896. 2003.

JUDD, W. S.; CHRISTOPHER, C.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHVE, M. J. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. 3ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed. p 359. 2009.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. V. 1 2 edição. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1993.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect... *Laprocroton* (Müll. Arg.) Pax (EUFORBIACEAE). **Biota Neotropical**, v. 8, n. 2, 177-231.2008. p.

LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemical Society**, v. 56. 1934.

LOPEZ, J. A; LAZARO, C. C; CASTILHO, L. R; FREIRE, D. M. G; CASTRO, A. M. Characterization of multienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babassu cake, for use in cold hydrolysis of raw biomass. **Biochemical Engineering**, v. 77. p 231-239. 2013.

LYND, L.R. & ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

MAIA, G. N. **Caatinga: Árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo. Editora Leitura e Arte. 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3,. p. 426-428. 1959.

MONTEIRO. L. P. **Determinação da atividade citotóxica do extrato vegetal de Croton urucurana Baill em linhagens de células tumorais**. 86 p. (Dissertação Mestrado em Bioquímica Aplicada) Universidade Federal de Viçosa. 2015.

MONTEIRO. V. N. & SILVA. R. N. do. Aplicações Industriais de Biotecnologia. **Revista Processos Químicos**, SENAI. Ano 3. v. 3 n. 5 Goiânia, 2009.

MOTTA, Valter T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.

MOURA, C. L. A.de; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Determinação da Atividade de Invertase em Extratos Enzimáticos. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, CE 2007.

MUELLER, J. Euphorbiaceae. In **Flora brasiliensis** (C.F.P. Martius eb A. G. Eichler, eds.). v.11, p.1-292. 1873.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOVAKI, L.; HASAN, S. D. M.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **ENGEVISTA**, v. 12, n. 2. p. 131-140. 2010.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.p. 61-66. 2007.

OLIVEIRA, A. P. R. DE. **Efeito do Óleo Essencial do *Croton sonderianus* Muell. Arg. sobre o Trato Gastrointestinal**. 120 p. (Dissertação Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará. FORTALEZA – CEARÁ. 2008.

OLIVEIRA, G. A. V. & SILVA, J. M. S F. Equilíbrio químico e cinética enzimática da interação de α -amilase com compostos fenólicos encontrados em cerveja. **Química Nova**, v. 40, n. 7 <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170058>. p 726-732. 2017.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, A. C; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos. **SaBios: Ver. Saúde e Biol.**, v.7, n. 3. p. 97-109. 2012.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido** 169 p. (Tese Doutorado em Engenharia Química). Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.

PALMEIRA-JÚNIOR, S. F; ALVES, V. L; MOURA, F. S; VIEIRA, L. F. A; CONSERVA, L. M; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas e caules de *Croton sellowii* (EUPHORBIACEAE). **Ver. Bras. Farmacog.** v. 16. n. 3, João Pessoa. p. 397-402. 2006.

PANDEY, A. Solid - State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**: 13, p 81-84. 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science**: 77, P 149-152. 1999.

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

PEREIRA, A. DA S. **Produção de alfa-amilase por fermentação no estado sólido: separação por sistemas aquosos bifásicos**. 89 p. (Dissertação Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Itapetinga-Ba. 2015.

PEREIRA, R. J. & CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, N. 4, p. 146-152. 2012.

PEREZ, C. L. **Avaliação da viabilidade técnica da ampliação de escala da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES em biorreatores de leite empacotado**. 98 p. (Dissertação Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2017.

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 dos resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado técnico online**. Fortaleza-CE. Agosto, 2005.

PIRES, T. C. R.; VEIGA, E. M. Da.; FILHO, F. F. Enzimas amilolíticas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). **Ciência Tecnol. Alimentos**. Campinas, 22(3): p 278-284. 2002.

PRADO, D.E. As Caatingas da América do Sul. *In*: Leal, I.R Tabarelli. M e Silva, J.M C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. P. 3-73. 2003.

