



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA
RENORBIO**

PEDRO JORGE LOURO CRUGEIRA

Fotoestimulação de um consórcio bacteriano termo-celulolítico para
degradação de celulose e hemicelulose oriundas das
fibras de coco verde

Salvador-BA

2019

PEDRO JORGE LOURO CRUGEIRA

Fotoestimulação de um consórcio bacteriano termo-celulolítico para
degradação de celulose e hemicelulose oriundas das
fibras de coco verde

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia
- RENORBIO, como requisito para obtenção do
título de doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Barbosa
Pinheiro

**Salvador – BA
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Crueira, Pedro Jorge Louro

Fotoestimulação de um consórcio bacteriano termo- celulolítico para
degradação de celulose e hemicelulose oriundas das fibras de coco verde /

Pedro Jorge

Louro Crueira. -- Salvador - BA, 2019.

94 f. : il

Orientador: Paulo Fernando de Almeida. Coorientador: Antônio
Luiz Barbosa Pinheiro. Tese
(Doutorado - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DA RENORBIO) -- Universidade Federal da Bahia,
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2019.

1. Fotoestimulação. 2. Laser de Baixa Potência. 3. LED. 4. Hidrólise
da casca de coco. 5. Biomassa lignocelulósica. I. de Almeida, Paulo
Fernando. II. Pinheiro, Antônio Luiz Barbosa . III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

“Fotoestimulação de um consórcio bacteriano termo-celulolítico para degradação de celulose e hemicelulose oriundas das fibras de coco verde”

Elaborada por:

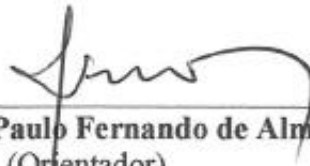
PEDRO JORGE LOURO CRUGEIRA

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de

DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA

Salvador - Bahia, 26 de junho de 2019

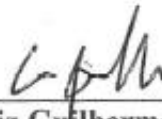
BANCA EXAMINADORA:



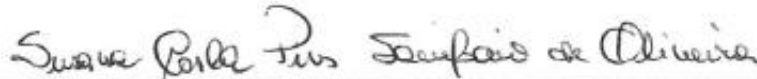
Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida
(Orientador)
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Fabio Alexandre Chinalia
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Luiz Guilherme Pinheiro Soares
Universidade Federal da Bahia



Prof.ª Dr.ª Susana Carla Pires Sampaio de Oliveira
UNIME



Prof. Dr. Edgard Bacic De Carvalho
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação RENORBIO pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado;

Aos meus orientadores Professor Paulo Almeida e Professor Antônio Pinheiro, pela liberdade e confiança referente ao presente trabalho, por todo o aprendizado que suscitou em mim, bem como da indiscutível amizade e compreensão em todos os momentos difíceis;

Ao Professor Fábio Chinalia pelo aprendizado que semeou em mim, bem como pela constante ajuda nas diferentes etapas do desenvolvimento desta pesquisa;

A toda a equipe do laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos LABEM e Centro de Biofotônica da FOUFBA por terem participado e acreditado em este projeto.

Aos colegas do Centro de Biofotônica em especial: Sandra Fagnani, Gustavo Pires, Fernando Sampaio, Susana Sampaio, Guilherme Pinheiro e Neandder Correia que sempre me acompanharam, muitas vezes nas horas mais tardias do dia em busca do conhecimento.

Todos os professores, alunos e funcionários do programa de Pós-graduação em Biotecnologia da RENORBIO;

À FAPESB pelo importante incentivo à pesquisa e pela concessão da bolsa de estudo.

À minha família, mãe Maria Eduarda Louro e irmã pela confiança e apoio em toda minha vida acadêmica.

À minha namorada, Sandra, por me acompanhar, compreender e desejar sempre a minha felicidade

Às minhas filhas, Mariana e Sofia Crugeira por serem fonte de inspiração para superar os obstáculos encarados ao longo desta formação.

Ao meu pai Raul Crugeira, tia Fernanda e primas, pelo encorajamento e apoio concedidos, assim como, pela vossa capacidade de partilhar e possibilitar perspectivas do conhecimento na minha jornada acadêmica e exemplo de persistência e dedicação.

À Rosa por toda a inspiração e confiança.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Meu agradecimento especial a Deus que permitiu que muitas pessoas importantes participassem desse momento e me inspirou a cumprir esta missão.

Obrigado!

RESUMO

O agronegócio do coco verde é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos. A vasta disponibilidade desses materiais, assim como, sua composição criou a necessidade e a oportunidade de se tornarem uma fonte de matéria-prima para a produção de insumos biotecnológicos de alto valor agregado. O objetivo deste estudo foi potencializar, através de fotobiomodulação, a hidrólise da biomassa lignocelulósica. O consórcio termo-celulolítico foi coletado de uma leira de compostagem em fase ativa (65 a 70 °C), submetido a estresse nutricional e efetuado o protocolo de irradiação de seis emissões de radiação Laser em baixa potência ($\lambda 660 \text{ nm}$) ou LED ($\lambda 632 \pm 2 \text{ nm}$) com intervalos de tempo de 12 hs. A quantificação microbiana foi avaliada, após irradiação, e comprovada resposta biológica significativa estimulatória nos consórcios bacterianos. As culturas irradiadas por LED, obtiveram uma concentração celular superior às irradiadas por Laser, apresentando significância de $P < 0,0001$ entre os grupos. Procedeu-se à inoculação do consórcio irradiado por fontes de luz distintas em caldo mineral com a biomassa residual pré-tratada (casca de coco verde) por NaOH 5% ou KOH 5% e avaliados os açúcares redutores totais (ART), concentração de glicose e xilose, ao longo de 240 hs, assim como, as atividades metabólicas desenvolvidas. A quantificação de ART, indica uma maior concentração nas amostras irradiadas e uma atividade metabólica superior no grupo LED de 143% em relação ao controle, nas primeiras 48 hs de incubação. A concentração de glicose foi maior no grupo irradiado por LED, ao final de 48 hs, apresentando uma atividade metabólica no substrato pré-tratado por NaOH a 5%, de 294,9% superior, quando comparado ao controle, indicativo de maior atividade advinda das reações bioquímicas em cascata desencadeadas pela emissão da radiação. As micrografias das fibras de coco ao final de 240 hs, demonstraram uma ação microbiana mais eficaz nos grupos irradiados. A análise da atividade ligninolítica demonstrou que os emissores de luz Laser e LED aumentaram a proliferação bacteriana, produção proteica e atividade metabólica antecipando e aumentando o catabolismo do corante RBBR. Sendo a viabilidade econômica um fator preponderante na produção industrial, deverá se considerar a fotoestimulação como uma ferramenta impulsionadora dos bioprocessos, direcionando a luz LED como promitente coadjuvada ao baixo custo.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica, Hidrólise da casca de coco, Consórcio bacteriano, Laser de Baixa Potência, LED, Fotoestimulação.

CRUGEIRA, Pedro Jorge Louro. Photostimulation of a thermo-cellulolytic bacterial consortium for degradation of cellulose and hemicellulose from green coconut fibres, Federal University of Bahia, Salvador, 2019.

ABSTRACT

The agribusiness of the green Coconut is responsible for the generation of large quantities of waste. The wide availability of these materials, as well as their composition, led to both need and opportunity for it to become a source of raw material to produce biotechnological products of high added value. The aim of this study was to increase, through photostimulation, the hydrolysis of lignocellulosic biomass. The Thermo-Cellulolytic consortium, in the active phase (65 to 70 °C), was collected from a composting pile, was subjected to nutritional stress and an irradiation protocol of six either Laser ($\lambda 660 \text{ nm}$) or LED ($\lambda 632 \pm 2 \text{ nm}$) irradiations were carried out at 12-h intervals. Microbial quantification carried out and showed a significant stimulatory biological response in the bacterial consortia. The cultures irradiated by LED showed a higher significant ($p < 0.0001$) cell count when compared to those irradiated by Laser. The inoculation of the consortium irradiated by distinct light sources in mineral broth was proceeded with the residual biomass (green coconut bark) pretreated either by NaOH 5% or KOH 5% and evaluated the total reducing sugars (TRS), the concentrations of glucose and xylose, over 240-h, metabolic activity was also studied. The quantification of TRS, indicated higher concentration in the irradiated samples and a higher (143%) metabolic activity was observed in the LED group in comparison to the control within the first 48-h of incubation. The glucose concentration was higher in the group irradiated by LED at the end of 48-h, presenting a metabolic activity 294.9 % higher in the substrate pretreated by 5% NaOH when compared to the control. This is indicative of greater biochemical activity triggered by light radiation. The micrographs of the coconut fibers at the end of 240 hs showed a more effective microbial action in the irradiated groups. The analysis of the ligninolytic activity showed that, both Laser and LED light, increased the bacterial proliferation, protein production, metabolic activity as evidenced by an early e increased catabolism of the RBBR dye. As economic viability is a more important factor in industrial production our results prompts as to conclude that LED photostimulation should be considered as a potential tool to optimize bioprocesses at low cost.

Keywords: lignocellulosic biomass, hydrolysis of coconut husk, bacterial consortia, low power Laser, LED, photostimulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aplicações dos componentes provenientes da biomassa lignocelulósica.	20
Figura 2. Subprodutos inibitórios do processo de pré-tratamento.	23
Figura 3. Representação de sítios ativos.	28
Figura 4. Modelos de sinergia entre endoglucanases e exoglucanases na hidrólise de celulose.	29
Figura 5. Esquema de estratégia microbiana da hidrólise da celulose, não celulossômica.	30
Figura 6. Distribuição da energia do Laser e LED por banda espectral.	32
Figura 7. Fluxograma descrevendo a sequência experimental.	36
Figura 8. Irradiação do consórcio microbiano na câmara de fluxo laminar.	42
Figura 9. Esquema do protocolo de irradiação com os emissores de luz.	42
Figura 10. Esquema representativo da inoculação das amostras a serem avaliadas.	44
Figura 11. Micrografias obtidas por MEV da fibra de coco pré-tratada, após ação microbiana	50
Figura 12. Micrografias obtidas por MEV da fibra de coco pré-tratada.	51
Figura 13. Reação de saponificação, formação de sal carboxílico e álcool.	52
Figura 14. Degradação do papel de filtro.	53
Figura 15. Halos de hidrólise da CMC pelo método do vermelho congo.	54
Figura 16. Coloração de Gram do consórcio microbiano.	54
Figura 17. Imagens de microscopia de fluorescência das morfologias e arranjos dos microrganismos do consórcio.	55
Figura 18. Teste da oxidase.	55
Figura 19. Curva de crescimento do consórcio termo-celulolítico.	56
Figura 20. Quantificação microbiana após protocolo de irradiação.	58
Figura 21. Avaliação da hidrólise do corante RBBR ao longo do tempo.	60

Figura 22. Análise estatística da hidrólise do RBBR nos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo.	61
Figura 23. Epifluorescência emitida pelo consórcio em diferentes condições experimentais .	62
Figura 24. Análise de epifluorescência dos ácidos nucleicos nos diferentes grupos ao final de 48 hs de hidrólise RBBR.	63
Figura 25. Metabolismo aparente do consórcio microbiano na catálise de RBBR	64
Figura 26. Quantificação de açúcares redutores ao longo do tempo.	65
Figura 27. Avaliação das atividades metabólicas na produção de ART.	67
Figura 28. Cinéticas da concentração de glicose obtidas por cromatografia.....	68
Figura 29. Atividade metabólica aparente na obtenção de glicose.....	69
Figura 30. Cinéticas da concentração de xilose obtidas por HPLC.....	70
Figura 31. Análise Estatística da quantificação microbiana.....	72
Figura 32. Micrografias obtidas por MEV da biomassa residual de coco.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção mundial de coco.	19
Tabela 2 – Composição do caldo mineral	37
Tabela 3 – Composição do caldo sintético	38
Tabela 4 – Composição do meio mineral Czapek	40
Tabela 5 – Composição do meio mineral contendo CMC.....	40
Tabela 6 – Parâmetros de emissão de luz.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AFU	Unidade arbitrária de fluorescência
ART	Açúcares redutores totais
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DCPIP	2,6 Diclorofeno-indofenol
CMC	Carboximetilcelulose
LED	Diodo emissor de luz
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
KOH	Hidróxido de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
NH ₃	Amônia
NMP	Número Mais Provável
O ₂	Molécula de oxigênio
P	Fósforo
PBS	Solução tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBBR	Azul Brilhante de Remazol -R
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVO GERAL	17
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	RESÍDUOS DE COCO VERDE	18
3.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DA CASCA DE COCO VERDE	19
3.3	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA RESÍDUAL LIGNOCELULÓSICA.....	22
3.3.1	PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO.....	24
3.4	HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	25
3.4.1	ENZIMAS CELULOLÍTICAS	26
3.4.2	SINERGISMO ENZIMÁTICO	29
3.5	CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO LASER E LED	30
3.6	FOTOBIMODULAÇÃO	32
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PESQUISA	36
4.2	MATÉRIA PRIMA E PROCESSAMENTO.....	36
4.3	PRÉ-TRATAMENTOS DA CASCA DE COCO VERDE.....	37
4.4	COLETA DE AMOSTRAS MICROBIANAS	38
4.5	SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS TERMO – CELULOLÍTICOS	38
4.6	CARACTERÍSTICAS DO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO.....	38
4.6.1	ATIVIDADE CELULOLÍTICA	38
4.6.2	COLORAÇÃO DE GRAM	39
4.6.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	39
4.6.4	TESTE DA OXIDASE	39
4.7	CURVA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO.....	40
4.8	AVALIAÇÃO DA FOTOESTIMULAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO	41

4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIGNOLÍTICA	43
4.9.1	ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR EPIFLURESCÊNCIA	43
4.9.2	ATIVIDADE METABÓLICA LIGNOLÍTICA DO CONSÓRCIO.....	43
4.10	QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA HIDRÓLISE DA CELULOSE E HEMICELULOSE	44
4.10.1	DETERMINAÇÃO DE AÇUCARES REDUTORES PELO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO	44
4.10.2	QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE.....	45
4.11	QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA POR EPIFLURESCÊNCIA	47
4.12	ANÁLISE DA CASCA DE COCO VERDE POR MEV	47
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	PRÉ-TRATAMENTOS DA CASCA DE COCO VERDE.....	49
5.2	SELEÇÃO DO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO	52
5.3	CARACTERÍSTICAS DO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO.....	53
5.3.1	ATIVIDADE CELULOLÍTICA E COLORAÇÃO DE GRAM.....	53
5.3.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA	54
5.3.3	TESTE DA OXIDASE.....	55
5.4	CURVA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIANO	56
5.5	AVALIAÇÃO DA BIOMODULAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO	57
5.6	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LIGNOLÍTICA DO CONSÓRCIO FOTOESTIMULADO.....	60
5.7	QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA HIDRÓLISE DA CELULOSE E HEMICELULOSE	65
5.7.1	DETERMINAÇÃO DE AÇUCARES REDUTORES	65
5.7.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	68
5.8	QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA POR EPIFLURESCÊNCIA	71
5.9	ANÁLISE DA CASCA DE COCO VERDE POR MEV.....	73

6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A – Procedimento de Leitura e cálculo do NMP	87
APÊNDICE B - Curva de calibração co solução padrão de D-glucose	88
APÊNDICE C – Análise ANOVA com o teste de Tukey, 95% de confiança dos ART.....	89
APÊNDICE D – Análise ANOVA com o teste de Tukey, 95% de confiança da concentração de glicose	90
ANEXO A - Tabela de NMP para determinação de resultados	91
ANEXO B – Artigo Publicado	92
ANEXO C – Artigo Publicado	93
ANEXO D – Pedido Nacional de Invenção – INPI.....	94

1. INTRODUÇÃO

O crescimento exponencial da população e sua evolução concomitante com a exploração indiscriminada dos recursos naturais tende a culminar no cessamento das fontes ambientais. Dessa forma, a exploração da biomassa residual apresenta-se como uma das alternativas viáveis para a obtenção de insumos biotecnológicos de valor comercial (VALENTE et al., 2009).

A busca incessante pela reciclagem e reutilização dos resíduos agroindustriais vem desenvolvendo processos biotecnológicos de sua transformação em compostos e produtos de valor agregado, participando de forma ativa na via sustentável inerente à resolução dos problemas decorrentes de seu acúmulo e consequentes efeitos adversos na natureza, além de poder tornar-se uma fonte economicamente rentável (MENEZES et al., 2009).

A produção de coco tornou-se uma atividade de elevada relevância na economia de mais de 86 países. Na América do Sul, o Brasil é responsável por mais de 80% da sua produção, destacando-se também em área cultivada e produtividade. O Brasil é o quarto maior produtor mundial (2,9 milhões de toneladas do fruto em 2014), encontrando-se a maior parte das culturas na região Nordeste (FAO, 2014).

Os resíduos de coco verde podem constituir uma valiosa fonte de matéria-prima para obtenção de compostos orgânicos estáveis de aplicação no solo, na alimentação animal e até mesmo para a produção de etanol de segunda geração. Para isso, torna-se necessário a desobstrução dos dois grandes gargalos na obtenção de açúcares redutores: desagregação da lignina da hemicelulose/celulose e aumento da eficiência hidrolítica dos carboidratos associada a viabilidade econômica. Ou seja, desenvolvimento de bioprocessos sinérgicos estimulatórios que permitam uma maior atividade lignocelulolítica (CUNHA et al, 2013).

A susceptibilidade hidrolítica da celulose é influenciada diretamente pelo grau de cristalinidade das microfibrilas, existência de polímeros associados à sua matriz e microporos existentes (ALBUQUERQUE, 2013).

As celulasas, constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulolíticos promovendo sua hidrólise, são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis (UEDA et al., 2010). No entanto, até o momento poucos fungos e bactérias produzem altos níveis de enzimas capazes de degradar a biomassa lignocelulósica extensivamente. Essas enzimas incluem as ativas em carboidratos e as oxidativas de ligninas (CANTAREL et al., 2009).

Estudos sobre a influência dos emissores Laser e LED de baixa potência em populações microbianas vêm sendo discutidos na literatura. Indicam resultados bioestimulantes ou proliferativos, postulando que tais efeitos se devem às modificações geradas pelo aumento do aporte energético provido pela radiação na cadeia respiratória das bactérias (DIAS et al., 2009; PEREIRA et al., 2014; CRUGEIRA, 2016; DOBROWOLSKI et al., 2017).

Um dos alvos das irradiações no espectro vermelho é o complexo citocromo C, quando foto-excitado este complexo proteico aumenta sua capacidade de bombeamento de prótons e consequente aumento da quantidade de ATP celular disponível (KARU; 1998; KIPSHIDZE et al., 2001; CRUGEIRA et al., 2018). Cromóforo que possui alvos intramoleculares capazes de absorver luz, tais como os centros de cobre (ARGÜELLO et al, 2013).

O cobre e o zinco são encontrados em centros metálicos de proteínas ou mesmo atuando como co-fator enzimático. Estes metais, principalmente o zinco, são abundantes nos microrganismos e as metaloproteínas que os contém, comumente estão associadas a eventos transcricionais que desencadeiam o aumento do número de bactérias dos grupos irradiados (LATORRE et al., 2015).

A luz funciona basicamente como um “gatilho”, despontando respostas celulares, reações primárias na cadeia respiratória ou membrana celular, que se propagam através de reações secundárias consecutivas no citoplasma e no núcleo das células, desencadeando um processo em cascata. (KARU, 1999; CHAVANTES et al., 2009).

Neste estudo, pretende-se avaliar a capacidade catalítica do consórcio fotobiomodulado por Laser ou LED de baixa potência no bioprocessamento de degradação das fibras do coco verde e comparar os efeitos dos emissores na atividade microbiana.

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial da fotoestimulação de um consórcio bacteriano termo-celulolítico em acelerar a degradação da biomassa lignocelulósica residual de fibras de coco verde.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) os pré-tratamentos ácidos e/ou alcalinos aplicados ao resíduo de casca de coco verde;

- Verificar o potencial de estimulação da radiação Laser de baixa potência ou LED em um consórcio termo-celulolítico através da quantificação celular e análise da resposta celular;

- Avaliar a resposta do consórcio bacteriano irradiado por Laser ou LED através da análise da degradação do corante Azul Brilhante de Remazol-R e análise da atividade metabólica durante o processo catabólico;

- Estudar através da quantificação dos produtos da hidrólise e por análise de MEV a influência da fotoestimulação, comparando o desempenho dos emissores de luz Laser e LED.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESÍDUOS DE COCO VERDE

A grande demanda de alimentos e produtos, gerados pelo crescimento populacional e econômico, exercem sobre os sistemas produtivos a necessidade do aumento de produção a fim de suprir o crescente consumo. Simultaneamente, o aumento da geração dos resíduos domésticos requer uma reflexão sobre a eficácia do processamento sustentável versus viabilidade econômica (VALENTE et al., 2009).

Verificou-se nas últimas décadas uma busca incessante pela reciclagem e reutilização dos resíduos agroindustriais, desenvolvendo-se processos de sua transformação em compostos e produtos de valor agregado. A utilização de biomassa lignocelulósica residual como substrato em bioprocessos, despertou uma nova via sustentável para os problemas decorrentes de seu acúmulo e consequentes efeitos adversos na natureza, além de poder tornar-se economicamente rentável (MENEZES *et al.*, 2009).

A produção de coco tornou-se uma atividade de elevada relevância na economia de mais de 86 países. O Brasil é o quarto maior produtor de coco mundial, com uma produção de cerca de 2,9 milhões de toneladas do fruto em 2014, em uma área colhida de 250 mil ha de coqueiros tabela 1. A maior parte da cultura encontra-se na região Nordeste e boa parte da área cultivada é destinada a produção de água de coco proveniente do coco verde. Considerando a região da América do Sul, o Brasil é responsável por mais de 80% da produção do coco, destacando-se também em área cultivada e produtividade (FAO, 2014).

A tendência é o aumento da produção e de sua produtividade, visto o incremento tecnológico na condução e manejo dos coqueirais em quesitos como adubação, sistemas intensivos, e, principalmente, o avanço da fronteira agrícola com cultivo de coqueiros do tipo anão e híbridos (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011).

O expressivo aumento do consumo de água de coco, tornou-se um dos grandes propulsores na geração de resíduos, com um tempo de decomposição de até oito anos, em condições ambientais normais, devido a grande porcentagem de lignina e celulose que conferem a esse substrato uma grande durabilidade, o que gera um problema ambiental (MATTOS et al., 2011).

Tabela 1 – Produção mundial de coco, área colhid/produção em 2007; 2014 e projeção para 2017.

Coco-da-baía	Área colhida (ha)			Quantidade produzida (toneladas)			
	2007	2014	Varição 2007-2014	2007	2014	Varição 2007-2014	Projeção 2017
Indonésia	2.900.000	3.025.000	4,3	19.625.000	18.300.000	-6,8	17.759.890
Filipinas	3.359.777	3.502.011	4,2	14.852.900	14.696.298	-1,1	14.629.689
Índia	1.940.000	2.140.000	10,3	10.894.000	11.078.873	1,7	11.159.062
Brasil	283.205	250.554	-11,5	2.831.004	2.919.110	3,1	2.677.817
Sri Lanca	394.840	394.836	-0,0	2.180.440	2.395.266	9,9	2.493.696
Vietnã	119.300	139.236	16,7	1.034.900	1.374.404	32,8	1.552.106
Papua Nova Guiné	260.000	211.826	-18,5	1.424.000	1.168.768	-17,9	1.073.902
México	171.000	176.487	3,2	1.167.000	1.168.176	0,1	1.168.680
Tailândia	255.697	207.126	-19,0	1.721.640	1.000.320	-41,9	792.648
Outros	1.835.069	1.924.876	4,9	6.493.947	6.718.232	3,5	6.816.710
Total mundial	11.518.888	11.971.952	3,9	62.224.831	60.819.447	-2,3	60.124.200

Fonte: FAO, (2014).

Volumes significativos e crescentes de resíduos do coco são depositados e expostos ao meio ambiente tornando-se um foco para a proliferação de patologias, atraindo vetores, entre eles, ratos e insetos como o mosquito *Aedes aegypti*. Além disso, são usualmente descartados, em lixões e aterros sanitários, provocando impactos sobre a qualidade do ar, do solo e da água através da mistura com os resíduos pré-existentes que interagem química e biologicamente como um reator (ROSA et al. 2002). O descarte deve obedecer à lei federal nº 12.305/2010, que institui a política nacional de resíduos sólidos (PNRS), estabelecendo uma ordem de prioridade na gestão e gerenciamento de resíduos, não geração, redução, reutilização, reciclagem tratamento dos resíduos sólidos e disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos.

No entanto, os resíduos do coco verde podem constituir uma valiosa fonte de matéria-prima para obtenção de compostos orgânicos estáveis de aplicação no solo, para alimentação animal e até mesmo para a produção de etanol de segunda geração. Mas torna-se de extrema importância, que se consiga obter uma hidrólise mais eficiente e viável dos carboidratos complexos que constituem os resíduos de coco (ALBUQUERQUE, 2013).

3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DA CASCA DE COCO VERDE

A biomassa vegetal é um dos constituintes mais abundantes em nosso planeta, embora o reaproveitamento de sua massa residual não seja uma realidade vivenciada na atualidade.

O Brasil possui uma produção agroindustrial que se destaca no cenário mundial, criando-se um ambiente favorável para o avanço do reaproveitamento da biomassa como fonte renovável de matéria-prima. Atualmente o Brasil produz cerca de 330 milhões/ano de toneladas

de resíduos agroindustriais (RAMBO et al., 2015). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, (2015) o Brasil é o segundo maior exportador de alimentos, o décimo maior gerador de bioenergia em relação à matriz energética renovável e o nono maior exportador de produtos florestais, o que leva a uma grande disponibilidade de biomassa lignocelulósica residual para aplicações biotecnológicas.

As possibilidades e diversidade de produtos gerados a partir da biomassa residual é imensa, maiores investimentos impulsionariam o crescimento de várias áreas, tais como, industriais químicas, álcoolquímica, produção de bioplásticos verdes, entre outros (Figura 1).

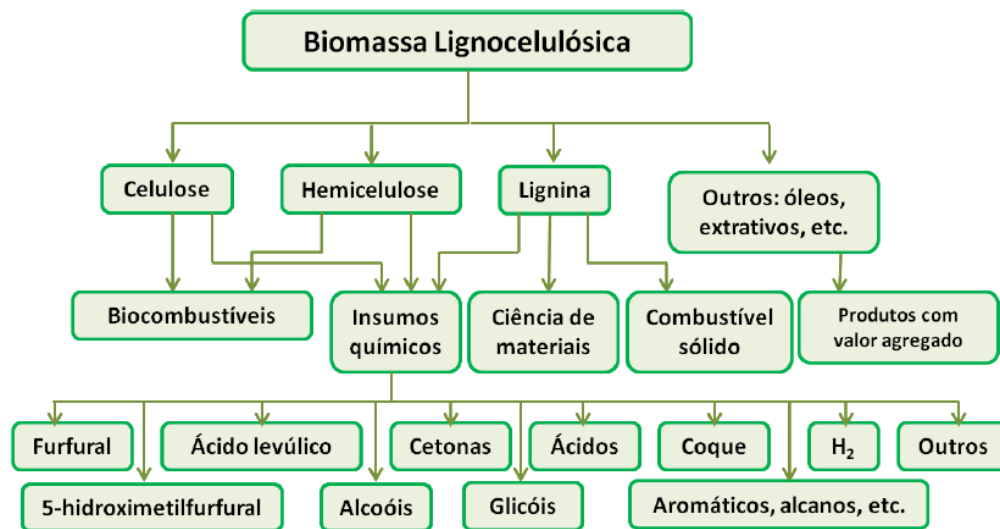


Figura 1. Aplicações dos componentes provenientes da biomassa lignocelulósica.
Fonte: SUN *et al.*, 2011.

A biomassa lignocelulósica é formada essencialmente por três constituintes orgânicos: celulose, hemicelulose e lignina, cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também das condições de crescimento, da fração da planta selecionada e do período de colheita. Estes componentes formam uma estrutura rígida e complexa constituindo a parede celular vegetal e representam cerca de 90 % da biomassa de carbono disponível na biosfera. Estruturas fibrilares de celulose encontram-se recobertas por uma matriz composta de hemicelulose e por redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades de fenilpropano interligadas, a lignina, cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação enzimática e/ou microbiana (ALBUQUERQUE, 2013).

A Celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1→4), é um dos principais constituintes da biomassa vegetal, molécula mais abundante na natureza, com alto grau de polimerização e elevado peso

molecular, principalmente em sua forma cristalina que confere alta resistência ao rompimento de suas ligações por substâncias químicas e agentes físicos (FARINAS, 2011).

Sua estrutura linear, conferida pelas ligações glicosídicas possibilita a união das cadeias de celulose pelas ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, em toda a sua extensão, formando assim, camadas de polímeros, designadas por microfibrilas, podendo ter uma espessura de 5 a 12 nm. As microfibrilas apresentam regiões altamente compactas (cristalinas) e áreas menos ordenadas (amorfas), onde as fibras apresentam maior distância entre si. O grau de cristalinidade destas microfibrilas, a existência de outros polímeros associados à matriz celulósica, e por outro lado, os microporos encontrados são de extrema importância, pois influenciam na susceptibilidade de hidrólise da molécula através das enzimas microbianas (ALBUQUERQUE, 2013).

A celulose encontra-se ligada a um heteropolissacarídeo de baixo peso molecular, a hemicelulose. Sua cadeia é formada por açúcares curtos, linear e altamente ramificados, que se ligam coesamente entre si e às microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo as ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa. São geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como por exemplo, xilanas, mananas e glucanas (OGEDA; PETRI, 2010).

Dependendo da espécie da planta, estágio de desenvolvimento e tipo de tecido, várias subclasses de hemiceluloses podem ser encontradas, como glucuronoxilanas, arabinoxilanas, mananas lineares, glicomananas, galactomananas, galactoglicomananas, β -glucanas e xiloglucanas. Arabinoxilanas, glucuronoxilanas, xiloglucanas e mananas lineares são pouco hidratadas, com exceção das mananas lineares, que servem como componente de armazenamento de sementes, estabilizam a parede celular através de interações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina. As xiloglucanas são as mais abundantes, encontradas na maioria das eudicotiledôneas. Os glucuronoarabinoxilanos ocorrem em maior proporção em paredes celulares de gramíneas (família *Poaceae*) e os mananos são de ampla ocorrência, mas geralmente aparecem em baixa proporção (BUCKERIDGE, 2010).

Presume-se que as hemiceluloses tenham ação ativa na regulação da elongação e alteração da parede, e que as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que as interações entre as hemiceluloses e ligninas (REN et al., 2016).

Outro constituinte da parede celular é a lignina, encontra-se associada à celulose e a hemicelulose, conferindo a planta rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos e mecânicos aos tecidos vegetais. Principal fonte de carbono aromático na biosfera, macromolécula de alto peso molecular e estrutura irregular constituída de unidades de

fenilpropano. Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano. A lignina apresenta um esqueleto básico de quatro ou mais unidades de fenilpropano por molécula substituída. Esses monômeros que formam a lignina são denominados alcoóis que são diferenciados entre si pelas substituições que apresentam no anel aromático (álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). A estrutura da lignina é bastante complexa e ainda não conhecida completamente. A distribuição e proporção destes monômeros obedecem à origem filogenética de cada vegetal variando entre as diferentes espécies de plantas e a razão entre elas tem sido usada como propósito taxonômico (SANCHEZ, 2009).

Devido às ligações químicas fortes entre as interunidades de fenilpropanóides e por se caracterizar por uma macromolécula heterogênea, a lignina é difícil de ser clivada por enzimas hidrolíticas. No entanto, ao longo da evolução, alguns microrganismos como os *Agaricomycetes* desenvolveram enzimas, lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, capazes de degradar substancialmente a lignina. Também, alguns *Ascomycetes*, especialmente da ordem *Xylariales*, desenvolveram a capacidade de degradar a lignina até certo grau (MORGENSTERN et al., 2008).

Bismark et al. (2001) descreve a constituição da parede celular da biomassa residual da casca de coco verde, com um teor de celulose de 36-43 %, de lignina em torno de 41-45 % e de hemicelulose 0,15-0,25%. Sua composição sugere que se recorra a processos físico-químicos para facilitar o processo de deslignificação, remoção da hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, aumentando assim, a suscetibilidade enzimática da celulose (CARDONA et al., 2010).

3.3 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA RESÍDUAL LIGNOCELULÓSICA

O processo de hidrólise da celulose em glicose, através da ação enzimática possui uma taxa de rendimento muito baixa, devido à sua estrutura altamente cristalina que dificulta o acesso do substrato aos sítios ativos, potencializado pela capacidade restringidora da lignina à superfície celulósica, para além das celulasas adsorverem as ligninas fisicamente. Por essa razão, torna-se necessário a elaboração de uma etapa de pré-tratamento com o objetivo de separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar a sua fração amorfa e solubilizar a hemicelulose (SARKAR et al., 2012).

Segundo Morais (2010), sem o pré-tratamento, a ação das enzimas é lenta e com rendimentos inferiores a 20%, mas a inserção de uma etapa de pré-tratamento resulta em rendimentos superiores a 80%.

A avaliação da eficácia do pré-tratamento baseia-se em função do rendimento, seletividade, funcionalidade e viabilidade econômica. Objetiva-se a diminuição do grau de polimerização das moléculas de celulose, de forma a tornarem-se acessíveis ao processo de hidrólise, reduzindo a degradação ou perda de carboidratos, formação de subprodutos inibitórios e alcançar um baixo custo (CHATUVERDI; VERMA, 2013).

Os inibidores formados como subprodutos no pré-tratamento podem ser classificados em três categorias: derivados furânicos (furfural e 5- hidroximetilfurfural), ácidos orgânicos fracos (ácido acético e outros) e derivados fenólicos, conforme esquema da Figura 2. Suas concentrações e compostos tóxicos formados dependerão da matéria-prima utilizada e das condições operacionais empregadas (OGEDA; PETRI, 2010).

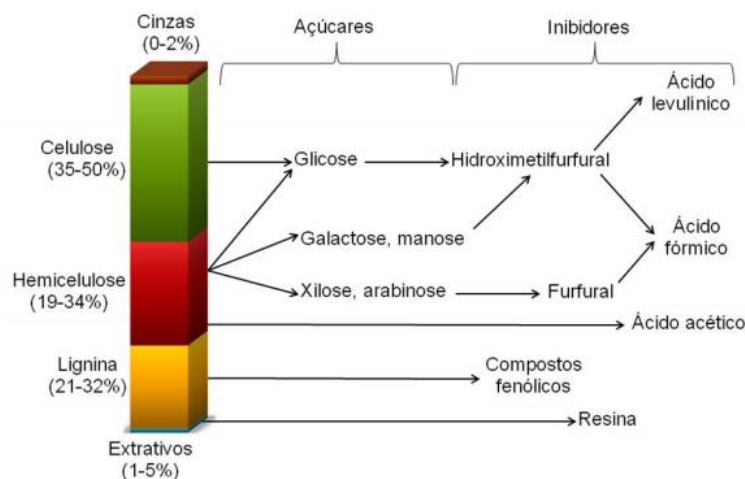


Figura 2. Subprodutos inibitórios provenientes do processo de pré-tratamento.
Fonte: RABELO, (2010).

Os inibidores gerados nos processos de pré-tratamento, devem ser removidos antes da etapa subsequente de hidrólise da biomassa, evitando assim, que a obtenção de açúcares seja prejudicada. Existem vários métodos estudados para realizar a remoção desses inibidores como o uso de ácidos e bases, troca iônica, evaporação, entre outros. A forma mais simples e mais utilizada é a lavagem com água. É uma etapa essencial para que a hidrólise da celulose não seja comprometida (CHUNDAWAT et al., 2007).

Segundo Zhang et al. (2004), o pré-tratamento é uma das prioridades para que se obtenha um bom rendimento no processamento da biomassa lignocelulósica residual em açúcares e

consequentemente uma geração de produtos competitivos no mercado como o etanol de segunda geração.

Existem diversos processos de pré-tratamento disponíveis, realizados por métodos físicos, químicos, biológicos e por combinações entre eles.

Os meios químicos são bastante utilizados, na sua maioria representam um baixo custo. Diferem entre si, pela ação dos reagentes químicos, bem como dos mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular, que resultam em uma melhor acessibilidade da enzima e rendimentos maiores. Os pré-tratamentos ácidos proporcionam a hidrólise da hemicelulose e a formação de uma fração sólida rica em celulose e lignina, enquanto que os pré-tratamentos básicos promovem a deslignificação e uma remoção diminuta da hemicelulose. Já os pré-tratamentos oxidativos contemplam a remoção dos dois componentes supracitados por oxidação da estrutura (CHEN et al., 2011).

Os pré-tratamentos com reagentes ácidos necessitam de equipamentos especiais por serem corrosivos, tóxicos nas concentrações utilizadas e liberam vários inibidores da fermentação, o que torna o processo mais oneroso. Requererem uma etapa adicional para neutralizar a biomassa e eliminar os inibidores formados, no término do processo (BEHERA et al., 2014).

Sabendo da existência de uma vasta gama de métodos de pré-tratamento e que todos os processos têm as suas vantagens e desvantagens a sua determinação depende do material a ser tratado e da finalidade a que se propõe.

3.3.1 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

Os pré-tratamentos alcalinos têm a capacidade de eliminar a fração de lignina da biomassa lignocelulósica, melhorando a acessibilidade aos polissacarídeos e a remoção de grupos acetila e outros substituintes da fração de hemicelulose (MOOD et al., 2013). Esses pré-tratamentos permitem uma menor degradação de açúcares e formação de derivados do furano quando comparados a pré-tratamentos térmicos e ácidos (CHEN et al., 2011).

Estudos elaborados por Rocha et al. (2012) de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, demonstraram que o pré-tratamento em meio alcalino com hidróxido de sódio a 100 °C por 1 hora permitiu a remoção de até 92,7 % da fração de lignina.

Oliveira et al. (2010) estudou o pré-tratamento alcalino utilizando NaOH (1%) a 100°C por 60 min, obtendo o resultado de 80,0% de deslignificação da palha da cana-de-açúcar.

Nascimento (2011) ao utilizar o substrato de bagaço de cana-de-açúcar com NaOH a 7% por 30 min a 120°C, obteve a deslignificação do material em 95% de biomassa.

Gonçalves (2014) realizou o pré-tratamento alcalino do coco maduro com NaOH em várias condições, atingindo a melhor conversão celulósica de 90,72% após 96 h de hidrólise enzimática, utilizando as condições de pré-tratamento de 2,5 (v/v) de NaOH, 180 °C por 30 min. Nascimento (2016) avaliou a conversão celulósica do coco verde após ser pré-tratado nas condições de 0,5 % (p/v) de NaOH, 121 °C por 30 min, atingindo um rendimento de hidrólise enzimática de 26,75 %.

O pré-tratamento com agentes alcalinos pode apresentar a desacetilação parcial da hemicelulose, gerando ácido acético em solução. No entanto, dependendo das condições de tratamento como temperatura, concentração, tempo e do agente utilizado, obtêm-se bons rendimentos, geralmente o NaOH e KOH são preferidos (PENG et al., 2012).

Os agentes químicos também podem ser associados aos processos físicos, tais como incremento de temperatura ou pressão, processos de descompressão rápida, uso de ultrassom, entre outros, com o objetivo de aumentar a área superficial do material lignocelulolítico e aumentar a acessibilidade com o intuito de melhorar a eficácia da hidrólise da biomassa (RODRIGUES et al., 2016).

3.4 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O objetivo primordial da hidrólise da biomassa lignocelulósica é a conversão em açúcares que possam ser utilizados na elaboração de vários bioprodutos, podendo ser realizada de uma forma direta ou combinada com diversos pré-tratamentos.

Os métodos frequentemente utilizados na clivagem dos materiais celulósicos são a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática do material pré-tratado. Em qualquer destes métodos existem vários modos de operação. A escolha do método deve-se basear em várias considerações, sendo de extrema importância a especificidade do produto, o objetivo final a que se propõem e o fator econômico da execução do processo. Por outro lado, é consenso que o material deve ser antes processado mecanicamente, quebrado ou moído, com o objetivo de aumentar a área superficial (LJUNGDAHL; ERIKSSON, 2012).

A clivagem de materiais lignocelulósicos através da ação enzimática apresenta-se ainda como um processo oneroso, sendo considerado um gargalo na produção de bioetanol, devido ao elevado custo de produção das enzimas (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012).

Nesse sentido, têm sido realizadas pesquisas por ferramentas que estimulem e otimizem os metabolismos enzimáticos na degradação da biomassa e consequente obtenção de bioprodutos de forma incessante, com forte incidência na engenharia genética de proteínas, na identificação de novas enzimas e na otimização do sinergismo dessas enzimas selecionadas (NASCIMENTO et al., 2009).

Uma das vantagens da hidrólise enzimática em relação à hidrólise química, é a elevada especificidade, não permitindo que as reações secundárias ocorram. A hidrólise enzimática adota uma estratégia que promove reações específicas tentando trazer o máximo de eficácia, no entanto, o ataque enzimático é um processo lento. Além disso, a biocatálise é mais sensível à ação dos inibidores de reação requerendo uma tecnologia mais complexa (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011). A hidrólise enzimática realiza-se em condições brandas, como temperaturas próximas de 50 °C, pH na faixa 4,5 – 6,0 e operação na pressão atmosférica (RABELO et al., 2011).

Usualmente para potencializar a hidrólise enzimática da celulose são realizadas operações de pré-tratamento para deslignificar a biomassa residual e expor a celulose e hemicelulose ao ataque enzimático (SUN; CHENG, 2002). As celulasas adsorvem sobre as ligninas, impedindo o intumescimento das fibras de celulose, como se verifica no *T. reesei*, aminoácidos hidrofóbicos expostos na superfície das celulasas podem interagir com a superfície hidrofóbica da lignina e causar inativação da enzima durante a hidrólise, reduzindo a eficiência do processo catalítico (PACK et al., 1998).

3.4.1 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As enzimas exercem a função de catalizadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular ativo. Esses biocatalizadores são moléculas proteicas, com poder catalítico associado à sua conformação nativa, a qual depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio (MADIGAN et al., 2016). Em condições ambientais díspares de seus parâmetros ótimos, pode ocorrer a desnaturação da biomolécula e alteração da sua estrutura nativa, frequentemente irreversível, acompanhada de perda de sua atividade catalítica.

Na natureza bactérias e fungos secretam enzimas que degradam os compostos lignocelulósicos das paredes celulares vegetais de forma sinérgica. As bactérias participam na decomposição da matéria orgânica e no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica promovendo a ciclagem de nutrientes, em transformações bioquímicas específicas como

nitrificação e desnitrificação, na fixação biológica de nitrogênio, na produção de substâncias de crescimento e metabólitos bioativos. A capacidade de secretar quantidades viáveis de enzimas extracelulares, como as celulases, é uma característica de microrganismos específicos e somente algumas cepas têm essa faculdade (YU et al., 2007).

As celulases, constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulolíticos promovendo sua hidrólise, são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis (UEDA et al., 2010).

No entanto, até o momento poucos fungos e bactérias produzem altos níveis de enzimas capazes de degradar a biomassa lignocelulósica extensivamente. Essas enzimas incluem as ativas em carboidratos e as oxidativas de ligninas (CANTAREL et al., 2009).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, e *Streptomyces* podem produzir celulases de forma efetiva (SADHU; MAITI, 2013). Fungos como *Sclerotium rolfii*, *Phanerochaete chrysosporium* e espécies como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicilium* também são usados para produzir celulases (SANCHEZ, 2009). Cepas mutantes de *Trichoderma* sp. (*T. viride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*) há muito são considerados os organismos mais produtivos e os mais poderosos na degradação da celulose cristalina (ZHOU et al., 2008).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas, sua classificação, de acordo com o local de atuação no substrato, segundo os critérios estabelecidos pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBM) divide-as em três grandes classes: as endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.3/EC 3.2.1.4) ou endoglucanases, hidrolisam ligações β -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose acessível aleatoriamente para produzir novas extremidades; as exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91), exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH), atuam progressivamente na clivagem de cadeias de celulose nas extremidades para libertar oligossacarídeos, dentre estes, unidades de celobiose solúvel; e por último as 1,4- β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) ou celobiasas, hidrolisam a celobiose, liberando duas unidades de glicose a fim de eliminar a inibição por celobiose (ANDERSEN, 2007).

As endoglucanases atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4), promovendo uma mudança rápida no grau de polimerização, disponibilizando terminais redutores e não redutores para a atuação das exoglucanases (celobiohidrolases), estas liberam D-celobiose, substrato para as β -D-glucosidases que catalisam a liberação de unidades monoméricas de D-glicose. As

celobiohidrolases são classificadas em dois subgrupos: um ataca os terminais redutores das moléculas de celulose (CBH I) e o outro ataca os terminais não redutores (CBH II) (WYMAN et al. 2005).

Embora a β -glicosidase participe da sacarificação da celulose, não é uma celulase estrita, pois hidrolisa ligações glicosídicas de oligossacarídeos solúveis e/ou celobiose, não atuando diretamente na celulose insolúvel (RABELO, 2010).

A arquitetura molecular das glucanases é de extrema importância nas respectivas atividades catalíticas, na sua maioria são proteínas modulares compostas por duas regiões distintas, possuindo um domínio de ligação ao substrato (CBD), que tem a função de aproximar o núcleo catalítico da superfície da celulose, e um domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo (JORGENSEN et al., 2007). Estas regiões estão unidas por uma cadeia polipeptídica flexível denominada de região ligante. O sítio ativo efetua a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e é diferente para cada classe de celulase, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato, como ligações internas e ligações terminais (MARTINS, 2005). O domínio catalítico das endoglucanases estão expostos para fora da enzima e apresenta uma estrutura em forma de fenda ou rachadura (Figura 3A), enquanto nas celobiohidrolases verifica-se uma estrutura em forma de um túnel. No caso da CBHI do *T. reesei*, um túnel de 50 Å de comprimento e 10 sítios ligantes de celulose garantem a sua permanência no domínio catalítico (Figura 3B) (HENRIKSSON et al., 1996).

Para que o processo de hidrólise da macromolécula de celulose apresente um maior rendimento de catálise é necessário a complementação e ação sinérgica do complexo celulolítico (VARNAI et al., 2010).

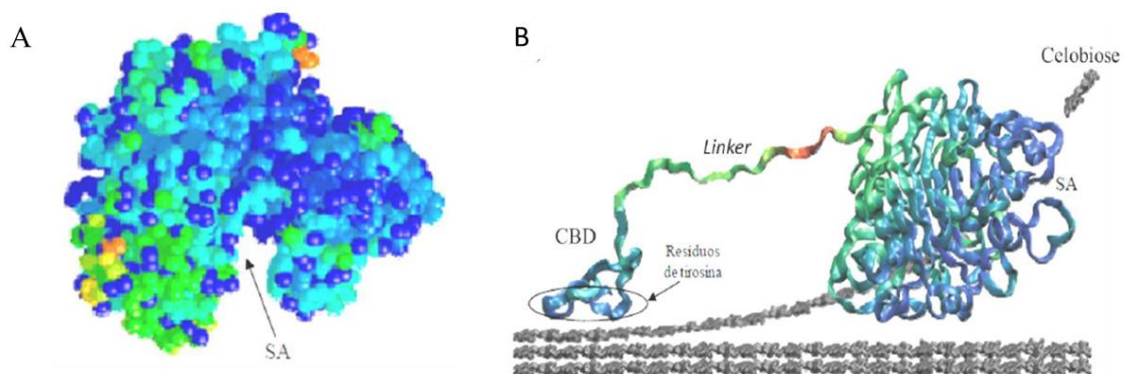


Figura 3. (A) Representação do sítio ativo (SA) de uma endoglucanase; (B) Representação do sítio ativo (SA) e do domínio de ligação ao substrato da CBH I de *T. reesei*.

Fonte: MONTE, (2009).

3.4.2 SINERGISMO ENZIMÁTICO

Embora vários domínios catalíticos individuais evidenciem atividade mensurável para a celulose, suas atividades são bastante reduzidas. Por conta própria, eles seriam catalisadores pobres para a hidrólise da biomassa lignocelulolítica.

No meio ambiente, dois mecanismos de ação catalítica favorecem o desempenho e eficácia da atividade enzimática. No primeiro, várias classes de celulases são expressas de forma coordenada, produzindo um aumento sinérgico da sua atividade (Figura 4).

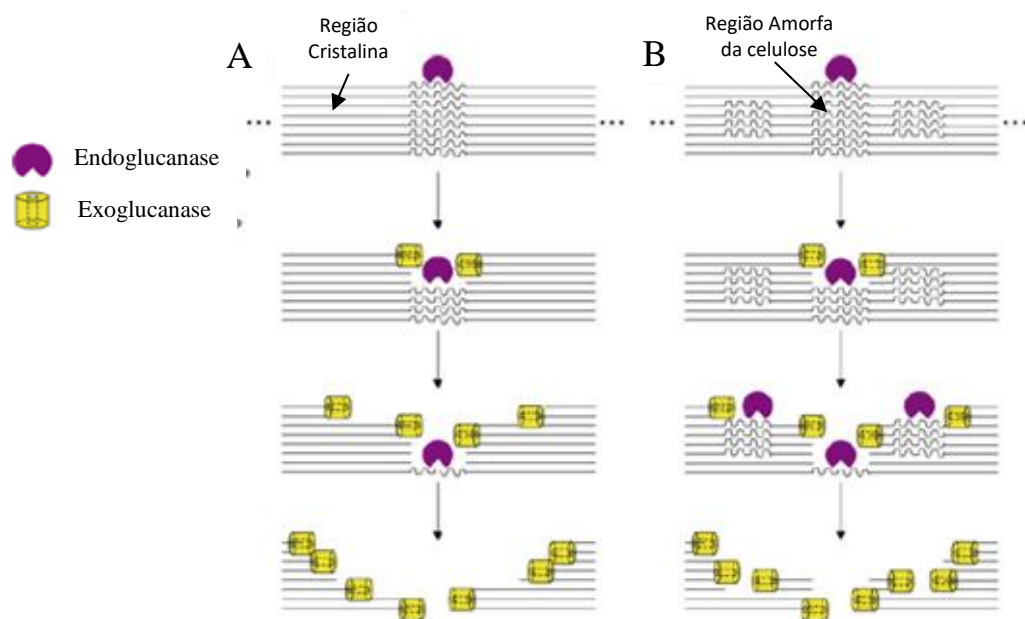


Figura 4. Modelos de sinergia entre endoglucanases e exoglucanases na hidrólise de celulose. (A) degradação das regiões amorfas pela endoglucanase produzindo extremidades redutoras e não redutoras, aumentando a reatividade das exoglucanases; (B) atividade da exoglucanase expõe regiões internas amorfas, liberando sítios adicionais para a atividade da endoglucanase.

Fonte: CUNHA et al., 2013.

Embora não esteja esquematizado na Figura acima, a presença da β -glicosidase é fundamental para que não ocorra inibição pelo produto formado pela atividade catalítica da exoglucanase (WILSON, 2008).

No segundo mecanismo de ação, domínios catalíticos estão ligados covalentemente ou não covalentemente a CBDs, que localizam a atividade enzimática para os substratos celulósicos, permitindo múltiplas rondas de hidrólise. Em bactérias aeróbias e fungos, isto é conseguido por fusão direta do CBD de codificação e sequências de codificação do domínio catalítico em genes de celulase (Figura 5). Além de melhorar a atividade por ligação à superfície

do substrato, estes domínios de ligação podem aumentar diretamente a atividade, fornecendo integridade estrutural ao domínio catalítico (BORASTON et al., 2004).

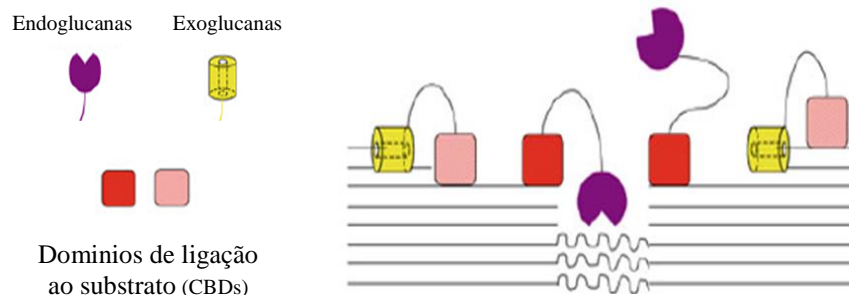


Figura 5. Esquema de estratégia microbiana da hidrólise da celulose, não celulossômica. Utilizado por bactérias aeróbicas e fungos. Fusão dos domínios catalíticos de celulase aos CBDs, localiza a atividade enzimática na superfície da celulose.

Fonte: CUNHA et al., 2013.

Em bactérias anaeróbicas, particularmente no gênero *Clostridium*, é utilizada uma estratégia que incorpora ambos os mecanismos de ação enzimática supracitados. Estando os domínios catalíticos encadeados de forma não covalente por “andaimos” moleculares na superfície da célula, formando complexos multi-enzimáticos (celulossoma) estáveis que agregam as enzimas celulolíticas, agindo de forma simbiótica (ANDERSEN, 2007).

Vários estudos têm sido realizados a partir de diferentes espécies de *Clostridium*, incluindo *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans* e *C. josui*, com o objetivo de elucidar a hidrólise enzimática conduzida pelo complexo enzimático celulossoma (DEMAIN et al., 2005).

Uma outra estratégia de sinergismo enzimático pode ocorrer quando as celulases são provenientes de microrganismos diferentes, designado por sinergismo cruzado. Estes sistemas revelam-se de extrema importância quando o índice de cristalinidade da celulose é elevado e quando as celulases oriundas de apenas um único microrganismo podem ser incapazes de obter uma degradação eficiente da celulose. Neste estudo utilizou-se um consórcio de microrganismos fotoestimulados, de forma a obtermos um mecanismo de sinergia cruzada e consequentemente otimizar a hidrólise enzimática (GAN et al., 2003).

3.5 CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO LASER E LED

A luz é objeto do fenômeno ondulatório, constituído por partículas de energia eletromagnética, os fótons. As ondas eletromagnéticas são caracterizadas, de forma geral, por

sua frequência, comprimento de onda e energia (NUNEZ et al., 2012).

O termo Laser é um acrônimo para “Light Amplification by emission of radiation”, significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Fonte de radiação não ionizante, altamente concentrada, que em contato com diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo de Laser, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares (PINHEIRO, 1998).

Os Laseres apresentam características especiais que os diferem de outras fontes de luz, como monocromaticidade, emissão de uma onda eletromagnética de um único comprimento de onda; colimação, ou seja, ondas eletromagnéticas são emitidas em uma única direção e paralelas entre si, favorecendo a transmissão de uma grande quantidade de energia a seu alvo; e por último, coerência temporal e espacial, que caracteriza a sincronia das ondas eletromagnéticas. Em alguns equipamentos as ondas eletromagnéticas podem ser polarizadas, orientadas em um único plano (BAGNATO; PAOLILLO, 2014).

O comprimento de onda é de extrema importância na interação da radiação Laser com a matéria, provocando interações e eventos celulares diferenciados. A propagação da luz no seu alvo depende da homogeneidade das estruturas e das suas propriedades. Tais fatores, são influenciados e determinados pela composição bioquímica das estruturas moleculares e condições fisio-biológicas das células alvo. Essas interações e as composições ópticas dos diversos meios celulares determinam a distribuição da luz incidente, sendo um fator preponderante e de relevância na geração da resposta biológica (FUKUDA et al., 2010).

Os efeitos do Laser foram divididos em dois grupos por Karu (1987), o primeiro como efeito primário ou direto (bioquímico, bioelétrico e bioenergético), o segundo, efeito secundário ou indireto, provoca vários estímulos ocasionando uma sequência de reações sucessivas.

O efeito fotoquímico ocorre devido à presença de fotoreceptores especialmente sensíveis a determinados comprimentos de onda, a absorção de fótons por biomoléculas intracelulares específicas produz estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas. Logo, essas ações determinarão mudanças fotodinâmicas em cadeias complexas e moléculas básicas de processos fisiológicos (KARU, 2010).

Recentemente, com o desenvolvimento do diodo emissor de luz (LED), uma nova etapa na óptica surgiu. Entre as peculiaridades do LED constam a longa durabilidade, baixo custo, confiabilidade, não geração de calor, dimensões reduzidas, temperatura de cor, alta eficiência energética, isto é, praticamente toda a energia incrementada no LED é transformada em luz e apenas uma pequena fração é perdida na forma de calor, tendo ainda a vantagem de ser bastante sustentável, ou seja, de causar um impacto ambiental reduzido (DOURADO et al., 2012).

