



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



JUSSARA MARIA MARTINS DE ALMEIDA AFONSO

**PRODUÇÃO DE FOSFATASES ÁCIDAS POR *Trichoderma*  
*harzianum* EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA**

Uberlândia

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



JUSSARA MARIA MARTINS DE ALMEIDA AFONSO

**PRODUÇÃO DE FOSFATASES ÁCIDAS POR *Trichoderma harzianum***  
**EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Miriam Maria de Resende

Uberlândia

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A257<br>2022 | <p>Afonso, Jussara Maria Martins de Almeida, 1994-<br/>Produção de fosfatases ácidas por cepas de <i>Trichoderma</i><br/>spp. em fermentação sólida [recurso eletrônico] /<br/>Jussara Maria Martins de Almeida Afonso. - 2022.</p> <p>Orientadora: Miriam Maria de Resende.<br/>Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de<br/>Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química.<br/>Modo de acesso: Internet.<br/>Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.219">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.219</a><br/>Inclui bibliografia.<br/>Inclui ilustrações.</p> <p>1. Engenharia química. I. Resende, Miriam Maria de,<br/>1971-, (Orient.). II. Universidade Federal de<br/>Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. III.<br/>Título.</p> <p>CDU: 66.0</p> |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química  
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

|                                    |                                                                                                                            |                 |       |                       |       |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Engenharia Química                                                                                                         |                 |       |                       |       |
| Defesa de:                         | Mestrado Acadêmico, 10/2022, PPGEQ                                                                                         |                 |       |                       |       |
| Data:                              | 18 de julho de 2022                                                                                                        | Hora de início: | 08:00 | Hora de encerramento: | 10:50 |
| Matrícula do Discente:             | 12022EQU008                                                                                                                |                 |       |                       |       |
| Nome do Discente:                  | Jussara Maria Martins de Almeida Afonso                                                                                    |                 |       |                       |       |
| Título do Trabalho:                | Produção de fosfatases ácidas por <i>Trichoderma harzianum</i> em fermentação sólida                                       |                 |       |                       |       |
| Área de concentração:              | Desenvolvimento de Processos Químicos                                                                                      |                 |       |                       |       |
| Linha de pesquisa:                 | Engenharia Bioquímica                                                                                                      |                 |       |                       |       |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais |                 |       |                       |       |

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: José Roberto Delalibera Finzer - PPGEQ/Unube; Eloizio Júlio Ribeiro - FEQUI/UFU; Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU e Miriam Maria de Resende - PPGEQ/UFU, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Miriam Maria de Resende, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Souza Ferreira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/07/2022, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Maria de Resende, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/07/2022, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Delalibera Finzer, Usuário Externo**, em



18/07/2022, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eloizio Julio Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/07/2022, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3734680** e o código CRC **D07CAC87**.

JUSSARA MARIA MARTINS DE ALMEIDA AFONSO

**Produção de fosfatases ácidas por *Trichoderma harzianum* em  
fermentação sólida**

Trabalho de Dissertação apresentado ao  
Programa de Pós- Graduação em Engenharia da  
Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
mestre em Engenharia Química.

Banca Examinadora:

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Miriam Maria de Resende**

Orientadora (PPGEQ/UFU)

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Souza Ferreira**

(PPGEQ/UFU)

---

**Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer**

(PPGEQ/UNIUBE)

---

**Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**

(PPGEQ/UFU)

Uberlândia

2022

*A todos aqueles que superam desafios e  
que conhecem o significado da palavra  
determinação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma na concretização deste trabalho, em especial:

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha existência e pelas oportunidades concedidas por Ele ao longo da minha vida.

Aos meus pais José Ronildo e Edina, pilares da minha formação como ser humano. Sou grata pelo incentivo aos estudos e pelo apoio incondicional.

Às minhas queridas irmãs Cinthia (*in memoriam*), cuja presença foi essencial na minha vida e Sabrina, pelo carinho e apoio.

Ao meu esposo Gustavo, que além de cuidar da manutenção do lar enquanto eu permanecia ocupada com este projeto, foi capaz de me incentivar todos os dias.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Miriam Maria de Resende, cuja dedicação, incentivo e paciência serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho. Grata por tudo.

Aos funcionários da FEQUI/UFU e colegas do NUCBIO pela atenção, conversas diárias e auxílio em questões técnicas.

Agradeço a todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais FAPEMIG pela bolsa de estudos concedida durante a pesquisa.

E a todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para minha conquista.

Muito obrigada.

“A ciência é mais que um corpo de conhecimento, é uma forma de pensar, uma forma cética de interrogar o universo, com pleno conhecimento da falibilidade humana.”

(CARL SAGAN)

## RESUMO

A absorção de fósforo do ambiente e sua utilização eficiente exigem a atuação de uma grande classe de enzimas denominadas de fosfatases. Essas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, células animais e microrganismos. Os fungos são capazes de converter fósforo insolúvel em formas solúveis durante as etapas de acidificação e de quelação ou, ainda, por hidrólise mediada pelas enzimas fosfatases. De acordo com o seu pH ótimo de atividade, as fosfatases podem ser classificadas como fosfatase ácidas (ACPases), sendo que seu pH ótimo de atuação é inferior a 6,00. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou diferentes formas de cultivo e extração de fosfatases ácidas por meio de fermentação sólida (FES) utilizando o fungo *Trichoderma harzianum* e milho, farelo de trigo e farelo de soja como fontes de fosfatos. Os testes preliminares foram fundamentais para analisar o potencial de produção enzimática da cepa de *Trichoderma harzianum*, onde os melhores resultados foram para o milho utilizando fermentação sólida com as diferentes formas de cultivo e extração enzimática. Dessa maneira, por meio do Planejamento Composto Central, foi possível desenvolver equações de atividade da fosfatase ácida (U/mL) e biomassa seca (g/L) usando como parâmetros: massa de milho, concentração de inóculo e umidade. Os melhores resultados foram para a fermentação sólida, utilizando o substrato milho com cultivo em água destilada estéril e extração com Tween 80, havendo um crescimento de biomassa celular e de atividade enzimática, cujos valores finais médios foram de  $9,78 \pm 3,68$  g/L e  $36,67 \pm 12,24$  U/mL, respectivamente, após 9 dias de fermentação sólida.

**Palavras-chave:** Resíduos agroindustriais; fermentação sólida; biorreatores.

## ABSTRACT

The absorption of phosphorus from the environment and its efficient use require the action of a large class of enzymes called phosphatases. These enzymes are widely distributed in plants, animal cells and microorganisms. Fungi are able to convert insoluble phosphorus into soluble forms during acidification and chelation processes, or even by hydrolysis mediated by phosphatase enzymes. According to their optimal pH of activity, phosphatases can be classified as acid phosphatase (ACPases), where their pH is less than 6.00. In this context, the present work evaluated different forms of cultivation and extraction of acid phosphatases through solid fermentation (FES) and submerged fermentation (FSbm) using the fungus *Trichoderma harzianum* and millet, wheat bran and soybean meal as sources of phosphates. Preliminary tests were fundamental to analyze the enzyme production potential of the *Trichoderma harzianum* strain, the results were for the fermentation millet studied with the different forms of cultivation and the enzymatic selection. Thus, through Central Composite Planning, it was possible to develop equations for acid phosphatase activity (U/mL) and dry biomass (g/L) using as parameters: millet mass, inoculum, and moisture. The best results were for the solid fermentation, using the millet substrate with cultivation in sterile distilled water and extraction with tween 80, where there was a growth of cell biomass, and enzymatic activity, whose average final values were  $9.78 \pm 3.68$  g/L and  $36.67 \pm 12.24$  U/mL, respectively, after 9 days of solid fermentation.

**Keywords:** agro-industrial waste; solid fermentation; bioreactors.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMO.....                                                                                                      | i   |
| ABSTRACT .....                                                                                                   | ii  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                           | iii |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                           | iv  |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                               | 1   |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                    | 4   |
| 2.1.Fósforo (P).....                                                                                             | 4   |
| 2.2 Microrganismos solubilizadores de fósforo (P).....                                                           | 5   |
| 2.3 Modo de ação dos microrganismos solubilizadores de fósforo.....                                              | 6   |
| 2.4 Fosfatases – Visão geral .....                                                                               | 7   |
| 2.4.1. Fosfatases ácidas .....                                                                                   | 9   |
| 2.4.2. Produção de fosfatases ácidas por microrganismos .....                                                    | 10  |
| 2.4.3. Utilização das fosfatases.....                                                                            | 13  |
| 2.5. Processos fermentativos para a produção de enzimas .....                                                    | 14  |
| 2.5.1. Fermentação sólida (FES) .....                                                                            | 15  |
| 3 Metodologia .....                                                                                              | 17  |
| 3.1.Microrganismos.....                                                                                          | 17  |
| 3.2.Preservação dos microrganismos em de discos de papel e armazenamento sílica-gel.....                         | 18  |
| 3.3.Ativação dos microrganismos .....                                                                            | 20  |
| 3.4.Determinação da umidade ( <i>h</i> ).....                                                                    | 21  |
| 3.7.Determinação da concentração celular (biomassa seca) em fermentação sólida .....                             | 24  |
| 3.7.1.Contagem do Número de conídios em Câmara de Neubauer.....                                                  | 25  |
| 3.8.Determinação do pH.....                                                                                      | 27  |
| 3.9.Ensaio enzimático.....                                                                                       | 27  |
| 3.10 Delineamento Composto Central (DCC).....                                                                    | 28  |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....                                                                                  | 29  |
| 4.1.Fermentação em estado sólido (FES).....                                                                      | 35  |
| 4.3.Delineamento Composto Central (DCC) em fermentação sólida (FES).....                                         | 36  |
| 4.3.1 Avaliação da atividade da fosfatase ácida (ACPase) pelo DCC .....                                          | 37  |
| 4.3.2 Avaliação da atividade da biomassa seca pelo DCC .....                                                     | 43  |
| 4.3.3. Análise conjunta das repostas da atividade da fosfatase ácida (ACPase) e da concentração de biomassa..... | 62  |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 4.3.4. Validação do modelo nas condições otimizadas..... | 64 |
| 5 CONCLUSÃO .....                                        | 65 |
| 6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....                   | 59 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                          | 66 |
| APÊNDICE 1.....                                          | 67 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Representação esquemática dos processos fisiológicos e químicos que influenciam a disponibilidade de fósforo na rizosfera. Fonte: Richardson, (2001) .....                                                                      | 7  |
| Figura 2 – Reação catalisada pela ação da fosfatase. Fonte: Oliveira et al., 2017.....                                                                                                                                                     | 8  |
| Figura 3 – Ação das fosfatases sobre seus substratos, em que: ROP - substrato; E.ROP - complexo enzima-substrato; E-Pi - fosforil enzima; Pi - fósforo inorganico; APi - éster de fosfato; E - enzima livre (adaptado, Nakagi, 2007) ..... | 10 |
| Figura 3.1. Esquema das etapas realizadas no desenvolvimento experimental da pesquisa.....                                                                                                                                                 | 10 |
| Figura 3.2 – Materiais utilizados na preservação dos fungos. Fonte: (Lima et al., 2022) .....                                                                                                                                              | 17 |
| Figura 3.3 – (A) Preparo de suspensão com leite em pó a 10%. (B) Transferência de papel filtro picado para placas de Petri contendo suspensão de conídios. Fonte: (Lima et al., 2022) .....                                                | 19 |
| Figura 3.4 – Discos de papeis colonizados envolvidos em papel de filtro em frascos do tipo penicilina, contendo sílica-gel azul. Fonte: (Lima et al., 2022) .....                                                                          | 20 |
| Figura 3.5 – Fungo <i>Trichoderma harzianum</i> ativado em placa Petri. Fonte: da própria autora.....                                                                                                                                      | 21 |
| Figura 3.6 – Reatores estáticos na estufa BOD. Figura Fonte: da própria autora.....                                                                                                                                                        | 21 |
| Figura 3.7 – Caldo fermentado bruto. Fonte: da própria autora.....                                                                                                                                                                         | 24 |
| Figura 3.8 – Câmara de Contagem Neubauer. Fonte: da própria autora.....                                                                                                                                                                    | 26 |
| Figura 3.8.1 – Área dentro dos subcompartimentos vermelhos para contagem do número de conídios de <i>Trichoderma harzianum</i> – E1, E2, E3, E4, E5. Fonte: Embrapa, 2012.....                                                             | 26 |
| Figura 3.9 – Ensaio enzimático para atividade fosfatase ácida. Fonte: própria autora.....                                                                                                                                                  | 28 |
| Figura 4. Esquema das etapas realizadas no desenvolvimento experimental da pesquisa.....                                                                                                                                                   | 33 |
| Figura 4.1 – Atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) milho e farelo de trigo. Fonte: da própria autora.....                                                                                                                         | 40 |
| Figura 4.2 – Atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) milho, farelo de trigo e farelo de soja. Fonte: da própria autora.....                                                                                                         | 43 |
| Figura 4.3 – Atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) milho, farelo de trigo e farelo de soja. Fonte: da própria autora.....                                                                                                         | 44 |
| Figura 4.4 – Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para atividade da fosfatase ácida (ACPase).....                                                                                                                          | 43 |
| Figura 4.5 – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida (ACPase).....                                                                                                                                              | 44 |

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.6 – Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida (ACPase).....                            | 44 |
| Figura 4.7 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida em relação a umidade (%) e massa de milho (g).....                       | 45 |
| Figura 4.8 – Curva de contorno para a umidade (%) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida.....                  | 46 |
| Figura 4.9 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida em relação a concentração de inóculo (g/L) e massa de milho (g).....     | 46 |
| Figura 4.10 – Curva de contorno para concentração de inóculo (g/L) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida..... | 47 |
| Figura 4.11 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida em relação a concentração de inóculo (g/L) e umidade (%) .....          | 47 |
| Figura 4.12 – Curva de contorno para concentração de inóculo (g/L) e umidade (%) objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida.....        | 48 |
| Figura 4.13 – Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para biomassa seca.....                                                     | 49 |
| Figura 4.14 – Distribuição dos resíduos relativos à atividade de biomassa seca.....                                                            | 50 |
| Figura 4.15 – Valores preditos em relação aos observados para resposta de biomassa seca.....                                                   | 50 |
| Figura 4.16 – Superfície de resposta para biomassa seca em relação a umidade (%) e massa de milho (g).....                                     | 51 |
| Figura 4.17 – Curva de contorno para a umidade (%) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade de biomassa seca.....                   | 51 |
| Figura 4.18 – Superfície de resposta para biomassa seca em relação a inóculo (g/L) e massa de milho (g).....                                   | 53 |
| Figura 4.19 – Curva de contorno para a inóculo (g/L) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade de biomassa seca.....                 | 53 |
| Figura 4.20 – Superfície de resposta para biomassa seca em relação a inóculo (g/L) e umidade (%) .....                                         | 54 |
| Figura 4.21 – Curva de contorno para a inóculo (g/L) e umidade (%) objetivando a máxima atividade de biomassa seca.....                        | 54 |

---

## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 3.1 – Composição do meio Czapek, meio de cultivo utilizado para ativação dos conídios preservados.....                                                           | 18 |
| Tabela 4 – Matriz do delineamento composto central.....                                                                                                                 | 29 |
| Tabela 4.1 – FES para cultivo e extração enzimática com tampão acetato de sódio, utilizando o substrato milho e farelo de trigo.....                                    | 30 |
| Tabela 4.2 – FES para cultivo com água destilada e extração enzimática com tampão acetato de sódio, utilizando o substrato milho, farelo de trigo e farelo de soja..... | 32 |
| Tabela 4.3 – FES para cultivo com água destilada e extração enzimática com Tween 80, utilizando o substrato milho, farelo de trigo e farelo de soja.....                | 35 |
| Tabela 4.4 – Delineamento Composto Central com as variáveis estudadas e as respostas analisadas.....                                                                    | 37 |
| Tabela 4.5 – ANOVA dos fatores e suas interações para fosfatase ácida (ACPase).....                                                                                     | 41 |
| Tabela 4.6 – ANOVA dos fatores e suas interações para biomassa seca.....                                                                                                | 46 |
| Tabela 4.7 – Resultados obtidos para fermentação sólida com cultivo com água destilada e extração enzimática com Tween 80, utilizando o substrato milho.....            | 51 |

---

## 1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é fundamental no metabolismo de plantas e microrganismos, o nutriente apesar de estar presente nos solos tanto nas formas orgânicas como inorgânicas apresenta reduzida disponibilidade e limita o crescimento das plantas (Junior et al., 2019). Uma forma de se obter compostos fosfatados no solo é através da ação de enzimas denominadas fosfatases, que catalisam a hidrólise de ésteres fosfatados produzindo fósforo solúvel (Souza, 2011).

As fosfatases são hidrolases que se encontram amplamente distribuídas na natureza em diversas formas moleculares e utilizam como substratos os fosfoésteres. Podem ser classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, dependendo do seu pH de atuação.

A atividade da fosfatase ácida foi detectada em 1931, onde foi observado a presença de uma enzima em eritrócitos capaz de hidrolisar a ligação ésterfosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato com um pH ótimo entre 5,6 e 6,0; muito diferente da fosfatase encontrada nos glóbulos brancos, que apresentou atividade ótima com um pH de 8,8 a 9,0 a partir de então conhecida como fosfatase alcalina (Nakagi, 2007).

A enzima fosfatase ácida, secretada pelas raízes das plantas, é responsável pela retirada de grupamentos fosfato de fontes orgânicas no solo, aumentando a absorção a partir de recursos de fósforo não imediatamente disponíveis (Silva, 2020). Diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos, possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (Souchie et al., 2006).

Esses microrganismos solubilizam o fosfato insolúvel na forma solúvel. Esses micróbios solubilizadores de P excretam ácidos inorgânicos, ácidos orgânicos e fosfatase para dissolver o fósforo. Contudo, os mecanismos de P-solubilização não diferem apenas entre isolados de fungos, mas também dependem das fontes de P aplicadas (Souchie et al., 2006).