RANDAU, K. P. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacológico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae)**. 143 p. (Dissertação Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2001.

REED, G. **Enzyme in food processing**. 2. ed. New York: Academic Press Inc. pág. 62-87. 1975.

REID, I. D. Solid-state fermentations for biological delignification. National Research Council of Canada. **Enzyme Microb. Technol.** v. 11. [http://org/10.1016/0141-0229\(89\)90052-5](http://org/10.1016/0141-0229(89)90052-5), p 786-803. 1989.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. 161 p. (Dissertação Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia- MG. 2010.

ROCHA, T. De O. **Estudos genético moleculares em Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) e velame pimenta (*Croton linearifolius*) com vistas à caracterização da diversidade**. (Dissertação Ciências Ambientais) Universidade Estadual do sudoeste da Bahia. Itapetinga-Ba. 2015.

RODRIGUES, A. M. & SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 21 (1): 57-62. 2001.

RUSTIGUEL, B. C. **Produção, Purificação e Caracterização Bioquímica das Invertases do Fungo Filamentoso *Aspergillus phoenicis***, 133 p. (Dissertação Mestrado em Ciências) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.; NEGRI, G. Tradicional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 18. n.1, p. 11-33. 2007.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian Caatinga. *In*: S.H. Bullock, H. A. Mooney; E. Medina (eds.). **Seasonally dry forests**. London: Cambridge University Press, p. 35-58. 1995.

SAMPAIO, E. V. S. B. Características e potencialidades. *In*: **Uso Insustentável e Conservação dos Recursos Florestais da Caatinga**. Serviço Florestal Brasileiro. Brasília-DF. p. 30-48. 2010.

SANTANA, L. S. M. DE; GONÇALVES, Z. S; FRANCO, M. A produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8 n. 14, p. 1981-1987. 2012.

SANTANA, M. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***. (Dissertação Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. 73 p. (Dissertação Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Itapetinga- Ba. 2012.

SANTOS-LIMA, T. M; SANTOS, D. R. V; SOUZA, R. M; BASTOS, N. G; VANNIER-SANTOS, M. A; NUNES, E. S; DIAS-LIMA, A. G. Plantas medicinais com ação antiparasitária: conhecimento tradicional na etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p. 240-247. 2016.

SANTOS, C. T.; FILHO, A. G.; BRITO, R. A.; PIRES, V. J. A.; BONOMO, F. C. R.; FRANCO, M. Production and Characterization of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus ssp.* By Solid State Fermentation of Prickly Pear. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 1, p. 222 – 233. 2016.

SANTOS, D. Y. A. C. Dos. Botânica Aplicada: Metabólitos secundários na interação planta-ambiente. Universidade de São Paulo. **Instituto de Biociências. Departamento de Botânica**. 2015.

SANTOS, J. C; LEAL, I. R; CORTEZ, J. S. A; FERNANDES, G. W; TABARELLI, M. Caatinga: The scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**. Vol. 4 (3): 276-286, 2011.

SANTOS, R. R. M. **Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido**. 83 p. (Dissertação Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2010.

SANTOS, S. F. de M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 151 p (Tese Doutorado em Engenharia Química), 2007. Universidade Federal do Rio Grande do Norte- Natal. 2007.

SCALDAFERRI, M. M. **Diversidade genética em velame pimenta (*Croton linearifolius*) e Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) em ambientes silvestres no sudoeste da Bahia.** 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB. Itapetinga-Ba. 2013.

SCALDAFERRI, M. M; FREITAS, J. S; SANTOS, E. S. L; VIEIRA, J. G. P; GONÇALVES, Z. S; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. Comparasion of protocols for genomic DNA extraction from “Velame pimenta” (*Croton linearifolius*), a native species to the Caatinga, Brasil. **African jornal of Biotecnology.** v. 12. p. 4761-4766. 2013.