A emissão de luz dos LEDs é difusa, não coerente, formada por junção do tipo P-N, (positivo-negativo) compostos por um pequeno chip de material semicondutor dopado. A escolha do semicondutor determinará o pico do comprimento de onda da emissão de fótons e a cor do LED, quando no espectro do visível (BAGNATO, 2002).

Em relação à coerência da luz devem-se distinguir dois aspectos essenciais: seu efeito físico e a interação da luz com as moléculas, células ou tecidos. A absorção da luz de baixa intensidade pelo sistema biológico, em condições fisiológicas, é de natureza puramente não coerente, devido à taxa de excitação da decomposição da coerência em níveis de elevada magnitude em relação à taxa de fotoexcitação (KARU et al., 2010).

A emissão espontânea da radiação LED, fonte de luz monocromática, emite em uma faixa espectral mais ampla em comparação com o Laser (Figura 6).

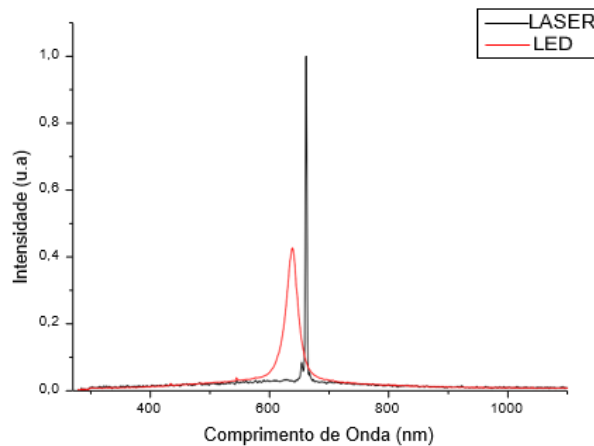


Figura 6. Distribuição da energia do Laser e LED por banda espectral.
Fonte: CORAZZA, (2005).

A radiação Laser caracteriza-se por uma maior concentração da energia (fluência) em uma pequena faixa espectral. Enquanto que a densidade de energia na emissão LED está distribuída em uma banda eletromagnética maior, possibilitando a interação com um maior grupo de fotorreceptores específicos. Apesar de se constatar uma diferente distribuição de energia da emissão Laser em relação à radiação LED, verifica-se uma ampla janela biológica de absorção da luz em células biológicas, permitindo uma ação biomoduladora (CORAZZA, 2005).

3.6 FOTOBIMODULAÇÃO

O estado fisiológico e a especificidade de cada célula apresentam um determinado limiar de sobrevivência, que pode ser modulado de acordo com a energia oferecida. O efeito molecular

da absorção de baixa intensidade de energia em estruturas bioquímicas da célula, resulta na busca da manutenção ou normalização das suas funções, biomodulação. Para que ocorra o processo de biomodulação é importante que as células alvo não estejam em condições de homeostase (CHAVANTES et al., 2009).

Catão (2004), afirma que a terapia a Laser de baixa intensidade influencia mudanças de caráter metabólico, energético e funcional, uma vez que favorece o aumento da resistência e vitalidade celular, levando os tecidos a um rápido retorno à sua normalidade.

Ao irradiar-se um organismo vivo, introduzimos energia em um sistema biológico, que utiliza e transforma essa energia para seu consumo próprio. É importante salientar que a dose, o comprimento de onda, a potência e a superfície irradiada são de extrema importância. A eficácia da irradiação está intimamente relacionada com a fluência adequada, aplicada de modo regular e gradual, de maneira que fluências baixas ou altas podem não produzir efeitos ou gerar prejuízos, respectivamente. A fluência define muitas vezes a fronteira da obtenção de um processo estimulatório ou inibitório (BAGNATO et al., 2007).

Atualmente, a fotobiomodulação é praticada em todo o mundo, sendo o Laser uma das fontes de luz mais exploradas nessa terapia (PINHEIRO et al., 2010).

Uma das funções de regulação celular acontece através de fotorreceptores como flavoproteínas, porfirinas, citocromos, tirosinas, asparaginas, entre outras, capazes de absorver um fóton de um determinado comprimento de onda, provocando uma transformação na atividade funcional e metabólica da célula. Os fotorreceptores específicos interferem no metabolismo celular sem a necessidade de energia luminosa, mas se incidir sobre estes uma radiação com comprimento de onda específico, são capazes de absorver os fótons, assumindo um estado excitado eletronicamente, propiciando alterações no metabolismo celular. Estes processos são definidos como bioestimulação (KARU, 1999; KUJAWA et al., 2004).

De acordo com o trabalho de T. Karu (1987), existem registros sobre os efeitos da radiação eletromagnética, desde o final do século 19, em vários comprimentos de onda na região do visível (400 a 700nm), sobre organismos e células (SCHNETZLER, 1874; PONZA, 1876; FUBINI, 1879).

Sabe-se atualmente que existe um mecanismo fotobiológico universal da ação da luz na cadeia respiratória de células eucarióticas e procarióticas com enzimas terminais da cadeia respiratória, atuando como fotorreceptores (KARU; KOLYAKOV, 2005).

A luz funciona basicamente como um “gatilho”, despertando respostas celulares, reações primárias na cadeia respiratória ou membrana celular, que se propagam através de

reações secundárias consecutivas no citoplasma e no núcleo das células, desencadeando um processo em cascata. (KARU, 1999; CHAVANTES et al., 2009).

Por outro lado, segundo Karu (1987), a resposta celular à fotoestimulação não está associada a propriedades específicas da luz Laser, como a coerência. Esta propriedade é perdida na interação da luz com o tecido biológico, não sendo uma condição essencial para o processo de fotoestimulação. Este estudo abriu espaço para o trabalho com fontes emissoras de luz não coerentes como os diodos emissores de luz LED (CRUGEIRA et al., 2018). Assim, considera-se que hajam efeitos bioestimulatórios semelhantes gerados a nível celular, pelo Laser e LED, quando comparados sob os mesmos comprimentos de onda, intensidade e tempo de irradiação, (SOUSA et al., 2010).

Estudos desenvolvidos pela NASA (*National Aero Space Agency*) nos Estados Unidos demonstraram fortes evidências da eficiência dos LEDs em processos de fotoestimulação celular à semelhança dos Lasers de baixa potência (VINCK et al., 2003).

A fotobioestimulação tem vindo a apresentar uma série de resultados positivos a nível celular, como o aumento da taxa de proliferação (KARU, 1987; CRUGEIRA et al., 2018), aumento da taxa de síntese de RNA e DNA (KARU, 1987; KARU; KOLYAKOV, 2005) e síntese de ATP (YU et al., 2004).

Como já foi referenciado, existe um mecanismo da ação da luz sobre a cadeia respiratória das células eucarióticas e procarióticas. No caso da radiação na região do vermelho ao infravermelho próximo NIR (NearInfra Red), os fotorreceptores são enzimas terminais da cadeia respiratória, como a citocromo c oxidase e o citocromo bd em células procarióticas de *Escheria Coli*. A nível experimental deve-se ter em atenção ao estado de oxidação/redução da enzima, citocromo c oxidase, apenas na forma intermediária funciona como um fotorreceptor (KARU, 2003).

As reações que ocorrem durante a irradiação, ainda não foram totalmente esclarecidas, gerando uma série de hipóteses relativamente à geração de oxigênio singlete (KARU, 1989), alteração das propriedades do estado excitado redox dos centros CuA e CuB ou *heme a* e *heme a3* (KARU, 1988), presença de óxido nítrico (NO), aquecimento local transiente ou aumento da produção de anions superóxidos (KARU; ANDREICHUK; RUABYKH, 1993).

Segundo Karu (2003), os diferentes mecanismos podem levar a resultados similares estimulando o estado redox da mitocôndria na direção de maior oxidação. De qualquer forma ainda está por esclarecer qual o parâmetro como dose e intensidade podem direcionar o processo para determinado mecanismo de ação ou predominância de um em relação a outro.

É de salientar que durante a excitação dos estados eletrônicos (reação primária) uma parte da energia de excitação é convertida em calor, elevando localmente a temperatura dos cromóforos absorventes. Ocasionalmente mudanças estruturais e deflagrando atividades bioquímicas, reações secundárias na ausência de luz, tais como ativação de enzimas (CHAVANTES et al., 2009).

Relativamente à ativação do fluxo de elétrons na cadeia respiratória, pode-se esperar um aumento da produção de radicais hidroxil ($\text{OH}\cdot$) e de anion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) como consequência da redução por um elétron. O principal uso do oxigênio na cadeia é a sua redução a água por quatro elétrons. Pequenos aumentos na concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e, subsequentemente, incremento da concentração do produto de sua dismutação (H_2O_2) em uma célula resultam em múltiplas respostas secundárias (KARU, 1989).

Os mecanismos secundários são os responsáveis pela conexão entre a resposta à ação da luz dos fotoreceptores, como os localizados na mitocôndria e os mecanismos de síntese de DNA e RNA localizados no núcleo ou outros fenômenos em diversos componentes da célula, como por exemplo, a adesão da membrana. Existem diferentes processos de regulação associados ao controle dos fotoreceptores sobre o nível de ATP intracelular, fatores de transcrição celular sensíveis ao estado redox ou cascatas homeostáticas de sinalização celular do citoplasma através da membrana da célula para o núcleo (KARU, 2003).

Estes mecanismos apresentam dependência de vários parâmetros como a dose de irradiação, o comprimento de onda, o modo de operação da excitação luminosa (pulsado/contínuo) e a intensidade de excitação. Foi observado que o estado geral redox da célula e seu pH no momento da irradiação podem levar a diferentes respostas das células irradiadas, isto é, a resposta à excitação, depende das condições iniciais da célula. Como estas condições dependem de uma série de fatores e variam de indivíduo para indivíduo a resposta aos efeitos da irradiação ainda necessitam de uma análise mais sistemática principalmente para estabelecer correlações quantitativas (DIAS et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PESQUISA

O procedimento laboratorial deste trabalho foi didaticamente dividido em etapas distintas: avaliação do pré-tratamento da casca de coco, análise da fotoestimulação por Laser ou LED do consórcio termo-celulolítico e quantificação dos produtos resultantes da hidrólise da biomassa residual pré-tratada pelo consórcio estimulado.

Apresenta-se o fluxograma com os pontos de maior relevância deste trabalho (Figura 7).

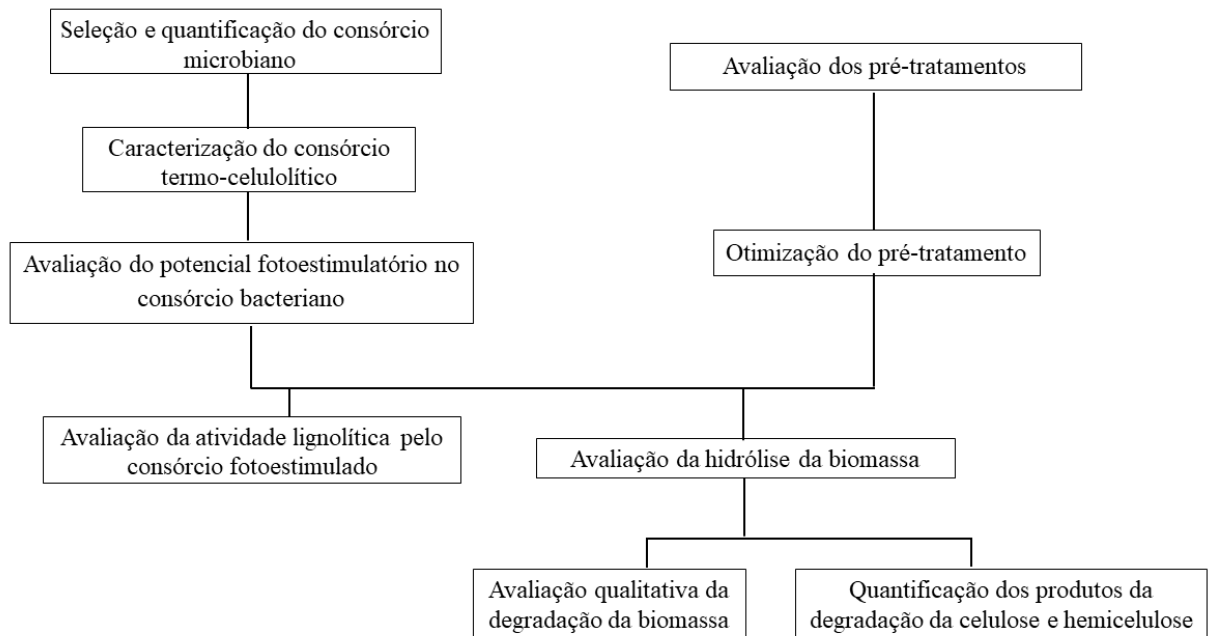


Figura 7. Fluxograma descrevendo a sequência experimental adotada neste trabalho. (CRUGEIRA, 2019)

4.2 MATÉRIA PRIMA E PROCESSAMENTO

A biomassa residual, foi coletada de uma unidade de processamento de água de coco, localizada em Salvador. O material foi selecionado através do seu aspecto, tamanho e lote. Sem atingir o estado de maturação e indícios de putrefação.

A casca de coco foi processada pelo triturador (Trapp TRC 40, Jaraguá do Sul/SC, Brasil) por duas vezes consecutivas de modo a obter fragmentos de menor tamanho e uniformes.

4.3 PRÉ-TRATAMENTOS DA CASCA DE COCO VERDE

Em uma primeira fase, a casca de coco verde foi submetida a três pré-tratamentos distintos: solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) seguida da solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH) ambas a 2,5%; solução de NaOH 2,5%; solução de NaOH 5%, com o objetivo de avaliar-se a capacidade de deslignificação.

Os pré-tratamentos foram efetuados em banho maria (Unique – USC 2500 ultrasonic cleaner, Illinois, Chicago, USA) à temperatura de 60 °C, por 30 minutos em triplicata. Utilizaram-se volumes de 400 mL das soluções para 20g de casca de coco verde, antecipadamente desidratada em estufa (Biopar, Porto Alegre-RS, Brasil) a 60 °C por seis horas. Após os pré-tratamentos, as fibras de coco foram lavadas com água destilada até à neutralização do pH (7,0).

Para uma avaliação qualitativa dos subprodutos inibitórios formados, durante os pré-tratamentos, inoculou-se 10 % do consórcio microbiano selecionado (item 4.5) em 125 ml de caldo mineral (Tabela 2) com 2,0 g de casca de coco pré-tratada e incubou-se em mesa de agitação (New Brunswick Scientific Co I26 Incubator Shaker Series, São Diego-CA, USA) a 60 °C e 100 rpm, em triplicata. Ao final de 96 hs avaliou-se a degradação da biomassa através de fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Tabela 2 – Composição do caldo de cultura mineral. (RENORBIO, 2019)

<i>Componentes</i>	<i>Unidades</i>	<i>Concentração</i>
NaNO ₃	g/L	2,0
K ₂ HPO ₄ OU KH ₂ PO ₄	g/L	1,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	g/L	0,5
KCl	g/L	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	g/L	0,01

Em uma segunda fase, com o objetivo de aumentar a deslignificação da biomassa e reduzir a hidrólise da hemicelulose, optou-se por dar seguimento ao estudo através dos pré-tratamentos alcalinos (solução de NaOH 5% e KOH 5%). Utilizaram-se volumes de 400 mL das soluções para 20g de casca de coco verde em banho maria (Unique – USC 2500 ultrasonic cleaner, Illinois, Chicago, USA) a 100 °C por uma hora. A casca de coco utilizada passou previamente por desidratação em estufa (Biopar, Porto Alegre-RS, Brasil) a 60 °C, por um período de seis horas.

Retiraram-se amostras, antes e após os pré-tratamentos, para avaliação por MEV.

4.4 COLETA DE AMOSTRAS MICROBIANAS

Foram coletadas de uma leira de compostagem amostras em diferentes pontos e profundidades, durante a fase de degradação ativa (temperaturas da ordem dos 65 a 70 °C).

Retiraram-se 30 aliquotas, perfazendo a massa total de 100 g, sendo devidamente acondicionadas, em recipiente previamente esterilizado e transportadas em ambiente refrigerado, 4 °C, diretamente para o laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM), da Universidade Federal da Bahia – UFBA.

4.5 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS TERMO – CELULOLÍTICOS

As amostras foram submetidas à extração microbiana, em solução tampão fosfato salino (PBS) estéril com Tween 80, 0,01 % (Merck, Alemanha), à temperatura de 60 °C a 100 rpm, durante 2 h em mesa agitadora (New Brunswick Scientific Co I26, São Diego-CA, USA).

Realizaram-se diluições decimais seriadas da cultura microbiana em caldo sintético (Tabela 3) em Erlenmeyers contendo 5 tiras de papel de filtro Whatman nº1 (1 x 6 cm; Start Bioscience, Brasil), como fonte de carbono. Após incubação a 60 °C e 100 rpm (New Brunswick Scientific Co I26 Incubator Shaker Series, São Diego-CA, USA) por 120 hs, identificou-se a capacidade celulolítica do consórcio, através da análise da degradação do papel de filtro. A quantificação celular foi efetuada pelo método do número mais provável (NMP). As análises foram realizadas em triplicata (Apêndice A).

Tabela 3 – Composição do caldo de cultura sintético. (RENORBIO, 2019)

Componentes	Unidades	Concentração
NaNO ₃	g/L	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	1,0
MgSO ₄	g/L	0,5
KCl	g/L	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	mg/L	10,0

4.6 CARACTERÍSTICAS DO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO

4.6.1 ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Após seleção do consórcio termo-celulolítico, realizou-se o método de descoloração através do vermelho congo (Sigma-Aldrich, Índia) para verificar seu potencial celulolítico,

formação do halo de hidrólise em meio de cultura mineral (Tabela 2) com carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono.

Após incubação do consórcio bacteriano por 36 hs, adicionou-se 10 mL de solução vermelho congo (2,5 g/l) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Decorridos 15 minutos a solução foi descartada e as placas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão. Aguardou-se 15 minutos para análise dos halos e colônias (NOGUEIRA; CAVALCANTI 1996).

4.6.2 COLORAÇÃO DE GRAM

Um esfregaço foi realizado e fixado através do calor e iniciou-se a coloração com solução cristal violeta (Sigma-Aldrich, Índia), seguida de lavagem em água destilada. Posteriormente utilizou-se a solução de lugol (mordente), para aumentar a ação do corante, aumentando a força de ligação do mesmo e lavou-se novamente com água destilada para a ação do álcool-acetona, afim de dissolver o complexo corante-iodo. Executou-se a lavagem em água corrente, corou-se com fucsina (Sigma-Aldrich, Índia), e por ultimo lavou-se com água destilada. Após secagem, observou-se ao microscópio óptico (Olympus CX 40, Shinjuku, Tokyo, Japan).

4.6.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Retirou-se 1 mL de amostra do consórcio microbiano, submeteu-se à centrifugação (Eppendorf 5804 R, Westbury-NY, USA) por 10 minutos a 10.000 rpm, de seguida o *pellet* foi lavado com solução PBS estéril (três vezes) e ressuspendido no corante de laranja de acridina (Sigma-Aldrich, Índia), em ambiente ausente de luz. Após 10 minutos foram retiradas alíquotas de 10 µl e preparadas as lâminas para visualização em microscópio (Olympus BX 51, lente U-TVO.5XC-3, Shinjuku, Tokyo, Japan).

4.6.4 TESTE DA OXIDASE

Preparou-se uma solução de N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno diamina mono-hidrocloridrato (Sigma-Aldrich, Índia) de 10 mg/mL e adicionou-se ao papel de filtro Whatman n°1 (Start Bioscience, Brasil) até completa absorção. De seguida, coletou-se com uma alça de platina uma porção de colônias do consórcio microbiano após incubação durante 36 hs a 50 °C

(TE – 392/I Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil) em meio mineral Czapek (Tabela 4) e adicionou-se ao papel de filtro Whatman nº1 (Start Bioscience, Brasil).

Como controle negativo utilizou-se uma cultura de *Escherichia coli*. Observou-se a coloração formada, imediatamente após a inoculação.

Tabela 4 – Composição do meio de cultura mineral Czapek. (RENORBIO, 2019)

<i>Componentes</i>	<i>Unidades</i>	<i>Concentração</i>
NaNO ₃	g/l	2,0
K ₂ HPO ₄ OU KH ₂ PO ₄	g/l	1,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	g/l	0,5
KCl	g/l	0,5
Peptona	g/l	2,0
CMC	g/l	5,0
Ágar	g/l	10

Fonte: ANEJA, K. R., 250p (2003).

4.7 CURVA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO

Inoculou-se 25 mL da cultura microbiana em Erlenmeyers contendo 250 mL de caldo mineral (Tabela 5) com CMC como única fonte de carbono, sob agitação (New Brunswick Scientific Co I26 Incubator Shaker Series, São Diego-CA, USA) de 100 rpm a 60°C.

Acompanhou-se o crescimento do consórcio durante 72 hs, retirando-se amostras de quatro em quatro horas para quantificação microbiana, pelo método de contagem direta da coloração fluorocromática de microrganismos utilizando-se o microscópio de fluorescência (Olympus BX 51, lente U- TVO.5XC-3, Shinjuku, Tokyo, Japan).

Tabela 5 – Composição do meio mineral contendo CMC. (RENORBIO, 2019)

<i>Componentes</i>	<i>Unidades</i>	<i>Concentração</i>
NaNO ₃	g/L	2,0
K ₂ HPO ₄	g/L	1,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	g/L	0,5
KCl	g/L	0,5
CMC	g/L	5,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	g/L	0,01

As amostras coletadas para quantificação foram tratadas pela metodologia descrita no item 4.6.3 deste trabalho. As lâminas visualizadas foram fotografadas em 20 campos distintos de cada amostra e aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Células por mililitro} = (N \times A) / (d \times V_f \times A_g)$$

Fonte: KEPNER Jr.; PRATT., 613p (1994).

N = número de células quantificadas

A = área da lamínula

d = fator de diluição

V_f = volume da amostra

A_g = área da grelha de contagem (campo da objetiva x números de campos)

4.8 AVALIAÇÃO DA FOTOESTIMULAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO

A cultura do consórcio microbiano encontrava-se conservada em ultrafreezer (Thermo Electron Corporation, Bartlesville, OK 74003, EUA) teve a sua a atividade metabólica e adequação à fonte de carbono, CMC, restabelecida em duas etapas: incubação em caldo nutriente (Sigma-Aldrich, Índia), na mesa de agitação (New Brunswick Scientific Co I26, São Diego-CA, USA) a 60 °C; 100 rpm, por um período de 24 hs e na segunda etapa incubou-se *overnight*, em caldo mineral contendo CMC (Tabela 5) a 60 °C; 100 rpm.

Após ativação da cultura, procedeu-se à incubação em meio mineral (Tabela 5), a 60 °C; 100 rpm por um período de 35 hs (final da fase exponencial de crescimento). A cultura foi centrifugada (Eppendorf 5804 R, Westbury-NY, USA) e o *pellet* lavado com solução PBS estéril (por três vezes) para se iniciar a fase de estresse nutricional.

Um método de indução de desordem funcional no consórcio termo-celulolítico foi estabelecido, através da privação nutricional total, para que fosse possível fotomodular o sistema metabólico de acordo com a energia oferecida.

Um dos grupos de estudo irradiou-se com aparelho de Laser (Twin flex – MMOptics São Carlos, SP, Brasil) e outro com o protótipo LED (MMOptics São Carlos, SP, Brasil). Os parâmetros de emissão de luz encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de emissão de luz utilizados. (RENORBIO, 2019)

Parâmetros	Laser	LED
Comprimento de onda (nm)	660	632±2
Modo	Contínuo	Contínuo
Tamanho do spot (cm ²)	0,04	0,5
Potência (mW)	40	145
Tempo de exposição (s)	325	44
Densidade de energia (J/cm ²)	13	13

Adotou-se a densidade energética de 13 J/cm^2 baseado em estudos relatados por Crugeira et al. (2016) em cultura microbiana consorciada.

O protocolo de irradiação foi efetuado sob condições de privação total de nutrientes (PBS), por um período de 68 hs, em placas de Petri (Figura 8).

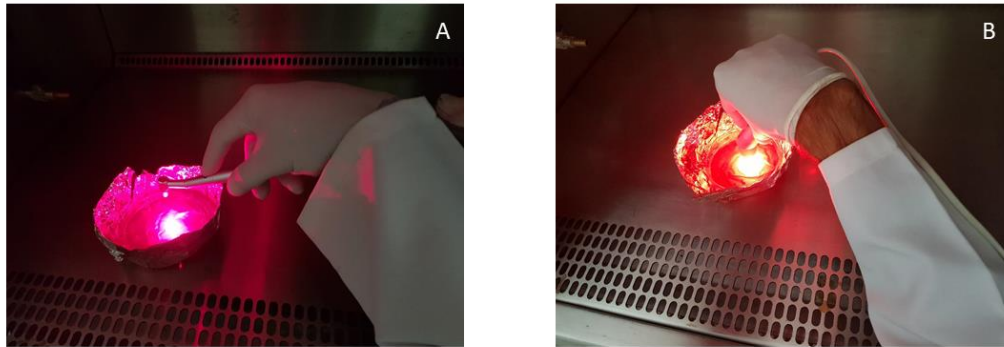


Figura 8. Irradiação do consórcio microbiano na câmara de fluxo laminar. (A) Irradiação por Laser de baixa potência. (B) Irradiação por LED. (CRUGEIRA, 2019)

Realizaram-se seis irradiações com intervalos de tempo de 12 hs, tendo sido efetuada a primeira aplicação ao final de 8 hs de privação de nutriente, sendo a cultura mantida em solução PBS a 60°C e a 100 rpm, para aplicação das irradiações seguintes, como esquematizado na Figura 9. Utilizou-se como controle uma cultura microbiana sujeita exatamente à mesma metodologia, mas sem qualquer irradiação. Todo o processo foi realizado em triplicata.



Figura 9. Esquema do protocolo de irradiação com os emissores de luz (Laser de baixa potência ou LED). (CRUGEIRA, 2019)

Após o protocolo de irradiação coletaram-se amostras para quantificação do número de células viáveis. Para tal, realizaram-se diluições seriadas em triplicata e inoculou-se $100 \mu\text{l}$ em cada placa de petri com meio de cultura agar nutriente (Merck, Alemanha), diluído dez vezes para que não ocorresse choque nutricional. Após incubação, durante 48 hs em estufa bacteriológica (TE – 392/I Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil) a 50°C , realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIGNOLÍTICA

Utilizou-se o corante polimérico Azul Brilhante de Remazol -R (RBBR) (Sigma-Aldrich, Índia), com o objetivo de realizar a triagem e avaliação do consórcio em termos de atividade lignolítica e ação da irradiação Laser de baixa potência ou LED na estimulação do processo catabólico.

Após o protocolo de irradiação esquematizado na Figura 9, inoculou-se 10 mL do consórcio termo-celulolítico em 100 mL de meio mineral com o corante RBBR 0,02 % (Sigma-Aldrich, Alemanha), incubando-se as triplicatas em mesa de agitação (New Brunswick Scientific Co I26, São Diego-CA, USA) a 100 rpm, 60 °C, em ambiente escuro. Retirou-se a primeira amostra ao final de 24 hs e as restantes a cada 48 hs durante 240 hs para efetuarem-se as leituras das absorvâncias a 595 nm (GLENN; GOLD, 1983) por espectrofotometria (Molecular Devices Spectramax 190 Microplate Reader, Hampton-NH, USA).

4.9.1 ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR EPIFLUORESCÊNCIA

Coletaram-se amostras em triplicata ao final de 48 hs durante o processo de hidrólise do corante RBBR e submetidas ao método de coloração fluorocromática com o laranja de acridina (Sigma-Aldrich, Índia), descrito no item 4.6.3, de forma a identificar os ácidos nucleicos monofilamentares e DNA bifilamentar (KASTEN, 1967).

Realizou-se a subtração do “background” das imagens obtidas por microscopia e selecionou-se a região de interesse usando a imagem contrastada que foi binarizada e usada como uma máscara para filtrar a imagem original. A intensidade de fluorescência de cada fotomicrografia foi quantificada, através do software “Image J”, de acordo com os protocolos de análise de O’neal, Landis e Isaacs (2002); Bakr (2005); Jensen (2013).