De acordo com Souza (2011), os microrganismos seriam as fontes mais expressivas de fosfatases no solo, devido a sua grande biomassa, à alta atividade metabólica e ao curto tempo de vida, com várias gerações, permitindo, assim, a produção e a liberação de quantidades elevadas de enzimas extracelulares, quando comparados com as plantas. Estudos mostram que o fungo *Trichoderma* sp. é um bioagente altamente desejável com potencial duplo para biocontrole, promoção de crescimento vegetal e capacidade de produzir e secretar fosfatase ácida (Zhao et al., 2017).

*Trichoderma* spp. são fungos que pertencem a divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, da ordem Hypocreales e família Hypocreaceae. Encontra-se representado num número importante de solos naturais, tanto de origem florestal, como de outros substratos

orgânicos cujo componente principal seja a lignina ou a celulose. O gênero *Trichoderma* conta com mais de 30 espécies diferentes, mais de 100 subespécies, das quais mais de 400 cepas estão depositadas em organismos oficiais. As espécies mais amplamente representadas, por causa das suas qualidades, são *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma pubescens*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma virens* e *Trichoderma viride* (Lima et al., 2022).

O fungo *Trichoderma harzianum* é uma das espécies mais estudadas e utilizadas no controle biológico de diversos fungos e nematóides patogênicos que causam prejuízos na agricultura (Lima et al., 2017). Este fungo foi destacado como um potente agente fertilizante, dada a sua capacidade de induzir a absorção e fornecer fosfato solúvel no solo (Kapri e Tewari, 2010).

Dessa forma, a vantagem do uso de fungos é relacionada ao seu cultivo, uma vez que é possível utilizar resíduos ou subprodutos agroindustriais como substratos (Kreling et al., 2020). Esta abordagem é considerada uma tecnologia verde, pois esses resíduos que têm pouco ou nenhum valor comercial podem causar impactos ambientais negativos se gerenciados de maneira inadequada (Sadh et al., 2018). Além disso, o uso destes resíduos e subprodutos agroindustriais na composição do meio de cultura permite a valorização, contribuindo para o desenvolvimento de economia circular de processos com maior sustentabilidade (Nazari et al., 2020).

Nesse sentido, a biotecnologia pode ser uma ferramenta adequada para transformar os resíduos e subprodutos agroindustriais em matérias-primas para a produção de produtos de valor agregado. A fermentação em estado sólido (FES) é um processo com baixo impacto ambiental e baixo custo, que pode utilizar subprodutos agroindustriais diretamente sem pré-tratamento (Leite et al., 2020).

A produção de enzimas de interesse biotecnológico por microrganismos tem sido realizada utilizando-se dois tipos de processos: a Fermentação Submersa (FSbm) e a Fermentação em Estado Sólido (FES). As enzimas industriais de origem microbiana são produzidas, principalmente, por FSbm (Pandey et al., 2001). O processo de fermentação submersa consiste em introduzir o microrganismo em um meio líquido como inóculo. Neste processo, os fermentadores contêm o meio de crescimento, proporcionando agitação controlada, aeração, níveis de pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido, entre outros parâmetros (Gomes, et al. 2022).

O processo de FES é realizado em um substrato sólido com baixo teor de umidade, com as vantagens de uma alta concentração do produto, mas apenas uma energia relativamente baixa

sendo necessária (Ichimura et al., 2003). O conteúdo de água necessário em FES é absorvido pelo substrato em uma matriz sólida e oferece mais vantagens para o crescimento de microrganismos pela transferência de oxigênio (Robinson, et al., 2001). Esta técnica tem se mostrado vantajosa, pois, além de simular o hábitat natural de fungos selvagens (Hansen et al., 2015), apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH (Rodríguez Zúñiga et al., 2011).

A FES vem ganhando espaço entre as pesquisas, principalmente, para produção de enzimas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos, como por exemplo, celulases, endoglucanases, amilase, carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e pectinase, comumente presentes em resíduos agroindustriais, dentre eles: bagaço de cana de açúcar, farelo de soja, farelo de trigo, casca de café, incluindo as misturas entre estes substratos (Rodríguez Zúñiga et al., 2011, Gusmão et al., 2014).

Diante da relevância e do potencial de aplicação biotecnológica dessas fosfatases, esse presente estudo tem por objetivo avaliar a produção fosfatase ácida de *Trichoderma* spp. em fermentação sólida.

## **1.1 Objetivo geral**

O presente trabalho apresenta como objetivo o estudo da produção de fosfatases ácidas, por meio da fermentação sólida de milheto, farelo de trigo e farelo de soja, utilizando cepas de *Trichoderma harzianum*.

## **1.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da utilização de farelo de trigo, subproduto da soja e grãos como milheto, que são substratos de baixo custo para a produção de fosfatase ácida;
- Monitorar e controlar as variáveis umidade e concentração de inóculo, que estão diretamente ligadas no processo de produção de fosfatases ácidas;
- Avaliar métodos de extração da enzima produzida por meio da fermentação sólida;
- Realizar tratamento estatístico dos resultados obtidos na produção das fosfatases e comparar esses valores com os obtidos pela literatura, para verificação da viabilidade da produção dessa enzima nos substratos alternativos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordados temas pertinentes ao desenvolvimento do presente trabalho, iniciando a abordagem com o elemento fósforo (P), bem como os microrganismos solubilizadores de fósforo e o modo de ação desses microrganismos. Na sequência, apresenta-se uma revisão sobre produção de enzimas utilizadas na hidrólise destas biomassas oriundas de resíduos agroindustriais, dando ênfase à produção de fosfatases ácidas por fermentação em estado sólido por microrganismos.

### 2.1 Fósforo (P)

O fósforo (P) é um nutriente essencial para todas as formas de vida e é um dos principais macronutrientes para as plantas (Shao et al., 2020). O ciclo do P no solo envolve as plantas, os animais e os microrganismos. Incluem-se nesse sistema etapas de absorção pelas plantas, reciclagem pelos resíduos de plantas e animais, reciclagem biológica pelos processos de mineralização-imobilização, reações de sorção pelas argilas e óxidos e hidróxidos do solo e solubilização de fosfatos pela atividade de microrganismos e plantas (Klein et al., 2013).

O fósforo (P) é encontrado no solo em duas formas principais: inorgânica e orgânica. As formas de P inorgânico compreendem, principalmente, aquelas adsorvidas aos grupos funcionais dos colóides inorgânicos, por meio de ligações monodentadas, bidentadas e binucleadas, cuja energia de ligação com os colóides aumenta, nesta e na ordem inversa, a sua labilidade (Gatiboni et al., 2008).

As formas orgânicas de P (Po) representam os íons fosfatos ligados aos compostos orgânicos, sua labilidade está diretamente relacionada à suscetibilidade de decomposição do radical orgânico ao qual o fosfato está ligado. Assim, os fosfatos diésteres são bastante suscetíveis ao ataque microbiano e compõem o “pool” de P lábil do solo. No entanto, compostos que possuem alta carga elétrica residual, como os fosfatos monoésteres, são fortemente adsorvidos aos colóides inorgânicos e permanecem protegidos química e fisicamente do ataque microbiano (Gatiboni et al., 2008).

O P encontra-se na solução como íons ortofosfatos, forma derivada do  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . O P pode ser encontrado em formas inorgânicas e orgânicas, sendo que a orgânica aumenta com o aumento da matéria orgânica e com a diminuição do pH. A forma química do P no solo depende do pH, na faixa entre 4 e 8 predomina a forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , sendo esta a principal forma de absorção das plantas (Klein et al., 2013).

O P pode ainda ser encontrado nas seguintes condições: a) P fixado: encontra-se na forma inorgânica e está fortemente adsorvido ao solo, geralmente ligado ao Al, Fe e Ca dos minerais de argila; b) P solúvel: encontram-se na forma inorgânica, é disponível às plantas e está nas formas  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ; c) P orgânico: refere-se ao P ligado aos compostos orgânicos, como ácidos nucleicos, fosfolipídios etc. (Klein et al., 2013).

A disponibilidade de fósforo (P) no solo é um dos fatores mais limitantes para o crescimento das plantas e produtividade em ecossistemas naturais e agrícolas. Nas práticas agrícolas, milhões de toneladas de fertilizantes fosfatados são aplicados intencionalmente nos solos a cada ano para o crescimento das plantas. Para ser o mais eficaz, eficiente e ambientalmente favorável todos os fertilizantes fosfáticos devem permanecer disponíveis para as plantas perto da zona da raiz. Infelizmente, a grande porção de fosfatados inorgânicos solúveis os fertilizantes aplicados no solo são imobilizados rapidamente e ficam indisponíveis para as plantas (Lynch e Deikman, 1998).

## **2.2 Microrganismos solubilizadores de fósforo (P)**

No solo, o P está sujeito a diversos processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre estes processos, destaca-se a dissolução das formas pouco solúveis de P, tornando-as disponíveis para as plantas. Diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos, possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (Junior, et al. 2019).

O fósforo é aplicado ao solo na forma de fertilizantes fosfatados. No entanto, uma grande parte do fosfato inorgânico solúvel aplicado ao solo como fertilizante químico é imobilizado rapidamente e se torna indisponível para as plantas. Microrganismos estão envolvidos em uma série de mecanismos que afetam a transformação do P do solo e são, portanto, parte integrante do ciclo do solo P. Em particular, os microrganismos do solo são eficazes na liberação de P inorgânicos e orgânicos do P total do solo por solubilização e mineralização (Chen et al., 2006).

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos desempenham importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos (Ca-P, Al-P e Fe-P), considerando o aumento do teor de fósforo na solução, que propicia melhor crescimento e maior rendimento das culturas. O uso de microrganismos solubilizadores em inoculantes ou o manejo de suas populações no solo constituem alternativas para a melhoria do suprimento de fósforo para as plantas (Filho e Vidor, 2000).

A solubilização de fósforo por microrganismos pode ocorrer principalmente por dois mecanismos de ação sobre o meio. O primeiro é conhecido como mineralização, em que o fósforo é liberado em formas imediatamente assimiláveis pela atividade enzimática específica das enzimas fosfatases que hidrolisam o P-orgânico presente em fitatos, fosfolipídios e ácidos nucleicos (Nahas et al., 1990).

Os microrganismos envolvidos nos processos de solubilização do fósforo inorgânico excretam ácidos orgânicos e seus prótons associados, que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático, ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato. Para serem utilizados pelas plantas, as formas orgânicas de P são mineralizadas por microrganismos produtores de enzimas denominadas fosfatases e fitases, que catalisam a hidrólise de ésteres a anidridos de  $H_3PO_4$  (Junior e Mendes, 2003).

Vários grupos importantes da comunidade microbiana edáfica ou da rizosfera são capazes de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis, por meio de mecanismos diversos. Isso torna a solubilização de diferentes fontes de fósforo inorgânicos insolúveis (hidroxiapatita, fluorapatita, variscita, strengita, etc) em uma das principais alternativas sustentáveis para aumentar a disponibilidade deste nutriente as plantas. Os microrganismos utilizam-se de mecanismos como a produção e liberação de ácidos inorgânicos de baixo peso molecular que solubilizam formas precipitadas de fósforo, como fosfatos de ferro e alumínio nos solos ácidos e os fosfatos de cálcio em solos alcalinos, atuando como fontes de prótons ou na quelação do elemento acompanhante do íon fosfato (Marra et al., 2012).

Khan et al. (2013) revisaram o papel de fungos solubilizadores de fosfato em crescimento de plantas. Esses autores determinaram que os fungos têm a capacidade de solubilizar minerais para liberar P para aumentar o crescimento das plantas. Dado os impactos ambientais adversos dos fertilizantes químicos e sua crescente custos, o uso de fungos solubilizadores de fosfato é uma alternativa promissora para práticas agrícolas sustentáveis (Zhang et. al, 2013).

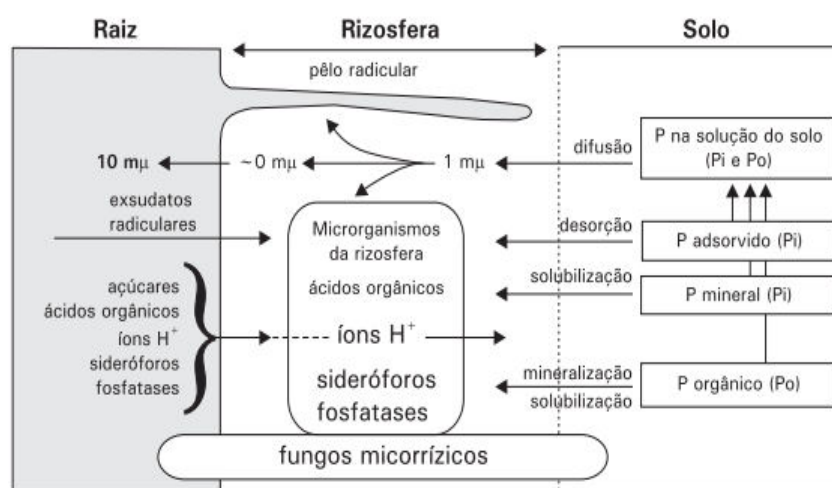
### **2.3 Modo de ação dos microorganismos solubilizadores de fósforo**

Os microrganismos podem agir de diferentes formas na disponibilização do fósforo para as plantas. Dentre essas formas, pode-se destacar a mineralização de formas orgânicas de fósforo para a solução no solo e a solubilização dos íons adsorvidos em partículas como descritos anteriormente. Mas também há os microrganismos que possuem o importante papel

de aumentar a superfície de contato dos pêlos radiculares das raízes, aumentando por consequência a absorção de nutrientes pelas plantas (Carvalho et al., 2003).

Esses microrganismos são os fungos micorrízicos que estão presentes na rizosfera das plantas e atuam criando associações com as mesmas através de hifas que penetram nos espaços intercelulares e intracelulares do córtex das raízes, assim se caracteriza uma relação de simbiose entre o fungo e a planta, em que são fornecidos carboidratos e nutrientes para o microrganismo, enquanto a planta se beneficia pela maior superfície de contato com o solo, que possibilita maior absorção de água e nutrientes (Carvalho et al., 2003).

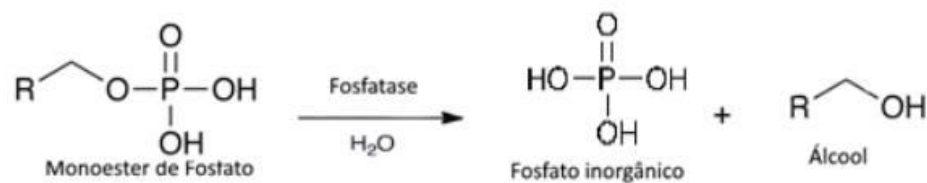
Pode-se observar na Figura 1, um esquema ilustrando a atuação dos microrganismos do solo nos processos de disponibilização de fósforo:



**Figura 1** - Representação esquemática dos processos fisiológicos e químicos que influenciam a disponibilidade de fósforo na rizosfera. Fonte: Richardson, (2001).

## 2.4 Fosfatases – Visão geral

Dentre as enzimas de interesse biotecnológico, pode-se citar as fosfatases (EC 3.1.3). Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas tanto em organismo procariotos quanto em eucariotos, sendo responsáveis por hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico liberando fosfato inorgânico (Figura 2). São descritos na literatura diferentes mecanismos de hidrólise e especificidades ao substrato de acordo com o pH ótimo da enzima (Ornela et al., 2017).



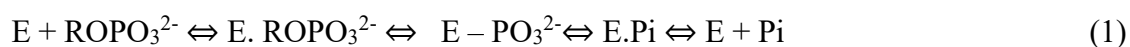
**Figura 2** - Reação catalisada pela ação da fosfatase. Fonte: Ornela et al., 2017.

As fosfatases estão divididas em dois grandes grupos de acordo com o pH ótimo de atuação: fosfatases alcalinas, com pH ótimo igual ou superior a 8,0 e fosfatases ácidas, com pH ótimo igual ou inferior a 6,0. Contudo, uma nova classificação já foi proposta para estas enzimas, na qual as fosfatases podem ser divididas em cinco grandes famílias: i) fosfatases alcalinas; ii) fosfatases ácidas de alta massa molecular; iii) fosfatases ácidas de baixa massa molecular; iv) fosfatases púrpuras e v) proteínas fosfatases (Guimarães et al., 2004).

As fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0 e utilizam como substratos compostos com baixa massa molecular (por exemplo, açúcares fosforilados). Contrastando com as fosfatases ácidas, as alcalinas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 9,0 e atuam em substratos de baixa massa molecular relativa. No entanto, há necessidade de íons divalentes, como magnésio, cobalto ou manganês, para catálise (Aoyama, et al., 2003).

Uma distinção vista em relação às fosfatases ácidas é o mecanismo de reação (Vicent, et al. 1992):

Fosfatase alcalina



Fosfatase ácida



As fosfatases púrpuras são metaloenzimas binucleares encontradas em organismos eucariotos e em algumas espécies de bactérias. A característica da cor púrpura quando estas enzimas são purificadas é resultado da transição e transferência de cargas causada por resíduos de tirosina coordenados a íons férricos (Tran et al., 2010).

As proteínas fosfatases são fosfotransferases que catalisam a transferência de grupos fosforil das cadeias laterais de aminoácidos previamente fosforilados para moléculas de água, com base na sua função, estrutura, sequência, especificidade, ativadores e inibidores. As

proteínas fosfatases podem ser agrupadas em dois grandes grupos: proteínas serina/treonina fosfatases e proteínas tirosinas fosfatases (Zhang, 2002). Segundo Dickman e Yarden (1999), essas enzimas se apresentam como elementos-chave na manutenção do equilíbrio celular, regulando várias reações reversíveis de fosforilação.

#### 2.4.1. Fosfatases ácidas

A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos, sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato em pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase alcalina de glóbulos brancos que catalisa essa reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0. Inicialmente a diferença entre as fosfatases ácidas e alcalinas era baseada somente no pH ótimo para a atividade enzimática (Jonsson et al., 2009).