SCALDAFERRI, M.M.; FREITAS, J. S.; VIEIRA, J. G. P.; GONÇALVES, Z. S.; SOUZA, A. M.; CERQUEIRA- SILVA, C. B. M. Comparison of methods for estimates of molecular genetic diversity in genus croton: influence of coefficients, clustering strategies and data projection. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 3, pág.5566-5573, 2014.

SLIVINSKI C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido.** (Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Ponta Grossa Ponta Grossa. 2007.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos.** 109 p. (Dissertação Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco. 2013.

SILVA, C. C. A. **Caracteres de resiliência e usos antrópicos em espécies vegetais da Caatinga.** Dissertação 155 p. (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) Universidade Federal de Pernambuco – Recife. 2015.

SILVA, D. J & QUEIROZ, A. C.; **Análise de alimentos:** Métodos químicos e biológicos. 3ª ed. Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 2012.

SILVA, E.S.A.; SOUZA, C.M.A.; ROCHANETO, O.G.; FIGUEIRÊDO, F. J. C. Parâmetros bioquímicos de plantas de pimento longa (*Piper hispidinervum* C. DC) em diferentes condições de cultivo no município de Igarapé-Açu. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 51, p. 171-189. 2009.

SILVA, F. R; JUNIOR, V. C; NUNES, D. S. Chemical composition of essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 3, p. 325-329. 2012.

SILVA, G. J. A. M; SILVA, A. G. P. F; RAIMUNDO, H. C; NETO, J. A. F; ANDRADE, K. M; LICHSTON, J. E. Plantas Forrageiras da Caatinga. **Revista Centauro.** v. 7, n.1, p 1-16. 2016.

SILVA, T. S. S. **Estimativas genéticas em *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) por meio de marcadores moleculares.** (Dissertação Ciências Ambientais) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga- Bahia. 2016.

SILVA, S. L. C; CARVALHO, M. G; CARNEIRO-TORRES, D. S; VASCONCELOS. K. C; OLIVEIRA, N. F. Biodiversidade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull.

Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Crochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Acta Veterinária Brasília**, v. 4, n.4, p. 252-258. 2010.

SILVA, S. L. Da C.; GUALBERTO, S. A. CARVALHO, K. Da S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Biotemas**. p.79-85. 2014.

SINGHANIA, R. R; SUKUMARAN, R. K; PATEL, A. K; LARROCHE, C; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541-549. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p. 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 178 p. (Dissertação Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná. CURITIBA. 2005.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 68 p. (Dissertação Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

TOREZAN, G. A. P. **Tratamento enzimático em suco de manga (*Mangifera indica* L. CV. Keitt) para a redução dos teores de sacarose e glicose e obtenção de geleia através de processo contínuo**. 158 p. (Dissertação Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2000.

TORRES. D. S. C. **Diversidade de *Croton* L. (EUPHORBIACEAE) no bioma Caatinga**. 295 p. (Tese Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana- BA. 2009.

TRINDADE, M. J. de S & LAMEIRA, O. A. Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. Laboratório de biotecnologia. **Embrapa Amazônia Oriental**. Belém-PA, 2014.

TUNG, Q.T.; MIYATA, N.; IWAHORI, K. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 97, p.329-335. 2004.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S. B.; PAREYN, F.G.C. Ecorregiões: Propostas para o Bioma Caatinga. Resultados do Seminário de Planejamento Ecorregional da Caatinga/Aldeia-PE. Recife. Associação Plantas do Nordeste, **Instituto de Conservação Ambiental the nature conservancy do Brasil**, Recife. 2002.

VIDO, D. L. R. **Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex Miq. Proveniente**

da Serra do Mar e da Serra da Matiqueira (Mata Atlântica). 92 p (Dissertação Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente. São Paulo, 2009.

VITTI, A. M. S & BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**. n. 17, Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Agosto. p 1-26. 2003.

WAINWRIGHT, M. Introducción a La Biotecnología de los Hongos. **Zaragoza**: Acribia, p.228, 1995.

ZÚÑIGA, U. F. R. et al., Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesq. agropec. bras.** v. 46. n. 8 Brasília. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000800018>. p 912-919. 2011.