4.9.2 ATIVIDADE METABÓLICA LIGNOLÍTICA DO CONSÓRCIO

A atividade metabólica aparente foi determinada a partir da inclinação das equações das retas de regressão linear obtidas das curvas de degradação do RBBR (Sigma-Aldrich, Índia), obtenção de ART e glicose ao longo do tempo. A equação utilizada foi $y = ax + b$, sendo a atividade metabólica aparente o valor numérico de a .

4.10 QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA HIDRÓLISE DA CELULOSE E HEMICELULOSE

4.10.1 DETERMINAÇÃO DE AÇUCARES REDUTORES PELO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO

Os açúcares redutores solúveis totais foram determinados durante o processo de hidrólise microbiana da casca de coco pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, Índia).

Inoculou-se 25 mL do consócio bacteriano em 250 mL de caldo mineral (Tabela 2), utilizando-se 4,0 g de casca de coco verde como fonte de carbono (pré-tratada com NaOH 5% ou KOH 5%) formando os grupos de estudo descritos na Figura 10.

Incubou-se em mesa de agitação (New Brunswick Scientific Co I26 Incubator Shaker Series) a 60°C; 100 rpm, em triplicata, por um período total de 240 hs.

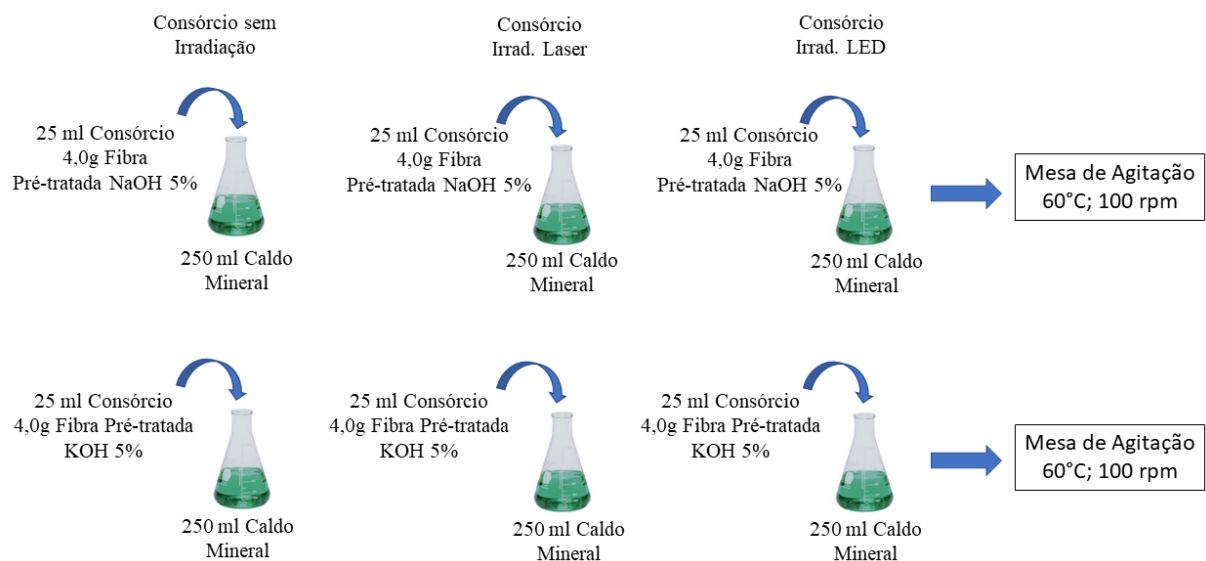


Figura 10. Esquema representativo da inoculação das amostras a serem avaliadas ao longo do tempo de incubação. (CRUGEIRA, 2019)

As primeiras amostras de sobrenadante foram coletadas ao final de 24 e 48 hs de incubação, e posteriormente seguiu-se a coleta de 48 em 48 hs, para quantificação dos açúcares redutores ao longo do tempo, de acordo com o procedimento descrito por Vasconcelos et al. (2013).

Efetuuou-se inicialmente uma curva de calibração com soluções padrão de D-glucose (Apêndice B). O cálculo da concentração de açúcares redutores totais (ART), em g L^{-1} foi realizado de acordo com a Equação:

$$\text{ART} = \text{abs} \times f \times d$$

em que:

abs é média das absorvâncias lidas;

f é fator de concentração;

d é inverso da diluição da amostra.

4.10.2 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE

A quantificação do teor de glicose e xilose nas amostras realizou-se por análise cromatográfica de HPLC (“High performance Liquid Chromatograph”) no Laboratório de Bioprospeção Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Analisou-se os produtos de hidrólise da casca de coco pré-tratada, no sobrenadante ao longo do tempo, de forma a avaliar a ação do consórcio microbiano fotoestimulado por Laser ou LED.

As amostras foram coletadas do *shaker* (New Brunswick Scientific Co I26 Incubator Shaker Series, São Diego-CA, USA) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 100 rpm, representadas na Figura 10, ao final de 24, 48, 96, 144, 192 e 240 hs de incubação. Posteriormente foram filtradas por membranas Kasvi[®] PES de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Kasvi, Itália), e colocadas em vials para injeção no cromatografo de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR).

Os experimentos cromatográficos foram elaborados em sistema de HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, injetor automático VRW HITACHI L-2200 e detector de índice de refração (IR) VRW HITACHI L-2490. Foi utilizada coluna HPX-87H Aminex[®] column ($300\text{ mm} \times 7.8\text{ mm i.d.} / 9\text{ }\mu\text{m}$ / BIO-RAD, California, USA). O volume de injeção foi de $20\text{ }\mu\text{L}$, a fase móvel utilizada foi solução aquosa de H_2SO_4 0,01N com fluxo de $0,6\text{ mL/min}$. A análise realizou-se à temperatura ambiente, o tempo total da análise foi de 20 min.

As amostras foram analisadas para identificação dos padrões de glicose e xilose comparando os tempos de retenção dos picos nos cromatogramas das amostras com os dos padrões.

A quantificação realizou-se utilizando-se as curvas analíticas de calibração dos padrões, interpolando o valor de área das amostras encontradas, nas equações da reta obtidas.

A validação foi realizada segundo parâmetros do Conselho Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano que utilizam os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (ICH, 1996).

A seletividade foi determinada por meio da comparação de picos dos padrões com os picos correspondentes nas amostras, levando-se em consideração o tempo de retenção.

Determinou-se a linearidade pela representação gráfica das respostas em função da concentração do analito através do gráfico da curva de calibração, projetando a equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados, levando-se em consideração o coeficiente de correlação (r) e de determinação (r²). As equações da reta foram obtidas por injeções de soluções com diferentes concentrações dos padrões externos, numa faixa de 0,08 a 4,00 mg/mL para a lignina, de 12 a 100 µg/mL para a glicose e de 8 a 36 µg/mL para a xilose. As soluções de cada padrão externo foram preparadas pela dissolução do padrão em água ultrapura.

A precisão foi determinada pela injeção em triplicata de três soluções de cada um dos padrões, de acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Esse parâmetro foi expresso como o desvio padrão relativo, segundo a equação:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (\text{CURRIE, 1995})$$

Em que:

DP é o desvio padrão.

CMD é a concentração média determinada.

A exatidão verificou-se pelo fator de recuperação. Foi feito um *pool* de amostras e este foi fortificado com três soluções padrão de concentrações conhecidas de 3,00, 2,00 e 1,20 mg/mL para a lignina, 80, 50 e 30 µg/mL para a glicose, 26, 20 e 10 µg/mL para a xilose. A exatidão foi avaliada através de valores de concentração determinados (CURRIE, 1995) e, em seguida, comparados à concentração teórica como pode ser verificado na Equação.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

O limite de detecção (LD) foi estimado, de acordo com a IUPAC, pela relação do desvio padrão do coeficiente linear e da inclinação da curva de calibração, segundo a fórmula abaixo:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (\text{CURRIE, 1995})$$

Em que:

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração.

IC é a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação (LQ) foi estimado, de acordo com a IUPAC, pela relação do desvio padrão do coeficiente linear e da inclinação da curva de calibração, segundo a Equação:

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (\text{CURRIE, 1995})$$

Em que:

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração.

IC é a inclinação da curva de calibração.

4.11 QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA POR EPIFLUORESCÊNCIA

As amostras de sobrenadante foram coletadas em triplicata durante o processo de hidrólise da casca de coco, com os dois pré-tratamentos distintos supracitados (Figura 10). O tratamento das amostras foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.3 deste trabalho.

As lâminas foram visualizadas e fotografadas em 20 campos de cada amostra e realizada a quantificação microbiana por epifluorescência, como descrito no item 4.9.2 desta metodologia.

4.12 ANÁLISE DA CASCA DE COCO VERDE POR MEV

As micrografias foram obtidas, utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM – 6610 LV, com aceleração de 10KV, no laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LAMUME) da UFBA.

Utilizou-se o MEV para efetuar a análise qualitativa da estrutura superficial das fibras de coco, de forma a avaliar e comparar a efetividade dos pré-tratamentos e da hidrólise da celulose provocada pela ação microbiana fotoestimulada.

Inicialmente avaliou-se os pré-tratamentos efetuados (conforme item 4.3) através das micrografias obtidas, utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM – 6610 LV, com aceleração de 10KV. Os pré-tratamentos que obtiveram maior capacidade de deslignificação da biomassa, foram utilizados na etapa seguinte deste estudo, hidrólise da celulose. Após 240 hs de ação microbiana avaliou-se as micrografias obtidas das fibras de coco, a fim de mensurar a degradação ocorrida.

As amostras analisadas por MEV, foram previamente fixadas em fita carbono ao suporte de alumínio (stubs) e submetidas à metalização (DENTON VACUUM, modelo DESKV) com ouro.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados obtidos nos diferentes ensaios foi realizada utilizando o teste estatístico ANOVA com o pós-teste de comparação múltipla de Tukey através do software GraphPad Prism[®] 6.0 (São Diego-CA, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e sua discussão, apresentam-se de acordo com as etapas do desenvolvimento dos experimentos de forma a tornarem-se mais explicativos e elucidativos. Deve-se salientar, três fases distintas do estudo: análise e avaliação dos pré-tratamentos, avaliação do potencial estimulatório dos emissores de luz (Laser ou LED) no consórcio microbiano e sua influência catalítica no processo de hidrólise da biomassa residual pré-tratada.

5.1 PRÉ-TRATAMENTOS DA CASCA DE COCO VERDE

Neste estudo realizaram-se pré-tratamentos físico-químicos, com o propósito de melhorar a capacidade e acessibilidade à macromolécula de celulose e concomitantemente diminuir a desacetilação da hemicelulose (MOOD et al., 2013). Os pré-tratamentos devem evitar a degradação ou perda dos carboidratos e formação de subprodutos inibitórios ao processo de hidrólise. Por essa razão, após os pré-tratamentos preliminares, avaliou-se a ação microbiana na hidrólise da biomassa por análise qualitativa das fibras (MEV).

Muitas vezes, a remoção de lignina é eficaz, mas a formação de subprodutos inibitórios influencia negativamente a hidrólise da celulose. Este processo ocorre com frequência quando se utilizam pré-tratamentos ácidos na biomassa lignocelulósica (CHEN et al., 2011; BEHERA et al., 2014).

Estudos realizados por Lucarini em 2017, comparando a formação de inibidores, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), após tratamentos ácidos com soluções de H_2SO_4 a 1 %, 2,5 % e 5% na palha de cana-de-açúcar, constataram a formação de inibidores em todos os tratamentos. Sendo a solução de H_2SO_4 a 1 % a que apresentou menor produção, furfural 0,158 mg/mL e HMF de 0,009 mg/ml.

Oliveira (2016) também identificou a formação de subprodutos inibidores como furfural, hidroximetilfurfural, ácidos láticos, levulínico, glicólico e fórmico no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar realizado com ácido acético em reator por batelada pressurizado.

Nas micrografias obtidas por MEV, verificou-se uma redução da quantidade de lignina, em todos os pré-tratamentos efetuados nesta primeira fase, comparativamente ao grupo não tratado (Figura 11). Constatou-se a presença de porosidades na superfície das fibras tratadas, podendo ser provenientes da remoção de depósitos gordurosos denominados de tioses das fibras (Figura 11B; D; F). Estas características das fibras de coco também foram observadas por

Bismarck et al. (2001), o mesmo ainda reporta que existe um grande número de depósitos de gordura globulares escondidas abaixo das superfícies não tratadas.

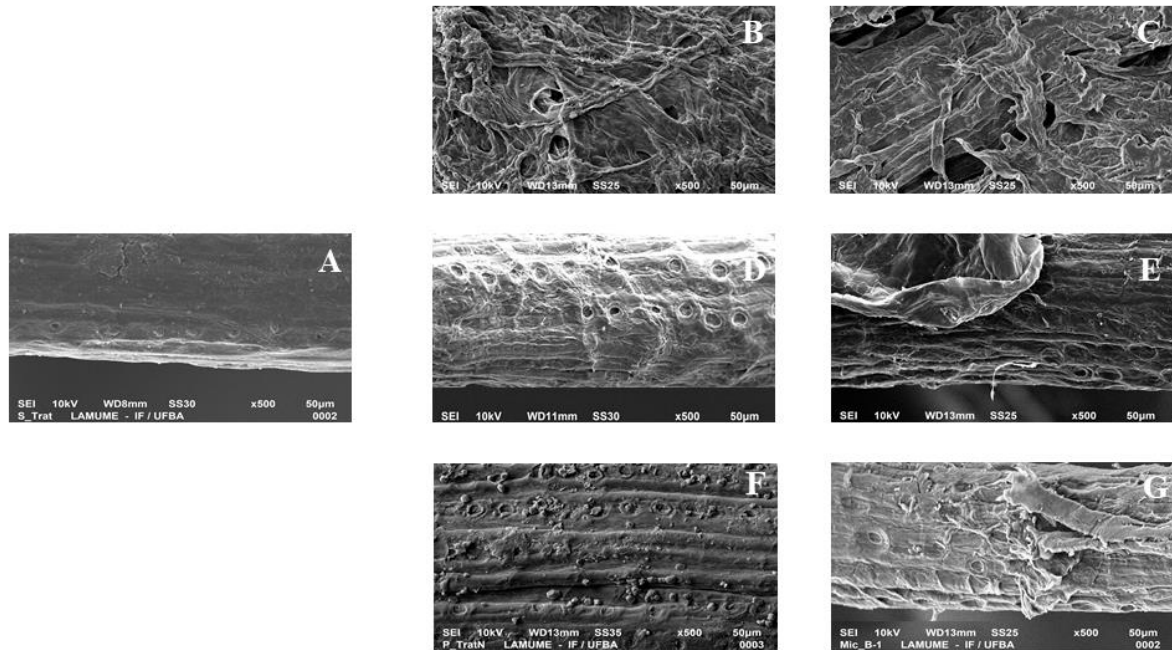


Figura 11. Micrografias obtidas por MEV da fibra de coco pré-tratada e após ação microbiana, aumento de 500x. (A) Sem pré-tratamento; (B) Pré-tratada por soluções H_2SO_4 e NaOH 2,5%, a 60 °C durante 30'; (C) Após incubação por 96 hs com consórcio termo-celulolítico (pré-tratada por H_2SO_4 e NaOH 2,5%); (D) Pré-tratada por solução NaOH 2,5%, a 60°C por 30'; (E) Após incubação por 96 h com consórcio termo-celulolítico (pré-tratada por NaOH 2,5%); (F) Pré-tratada por NaOH 5%, a 60°C por 30'; (G) Após incubação por 96 hs com consórcio termo-celulolítico (Pré-tratada por NaOH 5%). (CRUGEIRA, 2019)

A deslignificação foi mais eficaz nas fibras pré-tratadas com as soluções combinadas de H_2SO_4 e NaOH 2,5% (Figura 11B), apesar de se visualizar que o ataque do consórcio não apresentou eficácia hidrolítica microbiana (Figura 11C). Provavelmente neste pré-tratamento ter-se-á formado coprodutos inibidores como hidroximetilfurfural, furfural e compostos aromáticos, apesar da lavagem efetuada com água destilada, afetando o desempenho catabólico microbiano (SAHA et al., 2005).

Rasmussen et al. (2014) compararam os rendimentos da produção de etanol em presença dos inibidores (furfural e HMF), identificando uma diminuição do rendimento de 8 a 50% na presença de furfural nas concentrações de 21 a 65 mM e uma diminuição de rendimento de 50% nas faixas de concentração de 8 a 57 mM para o HMF.

Na comparação das micrografias das fibras pré-tratadas por soluções alcalinas de NaOH 2,5% ou a 5% (Figura 11D; F), verificou-se uma maior remoção de lignina, pelas aberturas superficiais, fendas internas e espaços vazios criados pela retirada de componentes não-

celulósico e consequente nitidez da fibra de celulose, (Figura 11F), por outro lado, no tratamento com solução de NaOH 5% visualizou-se a catálise da endoglucanase, hidrolisando ligações β -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose acessível aleatoriamente para produzir novas extremidades (Figura 11G).

Após análise preliminar dos pré-tratamentos optou-se por realizar uma segunda avaliação com tratamentos alcalinos (NaOH 5% ou KOH 5%) e temperaturas de 100 °C por um maior período de tempo (60 minutos), de forma a otimizar o processo de deslignificação.

As micrografias da figura 12 evidenciaram uma redução da quantidade de lignina em ambos os pré-tratamentos alcalinos, constatando-se uma diminuição das protusões globulares e orifícios (pequenos poros) e ainda componentes tais como ceras e ácidos graxos que fazem parte do preenchimento e ligações entre fibras, além de ésteres de ácidos, tais como os fenóis formando ligações para constituir a lignina, a qual une as fibras de celulose e confere resistência (BISMARCK et al., 2001).

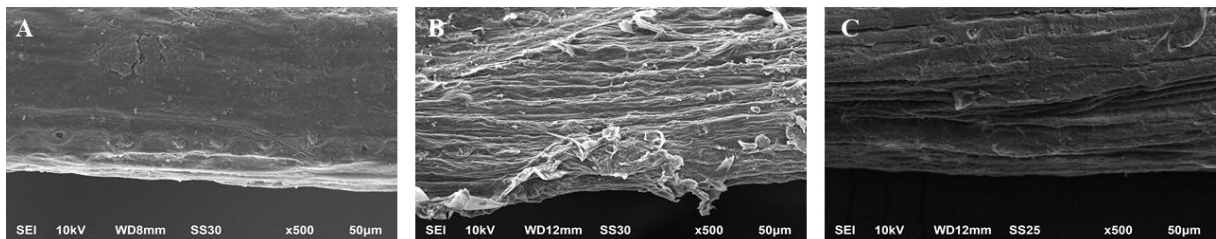


Figura 12. Micrografias obtidas por MEV da fibra de coco com aumento de 500x. (A) Sem tratamento; (B) Pré-Tratada por solução NaOH 5%, a 100°C por 60'; (C) Pré-Tratada por solução KOH 5%, a 100°C por 60'. (CRUGEIRA, 2019)

As micrografias evidenciaram uma deslignificação mais eficaz no tratamento alcalino por NaOH 5%, tendo a vantagem de ser um processo mais económico (Figura 12). De qualquer forma, optou-se por seguir o estudo com ambos os tratamentos alcalinos, comparando a ação do consórcio termo-celulolítico irradiado na hidrólise da celulose.

Estudo realizado por Mwaikambo e Ansell (2002) em fibras de cânhamo, juta, sisal e capoque, demonstraram que a solução de NaOH 6 % foi a mais eficaz na deslignificação, sem alteração do índice de cristalinidade das fibras.

Nascimento *et al.* (2011), trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar, conseguiram com solução de NaOH 7 % reduzir a concentração de lignina para 5 % na biomassa e obter teor de celulose em torno de 38 %, garantindo um alto conteúdo acessível de celulose para degradação enzimática. Assim, a celulose é mais exposta aos ataques enzimáticos das celulases, aumentando a hidrólise e a liberação de glicose.

Nesta fase do estudo optou-se pelos pré-tratamentos alcalinos por serem mais brandos e produzirem uma menor concentração de ácidos aromáticos, catecol, 4-hidroxibenzaldeído, furfural, HMF e vanilina solúveis (CABRAL et al., 2017).

A saponificação (pré-tratamento hidrotérmico alcalino) em condições brandas, temperaturas menores do que 140 °C, induz a clivagem de ligações éster que une os ácidos fenólicos. A substituição nucleofílica do grupamento acil da ligação éster ocorre com a reação do hidróxido de sódio, para formar um sal carboxílico e um álcool à temperatura ambiente (Figura 13) (PEDERSEN et al., 2010).

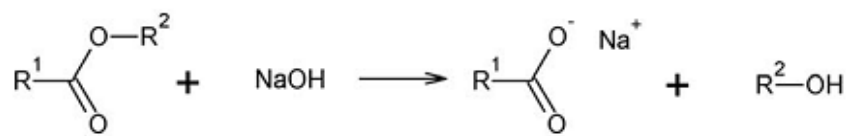


Figura 13. Reação de saponificação, formação de sal carboxílico e álcool.
Fonte: Pedersen et al. (2010).

No processo de deslignificação desenvolvido por Rocha et al. (2012), o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor foi reagido com uma solução de NaOH a 1,0 % (p / v), em uma razão sólido-líquido de 1:10 (p / v), temperature de 100 °C por 1 h e conseguiram uma remoção de até 92,7 % de lignina da biomassa.

Um pré-tratamento é considerado eficaz quando se maximiza a acessibilidade ao ataque bioquímico e/ou biológico, minimizando a formação dos coprodutos inibidores. É importante que a produção de resíduos e o gasto de energia seja diminuta, assim como, o custo operacional para que o processo seja economicamente viável.

5.2 SELEÇÃO DO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO

Após extração o consórcio foi submetido à verificação da atividade celulolítica, através da análise da degradação das tiras de papel filtro whatman nº1 (Start Bioscience, Brasil).

Constatou-se uma degradação total do papel de filtro nas triplicatas das diluições iniciais, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (Figura 14 B) e parcial na diluição 10^{-5} , obtendo-se assim, através da tabela do NMP (Anexo A) proposta por Silva et al. (2007), a quantificação inicial do consórcio de $4,6 \times 10^4$ NMP/mL de microrganismos termo-celulolíticos.



Figura 14. Degradação do papel de filtro (triplicata da diluição 10^{-4}). (A) antes da incubação. (B) após 120 hs de incubação a 60 °C a 100 rpm. (CRUGEIRA, 2019)

Realizou-se a incubação a 60 °C para selecionar microrganismos termófilos de forma a conseguir-se um maior desempenho catabólico da macromolécula de celulose. Por outro lado, optou-se por utilizar um consórcio microbiano, na expectativa de coexistir uma ação sinérgica de complementariedade entre os diversos microrganismos, como se observa na natureza.

Devido à recalcitrância da biomassa lignocelulósica, poucos microrganismos conseguem hidrolisar a celulose com alta eficiência, tornando-se o ataque microbiano com maior possibilidade e versatilidade no processo catabólico quando se trabalha em um sistema de co-culturas microbianas (LYND et al., 2002).

Atualmente a catálise da biomassa lignocelulósica por microrganismos é lenta, sendo essencial a elaboração de estudos e introdução de novas tecnologias para que se otimize o processo de hidrólise, tornando-o economicamente sustentável (SUKUMARAN et al. 2009; MTUI, 2009)

5.3 CARACTERÍSTICAS DO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO

5.3.1 ATIVIDADE CELULOLÍTICA E COLORAÇÃO DE GRAM

A avaliação do potencial celulolítico microbiano foi constatado pelos halos de hidrólise formados no teste de descoloração com o vermelho congo.

A formação de halos, resulta na clivagem da CMC em fragmentos menores que celohexose, à qual o vermelho congo não se liga. Estes pequenos fragmentos são dispensados da placa na lavagem, visto que o corante vermelho congo permanece ligado apenas onde existem ligações β -1,4 glicídicas (CASTRO, 2006).

Neste estudo verificaram-se halos representativos de atividade celulolítica em algumas das colônias do consórcio microbiano, demonstrando atividade da endoglucanase na CMC (Figura 15) (CRUGEIRA et al., 2018).



Figura 15. Halos de hidrólise da CMC, método do vermelho congo. (CRUGEIRA, 2019)

Segundo Wood (1980), apenas a atividade da endoglucanase pode ser esperada para produzir zonas de hidrólise, quando se utiliza como substrato a CMC.

Estudos realizados por Theather; Wood (1982) demonstram uma forte interação do vermelho congo com polissacarídeos (β 1-4) ligado em unidades D-glucopiranosil fornecendo a base para um ensaio sensível de identificação de colônias bacterianas produtoras de celulase.

A coloração de Gram foi efetuada no consórcio microbiano e constatou-se a presença de bactérias Gram-positivas apresentando a coloração roxa e Gram-negativas de coloração vermelha (Figura 16). Havendo uma maior prevalência de Gram-negativas.

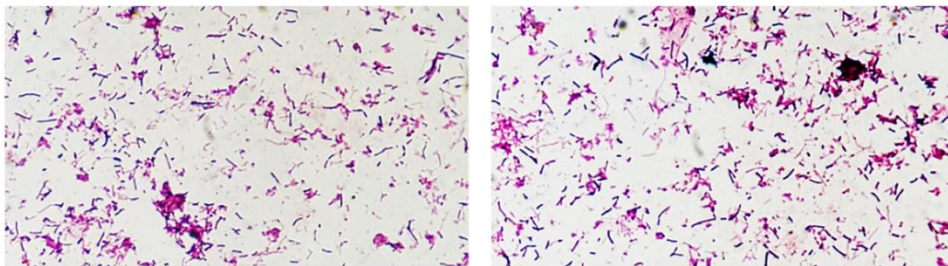


Figura 16. Coloração de Gram do consórcio microbiano. Presença de bactérias Gram positivas e negativas. (CRUGEIRA, 2019)

5.3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Foi possível através de microscopia de fluorescência realizada em estudo anterior (CRUGEIRA et al., 2016), analisar morfológicamente os microrganismos envolvidos no consórcio, dentre eles podemos citar: cocos, diplococos, estreptococos, estafilococos, bacilos, diplobacilos e estreptobacilos (Figura 17).

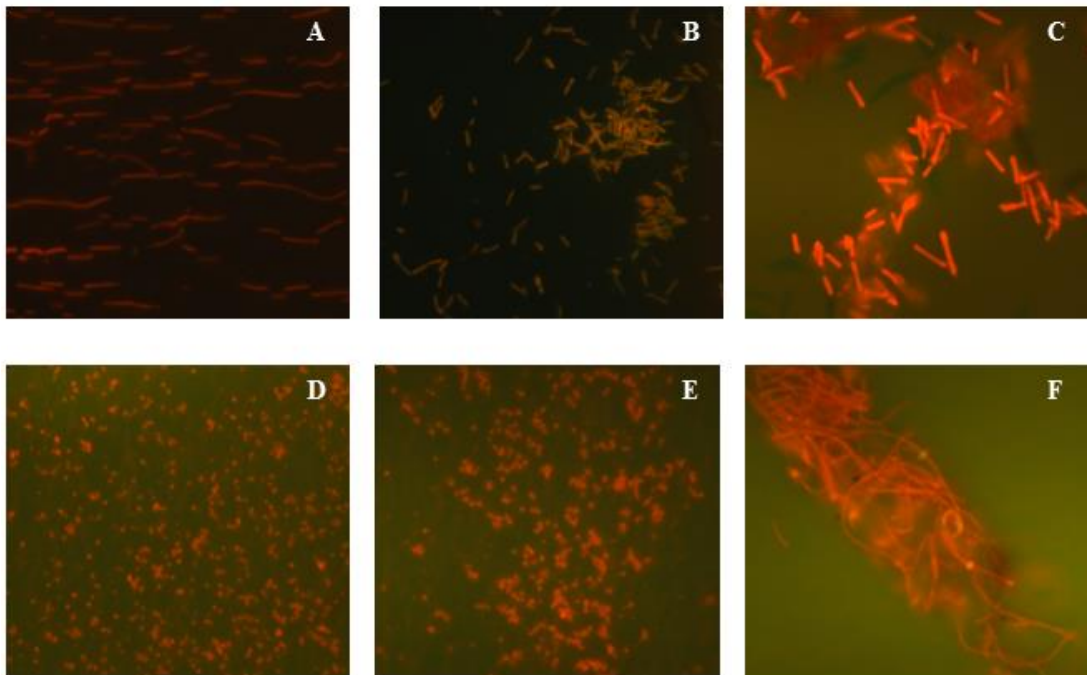


Figura 17. Imagens de microscopia de fluorescência das morfologias e arranjos dos microrganismos do consórcio. (A) bacilos, diplobacilos e estreptobacilos; (B) bacilos em agregados irregulares; (C) bacilos com endósporos terminais; (D) cocos e diplococos em agregados; (E) cocos em agregados irregulares; (F) Filamentos longos de cocos com endósporos. (CRUGEIRA, 2019)

5.3.3 TESTE DA OXIDASE

O consórcio bacteriano apresentou resultado positivo (coloração púrpura no local da inoculação), decorrente da oxidação do reagente N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (MADIGAN, MARTINKO; PARKER, 2016). No controle negativo, cultura de *Escherichia coli*, não se verificou alteração de coloração, oxidase negativa (Figura 18).