Neuman (1968) observou que o mecanismo de reação era diferente para as duas enzimas, onde a fosfatase ácida requeria para a sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato. Chaimovich e Nome (1970) relataram a atividade das fosfatases ácidas com ausência de cátions mono e bivalentes no meio de reação, enquanto as fosfatases alcalinas requerem metais, principalmente  $Mg^{2+}$ , para sua atividade (Jonsson et al., 2009).

Esta enzima é secretada por plantas e microrganismos e sua atividade é responsável pela mobilização mais ativa ou apropriada de fontes orgânicas de P, catalisando a hidrólise de P a partir de fosfatomonoésteres ou fosfatodiésteres, podendo hidrolisar uma ampla gama de monoésteres de fósforo, com ótima atividade sob condições ácidas, aumentando a absorção da planta a partir de recursos de P não imediatamente disponíveis para absorção (Silva, 2020).

Em mamíferos, as fosfatases ácidas são classificadas em: alta massa molecular - AMM (80-200 KDa), sensíveis ao fluoreto e tartarato, resistentes ao formaldeído e reagente com grupo sulfidril e com resíduo de histidina no sítio ativo; baixa massa molecular - BPM (10-30 KDa), sendo inibidas por reagentes que bloqueiam o grupo sulfidril e formaldeído, enquanto que não é afetada pelo fluoreto e tartarato e enfim as de intermediária massa molecular - IPM (35-50 KDa) apresentam propriedades ora como as de BPM, ora as de APM (Naz et al., 2006).

As fosfatases ácidas ou ortofosfato mono éster fosfohidrolases (E.C.3.1.3.2.) são enzimas que se caracterizam pela hidrólise de uma grande variedade de ésteres de ortofosfato e reações de transfosforilação (Jonsson et al., 2009), como esquematizado a seguir:

Hidrólise:

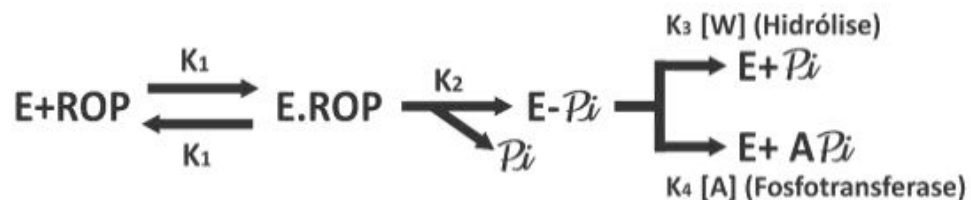


Transfosforilação:



\* aceptor com função álcool

As rotas reacionais da ação da fosfatase sobre seus substratos é mostrado de forma esquemática na Figura 3 (Nakagi, 2007). De acordo com o esquema, o substrato se liga ao sítio ativo da enzima formando o complexo enzima-substrato (E.ROP). A quebra do complexo promove a liberação do fosfato inorgânico (Pi) e do intermediário fosforilado E – Pi. Esta molécula pode sofrer hidrólise pela molécula de água (W) liberando o fósforo inorgânico (Pi) e a enzima livre. Também, se for adicionado ao meio de reação um aceptor (A), pode ocorrer a transferência de fosfato inorgânico formando assim, um novo éster de fosfato (APi), numa reação de transfosforilação.



**Figura 3** - Ação das fosfatases sobre seus substratos, em que: ROP - substrato; E.ROP - complexo enzima-substrato; E-Pi - fosforil enzima; Pi - fósforo inorgânico; APi - éster de fosfato; E - enzima livre (adaptado, Nakagi, 2007).

#### 2.4.2. Produção de fosfatases ácidas por microrganismos

Os microrganismos podem assimilar apenas fosfato dissolvido e, portanto, a atividade da fosfatase desempenha um papel fundamental na transformação do P da matéria orgânica do solo em formas disponíveis. As enzimas fosfatase são produzidas por bactérias, fungos e raízes de plantas e servem para clivar um grupo fosfato de seus substratos, transformando formas complexas e às vezes indisponíveis de P orgânico em fosfato assimilável. Assim, a produção de fosfatase depende de uma combinação de demanda de P das plantas e micróbios, substrato orgânico de P disponível e limitação de P do solo (Margalef, 2017).

As fosfatases têm sido estudadas em vários microrganismos, desde bactérias como, por exemplo, *Lactobacillus curvatus* (Magboul e Mcsweeney, 1999), *Mycobacterium tuberculosis* (Saleh e Belisle, 2000), porém um número considerável delas foram caracterizadas a partir de fungos como *Aspergillus* sp., *Humicola* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Metarhizium* sp.,

*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* (Guimarães et al., 2004; Haas et al., 1991; Aleksieva et al., 2003; Boyce e Walsh, 2007; Li et al., 2006; Leitão et al., 2010; Zhao et al., 2017).

Microrganismos como bactérias e fungos tem sido amplamente estudada por solubilizar fosfatos e desempenham um papel importante no fornecimento fósforo (P) às plantas. Em seus estudos, Behera et al (2017), demonstraram resultados satisfatórios na atividade solubilizante de fosfato da cepa *Serratia* sp. (PSB-37). Fosfatase ácida produzida por *Serratia* sp. tem várias aplicações, incluindo a promoção do crescimento de plantas.

Pereira e Castro (2014) investigaram o efeito de rizobactérias solubilizadoras de fosfato no crescimento de *Zea mays* em solo agrícola deficiente em P. Seus trabalhos indicaram as bactérias tem grande potencial para ser utilizadas como biofertilizante em solos deficientes em P, especialmente as *Pseudomonas* sp. EAV e *A. nicotinovorans* EAPAA, pois ambas aumentam muito a disponibilidade de P no solo.

A produção de fosfatase ácida extracelular pelo fungo *Penicillium implicatum* foi estudada em diferentes concentrações de fosfato no meio de cultivo e na presença e ausência de agitação por Nakagi et al. (2007). A purificação da enzima também permitiu conhecer melhor o mecanismo de produção da enzima pelo fungo, que é de fácil cultivo em laboratório.

Em recentes trabalhos, Oliveira et al., (2020) estudaram a produção, a purificação e caracterização da fosfatase e da fitase alcalina produzidas pelo fungo filamentoso *R.microsporus* var. *microsporus*. Os autores demosntaram que o fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* apresentou potencialidade na produção das enzimas fosfatases e fitases.

Microrganismo que merece destaque é o *Trichoderma harzianum*. Fungo saprofítico (obtêm os seus nutrientes a partir de substâncias orgânicas provenientes de matérias em decomposição) presente nos solos, comumente encontrado no bioma do cerrado brasileiro. Considerado como agente fertilizante, devido à sua capacidade de liberar, induzir a captação e fornecer fosfato solúvel no solo (Kapri e Tewari, 2010). Além disso, são capazes de colonizar raízes e folhas das plantas hospedeiras, promovendo alterações bioquímicas benéficas. Também, são responsáveis pela mineralizar nutrientes orgânicos (carbono, nitrogênio e fósforo) e indução de resistência a doenças causada por patógenos vegetais (Harman et al., 2004; Verma et al., 2007, Bader et al. 2019).

Produtos à base de *Trichoderma* podem apresentar três diferentes tipos de propágulos (Amsellem et al., 1999; Papavizas, 1985; Verma et al., 2007): micélio, conídios e clamidósporos. Os conídios representam o modo mais comum de reprodução assexuada. São

produzidos pelas transformações do sistema vegetativo do próprio micélio. Os conídios podem ser hialinos ou pigmentados, geralmente escuros - os feoconídios; e podem apresentar formas diferentes esféricos, fusiformes, cilíndricos, piriformes etc; ter parede lisa ou rugosa; serem formados de uma só célula ou terem septos em um ou dois planos; e apresentar-se isolados ou agrupados (Black, 2002; Madigan et al., 2004; Murray et al., 2004).

Existe a aplicação considerável de *T. harzianum* como agente de controle biológico, numerosos estudos foram conduzidos para aumentar nossa compreensão dos mecanismos envolvidos no micoparasitismo (Ramada et al., 2015; Gomes et al., 2015). É sabido que esse fungo é capaz de produzir enzimas hidrolíticas, como fosfatases,  $\beta$ -glucanase (Noronha e Ulhoa, 1996), quitinases (Ulhoa e Peberdy, 1991) e xilanases (Buchert e Heikinheimo, 1998). Além disso, estudos sobre a privação de fosfato revelaram o potencial de *Trichoderma* spp. como agentes de solubilização do fosfato, solubilizando os fosfatos presentes no solo e aumentando a fertilidade do solo e o crescimento das plantas (KAPRI e TEWARI, 2010)

Estudos de Kapri e Tewari, (2010), destaca o potencial solubilizante de fosfato pelo fungo de *Trichoderma* sp. utilizando cepas em isoladas de diferentes rizosferas de árvores. Os isolados foram testados quanto ao seu potencial de solubilização de P in vitro usando o meio do National Botanical Research Instituteb (NBRIP) contendo fosfato tricálcico (TCP) como única fonte de P, e comparado com uma cultura padrão de *T. harzianum*. Verificou-se que todas as culturas solubilizaram o TCP.

O fungo *Trichoderma* sp. tem tomado grande destaque pois é um fungo de vida livre do solo e da rizosfera, simbiontes de plantas e funcionam como parasitas de outros fungos. Estão entre os fungos mais estudados e comercializados que são utilizados como biopesticidas e corretivos de solos biofertilizantes. Cepas com potencial para crescimento e saúde de plantas são frequentemente isoladas de solos (Harman et al., 2004, Lorito et al., 2004).

Em sua pesquisa Bader et al., (2019), demonstraram o sequestro de fosfato tricálcico por *Trichoderma* e levantaram a hipótese de que uma forma disponível do nutriente possa estar presente nas proximidades das raízes. Descobriram que as quatro cepas de *Trichoderma* foram capazes de solubilizar o fósforo inorgânico também contribuíram para melhorar o crescimento do tomateiro após a inoculação.

Sendo assim, Lima (2006), também observou o desenvolvimento do *Trichoderma harzianum* e verificou que o fungo foi capaz de produzir fosfatase ácida, fosfatase alcalina, e outras enzimas, sendo que neste caso as enzimas estavam presentes no sobrenadante de cultura líquida contendo farelo de soja e de milho.

### 2.4.3. Utilização das fosfatases

A investigação biotecnológica, acompanhada da aplicação das enzimas, tem sido realizada em microrganismos para a produção de enzimas para fins industriais. Entre estas enzimas, as fosfatases, responsáveis por hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico têm sido amplamente utilizadas em diferentes setores como, por exemplo, em experimentos de biologia molecular e na alimentação animal (Oliveira et al., 2017).

O interesse na aplicação biotecnológica de enzimas em ração, é principalmente devido ao custo das matérias primas tradicionais. Além disso, a utilização de enzimas que hidrolisam o fitato na ração, e atuam melhorando a digestibilidade e a disponibilidade do fósforo pelos animais, é uma forma de reduzir a contaminação ambiental. Nesse sentido, a utilização da fosfatase ácida para hidrolisar o fitato presente na ração, sugere uma forma de disponibilizar o fosfato para o consumidor, além do efeito adicional que pode apresentar (Nakagi et al., 2007).

A fosfatase ácida tem sido aplicada na indústria de fertilizantes. Em regiões tropicais, cujos solos possuem alta fixação de fósforo (P), é necessário corrigir a carência deste elemento por meio da utilização de fertilizantes. Dentre as opções de fonte de P disponíveis no mercado, os fertilizantes fosfatados totalmente acidulados ocupam posição de destaque, sendo frequentemente utilizados para a correção do solo. No entanto, o uso indiscriminado de adubos fosfatados solúveis reduz a sustentabilidade e ameaça à segurança ambiental das culturas brasileiras (Almeida, 2015).

Outras aplicações das fosfatases têm sido como biomarcador bioquímico. Os biomarcadores são alterações avaliadas em níveis bioquímico, celular, fisiológico e comportamental que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes na biota. A fosfatase ácida é uma enzima intra-lisossômica através da qual se pode comprovar uma possível toxicidade mediante a evidência do grau de fragilidade da membrana lisossômica (Cruz et al., 2007).

Na área de cosmética, a enzimocosmética vem sendo amplamente estudada. As enzimas estão inseridas cada vez mais em produtos de higiene pessoal, esfoliação de pele e antissinais. Pode-se afirmar que hoje a indústria farmacêutica representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas. Nesse contexto, as fosfatases alcalinas estão sendo aplicadas em estímulo a proliferação dos fibroblastos (Monteiro e Silva, 2009).

O grande uso das fosfatases microbianas se dá como insumo em kits de reagentes para análises clínicas, principalmente para as técnicas imunoenzimáticas por ELISA. Os testes imunológicos baseados na detecção de antígenos ou anticorpos podem acoplar enzimas, tais

como a fosfatase alcalina a um anticorpo ou anti anticorpo, dependendo do ensaio, as quais permitem a detecção da reação antígeno anticorpo e a interpretação do resultado (Zimmer et al., 2009).

## **2.5. Processos fermentativos para a produção de enzimas**

Dois tipos básicos de fermentação são utilizados para a produção de enzimas: a fermentação submersa (FSbm) e a fermentação em estado sólido (FES), a depender da natureza do resíduo utilizado. Resíduos líquidos (como *pulp-wash*, manipuera e melaço) ou sólidos (como cascas, tortas de óleo, farelos e sementes) são empregados como uma alternativa de substrato para os processos de fermentação para produção de diferentes enzimas.

A FSbm é a técnica majoritariamente utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (Orlandelli et al., 2012). A FES é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (Rahardjo et al., 2006).

A FES traz algumas vantagens comparativas em relação a FSbm, como: menor tamanho do reator, maior produtividade, custos reduzidos de separação do produto, menor gasto energético, baixo capital de investimento, redução da quantidade de resíduos gerados e simplicidade no processo (Rocha et al., 2011)

O tempo de fermentação está diretamente relacionado com o esgotamento nutricional no meio, implicando na redução do crescimento microbiano, inviabilizando a conversão da biomassa em produtos e, conseqüentemente, reduzindo a produção de enzimas (Santos et al., 2013). O pH pode influenciar no transporte de componentes na membrana das células (Kapoor et al., 2008) e assim, induzir mudanças morfológicas nos micro-organismos e interferir na estabilidade enzimática (Mrudula e Murugammal, 2011). A temperatura está relacionada com o transporte de massa e com a transferência de oxigênio (Wang e Yang, 2007).

O uso da FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o cultivo de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural desses microrganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos suscetíveis a problemas de inibição por substrato e possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (Holker et al., 2004).

A quantidade de água em um bioprocesso está diretamente relacionada a difusão de nutrientes no meio reacional e à absorção destes pelos agentes microbianos, bem como à manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos (Gervais; Molin 2003). Em relação ao cultivo de microrganismos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, reduzindo a taxa de crescimento microbiano e a formação dos produtos de interesse (Farinas, 2014).

Estudos mostram que a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (Pinto et al., 2005).

### **2.5.1. Fermentação sólida (FES)**

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semissólida, ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (Raimbault, 1998).

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (Aidoo et al., 1982). Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (Durand, 2003).

Levi Yafetto (2022) verificou que os microrganismos notavelmente mais usados na fermentação em estado sólido são principalmente fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* spp. Fungos filamentosos e leveduras digerem sólidos orgânicos substratos em um ambiente com baixo teor de umidade tornando-os ideais para uso em fermentação em estado sólido (Yazid et al., 2016).

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (Gervais e Molin, 2003). Na FES, a água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, a umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio;

o segundo, a atividade de água ( $a_w$ ), de compreensão um pouco mais complicada, é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. Para o entendimento da FES, a umidade tem se mostrado menos elucidativa que a atividade de água, pois esta última afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (Pinto et al. 2005).

Os substratos para FES são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria (Pandey, 2001). Farelos, cascas, bagaços e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação. São recursos naturais renováveis e produzidos em grandes quantidades, o que, algumas vezes, faz com que se tornem um problema ambiental (Pinto et al. 2005). Santin (1996) afirma que o crescimento dos microrganismos depende da atividade de água, em razão da influência da pressão osmótica sobre as trocas através das membranas. De acordo com Pelizer et al. (2003) a atividade de água influencia o crescimento microbiano e processos biológicos e enzimáticos. Cada microrganismo possui um limite mínimo de atividade de água para realizar suas atividades metabólicas. Portanto, a atividade de água ótima para fungos é em torno de 0,70; para leveduras 0,80 e, para bactérias, 0,90.

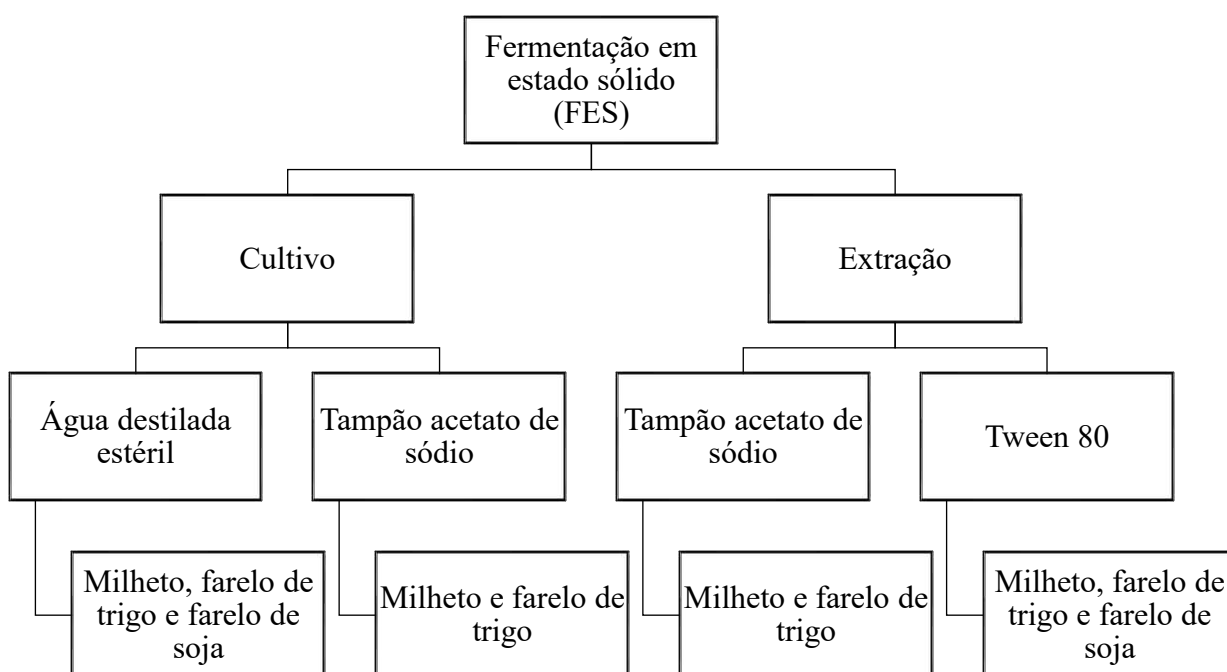
Dhillon et al. (2011), avaliaram o potencial de resíduos agrícolas para a produção de celulase e hemicelulase utilizando culturas individuais e mistas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* utilizando a fermentação em estado sólido (FES) e obtiveram resultados positivos no aproveitamento econômico de resíduos agroindustriais de baixo custo aplicando tecnologia de fermentação em estado sólido, que é simples e barata.

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo biotecnológico pode ser utilizado como método alternativo para melhorar as funcionalidades biológicas de resíduos agrícolas (Razak et al., 2015). Em seus estudos Lateef et al. (2008) relataram que a FES aumentou a qualidade nutricional e as atividades antioxidantes de diferentes resíduos sólidos, como a torta de dendê, casca de cacau e casca de mandioca.

### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentados os materiais, os microrganismos, as biomassas, bem como a metodologia empregada para cada etapa, de produção e de extração de enzimas utilizados no desenvolvimento experimental deste trabalho. O esquema das etapas realizadas está ilustrado na Figura 3.1.

**Figura 3.1.** Esquema das etapas realizadas no desenvolvimento experimental da pesquisa.



#### 3.1 Microrganismo

O fungo *T. harzianum* foi avaliado nesse estudo. O fungo *T. harzianum* foi isolado/coletado no Complexo Mineroquímico de Araxá (Vale Fertilizantes), Minas Gerais. O isolado de fungo foi identificado por testes bioquímicos de taxonomia convencional, pela Fundação André Tosello para Pesquisa e Tecnologia (Campinas - SP). Estas culturas fúngicas pertencem ao banco de microrganismos do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO)

da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e são mantidas em ultrafreezer a -70 °C. Para garantir as características originais dos fungos, foi realizada a técnica de preservação em discos de papel, e, posteriormente, para sua ativação, utilizou-se o meio Czapek modificado de composição descrita na Tabela 3.1 (adaptado de Araújo, 2014).

**Tabela 3.1** – Composição do meio Czapek, meio de cultivo utilizado para ativação dos conídios preservados.

| Reagentes                       | Concentração<br>(g/L) |
|---------------------------------|-----------------------|
| NaNO <sub>3</sub>               | 2,0                   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,0                   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,5                   |
| KCl                             | 0,5                   |
| FeSO <sub>4</sub>               | 0,01                  |
| Sacarose                        | 30,0                  |
| Agar                            | 20,0                  |

Fonte: Adaptado de Araújo, 2014

### 3.2 Preservação dos microrganismos em de discos de papel e armazenamento sílica-gel

O armazenamento de fungos em sílica-gel permite conservação de conídios isolados, por períodos prolongados. A contaminação por agentes contaminantes é bastante reduzida, pois as condições de umidade baixa previnem a sua presença. Outra grande vantagem deste método é o custo financeiro baixo e não haver necessidade de aparelhagem específica. Muitas culturas, de um mesmo isolado, podem ser recuperadas de uma mesma amostra de armazenamento (Santos et al., 2017).

A metodologia consiste em esterilizar a seco os frascos de vidro, contendo ¾ de sílica gel azul, à temperatura de 170 °C, por três vezes. Posteriormente, foi esterilizado em autoclave os tampões, papel de filtro, o papel toalha, e a lâmina de vidro, envoltos com papel de alumínio, à temperatura de 120 °C, por 45 min, como podemos ver na Figura 3.2. Também, foi esterilizado em autoclave a solução de leite em pó (10 % em peso), à 120 °C, por 15 min (Lima et al., 2022).

**Figura 3.2** – Materiais utilizados na preservação dos fungos



Fonte: Lima et al., 2022.

A partir dos microrganismos previamente replicados em placas contendo meio Czapek, por 7 dias, uma suspensão de conídios foi preparada, transferindo 5 mL da solução de leite em pó 10%, para cada placa estéril contendo meio de cultura Czapek. Para obtenção da suspensão mãe, fez-se a raspagem com auxílio de uma lâmina de vidro estéril, conforme a Figura 3.2 (A). Após o preparado da suspensão mãe, transferiu-se o papel de filtro picado para a placa. Nessa etapa é importante salientar que os papeis não podem ficar encharcados, para não dificultar o processo de secagem, conforme a Figura 3.2 (B) (Lima et al., 2022).

**Figura 3.3** – (A) Preparo de suspensão com leite em pó a 10%. (B) Transferência de papel filtro picado para placas de Petri contendo suspensão de conídios.



Fonte: Lima et al., 2022

Com o auxílio de uma pinça foi transferido o papel picado embebido para folhas de papel toalha com intuito de retirar o excesso de umidade, em seguida, foram imediatamente

transferidos para o frasco de sílica-gel, onde completam a secagem pelo efeito higroscópico da sílica onde os recipientes foram rotulados e armazenados em geladeira a 10 °C (Figura 3.4). Dhingra e Sinclair (1995) mencionam que a grande vantagem da sílica-gel é permitir longos períodos de preservação (5 ou mais anos). As modificações morfológicas são reduzidas ou praticamente eliminadas e mantêm a capacidade de esporulação do fungo. Os recipientes foram rotulados e armazenados em geladeira a 10 °C.

**Figura 3.4** – Discos de papéis colonizados envolvidos em papel de filtro armazenados em frascos do tipo penicilina, contendo sílica-gel azul.



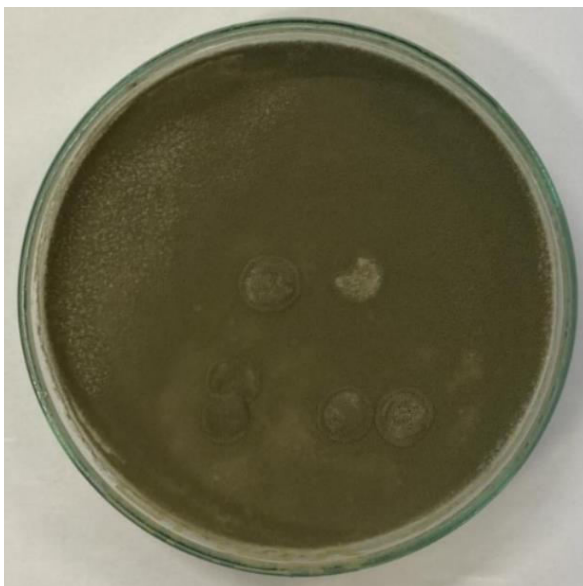
Fonte: Lima et al., 2022.

### 3.3 Ativação dos microrganismos

A ativação do microrganismo foi realizada através do repique das culturas, anteriormente preservadas (item 3.2), em placas de Petri contendo meio Czapek, meio de cultivo utilizado para ativação dos conídios preservados. O meio de cultura foi previamente esterilizado na autoclave a pressão de 1,0 atm (manométrica) por 20 min. Para a ativação dos fungos os seguintes materiais foram necessários: microscópio estereoscópico (lupa), pinça, bico de Bunsen, gás, alça de repicagem, câmara de fluxo laminar e álcool 70% e placas de Petri contendo o meio Czapek, descrito na Tabela 3.1. Em seguida, espalhou-se o disco de papel contendo o microrganismo preservado sobre a placa Petri com 0,1 mL de água destilada estéril. O espalhamento deve ser homogêneo por toda placa de Petri com diâmetro 9 cm. Após esta etapa as placas foram levadas para estufa a temperatura de 25 °C por 5 a 7 dias, obtendo-se

assim o fungo ativado como podemos ver na Figura 3.5. Após esse tempo, os conídios do fungo em estudo, obtidos da raspagem de uma placa de Petri foram utilizados na FES.

**Figura 3.5** – Fungo *Trichoderma harzianum* ativado em placa Petri.



Fonte: da própria autora.

### 3.4 Determinação da umidade (*h*)

A umidade (*h*) foi determinada seguindo a Equação 1:

$$h(\%) = \left[ \frac{\text{Peso da amostra úmida (PU)} - \text{Peso da amostra seca (PS)}}{\text{Peso da amostra seca (PS)}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

Peso da amostra úmida (PU) = (Peso da água (g) + Peso da amostra (g))

Peso da amostra seca (PS) = Peso da amostra seca (g).

### 3.5 Fermentação estado sólido (FES)

Experimentos foram realizados para estabelecer o melhor meio de cultivo do fungo e extração da enzima para a produção de atividade de fosfatase ácida, sendo avaliadas as fontes de carbono milheto, farelo de trigo e farelo de soja para a umidificação dos meios de cultivo testou-se tampão acetato de sódio com pH 5 concentrações 0,005M e água destilada estéril com

pH 5 e a extração da fosfatase ácida avaliada com tampão acetato de sódio com pH 5 com concentração 0,005M e Tween 80 a 1% em água.

### **3.5.1 FES (milheto e farelo de trigo): Cultivo e extração com tampão acetato de sódio**

Para essa fermentação foi utilizado como meio de cultivo o tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005M e extração enzimática com o tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M.

Inóculo: Raspou-se as placas Petri obtidas na etapa anterior com 20 mL de tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005M. A seguir estas células foram utilizadas nas FES visando à produção de complexo enzimático.

FES: As fermentações sólidas foram realizadas em reator estático (frascos cônicos de 500 mL de volume), como mostra a Figura 5. Foi inoculado 20 mL de tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de  $3 \times 10^8$  conídios/mL e 4 g/L de inóculo com 100 g de substrato previamente esterilizados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 30 minutos. Os substratos utilizados foram milheto e farelo de trigo que foram utilizados separadamente para cada FES. A FES foi realizada por sacrifício, ou seja, para cada ponto amostral foi descartado um reator estático. Efetuou-se o controle para cada ponto amostral. Os reatores estáticos foram adicionados na estufa BOD Thermostat Cabinets TS 606-G/4-i em temperatura de 24°C. Esses mesmos procedimentos foram aplicados nas FES de controle para cada substrato, mas sem a adição de células de *Trichoderma harzianum*.

Extração de enzimas: A extração das enzimas foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo. O meio extrativo utilizado foi o tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M. Após a adição do meio extrativo, o meio sólido fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se o extrato enzimático bruto.

### **3.5.2 FES (milheto, farelo de trigo e farelo de soja): Cultivo com água destilada estéril e extração com tampão acetato de sódio**

Para essa fermentação foram utilizados dois métodos diferentes de cultivo: tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005M e água destilada estéril com pH 5 e apenas um modo de extração com o tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M.

Inóculo: Raspou-se as placas Petri obtidas na etapa anterior com 20 mL de água destilada estéril pH 5. A seguir estas células foram utilizadas nas FES visando à produção de complexo enzimático.

FES: As fermentações sólidas foram realizadas em reator estático (frascos cônicos de 500 mL de volume), como mostra a Figura 3.5. Foi inoculado 20 mL de tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de  $3 \times 10^8$  conídios/mL e 4 g/L de inóculo com 100 g de substrato previamente esterilizados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 30 minutos. O mesmo foi realizado para o cultivo com água destilada estéril e pH 5. Os substratos utilizados foram milho e farelo de trigo que foram utilizados separadamente para cada FES. A FES foi realizada por sacrifício, ou seja, para cada ponto amostral foi descartado um reator estático. Efetuou-se o controle para cada ponto amostral. Os reatores estáticos foram adicionados na incubadora de BOD – 150 litros ALFA MARE AM5020 em temperatura de 24°C. Esses mesmos procedimentos foram aplicados nas FES de controle para cada substrato, mas sem a adição de células de *Trichoderma harzianum*.

Extração de enzimas: A extração das enzimas foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo. O meio extrativo utilizado foi o tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M. Após a adição do meio extrativo, o meio sólido fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se o extrato enzimático bruto.

### **3.5.3 FES (milho, farelo de trigo e farelo de soja): Cultivo com água destilada estéril e extração com Tween 80**

Para essa fermentação foi utilizado o cultivo com água destilada estéril pH 5 e extração enzimática com Tween 80 a 1% em água.

Inóculo: Para o preparo do inóculo para a FES raspou-se as placas Petri obtidas na etapa anterior com 20 mL de água destilada estéril pH 5. A seguir estas células foram utilizadas nas FES visando à produção de complexo enzimático.

FES: As fermentações sólidas foram realizadas em reator estático (frascos cônicos de 500 mL de volume), como mostra a Figura 3.5. Foi inoculado 20 mL de água estéril pH 5, com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de  $3 \times 10^8$  conídios/mL e 4 g/L de inóculo com 100 g de substrato previamente esterilizados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 30 minutos. Os substratos utilizados foram milho, farelo de trigo e farelo de soja que foram utilizados separadamente para cada FES. A FES foi realizada por sacrifício, ou seja, para cada ponto amostral foi descartado um reator estático. Efetuou-se o controle para cada ponto

amostral. Os reatores estáticos foram adicionados na incubadora de BOD – 150 litros ALFA MARE AM5020 em temperatura de 24°C, ver Figura 3.6. Esses mesmos procedimentos foram aplicados nas FES de controle para cada substrato, mas sem a adição de células de *Trichoderma harzianum*.

**Figura 3.6** – Reatores estáticos na estufa BOD utilizando o substrato farelo de trigo.



Fonte: da própria autora.

Extração de enzimas: A extração das enzimas foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo. O meio extrativo utilizado foi o Tween 80 a 1% em água. Após a adição do meio extrativo, o meio sólido fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se o extrato enzimático bruto.

### **3.6 Determinação da concentração celular (biomassa seca) em fermentação sólida**

A biomassa para fungos foi determinada pela filtração do caldo fermentado bruto (Figura 3.7) de um volume conhecido. Os filtros de papel, pesados previamente, apresentavam diâmetro 90 mm e retenção de partículas de 4-7  $\mu\text{m}$ . Depois de filtrado, os filtros com a biomassa foram levados para estufa à temperatura de  $100 \pm 1,0^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi reservado para análises da atividade da fosfatase ácida. Após 24 horas, o filtro foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento e, posteriormente, foi pesado. Este procedimento foi

repetido até a verificação de peso constante para a medida da biomassa seca. A diferença de massa do filtro antes e depois da filtração foi a massa de células presente no volume do caldo fermentado, sendo que a concentração celular foi expressa em (g/L), conforme a Equação 2.

**Figura 3.7** – Caldo fermentado bruto.



Fonte: da própria autora.

$$Biomassa\ seca\ \left(\frac{g}{L}\right) = \left[ \frac{m_{Fantes} - m_{Fdepois}}{V_{filtrado}} \right] \quad (2)$$

### 3.6.1 Contagem do Número de conídios em Câmara de Neubauer

Para determinar a concentração de conídios empregou-se a metodologia adotada por (Embrapa, 2012). Tem como base a preparação de suspensão de conídios de *Trichoderma* e contagem do número de conídios com auxílio de uma Câmara de Neubauer (hemacitômetro) ao microscópio óptico. Utilizou-se Câmara de Neubauer melhorada espelhada com profundidade de 0,100 mm, resolução de 0,0025 mm<sup>2</sup>, volume de 0,1 µL, modelo K5-0011 KASVI e marca OLEN.

Depois de fazer a extração dos conídios em duplicatas, transferiu-se 1,0 mL da suspensão extrativa com auxílio de micropipeta com ponteira previamente esterilizada para o tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada estéril. Repetiu-se o procedimento de diluição por mais 2 vezes a fim de facilitar a contagem na câmara. Em seguida, homogenizou o conteúdo em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da suspensão, em cada uma das passagens (Embrapa, 2012).

A suspensão foi colocada na canaleta da câmara de Neubauer, já coberta com a lamínula, até o preenchimento de todo o espaço existente entre a lamínula e a câmara de Neubauer. Antes de iniciar a contagem, a câmara de Neubauer foi deixada com a suspensão de conídios em repouso por 5 minutos, para que os conídios precipitem, facilitando a contagem e reduzindo erros.

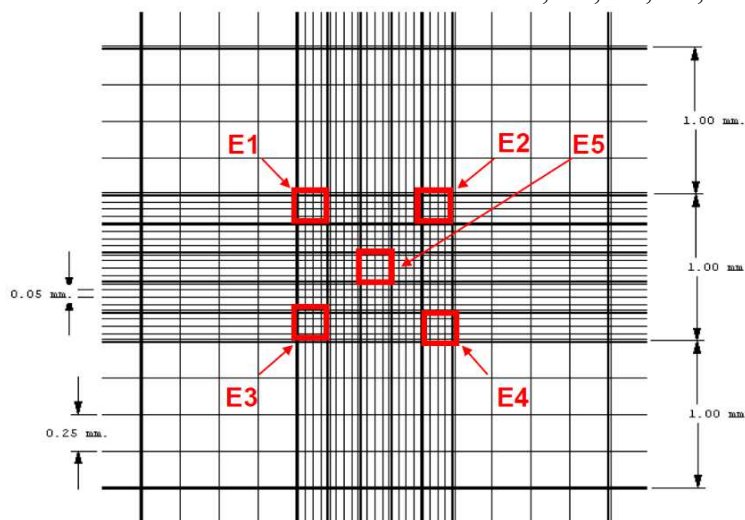
A contagem de conídios foi realizada em microscópio óptico, no aumento de 250 X ou 400 X, nos campos 1 e 2 da câmara de Neubauer (Figura 3.8), nos cinco quadrados (subcompartimentos) como demarcados na Figura 3.8, totalizando cinco contagens por campo da câmara de Neubauer (E1, E2, E3, E4 e E5). É importante salientar que muitos conídios ficam exatamente sobre as linhas de demarcação internas dos subcompartimentos. Recomenda-se contar apenas os conídios que estiverem nas linhas da esquerda e superior do mesmo campo da observação para evitar que eles sejam contados duas vezes (Embrapa, 2012).