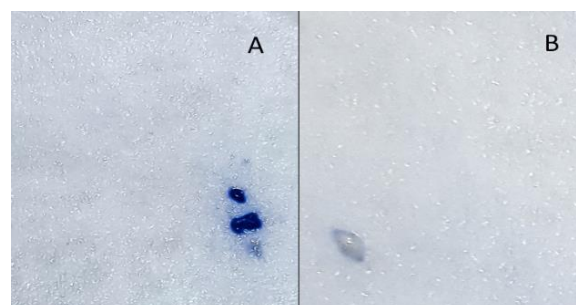


Figura 18. Teste da oxidase. (A) Oxidase positiva consórcio termo-celulolítico; (B) Oxidase negativa *Escherichia coli*. (CRUGEIRA, 2019)

Karu em 1999 demonstrou que o citocromo microbiano tem seu pico de absorção no espectro vermelho de 633nm, comprimento de onda utilizado na emissão de luz LED.

A citocromo oxidase é um cromóforo que possui alvos intramoleculares capazes de absorver luz, tais como os centros de cobre. Este metal pode ser identificado em diferentes enzimas de bactérias Gram positivas ou Gram negativas. Dentre estas enzimas podem ser citadas a citocromo oxidase e Cu-chaperonas, além de reguladores transcricionais (KARU 1999; RADEMACHER; MASEPOHL, 2012; ARGÜELLO et al., 2013).

Sendo assim, a radiação emitida na região do vermelho ao consórcio bacteriano pode ter como fotorreceptor, o citocromo C oxidase, impulsionando a capacidade de bombeamento de prótons e consequente aumento da produção de ATP celular disponível para diversas vias metabólicas, destacando-se a fissão binária bacteriana que culmina com o aumento da proliferação celular e consequente atividade microbiana e/ou via transcricional (CRUGEIRA et al., 2018).

5.4 CURVA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIANO

Verificou-se na curva de crescimento obtida, do consórcio termo-celulolítico, uma fase exponencial nas primeiras oito horas de incubação, seguindo-se uma fase de declínio para entrar posteriormente em uma curta fase de adaptação. Em seguida, identificou-se uma intensa divisão celular, fase log, até às 36 hs de crescimento. Consecutivamente inicia-se a fase estacionária por 16 hs, seguindo-se a de declínio ou morte até término do acompanhamento, 72 hs (Figura 19).

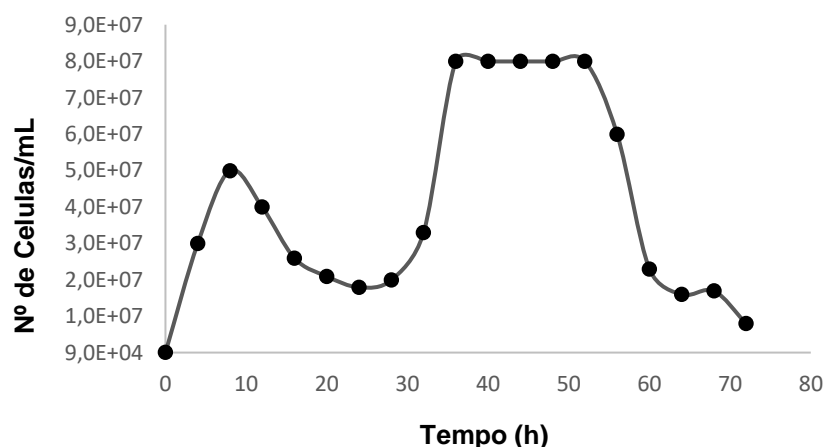


Figura 19. Curva de crescimento do consórcio termo-celulolítico em meio mineral Czapek. (CRUGEIRA, 2019)

A curva de crescimento iniciou-se com uma fase de multiplicação celular, podendo indicar, hipoteticamente, que os microrganismos possuíam reservas nutricionais armazenadas

para depois iniciarem o processo de hidrólise da fonte de carbono (CMC) ou que tenham conseguido a degradação do CMC, em uma primeira fase, gerando subprodutos e produtos, como a glicose de fácil assimilação, estimulando assim, a divisão celular a partir da 28 hs de crescimento.

Segundo Lynd et al. (2002), a produção de enzimas para a utilização de celulose, em diversos microrganismos, é induzida na presença do substrato e inibida quando açúcares mais facilmente utilizáveis, como glicose, estão presentes.

Como se trata de um consórcio, constituído por várias populações bacterianas é natural que coexista uma competição pela fonte de carbono de fácil acesso.

5.5 AVALIAÇÃO DA BIOMODULAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO

O protocolo de irradiação foi efetuado no consórcio sob estresse nutricional (solução PBS), sendo que, a absorção da radiação ocorre sobretudo quando a célula se encontra afetada por uma desordem funcional (CHAVANTES, 2009).

Incentivou-se o desequilíbrio celular de forma a induzir a absorção da luz pelas moléculas fotoceptoras, desencadeando alterações físico-químicas primárias e uma sequência de reações bioquímicas secundárias nos microrganismos envolvidos. Desta forma, pretendeu-se induzir a biomodulação molecular dos microrganismos. A energia absorvida será transformada em energia bioquímica e utilizada em processos metabólicos de forma a restabelecer o estado de homeostase dos microrganismos (KARU, 2003).

A densidade energética é sem dúvida um dos parâmetros de grande relevância para que se atinga o efeito molecular pretendido, pode ser a fronteira entre a resposta estimulatória ou inibitória (KARU, 1999).

A dose energética utilizada foi fundamentada em estudo realizado por Crugeira et al. (2016), em consórcio microbiano termo-celulolítico, identificando a densidade energética de 13 J/cm^2 que propiciou melhor resposta estimulatória.

Após o protocolo de irradiação, comparou-se o número de UFC dos grupos de estudo, constatando-se nas culturas irradiadas por Laser uma proliferação celular de $2,0 \times 10^7$ UFC/mL enquanto que as submetidas à emissão LED obtiveram $5,5 \times 10^7$ UFC/mL, ambas superiores ao grupo controle com uma quantificação de 9×10^5 UFC/mL. A quantificação microbiana nos grupos irradiados foi superior a 2000 % relativamente ao grupo controle (Figura 20).

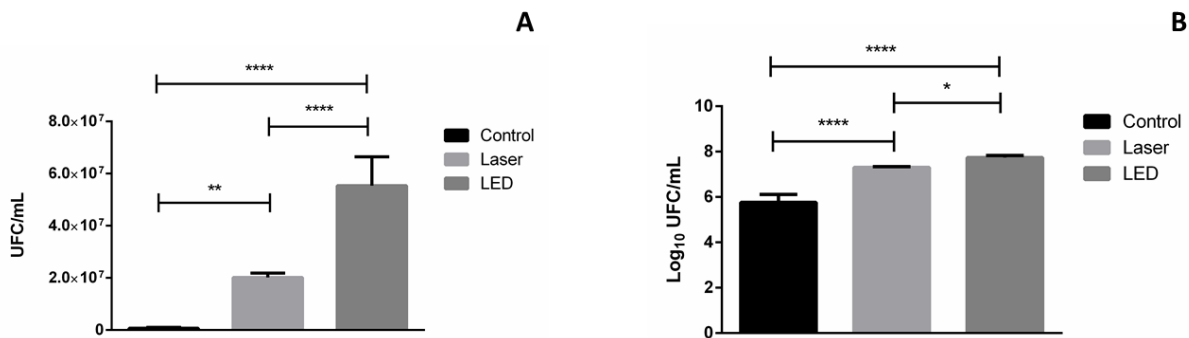


Figura 20. Quantificação microbiana após protocolo de irradiação. (A) Escala aritmética. (B) Escala logarítmica. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (CRUGEIRA, 2019)

Os resultados foram tratados pelo método estatístico ANOVA, com o teste de Tukey de 95 % de confiança e verificou-se nos grupos irradiados por ambas as fontes luminosas um aumento do número de células significativo, comparativamente ao grupo controle (Figura 20B), comprovando uma resposta biológica fotoestimulatória no consórcio microbiano.

O grupo irradiado por Laser apresentou significância de $p=0,0057$ perante o grupo controle, enquanto que o grupo LED uma significância de $p < 0,0001$ em relação às amostras controle. Comparando a proliferação microbiana obtida, entre as duas fontes emissoras de luz constatou-se uma significância de $p < 0,0001$.

Karu et al. (1983), estabeleceu as bases para a compreensão dos mecanismos moleculares associados aos efeitos da luz sobre as células, registrando um gráfico de fotorresposta, na região do visível, estimulatório do crescimento de *Escherichia coli* pela taxa de síntese do DNA e do ácido ribonucléico.

A incidência de radiação nos fotorreceptores, quando associados a um comprimento de onda e densidade de energia específica, são capazes de absorver os fótons assumindo um estado excitado eletronicamente nos processos moleculares primários que desencadeiam efeitos biológicos em determinadas circunstâncias (KARU, 1999).

Os resultados de quantificação celular após irradiação, neste estudo, indicaram de forma elucidativa que a emissão de luz não coerente, desenvolve o processo de estimulação metabólica microbiana, estando em consonância com o estudo realizado por Karu (1987) demonstrando que a resposta celular à fotoestimulação não está associada a propriedades específicas da luz Laser, como a coerência. Esta propriedade é perdida na interação da luz com o tecido biológico, não sendo uma condição essencial para o processo de fotoestimulação.

Diversos estudos sobre o efeito da radiação Laser nas bactérias indicam efeitos bioestimulantes ou proliferativos, postulando que tais efeitos são devido às alterações causadas pelo aumento do fornecimento de energia pela radiação na cadeia respiratória de bactérias

(KARU, 1998; KIPSHIDZE et al., 2001; CRUGEIRA et al., 2016). Um dos alvos de irradiação no espectro vermelho é o complexo citocromo C presente em bactérias, quando fotoestimulado este complexo proteico aumenta sua capacidade de bombeamento de prótons e, conseqüentemente, aumenta a quantidade de ATP celular disponível (KARU, 1998).

O zinco e o cobre são encontrados em centros metálicos de proteínas ou mesmo atuando como co-fator enzimático. Estes metais, principalmente o zinco, são abundantes nos microrganismos e as metaloproteínas que os contem comumente estão associadas a eventos transcricionais. Assim o aumento no número de bactérias dos grupos irradiados pode estar também relacionado à ativação de tais metaloproteínas (RADERMACHER; MASEPOHL, 2012; ARGÜELLO et al., 2013; LATORRE et al., 2015).

Um dos fatores que pode explicar a maior efetividade da irradiação LED identificada neste trabalho, embasa-se em estudos realizados por Karu (1999) demonstrando que o citocromo microbiano tem seu pico de absorção máxima em 633nm. Este fato pode corroborar a maior eficácia do LED (632 nm) no aumento da proliferação microbiana, quando comparados ao grupo controle ou mesmo ao grupo irradiado com Laser (660nm).

Por outro lado, o espectro de ação eletromagnético da luz emitida pelo LED é mais amplo em relação ao do Laser. O Laser é caracterizado por uma maior concentração da fluência em uma pequena faixa espectral. Enquanto que no LED, a densidade de energia está distribuída em uma banda eletromagnética maior, podendo interagir com um maior grupo de fotorreceptores específicos.

As mudanças químicas ou físicas primárias conseguidas pela radiação luminosa nas moléculas fotoceptoras são seguidas por uma cascata de reações bioquímicas secundárias. Estas reações ocorrem na ausência de luz, podendo acontecer após horas ou dias da emissão da irradiação (DEVLIN, 2003).

O processo é complexo e de grande abrangência, dependendo dos fotorreceptores e conseqüentemente das vias metabólicas envolvidas, é possível alterar o pH e o estado redox da célula, por exemplo. Para além da enzima transportadora antiporte Na^+/H^+ , outros carreadores de ions, cation sódio (Na^+), cation potássio (K^+), enzima ATPase e enzimas que controlam níveis de AMPcíclico em uma célula são também ativados pela irradiação e outras respostas secundárias podem surgir na membrana plasmática (KARU; KOLYAKOV, 2005; DIAS, 2009)

As reações inerentes à emissão de luz que desencadeiam respostas biológicas estimulatórias são vastas e influenciam uma grande parte do metabolismo da célula, culminando com o aumento da proliferação celular.

5.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LIGNOLÍTICA DO CONSÓRCIO FOTOESTIMULADO

A determinação da atividade ligninolítica através de corantes poliméricos foi sugerida, inicialmente, por Glenn e Gold, (1983) e se estabeleceu como método para identificação de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos. O RBBR oferece a vantagem do desenvolvimento de métodos espectrofotométricos simples, rápidos e quantitativos. Apresentam baixa toxicidade para os microrganismos e sua natureza polimérica assegura que sua degradação, pelo menos nas etapas iniciais, ocorra extracelularmente (OKINO et al., 2000; MACHADO et al., 2005).

Apesar do RBBR apresentar uma estrutura molecular complexa e recalcitrante, identificou-se sua degradação pelo consórcio bacteriano fotoestimulado, logo nas primeiras horas de análise, demonstrando a estimulação catalítica das enzimas lignolíticas extracelulares, comparativamente ao grupo controle (Figura 21).

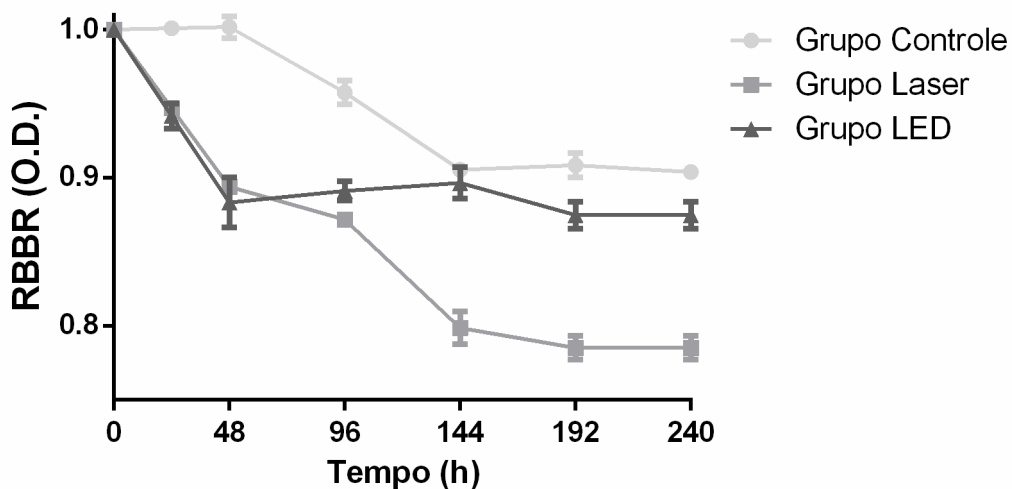


Figura 21. Avaliação da hidrólise do corante RBBR pelo consórcio bacteriano ao longo do tempo. (CRUGEIRA, 2019)

Os resultados obtidos, nas primeiras 48 hs, demonstraram que o grupo LED apresentou maior degradação do RBBR (40,24 %), enquanto o grupo Laser apresentou uma degradação de 39,49 %, com significância em relação ao controle de $p < 0,0009$, esta diferença não se verificou entre os grupos LED e Laser (Figura 22B).

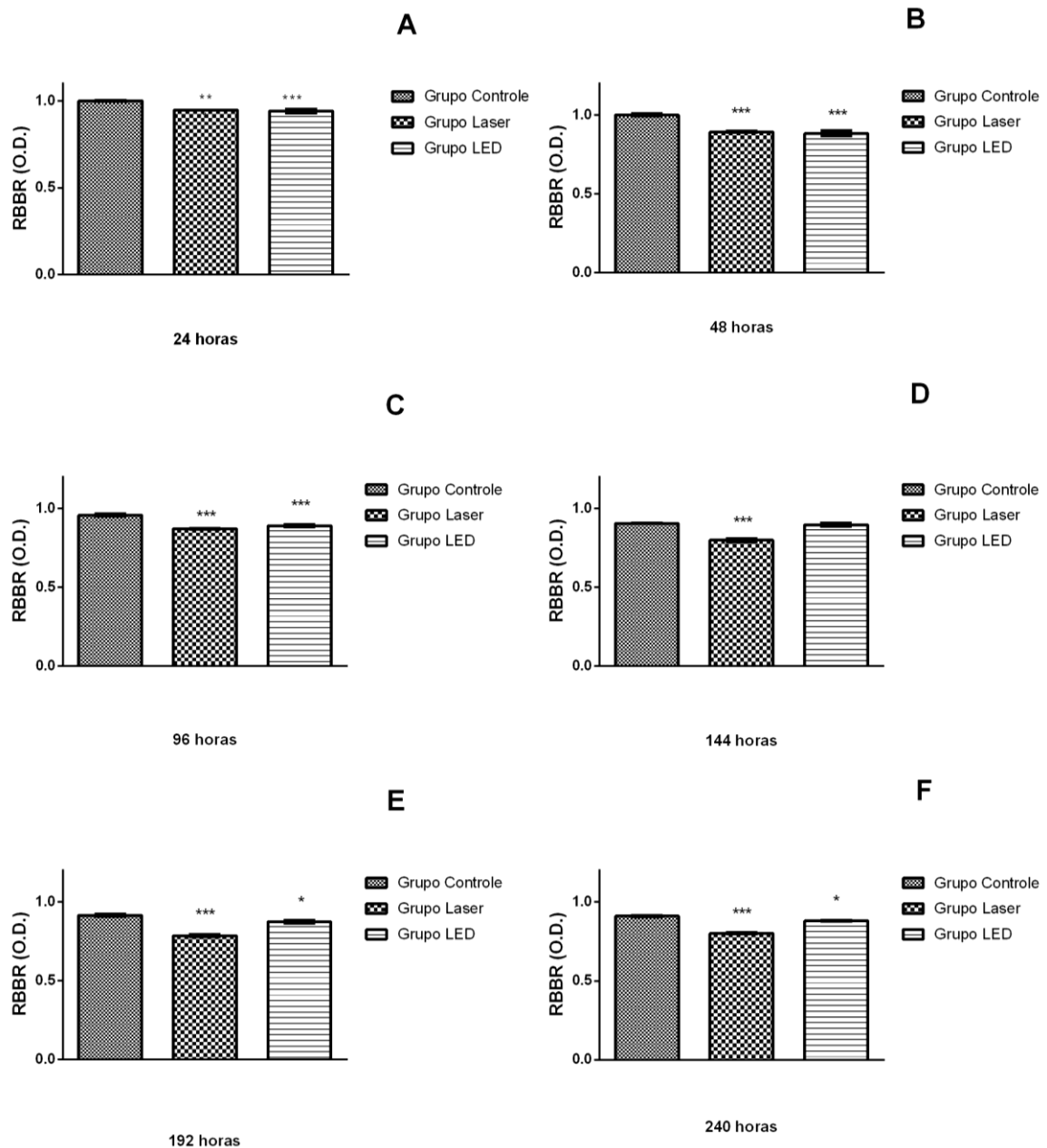


Figura 22. Análise estatística da hidrólise do RBBR nos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo. (A) Avaliação da degradação de RBBR em 24 hs. (B) Avaliação da degradação de RBBR em 48 hs. (C) Avaliação da degradação de RBBR em 96 hs. (D) Avaliação da degradação de RBBR em 144 hs. (E) Avaliação da degradação de RBBR em 192 hs. (F) Avaliação da degradação de RBBR em 240 hs. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ relativamente ao controle. (CRUGEIRA, 2019)

Esta constatação indica a possibilidade de a irradiação emitida ter promovido a excitação dos grupos prostéticos (heme e cobre), agentes mediadores de oxidorredução na ação catalítica do corante RBBR. Estes mediadores podem estar envolvidos na geração de espécies

reativas de oxigênio (ROS), e atacar, direta ou indiretamente, a lignina e/ou moléculas xenobióticas (VAN AKEN; AGTHOS, 2002).

A ação catalítica do grupo controle só se iniciou após 48 hs de incubação, revelando que a irradiação estimulou os processos enzimáticos extracelulares.

Ao final de 96 hs verificou-se diferença estatística de $p= 0,0001$ entre os grupos irradiados e o grupo controle. Em 144 hs de incubação identificou-se diferença significativa entre o Laser e o controle e entre o Laser e o LED de $p= 0,0003$ (Figura 22C).

A maior degradação entre todos os tempos e grupos experimentais foi obtida no grupo Laser no tempo de 192 hs (45,49 %), apresentando significância de $p<0,0009$ em relação ao controle e $p<0,009$ em relação LED (39,37 %) (Figura 22E).

Ao final de 240 hs, verificou-se que a ação catalítica no grupo irradiado por Laser foi maior do que nos restantes grupos de estudo ($p< 0,0001$). No mesmo período o grupo LED apresentou uma diferença significativa de $p< 0,05$ relativamente ao grupo controle.

A análise dos ácidos nucleicos por epifluorescência, constatou a alteração do padrão de coloração de verde para laranja nos grupos irradiados, demonstrando o aumento de produção de RNA nas primeiras 48 hs de incubação (Figura 23).

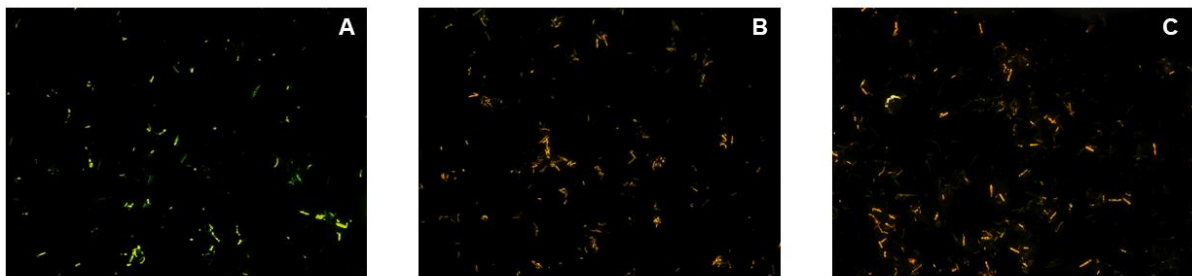


Figura 23. Epifluorescência emitida pelo consórcio em diferentes condições experimentais em 48 h de incubação. (A) Grupo controle apresenta células marcadas de verde, indicando DNA bifilamentar. (B) Grupo Laser apresenta células marcadas de laranja, indicando presença de ácidos nucleicos monofilamentares. (C) Grupo LED apresenta células marcadas em laranja, indicando presença de ácidos nucleicos monofilamentares. (CRUGEIRA, 2019)

A sua quantificação em 48 hs de incubação, identificou no grupo controle um maior percentual de DNA bifilamentar (64,56 %) e menor de RNA (35,43%) por unidade arbitrária de fluorescência (AFU), apresentando significância em relação aos grupos irradiados, Laser $p<0,0357$ e LED $p<0,0049$ (Figura 24).

Os grupos irradiados apresentaram um aumento na produção de ácidos nucleicos monofilamentares (RNA) de 28 % comparativamente ao grupo controle. As duas fontes emissoras de luz não registaram diferença estatística significante entre elas (Figura 24).

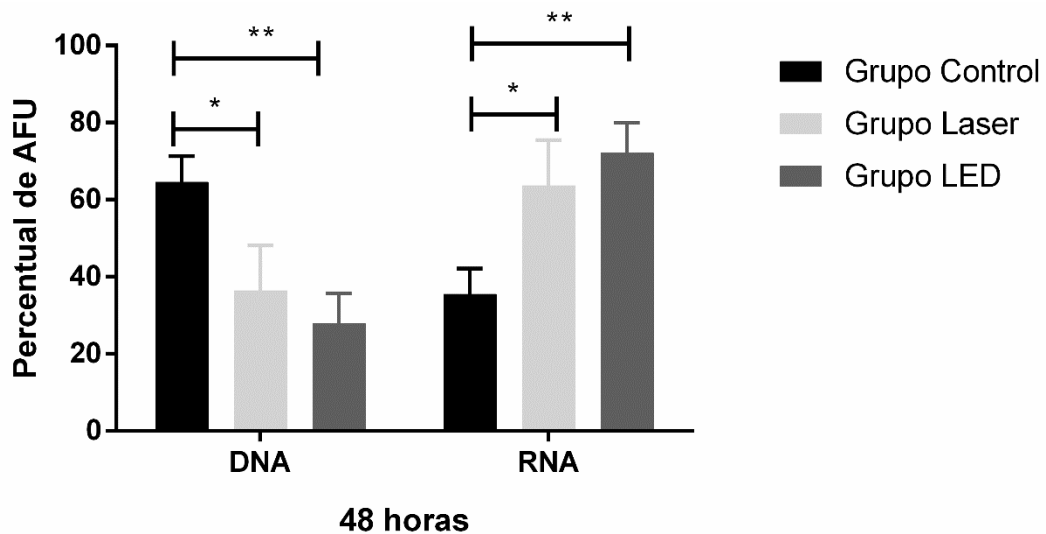


Figura 24. Análise de epifluorescência dos ácidos nucleicos mono e bifilamentares nos diferentes grupos experimentais ao final de 48 hs de hidrólise RBBR. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. (CRUGEIRA, 2019)

Foram descritos efeitos produzidos pela luz na ativação dos processos transcricionais e traducionais (HEMPHIL et al., 2013; WANG et al., 2017).

Ao avaliar-se a atividade metabólica foi possível confirmar que os protocolos de irradiação apresentaram dois efeitos sobre a degradação de RBBR: aumento da degradação e antecipação da atividade lignolítica do consórcio em torno de 48 hs (Figura 25).

Os grupos irradiados (LED e Laser) apresentaram uma atividade metabólica superior a 2.300 % e 2.100 % respectivamente, em relação ao controle nas primeiras 48 hs de incubação. Neste período os grupos irradiados demonstraram uma atividade metabólica máxima, enquanto o grupo controle apresentou o seu pico máximo em 144 hs, fase de incubação bastante mais tardia (Figura 25).

A atividade metabólica do grupo controle manteve-se menor que os grupos irradiados em todos os tempos de análise, exceto no tempo de 240 hs que a menor taxa se verificou no grupo LED com uma redução de 21 % em relação ao controle.

A ativação de distintas rotas metabólicas ocorre por emissores de luz com comprimentos de onda diferentes (OLIVEIRA et al., 2016). As rotas metabólicas sugeridas por Crueira e colaboradores, em 2018, fundamentam os resultados obtidos na catálise do RBBR neste estudo, nos grupos LED (40,24 %) e Laser (39,49 %), em relação ao controle ($p < 0,0009$) ao final de 48 hs.