**Figura 3.8** – Câmara de Contagem Neubauer.



Fonte: própria autora.

**Figura 3.8.1** – Área dentro dos subcompartimentos vermelhos para contagem do número de conídios de *Trichoderma* – E1, E2, E3, E4, E5.



Fonte: Embrapa, 2012.

Para determinar o número de conídios utilizou-se a fórmula a seguir para cada repetição (Embrapa, 2012):

$$\frac{\text{Conídio}}{\text{mL}} = \left( \frac{\text{Campo1} + \text{Campo2}}{2} \right) \cdot 2,5 \cdot 10^5 \quad (2)$$

$$\text{Campo 1} = \frac{(E1 + E2 + E3 + E4 + E5)}{5} \quad (3)$$

$$\text{Campo 2} = \frac{(E1 + E2 + E3 + E4 + E5)}{5} \quad (4)$$

### 3.7 Determinação do pH

O pH foi medido em pHmetro Gehaka de bancada, previamente calibrado.

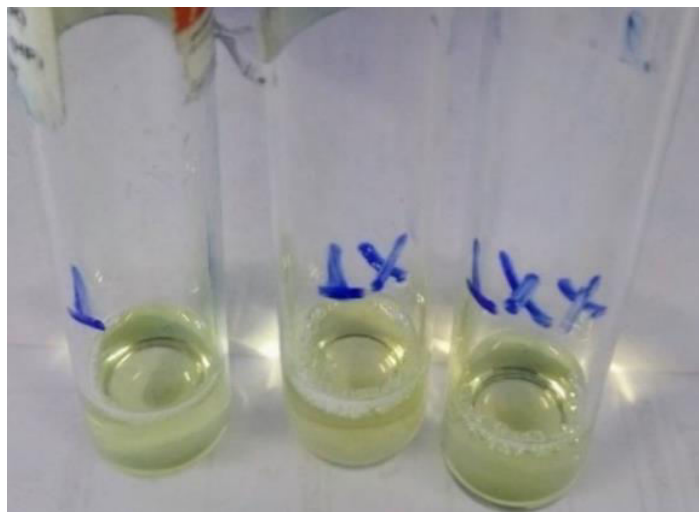
### 3.8 Ensaio enzimático

A atividade da fosfatase ácida foi medido de acordo com Leitão et al. (2010), utilizando como substrato fosfato de p-nitrofenilo sal disódico hexahidratado (p-NPP) (Sigma Aldrich™). Foi feita uma curva de calibração, utilizando a fosfatase ácida de trigo padrão, fornecida pela empresa Sigma Aldrich™, curva no Apêndice 1.

A mistura para o ensaio consiste em 50 µL do extrato enzimático, 100 µL da solução de (p-NPP) concentração 5 m.mol/L e 350 µL de tampão acetato de sódio 50 m.mol/L e pH=5,00. Após a adição dos reagentes incubar à 45°C em banho termostático por 15 min. Por fim, depois deste período a reação deve ser interrompida com a adição de 1000 µL de NaOH na concentração de 0,1 mol/L. A quantidade de (p-NPP) liberada foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a 405 nm de comprimento de onda, ver Figura 3.9.

Uma unidade (1 U) de atividade da fosfatase ácida será definida como 1 µM de p-nitrofenol (p-NP) formado por minuto (Ames, 1966).

**Figura 3.9** – Ensaio enzimático para atividade fosfatase ácida.



Fonte: própria autora

#### **4 Delineamento composto central (DCC)**

A fim de otimizar o experimento, foi realizado um delineamento composto central (DCC), no qual foram analisados a interação entre as variáveis selecionadas e o efeito que elas possuem nas respostas desejadas. Este planejamento foi proposto em 3 níveis, com 3 repetições no ponto central e 3 variáveis foram estudadas:  $X_1$  – Massa de milho (g);  $X_2$  – Umidade (%) e  $X_3$  – Inóculo (g/L). Foram totalizados 17 tratamentos e o  $\alpha$  utilizado foi o de rotabilidade a fim de ampliar a faixa experimental, sendo seu valor absoluto igual a 1,68.

As respostas analisadas foram a atividade da fosfatase ácida (ACPase) expressa em (U/mL), e a biomassa seca (g/L), no tempo de 9 dias, tempo final da fermentação sólida. Todos os dados estatísticos foram calculados utilizando o StatSoft Software Estatística 7.1. A Tabela 3.2 apresenta a matriz de delineamento composto central com os valores codificados das variáveis analisadas.

**Tabela 3.2** - Matriz do delineamento composto central.

| ENSAIOS | $X_1$ (g/L) | $X_2$ (%) | $X_3$ (g/L) |
|---------|-------------|-----------|-------------|
| 1       | -1          | -1        | -1          |
| 2       | -1          | -1        | +1          |
| 3       | -1          | +1        | -1          |
| 4       | -1          | +1        | +1          |
| 5       | +1          | -1        | -1          |

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| 6  | +1        | -1        | +1        |
| 7  | +1        | +1        | -1        |
| 8  | +1        | +1        | +1        |
| 9  | $-\alpha$ | 0         | 0         |
| 10 | $+\alpha$ | 0         | 0         |
| 11 | 0         | $\alpha$  | 0         |
| 12 | 0         | $+\alpha$ | 0         |
| 13 | 0         | 0         | $-\alpha$ |
| 14 | 0         | 0         | $+\alpha$ |
| 15 | 0         | 0         | 0         |
| 16 | 0         | 0         | 0         |
| 17 | 0         | 0         | 0         |

A partir do DCC foi possível gerar um modelo para cada resposta (atividade da fosfatase ácida (ACPase) e biomassa seca) em função das variáveis independentes (massa de milho, umidade e inóculo), utilizando o Statistica® 7.1. Além disso, foram geradas superfícies de resposta por esse software, cuja análise, juntamente com a utilização da função desejabilidade do Statistica® 7.1, permitiu determinar as melhores condições para maximização das duas respostas estudadas. Os experimentos de validação foram então conduzidos nas condições de otimização, que estavam dentro da faixa de estudo do DCC, conforme a metodologia usada nos 17 experimentos do DCC.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados da fermentação em estado sólido (FES). Em seguida, os resultados da atividade de fosfatase ácida produzida pela FES e a discussão sobre esses resultados. Na sequência são expostos os resultados no Delineamento Composto Central (DCC).

### 4.1 Fermentação em estado sólido (FES)

FES: Cultivo e extração enzimática com tampão acetato de sódio

A Tabela 4.1 apresentam os resultados obtidos de crescimento celular, pH e produção de conídios para FES, utilizando milho e farelo de trigo, respectivamente:

**Tabela 4.1** – FES para cultivo e extração enzimática com tampão acetato de sódio, utilizando o substrato milho e farelo de trigo.

| Cultivo e extração enzimática com tampão acetato de sódio |                |                   |      |                           |                   |      |                           |
|-----------------------------------------------------------|----------------|-------------------|------|---------------------------|-------------------|------|---------------------------|
| Milho                                                     |                |                   |      | Farelo de trigo           |                   |      |                           |
| Tempo<br>(dias)                                           | Umidade<br>(%) | Biomassa<br>(g/L) | pH   | Conídios<br>(conídios/mL) | Biomassa<br>(g/L) | pH   | Conídios<br>(conídios/mL) |
| 0                                                         | 20             | 1,00±0,3          | 5,00 | 3,00x10 <sup>8</sup>      | 4,00±0,2          | 5,00 | 3,00 x10 <sup>8</sup>     |
| 3                                                         | 20             | 0,84±0,3          | 5,01 | 6,72x10 <sup>7</sup>      | 7,12±0,2          | 5,43 | 7,15x10 <sup>8</sup>      |
| 5                                                         | 20             | 1,04±0,3          | 5,39 | 9,20x10 <sup>7</sup>      | 7,92±0,2          | 5,54 | 11,20x10 <sup>8</sup>     |
| 7                                                         | 20             | 2,64±0,3          | 5,37 | 4,57x10 <sup>8</sup>      | 10,84±0,2         | 5,66 | 12,20x10 <sup>8</sup>     |
| 9                                                         | 20             | 3,52±0,3          | 5,69 | 7,22x10 <sup>8</sup>      | 13,36±0,2         | 5,49 | 13,75x10 <sup>8</sup>     |

A umidade da FES foi estabelecida com valor de 20%, isso deve-se ao fato do crescimento do microrganismo. O excesso de umidade em um substrato pode alterar o crescimento do microrganismo e, quando a diminuição ocorre, a produção de enzima será reduzida devido ao baixo transporte de nutrientes (Reinoso, 2015). No caso dos fungos, a umidade do material deve ser em uma faixa de 20 e 70% (Bustamante, 2015).

A fermentação em estado sólido apresenta diversas vantagens, principalmente quando os agentes de transformação são fungos filamentosos como é o caso do fungo em estudo *Trichoderma harzianum*. Uma delas é que as condições de cultivo são mais parecidas com o habitat natural dos fungos filamentosos, com isto os fungos estão mais adaptados para crescer e excretar maior quantidade de enzimas (Santos et al., 2008).

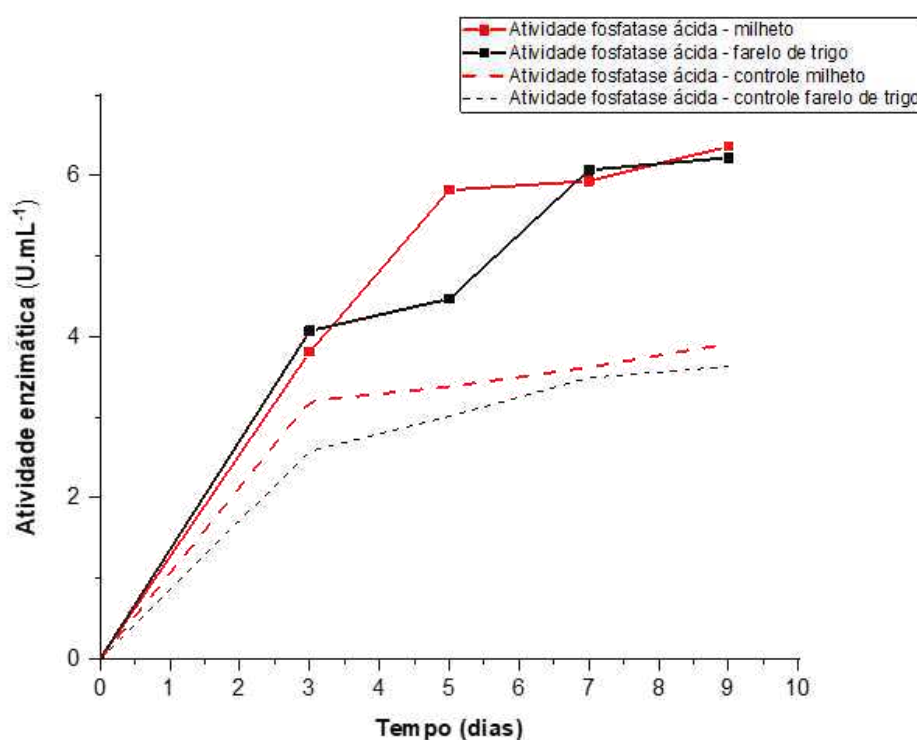
De início há um crescimento significativo para a biomassa e dos conídios de ambas as fermentações sólidas. Isso ocorre porque no início do cultivo ocorre a fase de crescimento exponencial (log), em que os microrganismos utilizam a maior parte dos nutrientes disponíveis para se multiplicarem. Em 9 dias há um maior valor de biomassa (g/L) para o farelo de trigo em relação ao milho. Isso, se deve ao fato de uma difícil separação do sobrenadante do resíduo no momento da extração, ou seja, não se separou por completo a biomassa.

É importante ressaltar que houve a correção para 5 do pH do tampão acetato de sódio concentração 0,005 M. O cultivo e extração com o tampão acetato de sódio foi realizado

visando estabilidade do pH. O pH manteve-se em torno de 5 em ambas as fermentações. Isso pode ser explicado pelo fato de alguns íons presentes no tampão agirem como cofatores, mudando a conformação da enzima e proporcionando uma alta eficiência catalítica à mesma (Queiroz et al., 2009).

A Figura 4.1 mostra a atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) para o substrato milho e farelo de trigo com e sem a adição de inóculo (controle).

**Figura 4.1** – Atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) para cultivo e extração enzimática com tampão acetato de sódio.



Fonte: da própria autora.

Em ambas as fermentações o valor da atividade enzimática se manteve crescente chegando há um valor de 6 U/mL. No tempo 5 dias o resultado mostrou-se melhor para o milho, ressaltar que, mesmo com a biomassa bem menor demonstra uma constância no valor do crescimento da atividade enzimática para esse substrato. Leitão et al. (2010) que, estudando ACPase secretada por *Trichoderma harzianum* cultivado em diferentes substratos identificaram uma atividade específica de 12,4 U/mg em uma faixa de pH variando de 4,5 - 6,0.

Bakker (2017) avaliou a atividade enzimática, confirmando a maior expectativa de maior estabilidade na extração de enzima quando realizada com tampão, fator que mantém o pH estável. O fato também foi relatado por Taraboulsi-Jr et al. (2010), ao pesquisarem os fatores

que afetam a atividade enzimática. Queiroz et al. (2009), realizando fermentação em estado sólido utilizando tampão acetato de sódio pH 6 para a umectação do substrato, demonstrou maior atividade relativa da enzima fitase no tampão acetato de sódio pH 6,0, aos 60 minutos, com 97,58%.

FES: Cultivo água destilada estéril e extração com tampão acetato de sódio

A Tabela 4.2, apresentam os resultados obtidos de crescimento celular, pH e produção de conídios para FES, utilizando milho e farelo de trigo respectivamente:

**Tabela 4.2** – FES com cultivo em água destilada estéril e extração com tampão acetato de sódio utilizando o substrato milho, farelo de trigo e farelo de soja.

| Cultivo em água destilada estéril e extração com tampão acetato de sódio |             |                |      |                        |                 |      |                        |                |      |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------|------|------------------------|-----------------|------|------------------------|----------------|------|
|                                                                          |             | Milho          |      |                        | Farelo de trigo |      |                        | Farelo de soja |      |
| Tempo (dias)                                                             | Umidade (%) | Biomassa (g/L) | pH   | Conídios (conídios/mL) | Biomassa (g/L)  | pH   | Conídios (conídios/mL) | Biomassa (g/L) | pH   |
| 0                                                                        | 20          | 1,00±0,25      | 5,00 | 3,00x10 <sup>8</sup>   | 3,00±0,2        | 5,00 | 3,00x10 <sup>8</sup>   | 0,50±0,15      | 5,00 |
| 3                                                                        | 20          | 1,13±0,25      | 5,35 | 4,50x10 <sup>8</sup>   | 3,57±0,2        | 5,23 | 8,00x10 <sup>8</sup>   | 0,99±0,15      | 6,96 |
| 5                                                                        | 20          | 1,94±0,25      | 5,37 | 5,10x10 <sup>8</sup>   | 6,32±0,2        | 5,34 | 8,90x10 <sup>8</sup>   | 1,02±0,15      | 6,77 |
| 7                                                                        | 20          | 2,68±0,25      | 5,41 | 6,77x10 <sup>8</sup>   | 7,99±0,2        | 5,37 | 9,18x10 <sup>8</sup>   | 1,07±0,15      | 6,85 |
| 9                                                                        | 20          | 3,15±0,25      | 5,67 | 7,13x10 <sup>8</sup>   | 9,91±0,2        | 5,58 | 10,23x10 <sup>8</sup>  | 1,12±0,15      | 6,45 |

Analisando os resultados obtidos, verificamos a dificuldade de separação da biomassa no caso do farelo de trigo, o que explica valores altos para a biomassa seca chegando a 9,915 g/L em 9 dias. Para o milho obteve-se biomassa de 3,15 g/L no tempo 9 dias. Aurora et al. (2018) estimaram o crescimento microbiano de *Rhizopus oryzae* MTCC 1987 em farelo de trigo e torta de óleo de linhaça para a produção de fitase, a partir de ensaios de glicosamina, e obtiveram concentração máxima de células de 71 g/kgms.

Houve uma melhor produção de conídios (conídios/mL) para o farelo de trigo em comparação com o milho no tempo 9 dias. O farelo de soja não atingiu valor mínimo de produção de conídios para sua contagem em Câmara de Neubauer seguindo a metodologia utilizada. Chavez (2006), estudando a otimização da produção de conídios do fungo *Trichoderma harzianum* em fermentação sólida, para diferentes substratos como arroz, aveia, soja, trigo, cevada entre outros, obteve como melhor substrato o arroz com produção de 45x10<sup>8</sup> conídios/mL.

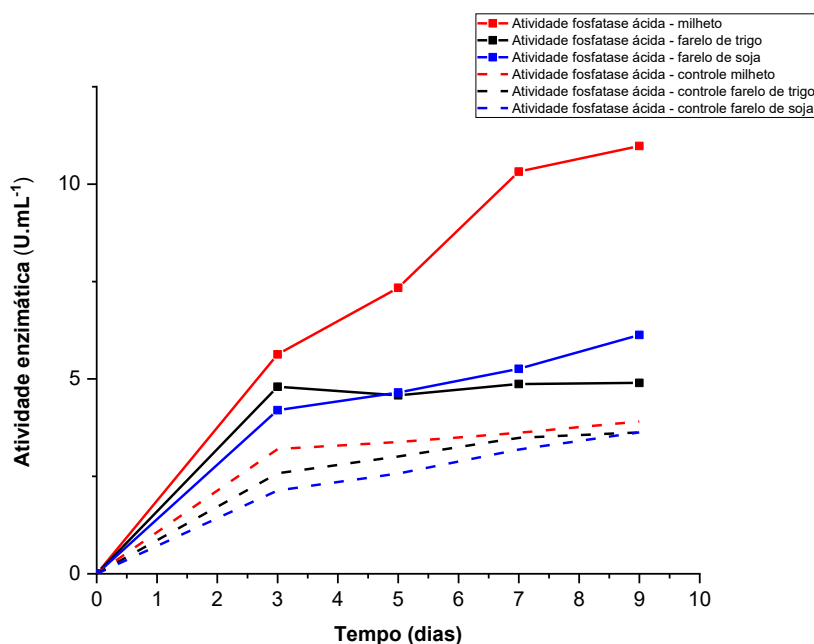
Vale ressaltar que houve a correção do pH para 5 na extração utilizando todos os substratos. O substrato farelo de soja apresentou valor de 6,45 para o pH no tempo de 9 dias o que resulta em uma interferência negativa na atividade enzimática de fosfatase ácida, já que a maioria das fosfatases ácidas descritas na literatura apresentam atividade enzimática máxima em pHs ácidos, variando entre 3,5 a 5,5 (Fujita et al., 2003; Gargova e Sariyska, 2003; Guimarães et al., 2004; Li et al., 2006; Leitão et al., 2010).

Os substratos farelos de trigo e milho mostraram-se fontes de carbono promissoras na produção de fosfatases ácidas. Em estudos feitos por Said e Pietro (2002, 2004), fungos filamentosos crescem muito bem e produzem uma grande quantidade de hidrolases quando cultivados em FES, principalmente quando é utilizado farelo de trigo como fonte de carbono. Dentre as hidrolases produzidas, relacionam-se algumas fosfatases. Mas esse estudo mostrou que o uso de milho permitiu uma maior produção de fosfatase ácida que o farelo de trigo.

Mas esse estudo mostrou que o uso de milho permitiu uma maior produção de fosfatase ácida que o farelo de trigo.

A Figura 4.2 mostra a atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) para os substratos milho, farelo de trigo e farelo de soja:

**Figura 4.2** – Atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) para cultivo em água destilada estéril e extração com tampão acetato de sódio.



Fonte: da própria autora.

Verifica-se o melhor resultado para produção de fosfatase ácida utilizando como umidificação do meio com água destilada estéril e obtenção do extrato enzimático bruto com

tampão acetato de sódio foi para o milho, onde atingiu-se valor 5 U/mL no tempo 3 dias e máximo de 11 U/mL com 9 dias de FES. Barbosa Júnior et al., 2006, em seu trabalho verifica que os maiores níveis fosfáticos intra e extracelulares foram produzidos após 24-48 horas de crescimento, usando farelo de trigo ou farelo de soja, ou a mistura dessas duas fontes juntas em fermentação sólida, o que não ocorreu nesse trabalho.

FES: Cultivo água destilada estéril e extração com Tween 80

A Tabela 4.3 apresentam os resultados obtidos na FES de crescimento celular, pH e produção de conídios (conídios/mL), para cultivo em milho, farelo de trigo e farelo de soja umidificados com água destilada estéril e extração de biomassa com Tween 80.

**Tabela 4.3** – FES para cultivo com água destilada estéril e extração com Tween 80 utilizando o substrato milho, farelo de trigo e farelo de soja.

| Cultivo em água destilada estéril e extração com Tween 80 |             |                |      |                        |                 |      |                        |                |      |                        |
|-----------------------------------------------------------|-------------|----------------|------|------------------------|-----------------|------|------------------------|----------------|------|------------------------|
| Milho                                                     |             |                |      |                        | Farelo de trigo |      |                        | Farelo de soja |      |                        |
| Tempo (dias)                                              | Umidade (%) | Biomassa (g/L) | pH   | Conídios (conídios/mL) | Biomassa (g/L)  | pH   | Conídios (conídios/mL) | Biomassa (g/L) | pH   | Conídios (conídios/mL) |
| 0                                                         | 20          | 3,00±0,15      | 4,00 | 3,00x10 <sup>8</sup>   | 3±0,15          | 4,00 | 3,00x10 <sup>8</sup>   | 2,00±0,2       | 6,88 | 3,00x10 <sup>8</sup>   |
| 3                                                         | 20          | 3,61±0,15      | 5,21 | 3,90x10 <sup>8</sup>   | 3,37±0,15       | 4,86 | 9,00x10 <sup>8</sup>   | 2,37±0,2       | 7,78 | 2,09x10 <sup>8</sup>   |
| 5                                                         | 20          | 5,26±0,15      | 5,52 | 5,66x10 <sup>8</sup>   | 6,25±0,15       | 5,32 | 10,90x10 <sup>8</sup>  | 3,49±0,2       | 9,21 | 6,91x10 <sup>8</sup>   |
| 7                                                         | 20          | 7,51±0,15      | 5,08 | 7,81x10 <sup>8</sup>   | 12,26±0,15      | 5,59 | 11,56x10 <sup>8</sup>  | 5,92±0,2       | 9,81 | 8,97x10 <sup>8</sup>   |
| 9                                                         | 20          | 9,68±0,15      | 5,33 | 8,26x10 <sup>8</sup>   | 14,32±0,15      | 5,47 | 12,01x10 <sup>8</sup>  | 6,44±0,2       | 6,88 | 10,12x10 <sup>8</sup>  |

Nestes cultivos, o método de extração utilizado a fim de reduzir o custo de produção da biomassa, não se mostrou um método promissor para o farelo de trigo pois atingiu-se valor máximo de 14,32 g/L devido à dificuldade de separação do farelo do meio extrativo. O crescimento celular foi melhor para o milho e farelo de soja, com valores 9,986 g/L e 6,44 respectivamente.

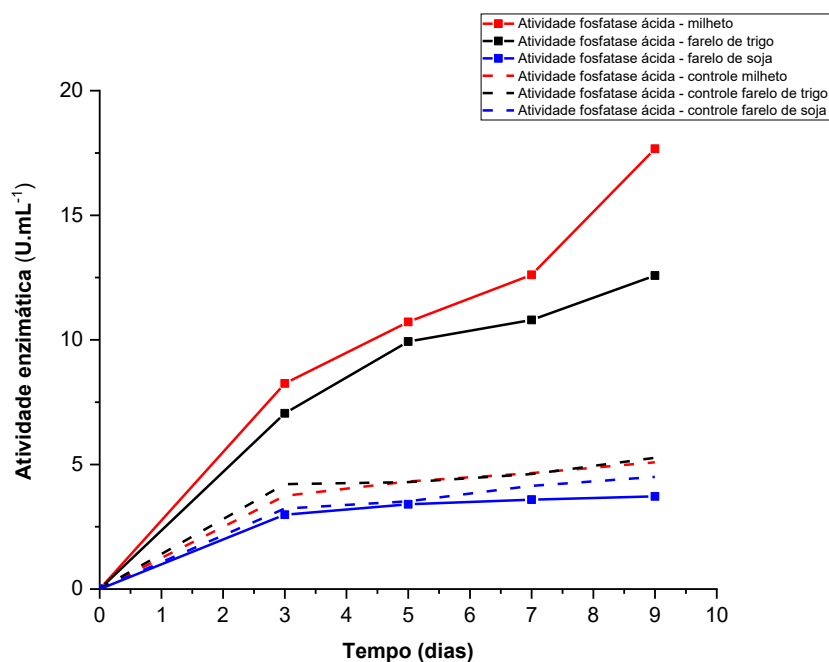
Diversos estudos relatam amplas variações em relação à produção de conídios de *Trichoderma* spp. em substratos distintos. Hanada e Costa (2018), ao avaliar a produção em *T. martiale* utilizando arroz como substrato de crescimento, suplementado com diferentes

nutrientes, constataram variação de  $1,53$  a  $10,17 \times 10^7$  conídios por grama de arroz. Simões (2010), comparando diferentes isolados de *Trichoderma*, também usando arroz como substrato, verificaram produção de conídios variando de  $1,3 \times 10^7$  a  $3,523 \times 10^9 \cdot g_{ds}^{-1}$ . ( $g_{ds}$  = grama de substrato seco).

Segundo Rini e Sulochana (2007), diferentes substratos podem ser adotados para a multiplicação de *Trichoderma* spp., tais como sorgo, arroz, esterco de gado e outros, sendo observadas diferentes concentrações na produção de conídios expressa em unidades formadoras de colônias por gramas ( $10,3$  a  $156,3 \times 10^8$  UFC. $g^{-1}$ ). Os resultados citados, comparados com os obtidos no presente estudo, mostram que o fungo *Trichoderma harzianum* multiplicado em milho e farelo de trigo apresentou uma ótima produção.

A Figura 4.3 mostra a atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) para os substratos milho, farelo de trigo e farelo de soja:

**Figura 4.3** – Atividade enzimática de fosfatase ácida (U/mL) para cultivo em água destilada estéril e extração com Tween 80.



Fonte: da própria autora

O substrato farelo de soja apresentou baixa atividade enzimática para fosfatase ácida e pH básico a partir de 7 dias de fermentação. Isso pode ser atribuído à presença da enzima urease, que apresenta pH ótimo de atuação na faixa de 6,5 a 8,5. Garcia e Neiva (1994), em seu trabalho, descrevem o farelo de soja como fonte de urease. A urease é uma enzima que, em meio aquoso,

catalisa a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. Sendo assim, a fosfatase ácida será secretada preferencialmente em pH ácido, o que difere das condições do meio de cultura do estudo, com pH de 9,81 em 9 dias.

Diante da análise do gráfico acima verificamos que a atividade enzimática foi de 18 U/mL o milho no tempo 9 dias. Zhao et al., (2017) estudaram a solubilização do fósforo em 3 fontes de fosfato, o fosfato tricálcico (TCP), fosfato de cálcio dibásico (DCP), e ácido fítico na presença, e ausência de sal. A melhor produção da fosfatase ácida foi de  $9,61 \cdot 10^{-3}$  U/mL, para meio de cultura contendo ácido fítico, como fonte de P.

#### 4.2 Delineamento Composto Central (DCC) em Fermentação Sólida (FES)

Após os resultados dos testes preliminares, e devido ao seu melhor potencial de produção de fosfatases ácidas, o milho foi o grão selecionado para o Delineamento Composto Central (DCC). O DCC foi elaborado com intuito de maximizar a produção da fosfatase ácida pela cepa de *Trichoderma harzianum*. Este planejamento foi proposto em 3 níveis, com 3 repetições no ponto central, e 2 variáveis foram estudadas:  $X_1$  – Massa de milho (80-100g);  $X_2$  – Umidade (30-70%) e  $X_3$  – Inóculo (2-4 g/L) totalizando 17 tratamentos. Nesse planejamento foi utilizado o alfa de rotacional, cujo valor foi de 1,68.

As respostas analisadas foram a atividade da fosfatase ácida (ACPase) expressa em (U/mL), e a biomassa seca (g/L), no tempo de 9 dias, tempo final da fermentação sólida. Todos os dados estatísticos foram calculados utilizando o StatSoft Software Estatística 7.1, e mostrados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** – Delineamento Composto Central com as variáveis estudadas e as respostas analisadas.

| ENSAIOS | X1 (g)     | X2 (%)    | X3 (g/L) | ACPase (U/mL) | Biomassa (g/L) |
|---------|------------|-----------|----------|---------------|----------------|
| 1       | (-1)80,00  | (-1)30,00 | (-1)2,00 | 12,24         | 4,38           |
| 2       | (-1)80,00  | (-1)30,00 | (+1)4,00 | 24,01         | 6,71           |
| 3       | (-1)80,00  | (+1)70,00 | (-1)2,00 | 17,63         | 4,52           |
| 4       | (-1)80,00  | (+1)70,00 | (+1)4,00 | 21,80         | 3,94           |
| 5       | (+1)120,00 | (-1)30,00 | (-1)2,00 | 24,28         | 5,36           |
| 6       | (+1)120,00 | (-1)30,00 | (+1)4,00 | 26,58         | 6,20           |
| 7       | (+1)120,00 | (+1)70,00 | (-1)2,00 | 23,31         | 5,13           |

|    |             |           |          |       |      |
|----|-------------|-----------|----------|-------|------|
| 8  | (+1)120,00  | (+1)70,00 | (+1)4,00 | 21,90 | 4,77 |
| 9  | (-α)66,36   | (0)50,00  | (0)3,00  | 22,01 | 3,68 |
| 10 | (+α) 133,63 | (0) 50,00 | (0)3,00  | 25,25 | 5,84 |
| 11 | (0)100,00   | (α)16,36  | (0)3,00  | 22,92 | 8,85 |
| 12 | (0)100,00   | (+α)83,63 | (0)3,00  | 13,30 | 4,43 |
| 13 | (0)100,00   | (0)50,00  | (-α)1,31 | 22,62 | 5,14 |
| 14 | (0)100,00   | (0)50,00  | (+α)4,68 | 30,94 | 7,08 |
| 15 | (0)100,00   | (0)50,00  | (0)3,00  | 36,67 | 9,29 |
| 16 | (0)100,00   | (0)50,00  | (0)3,00  | 36,56 | 9,78 |
| 17 | (0)100,00   | (0)50,00  | (0)3,00  | 36,05 | 9,73 |

A partir do DCC foi possível gerar um modelo para cada resposta (atividade da fosfatase ácida (ACPase) e biomassa seca) em função das variáveis independentes (massa de milheto, umidade e inóculo), utilizando o Statistica® 7.1. Além disso, foram geradas superfícies de resposta por esse software, cuja análise, juntamente com a utilização da função desejabilidade do Statistica® 7.1, permitiram determinar as melhores condições para maximização das duas respostas estudadas. Os experimentos de validação foram então conduzidos nas condições de otimização, que estavam dentro da faixa de estudo do DCC, conforme a metodologia usada nos 17 experimentos do DCC.

#### 4.2.1 Avaliação da atividade da fosfatase ácida (ACPase) pelo DCC

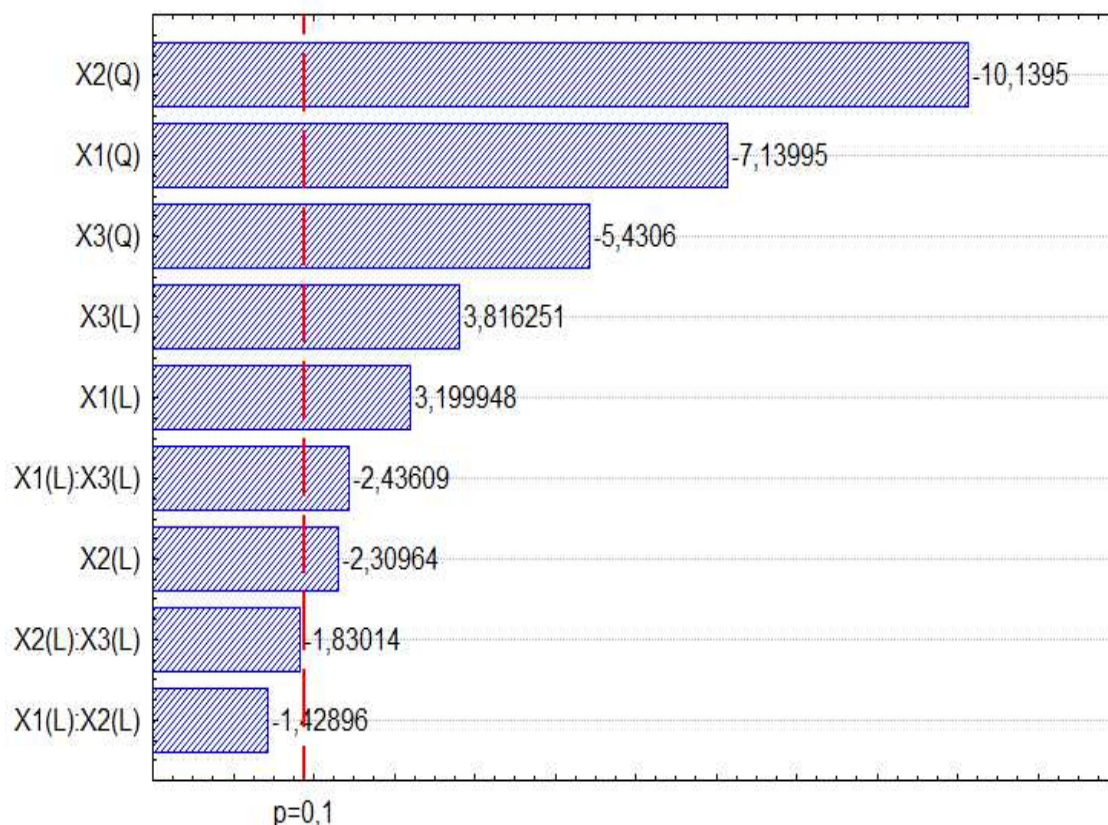
A resposta da atividade de fosfatase ácida foi analisada pelos dados da Tabela 4.4 e pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.4. Após a análise estatística tem-se a Equação codificada, com 90% de confiança.

$$ACPase(U.mL^{-1}) = 36,4675 + 1,891X_1 - 4,645X_1^2 - 1,365X_2 - 6,596X_2^2 + 2,255X_3 - 3,533X_3^2 - 1,881X_1X_3 \quad (5.6)$$

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,93, indicando que cerca de 93% dos dados experimentais são descritos pelo ajuste proposto na Equação 5.6. O valor negativo do coeficiente linear de  $X_2$  mostra que para maiores porcentagens de umidade diminui a resposta da atividade para este microrganismo. Tal fato pode ser observado na Tabela 4.4 comparando os tratamentos 2 e 7 ou também 2 e 8, por exemplo. A variável de  $X_3$  possui o

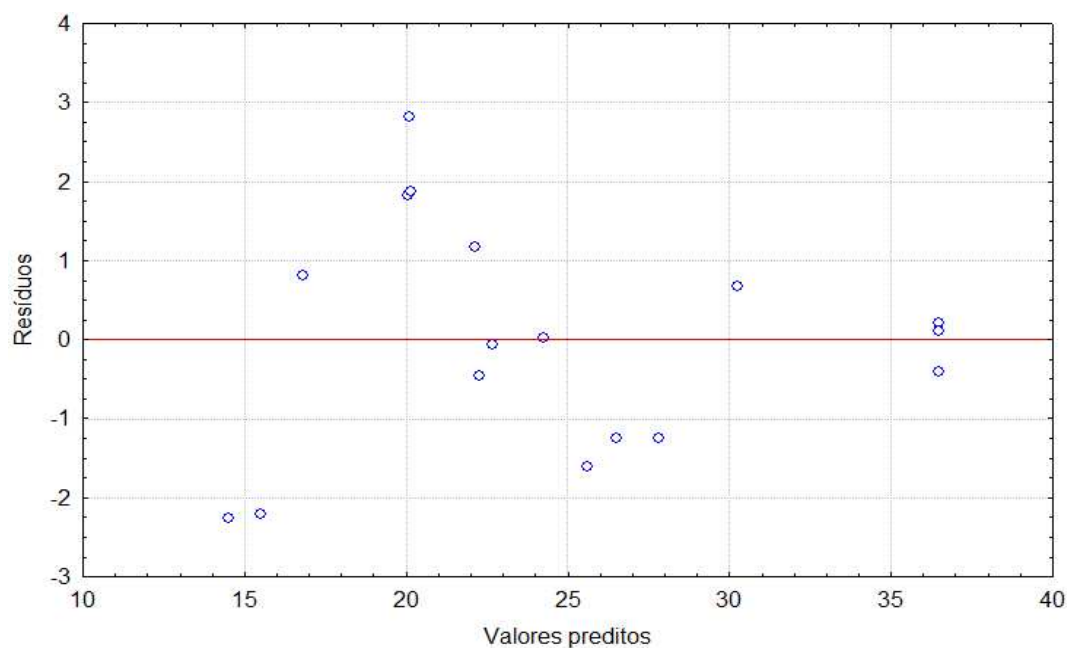
maior efeito nessa equação por possuir o maior coeficiente linear, ou seja, maiores concentrações dela aumentam a atividade enzimática. Também, pode ser exemplificado comparando os resultados dos tratamentos 1 e 2, na Tabela 4.4.