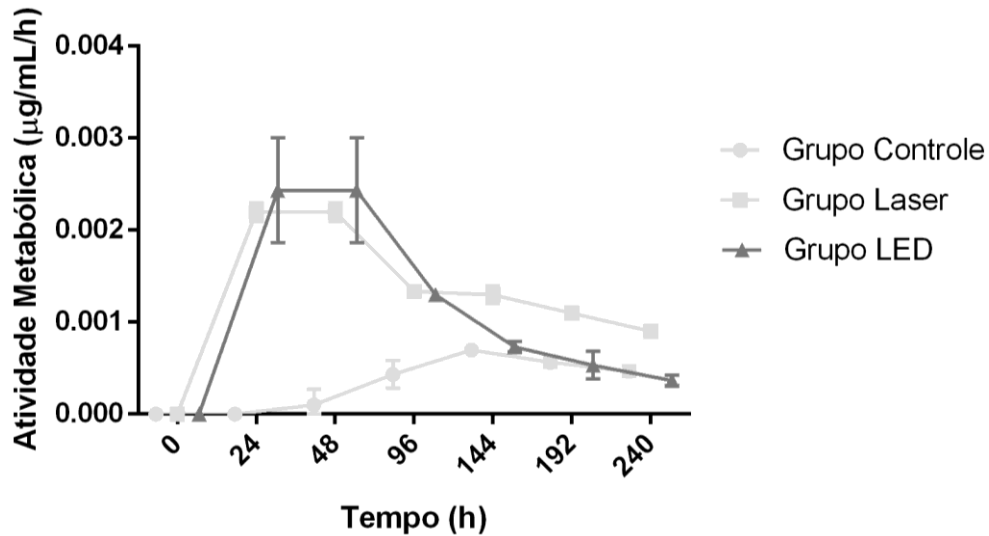


Figura 25. Metabolismo aparente do consórcio microbiano na catálise de RBBR nos diferentes grupos experimentais ao longo de 240 horas. (CRUGEIRA, 2019)

As vias metabólicas utilizadas na degradação do RBBR são diferentes nos grupos irradiados por 632nm e 660nm. Este fato pode ser explicado pela diferença inicial de células após o protocolo de irradiação, bem como, pela fotoativação direta ou indireta de metaloproteínas extracelulares.

No grupo LED a hidrólise do RBBR apresentou seu pico de degradação em 48 hs, confirmando os estudos realizados por Karu em 1983, que relatam a ocorrência do efeito fotoestimulatório, aumento do número de células, até 2 ou 3 gerações após a irradiação o que favorece o aumento da atividade metabólica e possivelmente uma ativação direta das metaloproteínas lignolíticas.

Contudo a irradiação emitida no comprimento de onda de 660nm pode ter induzido ativação das metaloproteínas intracelulares que participam ativamente na modulação das enzimas extracelulares ou agindo diretamente nas metaloproteínas lignolíticas (LIEBERT; BICKNELL e ADAMS, 2014). Esta última possibilidade relaciona-se à absorção de fótons pelos grupos prostéticos e/ou resíduos peptídicos aromáticos que podem aumentar a capacidade catabólica ou auxiliar na manutenção da conformação tridimensional das enzimas tornando-as mais resistentes à desnaturação promovida pela ação metabólica (KOPKA et al., 2017).

A radiação emitida pelas fontes de luz no espectro vermelho pode funcionar como um gatilho da ativação metabólica enzimática, ou seja, como um substrato oxidativo, proporcionando a “ativação” dos mediadores redox, grupos prostéticos metálicos das enzimas lignolíticas. Por outro lado, durante a excitação dos estados eletrônicos (reação primária) uma parte da energia é convertida em calor, elevando localmente a temperatura dos cromóforos

absorventes, ocasionando mudanças estruturais e deflagrando atividades bioquímicas, reações secundárias na ausência de luz, tais como ativação de enzimas (CHAVANTES et al., 2009).

5.7 QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA HIDRÓLISE DA CELULOSE E HEMICELULOSE

Os produtos da hidrólise da biomassa residual foram quantificados em amostras coletadas de sobrenadante ao longo do tempo, tendo em atenção que se avaliaram dois pré-tratamentos distintos (solução de NaOH 5 % ou de KOH 5 %), em cada um dos grupos de estudo: controle, Laser e LED.

5.7.1 DETERMINAÇÃO DE AÇUCARES REDUTORES

Realizou-se a dosagem dos ART ao longo de 240 hs com o objetivo de acompanhar a hidrólise da casca de coco, pelo consórcio irradiado versus controle (sem irradiação).

As cinéticas ao longo do tempo, demonstraram uma maior concentração de açúcares redutores no grupo irradiado por LED até às 144 hs de incubação, em ambos os pré-tratamentos do substrato. A maior produção de açúcares verificou-se no grupo Laser ao final de 192 hs de incubação no substrato tratado por NaOH 5 % (Figura 26).

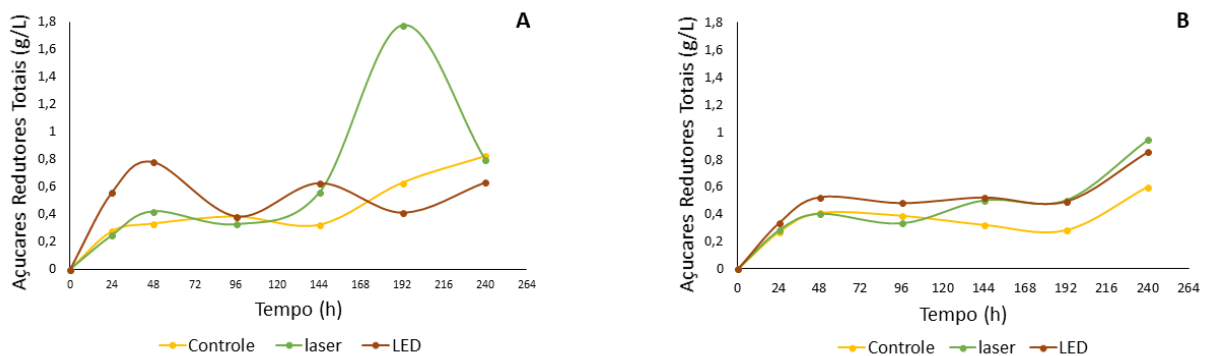


Figura 26. Quantificação de açúcares redutores ao longo do tempo. (A) Casca de coco pré-tratada com solução de NaOH 5%; (B) Casca de coco pré-tratada com solução de KOH 5%. (CRUGEIRA, 2019)

Constatou-se no pré-tratamento por NaOH uma significância de $p < 0,05$ do grupo LED comparativamente ao grupo controle no tempo de 24 e 48 hs, demonstrando um maior desempenho hidrolítico do consórcio bacteriano irradiado por LED. Após 144 hs verificou-se uma maior eficácia do grupo Laser versus o controle, apresentado significância estatística de

$p=0,0104$ no tempo de 192 hs de incubação. Não se identificou diferença significativa entre estes dois grupos nas 240 hs (Apêndice C).

A maior proliferação bacteriana constatada no grupo LED após o protocolo de irradiação é sem dúvida uma vantagem para uma maior degradação da biomassa, mas pela constatação das cinéticas podemos ponderar que vias metabólicas e enzimáticas diferentes são ativadas, como observamos no grupo Laser com uma maior ação hidrolítica após as 144 hs de incubação (CRUGEIRA et al., 2018).

Na incubação do substrato pré-tratado por KOH 5 % identificou-se uma supremacia do grupo LED até às 144 hs de incubação, sem significância estatística entre os grupos de estudo (Apêndice C). A partir das 144 hs a concentração de ART do grupo Laser iguala-se praticamente à do grupo LED, identificando-se a partir das 192 hs um maior poder hidrolítico do grupo Laser, atingindo o seu pico máximo em 240 hs, $p<0,01$ relativamente aos restantes grupos estudados, indicando um efeito metabólico mais tardio, mas por outro lado, com maior produção de ART (Apêndice C).

Observou-se que em ambos os tratamentos do substrato o grupo controle apresentou um comportamento bastante semelhante (Figura 26).

Em uma análise geral das cinéticas de ART, identificou-se uma flutuação dos produtos da hidrólise da biomassa ao longo do tempo (Figura 26).

Segundo Lynd et al. (2008) as taxas de hidrólise da celulose são inibidas pelo acúmulo dos produtos formados, em um processo de “feedback” negativo. Este mecanismo atua no sentido de priorizar a utilização de açúcares mais facilmente metabolizados, como a glicose. Assim, à medida que o processo catabólico da biomassa acontece, acumulam-se açúcares redutores que poderão inibir a degradação da celulose até que sejam utilizados como fonte de carbono dos microrganismos consorciados.

A degradação da biomassa gera subprodutos e produtos, como a glicose de fácil assimilação microbiana inibindo o catabolismo do substrato (LYND et al., 2002).

Este processo pode ter sido responsável pelo padrão de degradação obtido, onde se pode observar uma alta variação na quantidade de açúcares redutores com o tempo, alternando períodos de maior geração com períodos de maior consumo. Por essa razão, considerou-se importante avaliar as atividades metabólicas nas primeiras 48 hs de incubação (Figura 27).

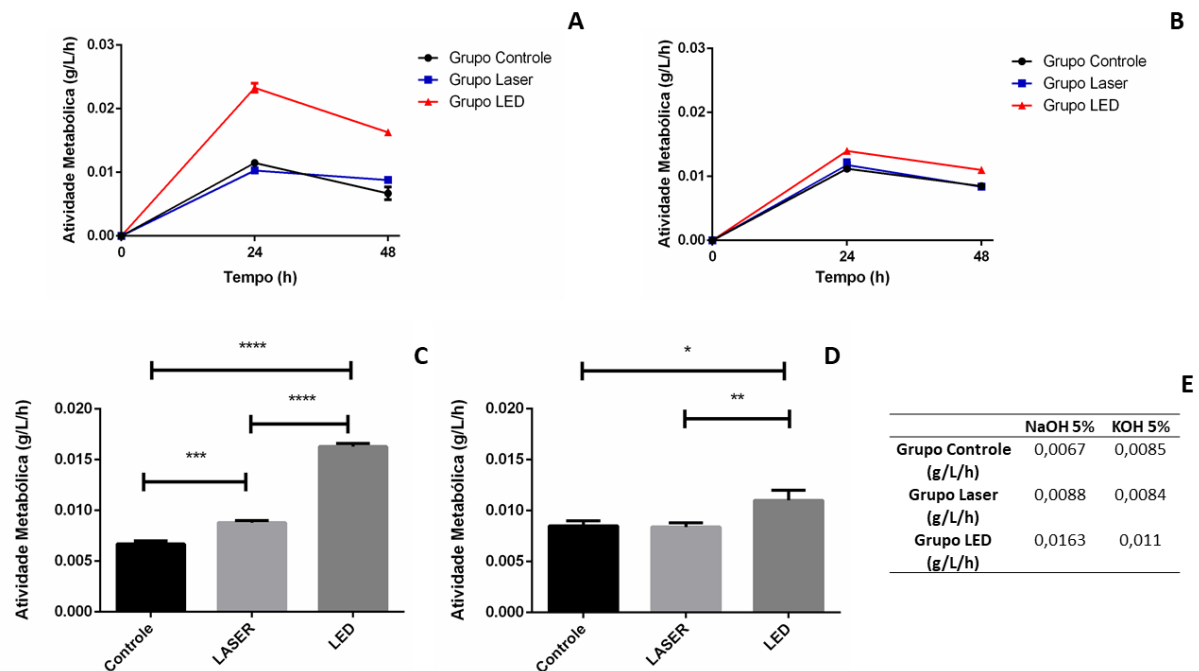


Figura 27. Avaliação das atividades metabólicas na produção de ART. (A) Atividade metabólica durante 48 hs no substrato pré-tratado com NaOH 5 %; (B) Atividade metabólica durante 48 hs no substrato pré-tratado com KOH 5 %; (C) Análise estatística das atividades metabólicas em 48 hs de incubação com o substrato pré-tratado por NaOH 5 %; (D) Análise estatística das atividades metabólicas em 48 hs de incubação com o substrato pré-tratado por KOH 5 %; (E) Atividades metabólicas em 48 hs de incubação. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (CRUGEIRA, 2019)

Observou-se na biomassa tratada com solução de NaOH 5 %, uma atividade metabólica superior nos grupos irradiados comparativamente ao grupo controle. Tendo o grupo LED uma atividade de 0,0163 g/L/h, 143 % maior ($p < 0,0001$) do que o controle nas primeiras 48 h de incubação (Figura 27 A; C).

Na análise de desempenho metabólico no substrato pré-tratado por solução de KOH 5 %, apenas o grupo irradiado por LED obteve uma atividade superior de 29,4 % relativamente ao grupo controle, nas primeiras 48 h. O grupo Laser e controle apresentaram atividades metabólicas similares (Figura 27 B; D).

A concentração de ART e atividades metabólicas determinadas nos pré-tratamentos em estudo, indicaram uma maior eficácia catabólica da biomassa no consórcio microbiano irradiado por LED, nas primeiras 48 h. Poderá ser fundamentado por uma maior proliferação celular após o processo de irradiação, transcrição génica e/ou maior atividade enzimática desenvolvida. Por outro lado, a produção de ART no substrato tratado por NaOH 5 % foi maior, induzindo que o pré-tratamento gerou uma maior acessibilidade aos polissacarídeos e consequentemente maior atividade hidrolítica.

Pode ter coexistido uma ativação das porfirinas membranares através da emissão de luz, visto que a decomposição é extracelular por complexos enzimáticos que agem na despolimerização dos componentes lignocelulósicos e seus produtos são transportados para o meio intracelular e utilizados no metabolismo bacteriano.

5.7.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Determinaram-se as concentrações de glicose e xilose por HPLC ao longo do tempo, com o objetivo de avaliar a degradação dos polissacarídeos, celulose e hemicelulose, pelo consórcio bacteriano fotomodulado.

A análise das cinéticas de glicose em ambos os pré-tratamentos do substrato demonstrou uma predominância catabólica do grupo irradiado por LED nas primeiras horas do estudo, apresentando concordância com os resultados obtidos na determinação de ART. Constatou-se uma flutuação na concentração de glicose ao longo do tempo, provavelmente pela utilização microbiana do monossacarídeo como fonte de carbono, confirmando o constatado na análise de ARTs (Figura 28) (LYND et al., 2008).

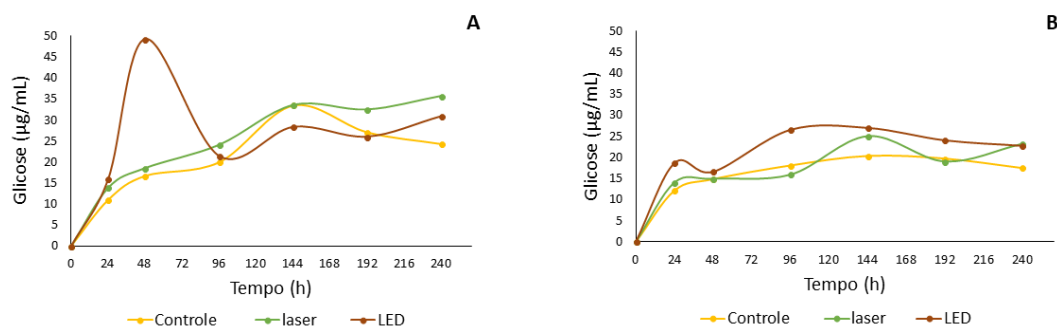


Figura 28. Cinéticas da concentração de glicose obtidas por cromatografia. (A) Substrato pré-tratado por solução NaOH 5%; (B) Substrato pré-tratado por solução KOH 5%. (CRUGEIRA, 2019)

No pré-tratamento do substrato por NaOH 5 % verificou-se uma maior obtenção de glicose do que no tratamento por KOH 5 %. O grupo irradiado por LED apresentou seu pico de concentração de glicose ao final das 48 hs, o mesmo identificado na determinação de ART, verificando-se significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (Apêndice D). Após este período, verificou-se um consumo da glicose obtida pelo consórcio modulado por LED até as 96 hs (Figura 28A).

A partir das 96 hs o grupo irradiado por Laser obteve um melhor desempenho, com significância de $p < 0,001$, nas 192 hs e 240 hs de incubação relativamente ao grupo controle.

Em praticamente todo o tempo de acompanhamento, constatou-se uma hidrólise dos polissacarídeos predominante nos grupos irradiados versus o grupo controle (apêndice D).

Na análise da hidrólise da biomassa pré-tratada por solução de KOH 5%, a concentração de glicose foi menor, do que no substrato tratado com solução de NaOH 5%. O consórcio irradiado por LED apresentou um melhor desempenho em praticamente todos os tempos quantificados, excepto nas 240 hs de incubação (Figura 28B).

O grupo controle no substrato tratado por NaOH 5% obteve uma melhor eficácia em comparação com o substrato pré-tratado com KOH 5%, mas não relevante, indicando uma expressão dos resultados maior para a emissão de luz do que para a diferença do pré-tratamento utilizado.

Determinaram-se as atividades metabólicas aparentes ao longo do tempo, sendo o período de maior representatividade as primeiras 48 hs de incubação, onde se verificou um menor consumo de glicose como fonte de carbono microbiana (Figura 29).

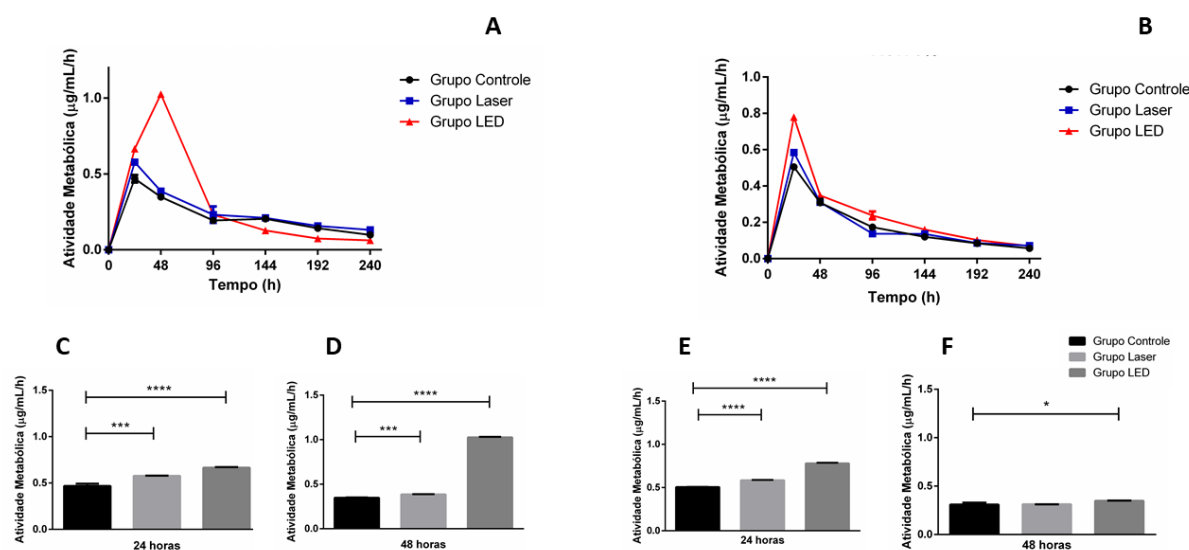


Figura 29. Atividade metabólica aparente na obtenção de glicose. (A) Cinéticas da obtenção de glicose nos grupos estudados na biomassa tratada por NaOH 5%; (B) Cinéticas da obtenção de glicose nos grupos estudados na biomassa tratada por KOH 5%; (C) Atividade metabólica no instante de 24 hs na biomassa tratada por NaOH 5%; (D) Atividade metabólica no instante de 48 hs na biomassa tratada por NaOH 5%; (E) Atividade metabólica no instante de 24 hs na biomassa tratada por KOH 5%; (F) Atividade metabólica no instante de 48 hs na biomassa tratada por KOH 5%. (CRUGEIRA, 2019)

As maiores atividades metabólicas foram alcançadas nas primeiras 48 hs de incubação nos grupos irradiados, em ambos os pré-tratamentos da biomassa (Figura 29A; B).

No pré-tratamento do substrato por NaOH, nas 48 hs observou-se uma atividade metabólica no grupo LED de praticamente o triplo (1,026 µg/mL/h), de 294,9% maior da atividade obtida no grupo controle (0,3479 µg/mL/h) (Figura 29D). O grupo irradiado por Laser

(0,3861 $\mu\text{g/mL/h}$) evidenciou uma diferença mínima em relação ao grupo controle nas primeiras 48 hs. Os resultados obtidos das atividades metabólicas apresentam concordância com a determinação de ART.

No tratamento da biomassa por KOH 5%, verificou-se uma maior atividade metabólica no tempo de 24 hs, no grupo LED, com significância de $p < 0,0001$ (56% maior) em comparação ao grupo controle (Figura 29E). A mesma significância foi obtida no grupo Laser relativamente ao grupo controle.

As atividades metabólicas obtidas no grupo LED (0,78 $\mu\text{g/mL/h}$) em 24 hs de incubação, no pré-tratamento por KOH, foram menores do que as identificadas no mesmo grupo, em 48 de incubação do substrato pré-tratado por NaOH (Figura 29 E; D). É nítida uma maior atividade metabólica aparente no grupo LED, nas primeiras horas de avaliação, em ambos os pré-tratamentos.

Na quantificação de xilose ao longo do tempo, verificou-se nos dois pré-tratamentos uma degradação diminuta do heteropolissacarídeo, hemicelulose, pois a concentração de um dos seus produtos hidrolíticos, xilose, diminui após as 24 hs de incubação (Figura 30).

Uma das hipóteses das baixas concentrações obtidas de xilose, pode-se fundamentar pelos pré-tratamentos físico-químicos realizados, poderem ter removido a maioria da hemicelulose disponível e/ou pelo déficit de xilanases nos microrganismos presentes no consórcio.

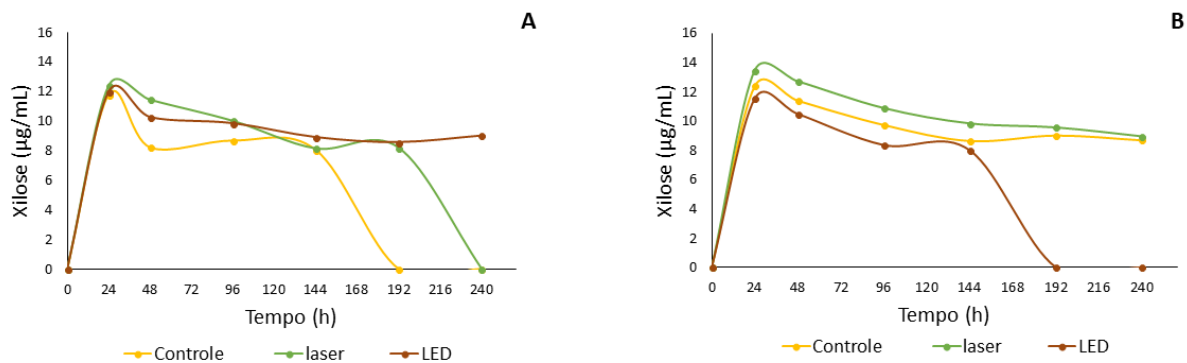


Figura 30. Cinéticas da concentração de xilose obtidas por HPLC. (A) Substrato pré-tratado por solução NaOH 5%; (B) Substrato pré-tratado por solução KOH 5%. (CRUGEIRA, 2019)

A severidade e o tipo de pré-tratamento influenciaram na porcentagem de massa recuperada de cada fração. O pré-tratamento pode provocar a solubilização da hemicelulose (AGUILAR et al., 2002).

Estudos efetuados por Shimizu, (2018) em cana-de-açúcar, demonstraram que no pré-tratamento alcalino por solução de NaOH 5%, a recuperação da massa inicial é da ordem dos 47,8 %. Por outro lado, Corradini et al. (2009) utilizou uma solução de hidróxido de sódio para extração da hemicelulose da casca de coco.

Estudos efetuados por Aguiar et al. (2010) em bagaço de cana, demonstraram que os processos de tratamento alcalinos removerem até 85% da fração de hemicelulose. Fundamentando que os dois processos de pré-tratamento aplicados ao substrato podem ter causado a perda de alguns substituintes da cadeia de hemicelulose e até mesmo a sua degradação, sendo que, o polissacarídeo não possui regiões cristalinas é mais facilmente catabolizado por produtos químicos.

5.8 QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA POR EPIFLUORESCÊNCIA

As quantificações microbianas realizadas ao final de 48 e 144 h demonstraram uma proliferação celular superior no grupo LED em ambos os pré-tratamentos. É de salientar que logo após o protocolo de irradiação (tempo zero) este grupo evidenciou maior concentração microbiana, “partindo em uma condição preveligiada para o processo de hidrólise da biomassa”.

Ao tratar os resultados obtidos pelo método estatístico ANOVA, com o teste de Tukey, 95% de confiança, foi possível identificar no substrato pré-tratado por solução de NaOH 5% em 48 hs, uma diferença significativa de $p=0,0005$ entre o grupo irradiado por LED e os restantes dois grupos de estudo (Figura 31A). Essa diferença se reduz no tempo de 144 hs constatando-se uma taxa de crescimento superior no grupo irradiado por Laser durante esse período de tempo. Indicando uma produção celular relativa maior no grupo Laser em uma fase mais tardia. No tempo de 144 hs continua a verificar-se significância ($p=0,0327$) do grupo LED em relação ao grupo controle (Figura 31C).

No substrato pré-tratado pela solução de KOH 5% constatou-se no tempo de 48 hs uma diferença significativa ($p<0,05$) dos grupos irradiados comparativamente ao grupo controle (Figura 30B). Prevalecendo no tempo de 144 hs significância do grupo LED perante o grupo controle (Figura 31D).

A proliferação celular determinada está em consonância com os produtos quantificados na hidrólise da celulose indicando o grupo irradiado por LED mais eficaz, principalmente nas primeiras 48 hs. Sendo que, o aumento proliferativo foi constatado na determinação realizada logo após o final do protocolo de irradiação descrito na Figura 10.

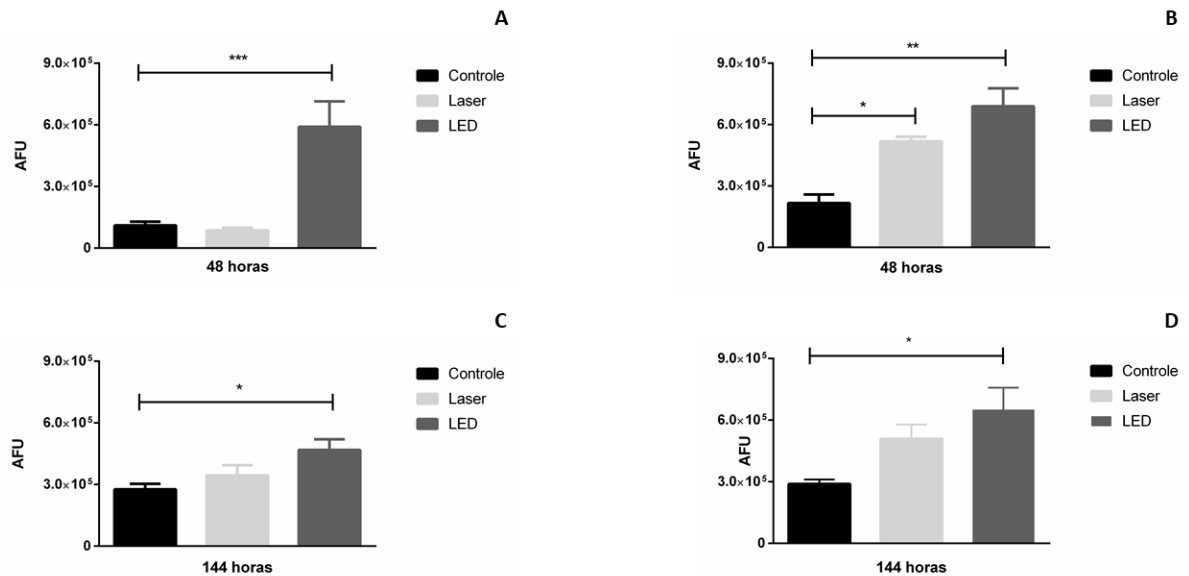


Figura 31. Análise Estatística da quantificação microbiana, pelo método ANOVA, com o teste de Tukey, 95% de confiança. (A) Proliferação microbiana em 48 hs de incubação no substrato pré-tratado por solução de NaOH 5%; (B) Proliferação microbiana em 48 hs no substrato pré-tratado por solução de KOH 5%; (C) Proliferação microbiana em 144 hs no substrato pré-tratado por solução de NaOH 5%; (D) Proliferação microbiana em 144 hs de incubação no substrato pré-tratado por solução de KOH 5%. ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05. (CRUGEIRA, 2019)

No grupo irradiado por Laser foi notório que a emissão de luz no espectro vermelho proporcionou o aumento do número de células até à 3^a geração. Este fenómeno já fora descrito em estudos realizados por Karu (1983) em culturas de *E. coli* irradiadas por Laser e luz vermelha incoerente, quando incubadas em meio nutriente identificou que o aumento do número de células ocorre apenas durante 2 ou 3 gerações após sua irradiação.

A ação da luz emitida pelo LED é mais ampla em relação à do Laser, sendo a densidade de energia distribuída em uma banda eletromagnética maior, possibilitando a interação com um maior número de fotorreceptores específicos (DACOSTA et al., 2003).

Estudos efetuados por Karu (1999) demonstrando que o citocromo microbiano tem seu pico de absorção máxima em 633nm. Este fato pode fundamentar a maior eficácia do LED (632 nm) no aumento da proliferação microbiana.

Dobrowolski et al. (2017) identificou a fotoestimulação como uma das novas biotecnologias aplicáveis á degradação da biomassa para obter energia sustentável.

Sabendo que, a viabilidade econômica é um fator predominante para a produção industrial este resultado torna-se promissor indicando a fotoestimulação como processo impulsionador de bioprocessos nas diversas áreas, direcionando a luz LED como promitente, coadjuvado ao fator de baixo custo destes dispositivos.

5.9 ANÁLISE DA CASCA DE COCO VERDE POR MEV

A microscopia eletrônica possibilitou a análise e avaliação da capacidade catabólica do consórcio fotoestimulado na biomassa residual de coco, ao final de 240 hs.

As micrografias evidenciaram uma maior degradação nos grupos irradiados, ou seja, a radiação no espectro vermelho ao incrementar a proliferação celular desenvolveu uma maior ação catabólica do substrato, comparativamente ao grupo controle (Figura 32).

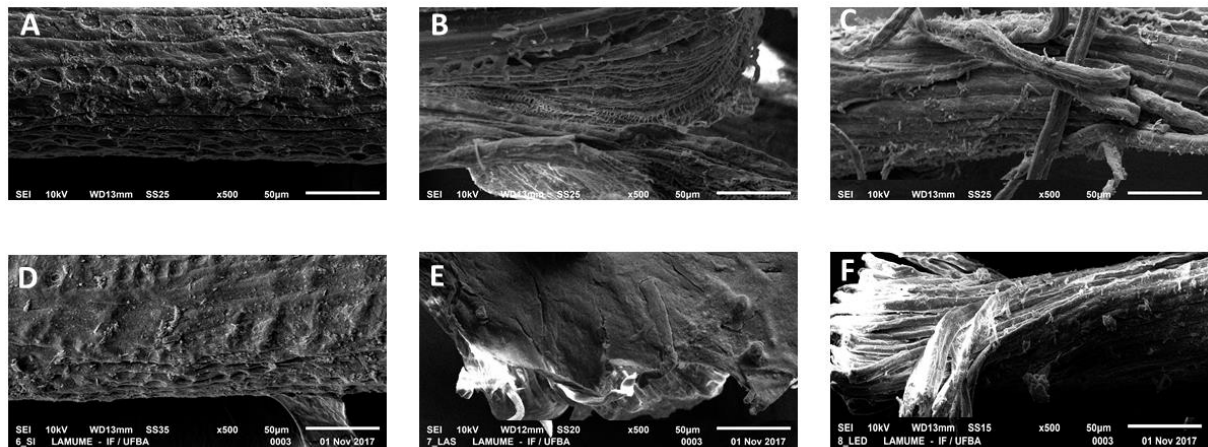


Figura 32. Micrografias obtidas por MEV, aumento de 500x, da biomassa residual de coco ao final de 240 hs. (A) Substrato pré-tratado por NaOH 5% e incubado com consórcio microbiano sem irradiação; (B) Substrato pré-tratado por NaOH 5% e incubado com consórcio microbiano irradiado por Laser; (C) Substrato pré-tratado por NaOH 5% e incubado com consórcio microbiano irradiado por LED; (D) Substrato pré-tratado por KOH 5% e incubado com consórcio microbiano sem irradiação; (E) Substrato pré-tratado por KOH 5% e incubado com consórcio microbiano irradiado por Laser; (F) Substrato pré-tratado por KOH 5% e incubado com consórcio microbiano irradiado por LED. (CRUGEIRA, 2019)

As reações inerentes à emissão de luz, desencadeiam respostas biológicas estimulatórias são vastas e influenciam as vias metabólicas da célula, culminando com o aumento da proliferação celular, como demonstrado na quantificação celular após o processo de irradiação (KARU, 2010; CRUGEIRA et al., 2018).

Estudos realizados por Karu (2010) em cultura de *Escherichia coli* identificaram enzimas terminais, citocromo bd, como fotoceptor na emissão de radiação no espectro vermelho. As condições experimentais implementadas são de extrema importância, pois o estado de oxidação/redução do fotoceptor primário é essencial para que o processo de fotobioestimulação ocorra.

Na análise do substrato tratado por solução de NaOH 5% verificou-se uma maior degradação nas amostras irradiadas, identificando-se rupturas das fibras de casca coco e sua degradação parcial. Constatou-se aberturas superficiais, fendas internas e espaços vazios

criados pela retirada de componentes não-celulósicos e ação hidrolítica nas cadeias celulósicas (Figura 32B; C).

No substrato tratado pela solução de KOH 5 %, as amostras irradiadas evidenciaram uma degradação menor do que a obtida com o pré-tratamento por NaOH 5 %, concordante com as quantificações realizadas dos produtos hidrolíticos da celulose (Figura 32E; F).

Os pré-tratamentos alcalinos proporcionaram reações de solvatação e saponificação causando a dilatação da biomassa e conseqüentemente, maior acessibilidade para a ação catabólica microbiana (HENDRIKS et al., 2009).

Os resultados corroboram com as quantificações de açúcares realizadas e confirmam o processo estimulatório dos emissores de luz utilizados em relação ao grupo controle. Comparando-se as fontes luminosas, verificou-se uma maior degradação provocada pelo consócio microbiano irradiado por LED, justificando-se por uma maior proliferação microbiana advinda da ação da luz nos processos metabólicos e expressão gênica (CRUGEIRA et al., 2018).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que o pré-tratamento com solução de NaOH 5%, melhorou a capacidade e acessibilidade à macromolécula de celulose da casca de coco.

Houve resposta estimulatória do consórcio bacteriano estatisticamente significativa à emissão das radiações Laser e LED no espectro vermelho, $p=0,0057$; $p<0,0001$, relativamente ao grupo controle. Entre as fontes emissoras de luz constatou-se uma significância de $p<0,0001$ do grupo LED em relação ao grupo Laser, comprovando que a resposta celular à fotoestimulação não está associada à coerência da radiação emitida.

O consórcio fotoestimulado provocou uma maior produção proteica e atividade metabólica antecipando e aumentando o catabolismo do corante RBBR. Nas primeiras 48 horas, o grupo LED apresentou maior degradação do RBBR com significância ($p<0,0001$) em relação ao controle e sem diferença estatística relativamente ao emissor Laser.

A obtenção de produtos da hidrólise da celulose (ART e glicose) foi significativa nos grupos fotoestimulados. O grupo LED apresentou um catabolismo mais eficaz, nas primeiras 48 h, representando uma atividade metabólica superior e significativa ($p<0,0001$; NaOH 5%) advinda das reações bioquímicas em cascata desencadeadas pela emissão da radiação, enquanto o grupo Laser, apresentou predominância catabólica após as 144 h de incubação.

A análise das micrografias da biomassa residual, corroboram com a quantificação dos produtos catabólicos do substrato, demonstrando uma maior ação bacteriana nos grupos irradiados.

Sabendo que a viabilidade econômica é um fator predominante para a produção industrial este resultado torna-se promissor indicando a fotoestimulação como ferramenta impulsionadora de bioprocessos nas diversas áreas, direcionando a luz LED como promitente coadjuvada ao fator de baixo custo, sendo que o emissor Laser apresentou uma resposta catabólica mais tardia.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (5): p. 1245-1254. 2010.
- AGUILAR, R., RAM_IREZ, J.A., GARROTE, G., & VAZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, 55 (4), p. 309–318, 2002.
- ALBUQUERQUE, É. D. Aumento da Atividade celulásica para a hidrólise da casca de coco verde pela aplicação da alta pressão hidrostática. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, RENORBIO, p. 31-35, 2013.
- ANEJA, K. R. Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. Deptt. of Microbioloy, Kurukshetra University, Kurukshetra (Haryana) India, 2003.
- ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, p. 1–14, 2013.
- BAGNATO, V. S.; PAOLILLO, F. R.; *Novos Enfoques da Fototerapia para Condicionamento Físico e Reabilitação*. São Carlos: Editora Compacta, 2014.
- BAGNATO, V. S. Uso de LEDs (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora. BR n. PI0200200-0, 23 jan. 2002.
- BAGNATO V. S.; MARIYAMA L. T. Dosimetria na terapia com laser de baixa intensidade. *J Bras Laser*, v. 1, p. 26-29, 2007.
- BAKR E. M. A new software for measuring leaf area, and área damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *JEN* 129(3):173–175, 2005.
- BÉGUIN, P.; LEMAIRE, M. The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 31(3), p. 201-236, 1996.
- BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* v. 36, p. 91–106, 2014.
- BEUKES, N.; PLETSCHKE, B. I. Effect of alkaline pre-treatment on enzyme synergy for efficient hemicellulose hydrolysis in sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. V. 102, p. 5207-5213, 2011.
- BISMARCK, A.; MOHANTY, A. K.; ARANBERRI-ASKARGORTA, I.; CZAPLA, S.; MISRA, M.; HINRICHSENBAND, G.; SPRINGERA, J. Surface characterization of natural fibers; surface properties and the water up-take behavior of modified sisal and coir fibers. *Green Chemistry*. Cambridge, v.3, p.100–107, 2001.
- BORASTON, A. B. et al Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *J. Biochem.* 382(pt 3):p. 769–781, 2004.

BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Routes to cellulosic ethanol. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. ISBN 978-0-387-92739-8. p. 3 – 146, 2011.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Blucher, p. 365-380, 2010.

CABRAL, M. M. S.; ABUD, A. K. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; ROCHA, M. S. R. dos S.; GOMES, M. A. Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. Engevista, Vol. 19, p. 99-108, 2017.

CANTAREL, B. L. COUTINHO, P.M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res. 37, p. 233–238, 2009.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. Bioresource Technology 10: 4754-4766, 2010.

CARVALHO, G. B. M. et al., Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. Revista Analytica, 14, p. 54-57, 2005.

CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp.). 2006. 212f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CASTRO A. M.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais, Química Nova vol.33 n°1, São Paulo, 181-188p, 2010.

CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clinica odontologica na estomatologia. Rev Bras Patol Oral. 3, p. 214-8, 2004.

CHAVANTES, M. A, et al. Laser em Biomedicina Princípios e Praticas, São Paulo, 2009.

CHEN WH, YE S. C.; SHEEN H. K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. Appl Energ. 93, p. 237-244, 2011.

CHUNDAWAT, S. P. S.; VENKATESH, B.; DALE, B. E. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. Biotechnology & Bioengineering, v. 96, p. 219-231, 2007.

CORAZZA. V. A. Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos. São Carlos; 89f. Dissertação do Programa de Pós Graduação Inter unidade em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2005.

CORRADINI, E.; ROSA, M. de F.; MACEDO, B. P. de; PALADIN, P. D.; MATTOSO, L. H. C. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p.837-846, 2009.

CRUGEIRA, P. J. L.; SANTOS, G. M. P.; CHINALIA, F. A.; ALMEIDA, P. F.; PINHEIRO, PINHEIRO, A. L. B. In: Longo, L. [Ed]. *Advances in laserology: Selected papers of Laser Florence 2015*, Medimond, Bologna. 1, p. 5-9, 2016.

CRUGEIRA, P. J. L.; SANTOS, G. M. P.; OLIVEIRA, S. C. P. S.; , SAMPAIO, F. J. P.; CORREIA, N. A.; FAGNANI, S. R. C. A.; CHINALIA, F. A.; ALMEIDA, P. F.; PINHEIRO, A. L. B. Photobiological effect of Laser or LED light in a thermophilic microbial consortium, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 181, p.115–121, 2018.

CRUGEIRA, P. J. L.; SANTOS, G. M. P.; OLIVEIRA, S. C. P. S.; , SAMPAIO, F. J. P.; CORREIA, N. A.; FAGNANI, S. R. C. A.; SAMPAIO, I. C. F.; FERREIRA, E. de S.; CHINALIA, F. A.; PINHEIRO, A. L. B. Effects of photostimulation on the catabolic process of xenobiotics, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 191, p. 38-43, 2019.

CUNHA, E.; HATEM, C.; BARRICK, D. Natural and Designed Enzymes for Celulose Degradation in Advanced Biofuels and Bioproducts, ed. W. J. Lee (New York, NY: Springer), p.339 – 367, 2013.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: (IUPAC Recommendations 1995). *Pure & Applied Chemistry*, 67, 1699, 1995.

DACOSTA, R. S.; ANDERSSON, H.; WILSON, B. C. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 78(4): p. 384-392, 2003.

DEMAIN A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. D. Cellulase, *Clostridia*, and Ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 69, no. 1, 2005.

DEVLIN T. M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. Tradução da 5ª edição americana. São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

DIAS, I. F. L.; SIQUEIRA, C. P. C. M.; FILHO, D. O. T.; LAURETO, E.; LIMA, F. M.; KASHIMOTO, R. K.; DURANTE, H. Efeitos da luz em sistemas biológicos. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 30, n.1, p. 33-40, 2009.

DOI, R. H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature Reviews 2*: p. 541-551, 2004.

DOURADO D. M.; FÁVERO, S.; MATIAS, R.; CARVALHO, P. de T.; da CRUZ-HÖFLING, M. A. Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1. *Fernandes, M.J.C.* 2012.

DOBROWOLSKI, J. W.; BEDLA, D.; CZECH, T.; GAMBUS, F.; GORECKA, k.; KISZCZAK, W.; KUŹNIAR, T.; MAZUR, R.; NOWAK, A.; ŚLIWKA, M.; TURUNOV, O.; WAGNER, A.; WIECZOREK, J.; ZABOCHNICKA ŚWIĄTEK, M. Integrated innovative

biotechnology for optimization of environmental bioprocesses and a green economy, in: Hemant J. Purohit, Vipin Chandra Kalia, Atul N. Vaidya, Anshuman A. Khardenavis (Eds.), Optimization and Appl of Bioproc, Springer, Singapore, p. 27–72, 2017.

EMBRAPA. Produção e Comercialização de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014. 2014. Disponível em:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122994/1/Producao-e_comercializacao-Doc-184.pdf>. Acessado em 28 Maio 2017.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Ed. EDUCS, P. 520, 2004.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. p.13, 2011.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAO Statistical Yearbook 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>>.

FUBINI, S. Influenza della luce sulla respirazione del tessuto nervoso. Archivio per le scienze mediche da G. Bizzozero, 3, 1879.

FUKUDA, T.Y.; JESUS, J.F.; SANTOS, M.G.; JUNIOR, C.C.; TANJI, M.M.; PLAPLER, H. Aferição dos equipamentos de laser de baixa intensidade. Revista Brasileira de Fisioterapia, v.14, n.4, p. 303-308, 2010.

GAN Q.; ALLEN S.J.; TAYLOR G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. Process Biochemistry, 38: p. 1003–1018, 2003.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. v.59, p. 257 – 268, 1987.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Decolorization of several dyes by a lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. Appl. Environ. Microb., 45:1741-1747, 1983.

GONÇALVES, F.; RUIZ, A., H. A.; NOGUEIRA, C. C.; SANTOS, E. S.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, G. R. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. Fuel, v. 131, p. 66–76, 2014.

HEMPHILL J.; CHOU, C.; CHIN J. W.; DEITERS, A. Genetically Encoded Light-Activated Transcription for Spatio-Temporal Control of Gene Expression and Gene Silencing in Mammalian Cells, *J Am Chem Soc.* 135, p.13433–13439, 2013.

HENDRIKS, A. T. W. M., & ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource technology, 100(1), p.10-18, 2009.

HENRIKSSON H.; STAHLBERG J.; ISAKSSON R.; PETTERSSON G. The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: A comparison of cellobiohydrolase I and endoglucanase I. FEBS Letters, 390: p. 339–344, 1996.

JENSEN E. C. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anat Rec* 296:378–381, 2013.

JORGENSEN H.; KRISTENSEN J.B.; FELBY C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 2007a, 1: p. 119–134, 2007.

KARU, T. I. Multiple Roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation, *Critical Review, IUBMB Life*, 62(8): p. 607–610, 2010.

KARU, T. I. Low-Power Laser Therapy. In: VODINH, T. (Ed.). *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press, p.1-25. cap. 48, 2003.

KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 49, p.1-17, 1999.

KARU T. *The Science of low power laser therapy*. Ed.1. London: Gordon & Breach Science Publishers; 1998.

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.*, 2, p.53-74, 1988.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. *IEEE Journal Quantum Electronics QE-23*, v.10, p.1703-1717, 1987.

KARU, T.; RYABYKH, T. P.; FEDOSEYEVA, G. E.; PUCHKAVA, N. I. Helium-Neon laser-induced respiratory burst of phagocyte cells. *Lasers Surg Med*, v.9, p.585-588, 1989.

KARU, T. I.; TIPHLOVA, O.A.; LETOKHOV, V.S.; LOBKO, V. V. Stimulation of *E. coli* growth by laser and incoherent red light. *Nuovo Cimento D, Bologna*, v. 2, n. 4, p. 1138-1144, 1983.

KARU, T.I.; KOLYAKOV, S.F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery Volume 23, Number 4*, p. 355–361, 2005.

KARU, T.I., KALENDO, G.S., LETOKHOV, V.S., and LOBKO V.V. Biostimulation of HeLa cells by low-intensity visible light. II. Stimulation of DNA and RNA synthesis in a wide spectral range. *Nuovo Cimento D*, 3, p.308-318, 1984.

KARU, T.I.; ANDREICHUK, T.; RUABYKH, T. Changes in oxidative metabolism of murine splenn following diode laser (660-950 nm) irradiation: effect of cellular composition and radiation parameters. *Lasers in Surgery and Medicine, New York*, v.13, n 4, p.453- 462, 1993.

KASTEN, F. H. Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. *Internat. Ver. Cytol.* 21: p. 141-202, 1967.

KEPNER, R.L.; PRATT, J.R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.* 58, p. 613, 1994.

KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M. H.; SHANKAR, L. R.; KHANNA, A.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surgery Medicine*, v. 28, n. 4, p.355–364, 2001.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.

KOPKA, B.; MAGERL, K.; SAVITSKY, A.; DAVARI, M. D.; RÖLLEN, K.; BOCOLA, M.; DICK, B.; SCHWANEBERG, U.; JAEGER, K-E.; KRAUSS, U. Electron transfer pathways in a light, oxygen, voltage (LOV) protein devoid of the photoactive cysteine, *Scientific Reports*, 7, p. 1-16, 2017.

KUJAWA, R. Biologiczne podstawy podchowu larw reofilnych ryb karpowatych w warunkach kontrolowanych. *Rozprawy i monografie, Wyd. UWM Publ., Olsztyn, Poland*, 2004.

LATORRE, M.; LOW, M.; GÁRATE, E.; REYES-JARA, A.; MURRAY, B. E.; Cambiazoac V, González M. Interplay between copper and zinc homeostasis through the transcriptional regulator Zur in *Enterococcus faecalis*. *Metallomics*. p. 1137-1145, 2015.

LIEBERT, A. D.; BICKNELL, B. T.; ADAMS, R. D. Protein conformational modulation by photons: A mechanism for laser treatment effects, *Medical Hypotheses* 82, p. 275–281, 2014.

LJUNGDAHL, L.G.; ERIKSSON, K.-E. Em *Advances in Microbial Ecology*; Marshall, K.C., ed.; Plenum Pub. Corp.: New York, p. 237, 2012.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. V. 193, p. 265- 275, 1951.

LUCARINI, A. C.; FERREIRA N. L.; SOUZA, C. D. S.; FRANCISCO, F. P. L.; FONSECA, I. R.; ROSSI, L. G.; FERREIRA, V. M. Estudo da remoção de inibidores de fermentação após tratamento ácido e enzimático de palha de cana. *The Journal of Engineering and Exact Sciences - JCEC*, Vol. 03 N. 02 p. 095–111, 2017.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J. D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C. E. How biotech can transform biofuels. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 2, p. 169-172, 2008.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolourization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: p. 246-252, 2005.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; BENDER, K. S; BUCKLEY, D. H; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 12 ed., Porto Alegre: Artmed, p.1006, 2016.

MARTINS L.F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2005.

MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.32, (Documentos 164, ISSN 1678-1953), 2011.

MATTOS, A. L. A.; ROSA, M. F.; CRISÓSTOMO, L. A.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; VERAS, L.G.C. Beneficiamento da casca do coco verde. Embrapa - Agroindústria Tropical, 2011.

MENEZES, C.R., SILVA, I.S., DURRANT, L.R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. Estudos tecnológicos. 5(1):68-78, 2009.

MONTE, J. R. Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*, dissertação de mestrado em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, p.35-37, 2009.

MONTES, D. Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas de campos de petróleo como método de monitoramento de Bactérias Redutoras de Sulfato- BRS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, p.121, 2015.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. "Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* v. 27, p. 77–93, 2013.

MORGENSTERN, I.; KLOPMAN, S.; HIBBETT, D. Molecular evolution and diversity of lignina degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. *Journal of Molecular Evolution* 66: p. 243-257, 2008.

MTUI, G.Y.S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology*. v.8, p. 1398-1415, 2009.

MWAIKAMBO, L. Y; ANSELL, M. P. Chemical modification of hemp, sisal, jute and kapok fibers by alkalization. *Journal of Applied Polymer Scienc*, 84 (12), p. 2222-2234, 2002.

NASCIMENTO, R J. A. Monitoramento em tempo real da hidrólise enzimática do bagaço da casca de coco verde por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal/RN, 2016.

NASCIMENTO, V.M. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. P. 126, 2011.

NASCIMENTO, R.P.; JÚNIOR, N. A.; PERERIRA, N. J.; BON, E.P.S.; COELHO, R.R.R. Brewr's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production high endo- β 1,4-xilanase titres. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: p. 879-881, 2009.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI. M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 5, p. 7-9, 1996.

NUNEZ, S, GARCEZ AS, RIBEIRO MS. PDT-Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil; 2012.

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

OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; FABRIS, C.; BONONI, V. L. R. 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: p. 889-893, 2000.

OLIVEIRA, F.M.V., Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. p. 98, 2010.

OLIVEIRA, F. A.; MATOS, A. A.; SANTESSO, M. R.; TOKUHARA, C. K.; LEITE, A. L.; BAGNATO, V. S.; MACHADO, M. A. A. M.; PERES-BUZALAF, C.; OLIVEIRA, R. C. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 163, p. 4–21, 2016.

OLIVEIRA, C. A. P. Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido acético diluído em sistema pressurizado. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis), Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

O'NEAL M. E.; LANDIS D. A.; ISAACS R. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. *J Econ Entomol* 95(6):1190–1194, 2002.

PACK, S. P.; CHO, K. M.; KANG, H. S.; YOO, Y. J.; *J. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 8, 441. PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Tecnol.*, 74, p. 25-33, 2000.

PEDERSEN, M. AND MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*. v.27, p.739-750, 2010.

PENG F.; PENG P.; Xu F, SUN R-C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*. 30(4): p. 879-903, 2012.

PEREIRA, P. R.; PAULA, J. B.; CIELINSKI J.; PILONETTO M.; BAHTEN L. C. Efeitos do Laser de baixa intensidade em cultura bacteriana in vitro e ferida infectada in vivo. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 41, nº 1, Rio de Janeiro, 2014.

PINHEIRO, A. L. B. In: Longo, L. [Ed]. *Advances in laserology: Selected papers of Laser Florence 2015*, Medimond, Bologna. 1, p. 5-9, 2016.

PINHEIRO, A. L. B. Evolução histórica e classificação dos lasers. In: *Lasers na Odontologia Moderna*. São Paulo: Pancast, p.19, 1998.

PINHEIRO, A. L. B.; NASCIMENTO, S. C.; VIEIRA, A. L. B.; ROLIM, A. B.; SILVA, P.S.; BRUGNERA Jr A. A laserterapia não cirúrgica estimula células de carcinoma de laringe? Um estudo “*in vitro*”. *Braz Dent J*, p.109-112, 2002.

PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; ZANIN, F. A. A. Aplicação do Laser na Odontologia, São Paulo: Ed Santos, P. 436, 2010.

PONZA, G. De l'influence de la lumière colorée dans le traitement de la folie. *Annales Medico-Psychologique*, Paris, v. 15, ser. 5, 1876.

RABELO, S. C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 7, p.2600-2607, 2011.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2010.

RADEMACHER, C.; MASEPOHL, B. Copper-responsive gene regulation in bacteria, *Microbiology* 158, p. 2451–2464, 2012.

RAMBO, M. K. D., SCHMIDT, F. L., FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta*. v. 144, p. 696-703, 2015.

RASMUSSEN, H.; SORENSEN, H.R.; MEYER, A.S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. *Carbohydrate Research*, n. 385, p. 45-57, 2014.

ROCHA GJM, GONÇALVES AR, OLIVEIRA BR, OLIVARES EG, ROSSELL, CEV. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind Crop Prod*. 35: p. 274- 279, 2012.

RODRIGUES, C. ; WOICIECHOWSKI A.L. ; LETTI, L. A. J. ; KARP, S. G. ; GOELZER, F. ; SOBRAL, K. C. A. ; CORAL, J.D. ; CAMPIONI, T. S. ; MACENO, M. A. C. ; SOCCOL C. R. Materiais Lignocelulósicos como Matéria-Prima para a obtenção de Biomoléculas de Valor Comercial. In: Rodrigo Ribeiro Resende. (Org.). BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES- Materiais Lignocelulósicos como Matéria-Prima para a obtenção de Biomoléculas de Valor Comercial. 1ed.São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 4, p. 283-313, 2016.

ROSA, M.F., BEZERRA, F.C., ARAÚJO, F.B.S NORÕES, E.R.V. Utilização do pó de coco verde na germinação de alface hidropônico. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.19, n. 2, p. 294, jul. 2001. Suplemento ref. 545. Edição de resumos do XLI Congresso Brasileiro de Olericultura, Brasília, DF, jul. 2002.

SADHU, S.; MAITI, T.K. Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal*, v. 3, p. 235-258, 2013.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v. 40, p.

3693-3700, 2005.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv. Mar –Apr*; 27 (2): p. 185-194, 2009.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, Índia, p.19-27, 2012.

SCHNETZLER, J. S. De l'influence de la lumière sur le développement des larves des grenouilles. *Archives des sciences Physiques et naturelles*, Geneva, v. 51, p. 247- 258, 1874.

SHIMIZU F. L. Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em microbiologia aplicada do Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, p. 38, 2018.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de análise microbiológica de alimentos. São Paulo, 1997. P. 207, 2007.

SOCCOL, C.R., VANDENRBERGHE, P.S.L., MEDEIROS, A.B.P, KARP, S.G., BUKERIDGE, M., RAMOS, L.P., PITARELO, A.P., LEITÃO-Ferreira, V., GOTTSCHALK, L.M.F., FERRARA, M.A. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspective in Brazil. *Biosource Technology* 101, p. 4820-4825, 2010.

SOUSA A. P.C.; SANTOS J.N.; REIS J. A. J.; RAMOS T. A.; SOUZA J.; CANGUSSÚ M. C. T., et al. Effect of LED phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 28(4): p. 547-52, 2010.

SUKUMARAN, R.K., SINGHANIA, R.R., MATHEW, G.M., PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy.* v.34, p. 421-424, 2009.

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

SUN, N.; RODRIGUEZ, H.; RAHMAN, M.; ROGERS, R. D. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? *Chemical Communications*, v. 47, p. 1405-1421, 2011.

UEDA, M.; GOTO, T.; NAKAZAWA, M.; MYTAKE, K.; SAKAGUCHI, M.; INOWEYE, K. A novel cold-adapted cellulase complex from *Eisenia foetida*: Characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulose, β -glucosidase, β 1,3 glucanase and β -xylosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part B.157: p.26-32, 2010.

VALENTE, B. S.; XAVIER, E. G.; MORSELLI, T. B. G. A.; JAHNKE, D. S.; BRUM Jr, B. de S.; CABRERA, B. R.; MORAES, P. de O.; LOPES, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. *Arch Zootec.* p.1-3, 69, 2009.

VAN AKEN, B. e AGTHOS, S. N. Implications of manganese (III), oxalate, and oxygen in the degradation of nitroaromatic compounds by manganese peroxidase (MnP). *Advances in Applied Microbiology*, v. 58, p.345-351, 2002.