**Figura 4.4** - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para atividade da fosfatase ácida (ACPase).  $X_1$  – Massa de milho (g);  $X_2$  – Umidade (%) e  $X_3$  – Inóculo (g/L).



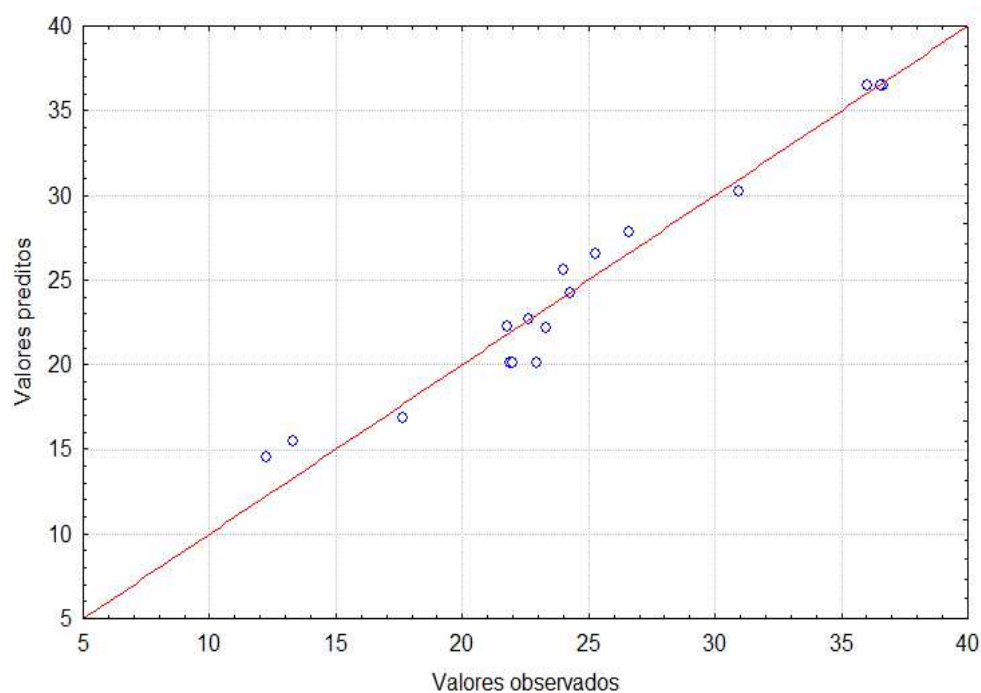
A Figura 4.5 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero, e sem tendências, indicando uma variância constante para todos valores de resposta.

**Figura 4.5** – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida (ACPase).



A Figura 4.6 mostra a distribuição dos valores preditos em função aos valores observados, nela é possível observar a proximidade dos valores analisados com os preditos. Tal fato indica que o modelo é apropriado para as análises dos dados.

**Figura 4.6** – Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida (ACPase).



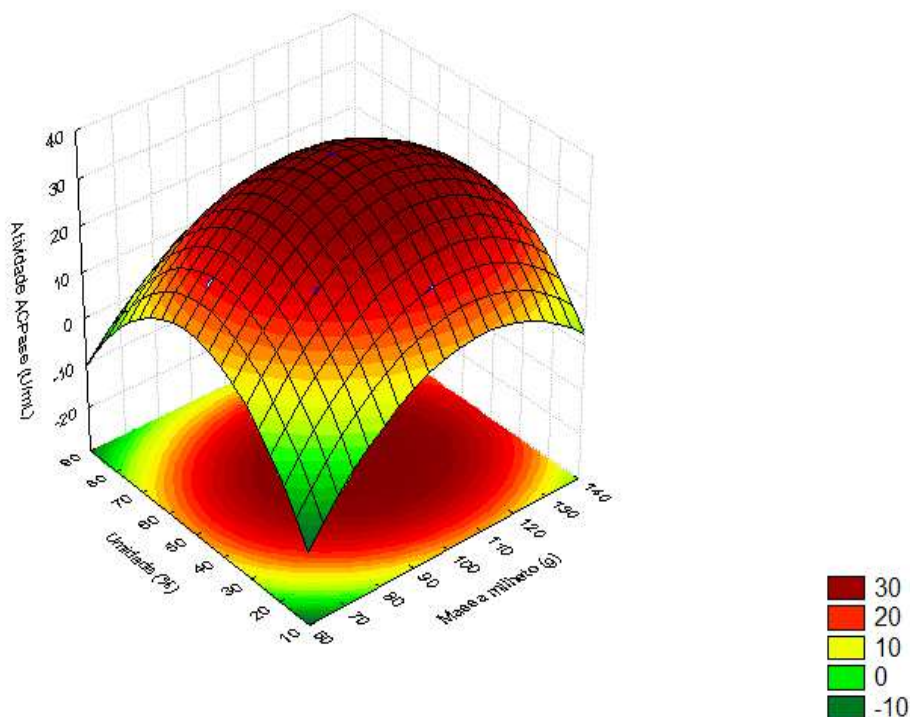
Na Tabela 4.5 é possível verificar a análise de ANOVA para a fosfatase ácida (ACPase), como os valores da distribuição F de Fisher-Snedecor tabelado (F<sub>Tab</sub>) foram menores do que os calculados (F<sub>Calc</sub>), as regressões são consideradas eficientes e podem representar o sistema.

**Tabela 4.5** – ANOVA dos fatores e suas interações para fosfatase ácida (ACPase).

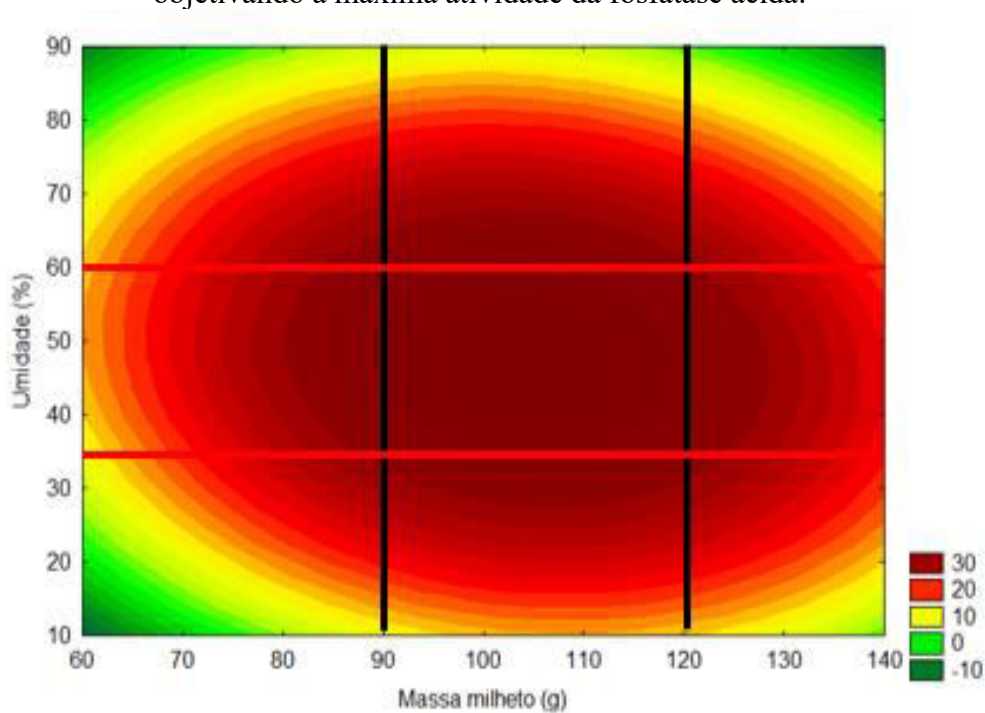
| Fonte de variação | Somatório dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio ou variância | Considerando $\alpha = 10\%$ |                             |                     |
|-------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------|
|                   |                         |                    |                             | F <sub>calculado</sub>       | F <sub>tabelado</sub> (7,9) | p-valor             |
| Regressão         | 764,7983                | 7                  | 109,256                     | 16,629                       | 2,505                       | 1,7x10 <sup>5</sup> |
| Resíduos          | 59,1310                 | 9                  | 6,570                       |                              |                             |                     |
| Total             | 823,9292                | 16                 |                             |                              |                             |                     |

A partir dos resultados para a ANOVA da regressão foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões ótimas. Nas Figuras 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, são apresentadas as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta ACPase em função da massa de milho (X1) e umidade (X2); massa de milho (X1) e concentração de inóculo (X3); e umidade (X2) e concentração de inóculo (X3), respectivamente.

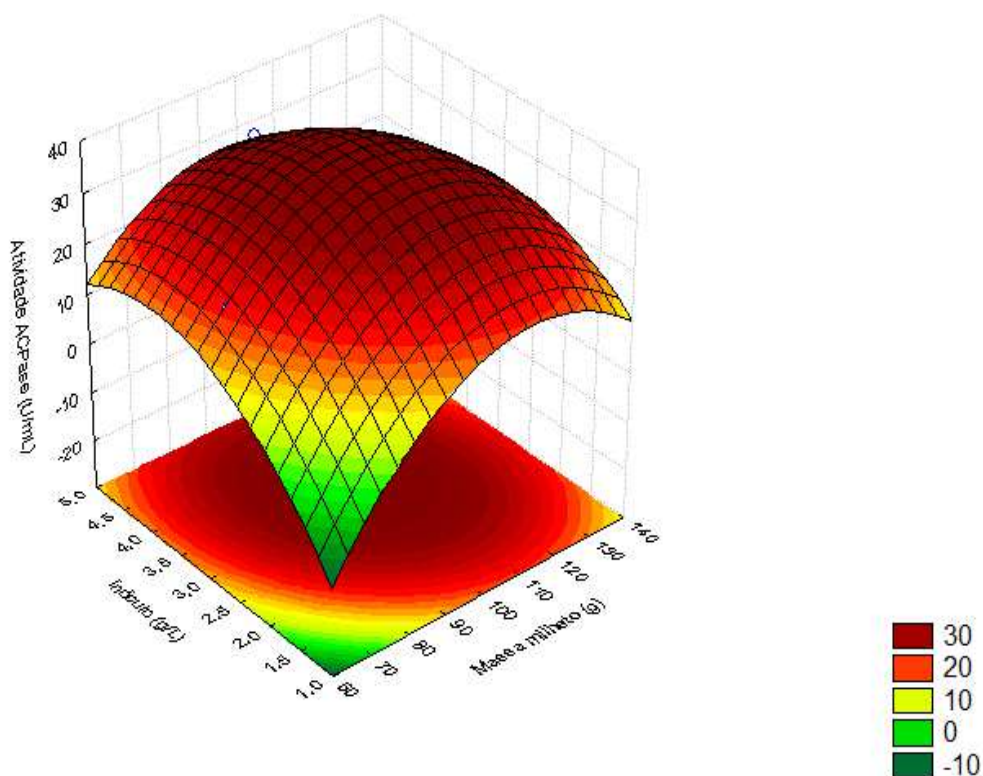
**Figura 4.7**– Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida em relação a umidade (%) e massa de milho (g).



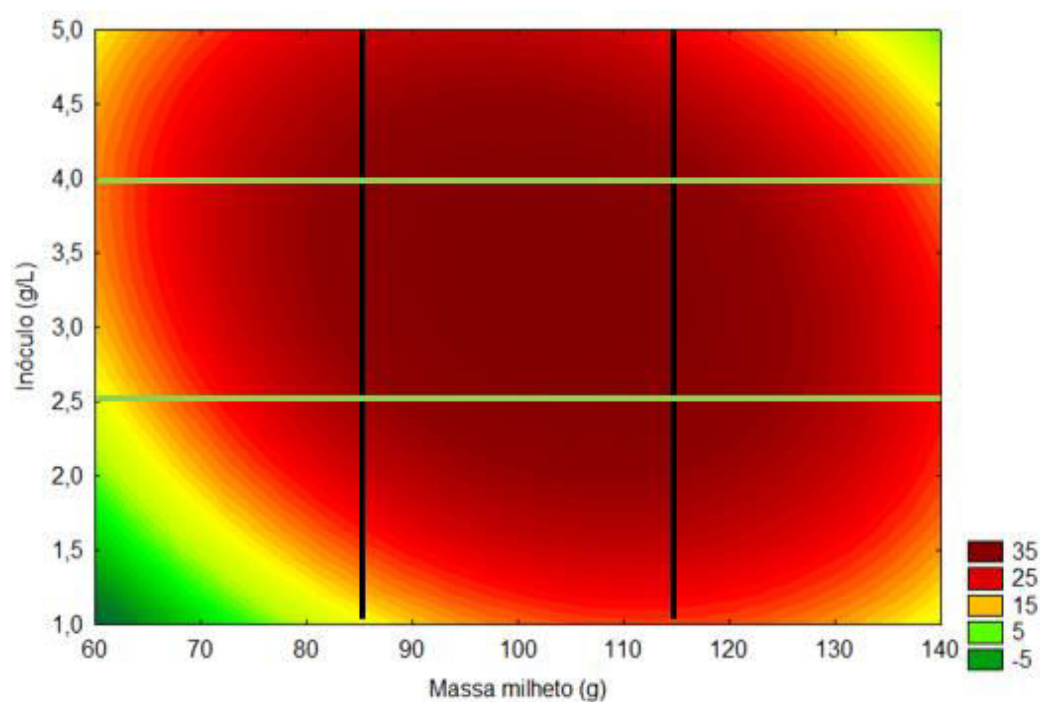
**Figura 4.8** – Curva de contorno para a umidade (%) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida.



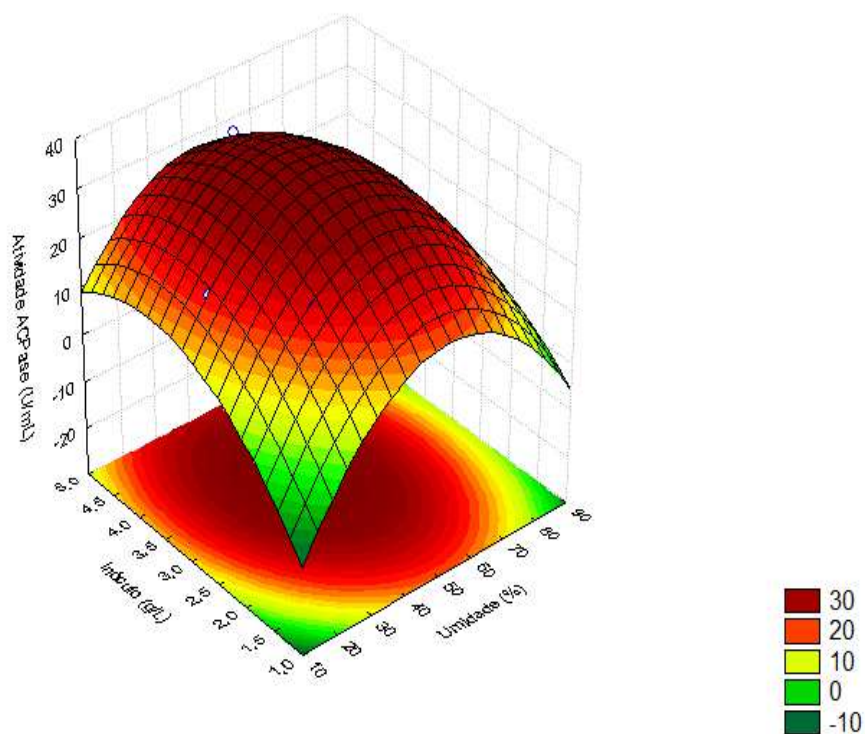
**Figura 4.9** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida em relação a concentração de inóculo (g/L) e massa de milho (g).