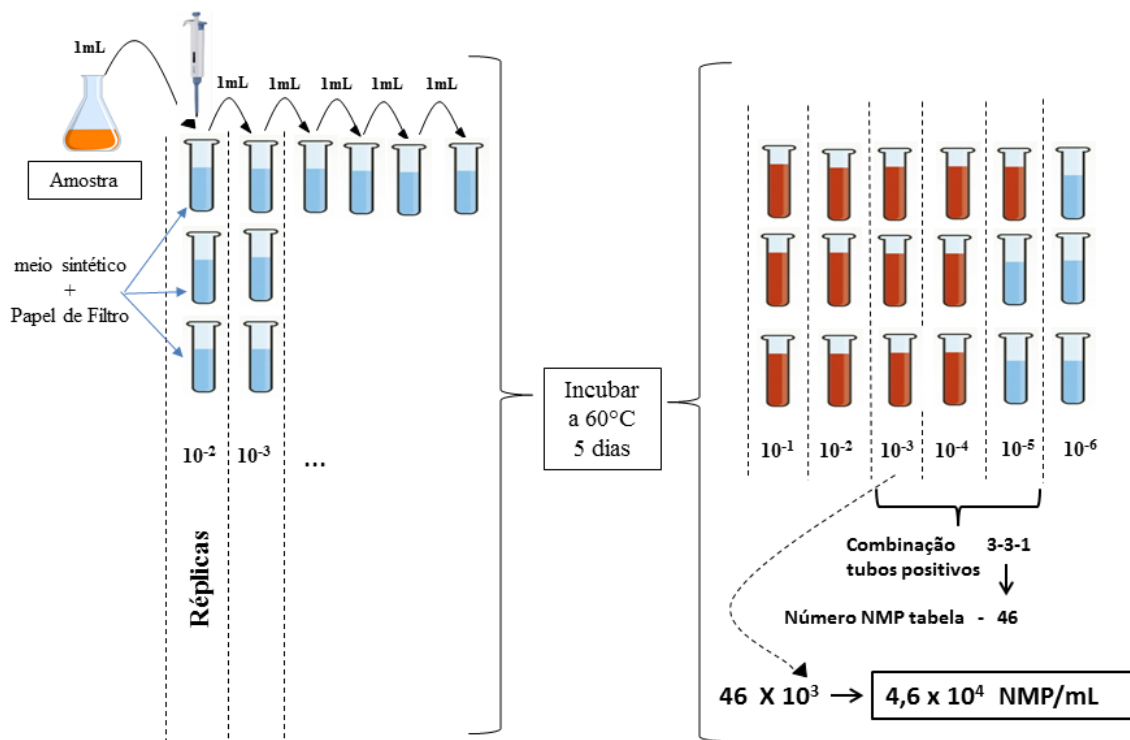
- VARNAI, A., SIIKA, M., VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicelulose. *Enzyme and Microbial Technology* 46:185-193, 2010.
- VASCONCELOS, N.M. de, PINTO, G.A.S., ARAGÃO, F.A. de S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. *Bol. Pesquisa e Desenvolvimento* 88, Embrapa, p. 10-22, 2013.
- VINCK, E.; CAGNIE, B. J.; CORNELISSEN, M. J.; DECLERCQ, H. A.; CAMBIER, D. C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiations. *Lasers in Medical Science*, London, v. 18, n. 2, p. 95-99, 2003.
- WANG, W.; WILDES C. P.; PATTARABANJIRD, T.; SANCHEZ, M. I.; GLOBER, G. F.; MATTHEWS, G. A.; TYE, K. M.; TING, A. Y. A light- and calcium-gated transcription factor for imaging and manipulating activated neurons, *Nat Biotechnol.*35, p.864-871, 2017.
- WOOD, P.J.; TEATHER, R.M. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* v.43, p.777-780, 1982.
- WOOD T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. In: *Methods in Enzymology*, New York, v. 160, p. 3-11, 1988.
- WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Em *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, cap. 43, 2005.
- YU. VLADIMIROV A. et al. Princípios fotobiológico de aplicações terapêuticas de radiação laser. *Bioquímica Moscou - Volume 69, Number 1 /Janeiro de 2004.*
- YU et al. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*, v. 18, p. 793–802, 2007.
- ZHANG, S., KESHWANI, D. R., XU, Y., HANNA, M. A., “Alkali Combined Extrusion Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzyme Saccharification” *Industrial Crops and Products* v. 37, pp. 352-357, 2012.
- ZHANG, Y. P., LYND, L.R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnology and Bioengineering*, Hanover, v. 88, n. 7, p.797-824, 2004.
- ZHOU J.; WANG Y.H.; CHU J.; ZHUANG Y.P.; ZHANG S.L.; YIN P. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresour Technol*, 99: p. 6826–6833, 2008.

APÊNDICE A – Procedimento de Leitura e cálculo do NMP

Para o cálculo do NMP:

- 1- Ver combinação dos 3 últimos tubos positivos;
- 2- Procura o valor do NMP na tabela;
- 3 – Multiplicar pelo fator de diluição referente ao antepenúltimo da combinação dos três tubos positivos.

Figura 1. Esquema representativo do NMP



Fonte: Adaptada (INGRAHAM, 2011)¹.

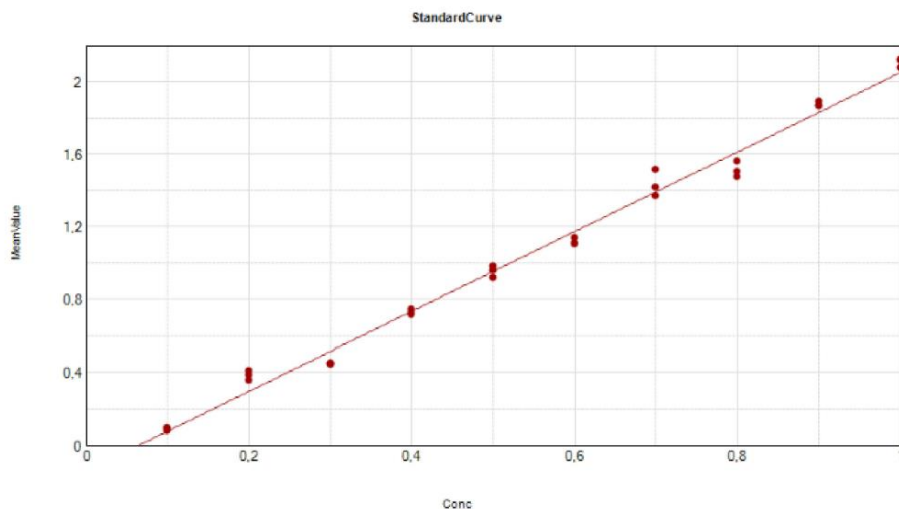
¹INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A. Introdução à microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de casos. **Cengage Learning**, 2011.

APÊNDICE B - Curva de calibração co solução padrão de D-glucose

Dados obtidos na análise através do aparelho Molecular Devices Spectramax 190 Microplate Reader, em triplicata:

Sample	Well	Concentration mg/mL	Values	MeanValue	Std.Dev.	CV%
01	D1	1.000	2.114	2.103	0.024	1.164
	E1		2.120			
	F1		2.075			
02	A2	0.900	1.888	1.873	0.013	0.678
	B2		1.865			
	C2		1.866			
03	A3	0.800	1.559	1.512	0.044	2.879
	B3		1.474			
	C3		1.502			
04	A4	0.700	1.371	1.434	0.075	5.196
	B4		1.516			
	C4		1.416			
05	D5	0.600	1.135	1.115	0.018	1.653
	E5		1.100			
	F5		1.108			
06	A6	0.500	0.958	0.952	0.032	3.357
	B6		0.980			
	C6		0.917			
07	A7	0.400	0.717	0.728	0.013	1.836
	B7		0.743			
	C7		0.724			
08	A8	0.300	0.450	0.446	0.004	0.807
	B8		0.443			
	C8		0.446			
09	A9	0.200	0.383	0.382	0.025	6.424
	B9		0.406			
	C9		0.357			
10	A10	0.100	0.091	0.088	0.006	7.305
	B10		0.093			
	C10		0.081			

Group Blank = 0.226



Curve Fit Results ▲

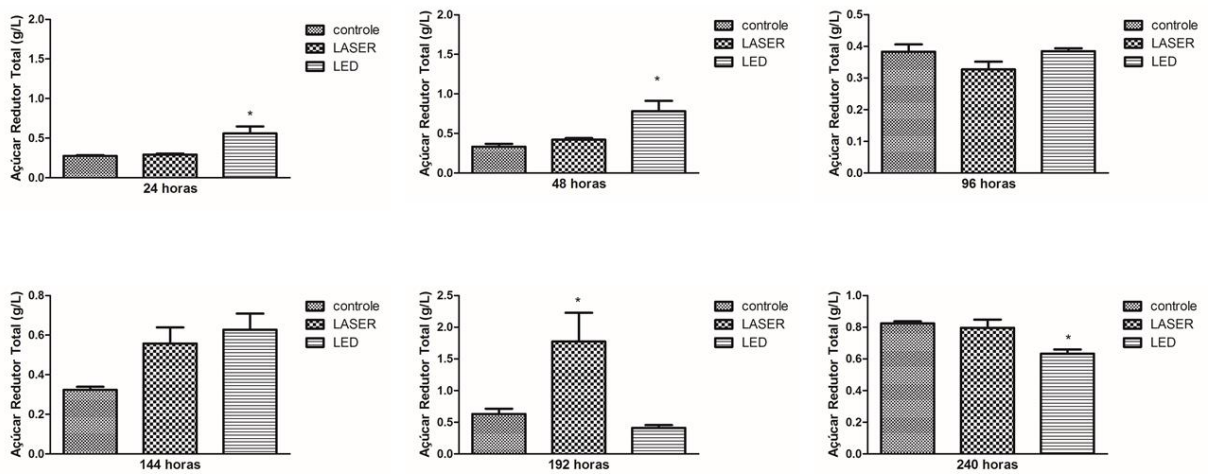
Curve Fit : Linear $y = A + Bx$

	Parameter	Estimated Value	Std. Error	Confidence Interval
Std $R^2 = 0.990$	A	-0.143	0.026	[-0.195, -0.090]
	B	2.192	0.041	[2.108, 2.277]

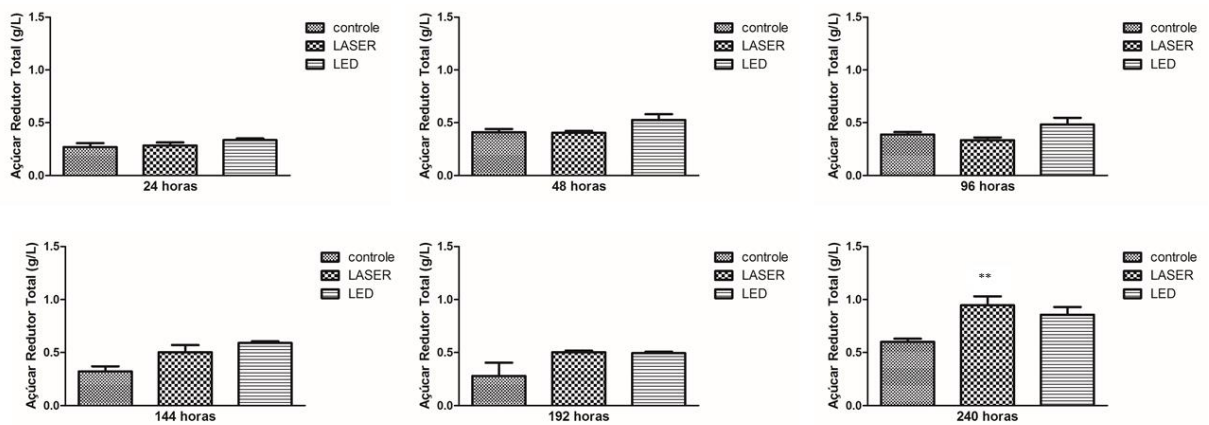
APÊNDICE C – Análise ANOVA com o teste de Tukey, 95% de confiança dos ART pelo método DNS dos substratos em estudo.

Substrato Pré-tratado por Solução de NaOH 5%

NaOH 5%
DNS

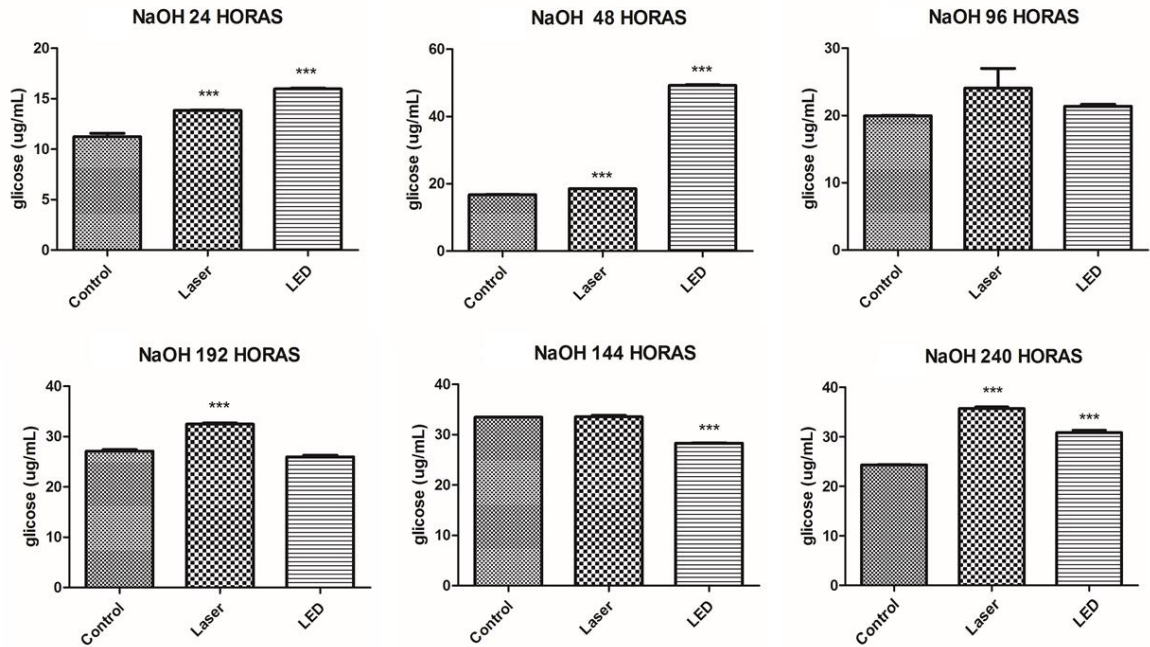


Substrato Pré-tratado por Solução de KOH 5%

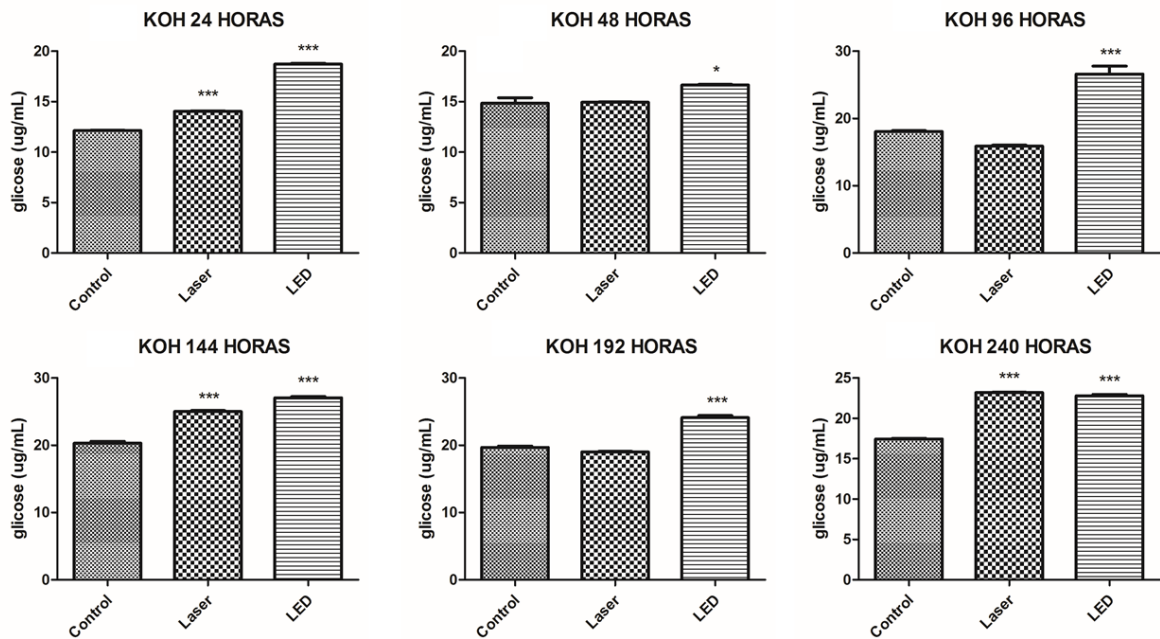


APÊNDICE D – Análise ANOVA com o teste de Tukey, 95% de confiança da concentração de glicose por HPLC.

Substrato Pré-tratado por Solução de NaOH 5%



Substrato Pré-tratado por Solução de KOH 5%



ANEXO A - Tabela utilizada de NMP para determinação de resultados

Tabela 1 – Número mais provável-NMP e intervalo de confiança a nível de 95% de propabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada 1 – 0,1- 0,01 g ou mL.

Combinação dos tubos +			NMP/g ou NMP/mL	Intervalo de confiança 95%		Combinação dos tubos +			NMP/g ou NMP/mL	Intervalo de confiança 95%	
				mínimo	máximo					mínimo	máximo
0	0	0	<0,3	–	0,95	2	2	0	2,1	0,45	4,2
0	0	1	0,3	0,02	0,96	2	2	1	2,8	0,87	9,4
0	1	0	0,3	0,02	1,10	2	2	2	3,5	0,87	9,4
0	1	1	0,6	0,1	1,8	2	3	0	2,9	0,87	9,4
0	2	0	0,6	0,1	1,8	2	3	1	3,6	0,87	9,4
0	3	0	0,9	0,4	3,8	3	0	0	2,3	0,46	9,4
1	0	0	0,4	0,0	1,8	3	0	1	3,8	0,87	11
1	0	1	0,7	0,1	1,8	3	0	2	6,4	1,7	18
1	0	2	1,1	0,4	3,8	3	1	0	4,3	0,9	18
1	1	0	0,7	0,1	2,0	3	1	1	7,5	1,7	20
1	1	1	1,1	0,4	3,8	3	1	2	12	3,7	42
1	2	0	1,1	0,4	4,2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1,5	0,5	4,2	3	2	0	9,3	1,8	42
1	3	0	1,6	0,5	4,2	3	2	1	15	3,7	42
2	0	0	0,9	0,1	3,8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1,4	0,4	4,2	3	2	3	29	9	0,1
2	0	2	2,0	0,5	4,2	3	3	0	24	4,2	0,1
2	1	0	1,5	0,4	4,2	3	3	1	46	9	0,2
2	1	1	2,0	0,5	4,2	3	3	2	110	18	0,41
2	1	2	2,7	0,9	9,4	3	3	3	>110	42	–

Fonte: Retirado (MONTES, 2015)¹.

¹MONTES, D. Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas de campos de petróleo como método de monitoramento de Bactérias Redutoras de Sulfato- BRS. Dissertação de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências e Saúde da Universidade Federal da Bahia, p.121, 2015.

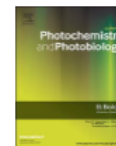
ANEXO B – Artigo Publicado

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 181 (2018) 115–121



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Photobiological effect of Laser or LED light in a thermophilic microbial consortium



Pedro Jorge Louro Crugeira^a, Gustavo M. Pires-Santos^a, Susana C.P.S. de Oliveira^a,
Fernando José Pires Sampaio^a, Neandder Andrade Correia^a, Sandra R.C. de A. Fagnani^a,
Fabio Alexandre Chinalia^b, Paulo Fernando de Almeida^c, Antônio L.B. Pinheiro^{a,d,e,*}

^a Center of Biophotonics, Federal University of Bahia, 62, Araújo Pinho Ave, Canela, Salvador, BA 40110-150, Brazil

^b Department of Biotinteraction, Institute of Health Science, Federal University of Bahia, Rector Miguel Calmon Ave, S/N, Salvador, BA 40110-100, Brazil

^c Laboratory of Biotechnology and ecology of microorganism, Institute of Health Science, Federal University of Bahia, Rector Miguel Calmon Ave, S/N, Salvador, BA 40110-100, Brazil

^d National Institute Basic Optics and Applied to Life Sciences, 400, Trabalhador São-Carlense Ave, Parque Arnold Schmidt, São Carlos, SP 13566-590, Brazil

^e Biomedical Engineering PhD Program, Brazil University, 235, Carolina Fonseca St, Itaquera, São Paulo, SP 08230-030, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Lignocellulosic biomass
Photobiotstimulation
Thermo-cellulolytic-consortium
Enzymatic-activity
Light

ABSTRACT

Cellulose has a highly diversified architecture and its enzymatic complexes are studied for achieving an efficient conversion and a high level of efficiency in the deconstruction of cellulolytic biomass into sugars. The aim of this investigation was to evaluate the effect of Laser or LED light in the cellulolytic activity (CMCase) and on the proliferation of the thermophilic microbial consortium used on the degradation process of a lignocellulosic biomass of green coconut shell. The irradiation protocol consisted of six Laser irradiations (λ 660 nm, 40 mW, 270 s, 13 J/cm^2) or LED (λ 632 \pm 2 nm, 145 mW, 44 s, 13 J/cm^2) with 12-h time intervals in nutrient deprivation conditions. After irradiation, the consortium was inoculated into a lignocellulosic biomass (coconut fibers). Non-irradiated consortium was also inoculated and acted as control. Cell proliferation and endoglucanase activity were quantified during the experimental time. Experiments were carried out in triplicate. The results showed an increase of 250 % of thermo-cellulolytic microorganisms for the LED group and 200% for the Laser group when compared to the control. The enzymatic index (red Congo method), showed a statistically significant difference in the process of degradation of the lignocellulosic biomass between the Laser and LED groups compared to the control group [$p < 0.0029$; $p < 0.029$, respectively] 48-hs after the inoculation of the microorganisms. At the end of 72-h, this significant difference was maintained for both irradiated groups ($p < 0.0212$). Based upon the protocol used on the present study, it is possible to concluded that LED light enhanced cell proliferation of the thermophilic microbial consortium while the Laser light increase the enzymatic index of the lignocellulosic biomass of green coconut shell.

1. Introduction

The use of biomass, as a ready accessible raw material, indicates the need of developing biotechnological and biostimulatory processes that would allow greater cellulolytic activity against the rigid and well-organized structure of cellulose where the degradation of lignocellulosic compounds is the great obstacle. Cellulose, even disaggregated with lignin and hemicellulose, may be highly diversified in its architecture; however, enzymatic complexes are being studied and produced to bring

synergistic action of a cellulolytic complex, constituted by cellulases, for the liberation of sugars, resulting in the final production of glucose, of great industrial interest. The degradation action and mechanism of operation of cellulases produced by bacteria are less well known than that of fungi. All cellulolytic bacteria secrete endoglucanases, with different properties and most demonstrate little activity in the crystalline structure of cellulose. Some exoglucanases have already been characterized, but only a minority acted synergistically with endoglucanase in the hydrolysis of the crystalline structure of cellulose [2].

ANEXO C – Artigo Publicado

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 191 (2019) 38–43



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Effects of photostimulation on the catabolic process of xenobiotics



Pedro Jorge L. Crugeira^a, Gustavo M. Pires Santos^a, Susana C.P.S. de Oliveira^a,
 Fernando José P. Sampaio^a, Sandra R.C.A. Fagnani^a, Igor C.F. Sampaio^b,
 Ederlan de Souza Ferreira^c, Fabio A. Chinalia^d, Antônio L.B. Pinheiro^{a,e,f,*},
 Paulo Fernando de Almeida^b

^a Center of Biophotonics, Federal University of Bahia, 62, Araújo Pinho Ave, Canela, Salvador, BA 40110-150, Brazil

^b Laboratory of Biotechnology and Ecology of Micro-organisms, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Reitor Miguel Calmon Ave, S/N, Salvador, BA 40110-100, Brazil

^c School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Barão de Jeremoabo street, Salvador, BA 40170-155, Brazil

^d Department of Biointeraction, Institute of Health Science, Federal University of Bahia, Reitor Miguel Calmon Ave, S/N, Salvador, BA 40110-100, Brazil

^e National Institute Basic Optics and Applied to Life Science, 400, Trabalhador São-Carlense Ave, Parque Arnold Schimidt, São Carlos, SP 13566-590, Brazil

^f Brazil University Scientific and Technological Institute, 235, Carolina Fonseca St, Itaquera, São Paulo, SP 08230-030, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Laser
 LED
 Microbial consortium
 RBBR

ABSTRACT

Light biotechnology is a promising tool for enhancing recalcitrant compounds biodegradation. Xenobiotics can cause a significant impact on the quality of the results achieved by sewage treatment systems due to their recalcitrance and toxicity. The optimization of bioremediation and industrial processes, aiming to increase efficiency and income is of great value. The aim of this study was to accelerate and optimize the hydrolysis of Remazol Brilliant Blue R by photo stimulating a thermophilic bacterial consortium. Three experimental groups were studied: control group; LED Group and Laser Group. The control group was exposed to the same conditions as the irradiated groups, except exposure to light. The samples were irradiated in Petri dishes with either a Laser device ($\lambda 660$ nm, CW, $\theta = 0.04$ cm², 40 mW, 325 s, 13 J/cm²) or by a LED prototype ($\lambda 632 \pm 2$ nm, CW, $\theta = 0.5$ cm², 145 mW, 44 s, 13 J/cm²). We found that, within 48-h, statistically significant differences were observed between the irradiated and the control groups in the production of RNA, proteins, as well as in the degradation of the RBBR. It is concluded that, both Laser and LED light irradiation caused increased cellular proliferation, protein production and metabolic activity, anticipating and increasing the catabolism of the RBBR. Being the economic viability a predominant aspect for industrial propose our results indicates that photo stimulation is a low-cost booster of bioprocesses.

1. Introduction

Xenobiotics can cause a significant impact on the quality of the results achieved by sewage treatment systems due to their recalcitrance and toxicity. Some of such compounds are associated to bioaccumulation events and/or similar potential impact to human health [1].

Micro-organisms may be used for bioremediation [2] as they are capable, under specific environmental conditions, to destroy harmful xenobiotics or can use of them as energy sources [3]. Sometimes a sole micro-organism is unable to carry out all metabolic processes required for the degradation of a xenobiotic compound, in such case, a microbial consortium is a choice as bioremediation requires optimal conditions for an adequate metabolic functioning of some micro-organisms [4]. In

this case, a group of micro-organism work together allowing that dead end products from one of them being further degraded by another one [3]. The optimization of the catabolic process makes bioremediation more effective in the mitigation of environmental impacts.

Metalloproteins, such as the ones in the phenoloxidase enzyme system, are redox mediating agents with oxide-reduction potential are widely distributed among living beings and includes lignolytic microbial enzymes such as laccases, lignin peroxidase-LiP and manganese peroxidase-MnP [5].

The most studied micro-organisms as lignin biodegraders in the nature are the fungi of the *Basidiomycetes* group and with regards to the degradation of xenobiotics, in general, it is the *Phanerochaete chrysosporium* [6]. However, bacteria have also been used in remediation

ANEXO D – Pedido Nacional de Invenção – INPI



29/04/2016 870160016722

16:25



00.000.2.2.16.0329640.3

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 009759 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 12

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PRODUTO BIOTECNOLÓGICO PARA APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO FOTOESTIMULADO E CATALIZADORES PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS, FERTILIZANTES, INSETICIDAS E RAÇÃO ANIMAL

Resumo: Refere-se a presente patente de invenção de um produto constituído de consórcio microbiano ou cepas isoladas, termo-celulolítico ou qualquer outro que são fotoestimulados por luz monocromática nos espectros visível e invisível, complementado com minerais e uréia, proporcionando a aceleração e eficácia da degradação de resíduos lignocelulósicos ou outros, em bioprocessos para obtenção de ração, compostos químicos e fertilizantes de forma sustentável e econômica, através do aumento da atividade e desempenho microbiano no processo.