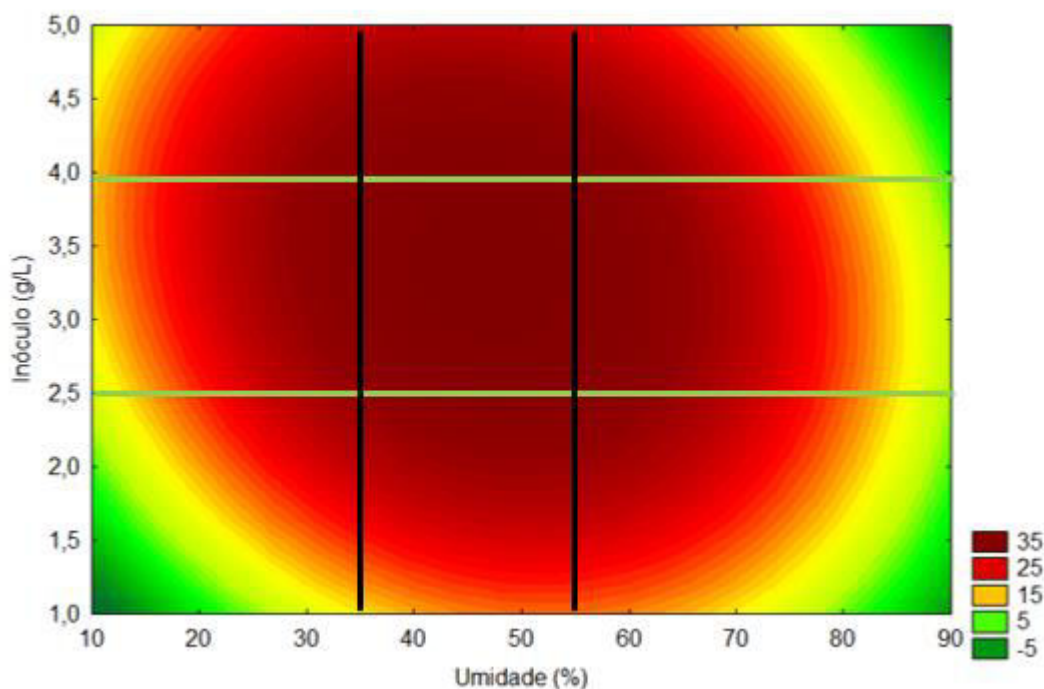
**Figura 4.10** – Curva de contorno para concentração de inóculo (g/L) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida.



**Figura 4.11** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida em relação a concentração de inóculo (g/L) e umidade (%).



**Figura 4.12** – Curva de contorno para concentração de inóculo (g/L) e umidade (%) objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida.



A partir da análise das figuras acima, a maior atividade da fosfatase ácida (ACPase) está associada a quantidades, relativamente altas, de massa de milho e concentração de inóculo, sendo que a umidade para este fim, não apresenta uma boa influência. Quando as variáveis X1, X2 e X3 estão nestas faixas, a atividade da enzima atinge a concentração média de 36 U/mL, tendo a máxima em 36,67 U/mL.

#### 4.2.2 Avaliação da concentração da biomassa seca pelo DCC

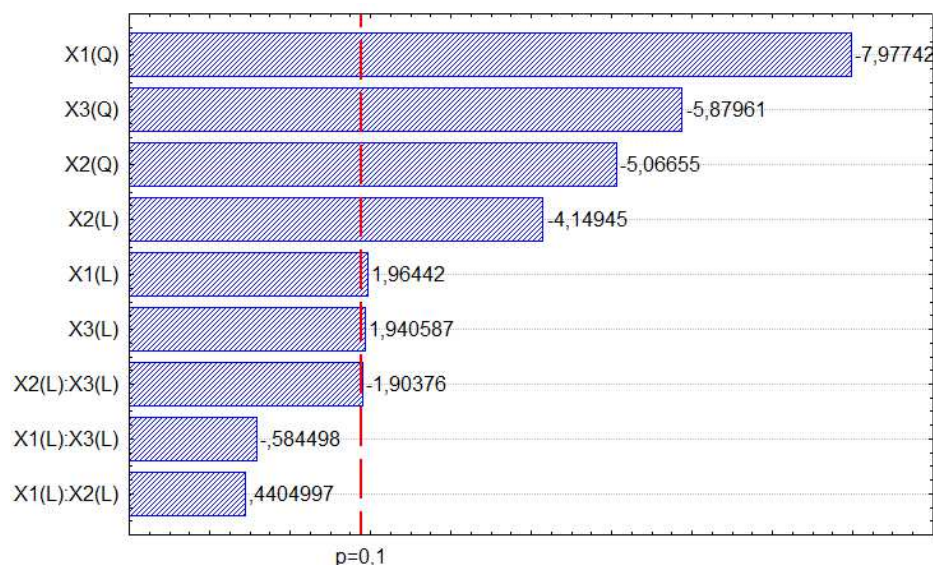
A resposta da biomassa seca (g/L) foi analisada pelos dados da Tabela 4.4 e pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.13. Após a análise estatística tem-se a Equação codificada, com 90% de confiança.

$$\text{Biomassa (g.L}^{-1}\text{)} = 9,635 + 0,406X_1 - 1,817X_1^2 - 0,859X_2 - 1,154X_2^2 + 0,401X_3 - 1,33972X_3^2 - 0,5144X_2X_3 \quad (6.5)$$

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,93, indicando que cerca de 93% dos dados experimentais são descritos pelo modelo proposto na Equação 6.5. O valor negativo do coeficiente linear de X2 mostra que para maiores porcentagens de umidade diminui a resposta da biomassa para este microrganismo. Tal fato pode ser observado na Tabela 4.4

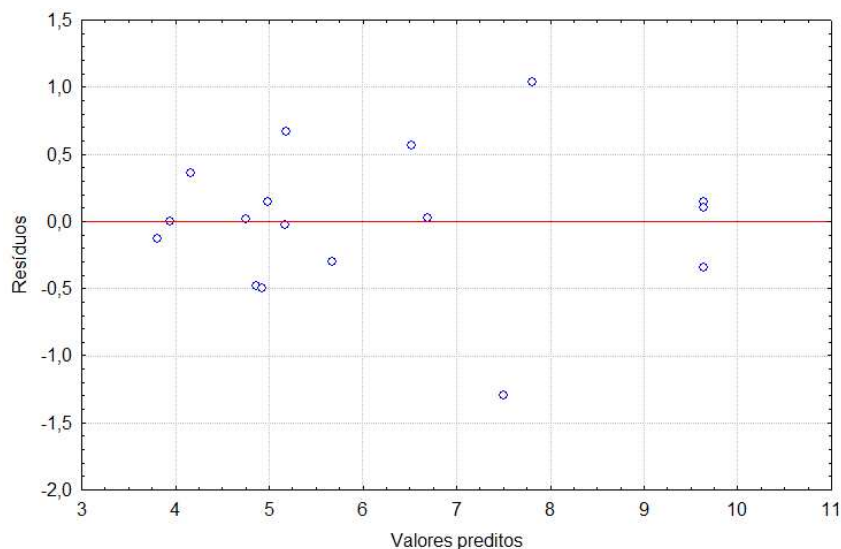
comparando os tratamentos 2 e 7, por exemplo. A variável de X1 possui o maior efeito nessa equação por possuir o maior coeficiente linear, ou seja, maiores concentrações dela aumentam a biomassa seca. Também, pode ser exemplificado comparando os resultados dos tratamentos 1 e 6, na Tabela 4.4.

**Figura 4.13.** Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para biomassa seca.



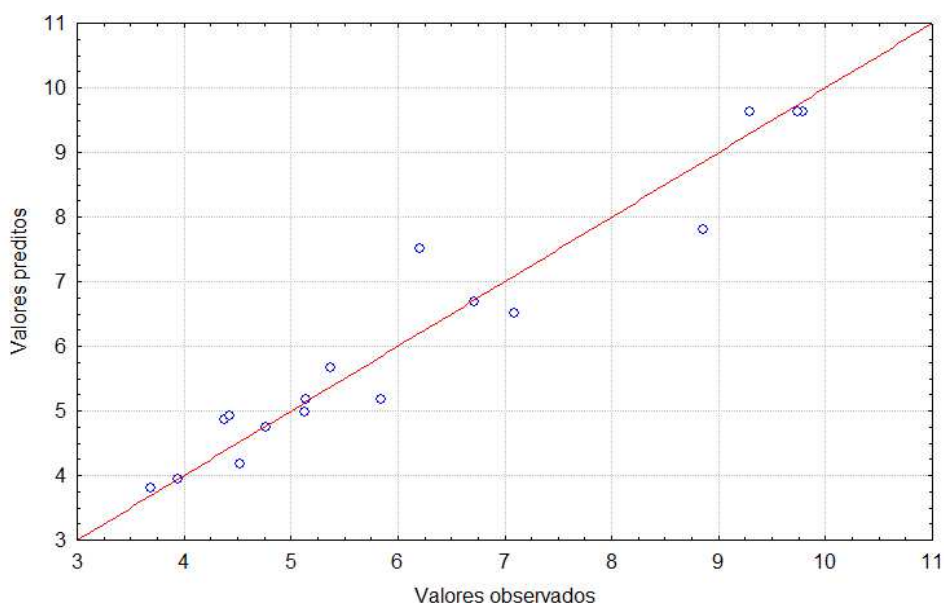
A Figura 4.14 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero, e sem tendências, indicando uma variância constante para todos valores de resposta.

**Figura 4.14** – Distribuição dos resíduos relativos à atividade de biomassa seca.



A Figura 4.15 mostra a distribuição dos valores preditos em função aos valores observados, nela é possível observar a proximidade dos valores analisados com os preditos. Tal fato indica que o modelo é apropriado para as análises dos dados.

**Figura 4.15** – Valores preditos em relação aos observados para resposta de biomassa seca.



Na Tabela 4.6 é possível verificar a análise de ANOVA para a biomassa seca, como os valores da distribuição F de Fisher-Snedecor tabelado (FTab) foram menores do que os calculados (FCalc), as regressões são consideradas eficientes e podem representar o sistema.

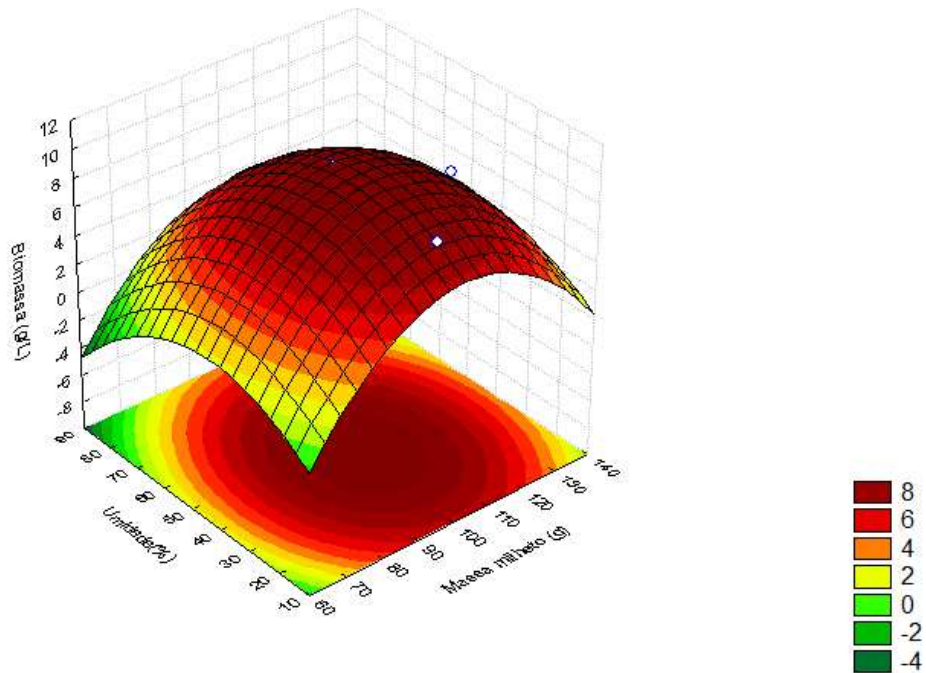
**Tabela 4.6** – ANOVA dos fatores e suas interações para biomassa seca.

| Fonte de variação | Somatório dos quadrados | Graus de liberdade | $\alpha = 10\%$             |                        |                            |                      |
|-------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|
|                   |                         |                    | Quadrado médio ou variância | F <sub>calculado</sub> | F <sub>tabelado(7,9)</sub> | p-valor              |
| Regressão         | 64,32843                | 7                  | 9,1890,490                  | 18,751                 | 2,505                      | 1,09x10 <sup>5</sup> |
| Resíduos          | 4,41069                 | 9                  |                             |                        |                            |                      |
| Total             | 68,73913                | 16                 |                             |                        |                            |                      |

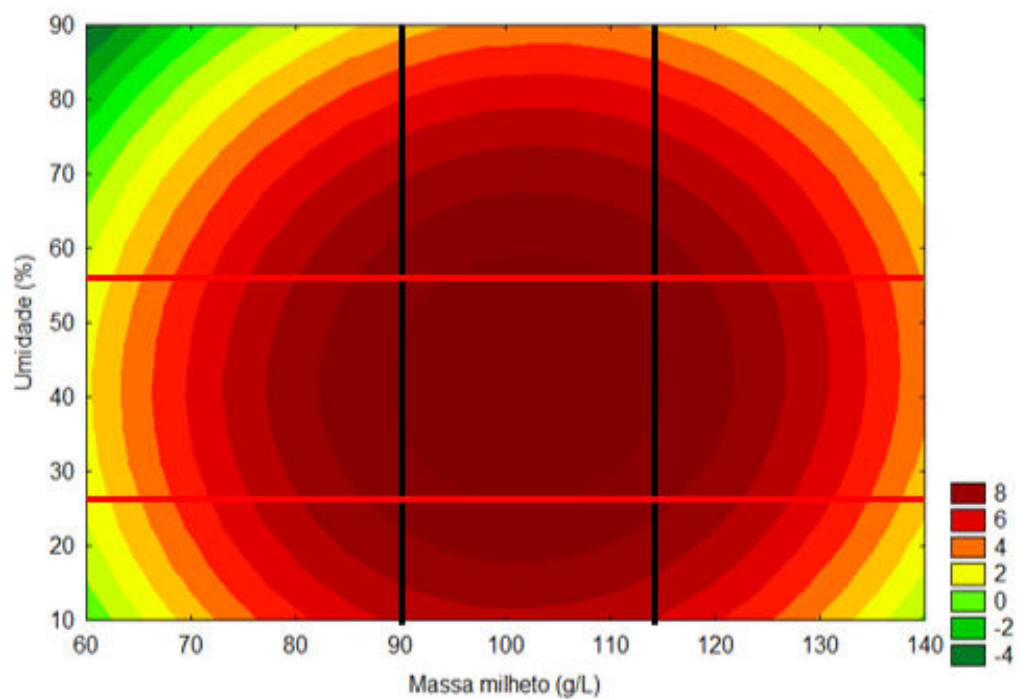
A partir dos resultados para a ANOVA da regressão foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões ótimas. Nas Figuras 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21, são apresentadas as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta ACPase em função

da massa de milho (X1) e umidade (X2); massa de milho (X1) e concentração de inóculo (X3); e umidade (X2) e concentração de inóculo (X3), respectivamente.

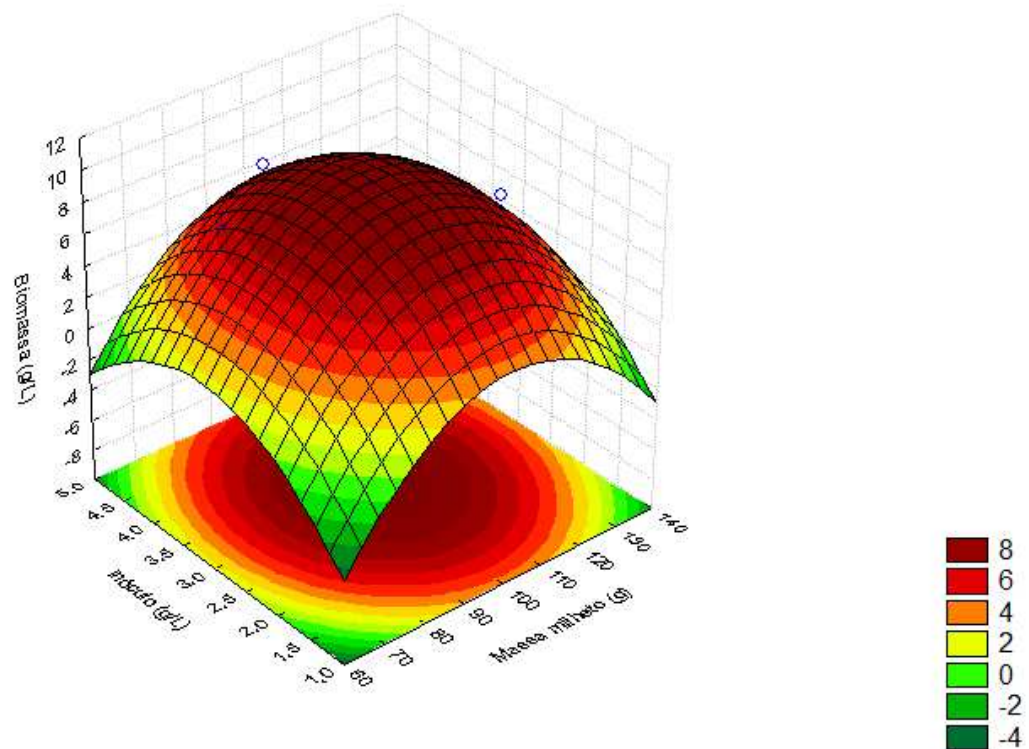
**Figura 4.16** – Superfície de resposta para biomassa seca em relação a umidade (%) e massa de milho (g).



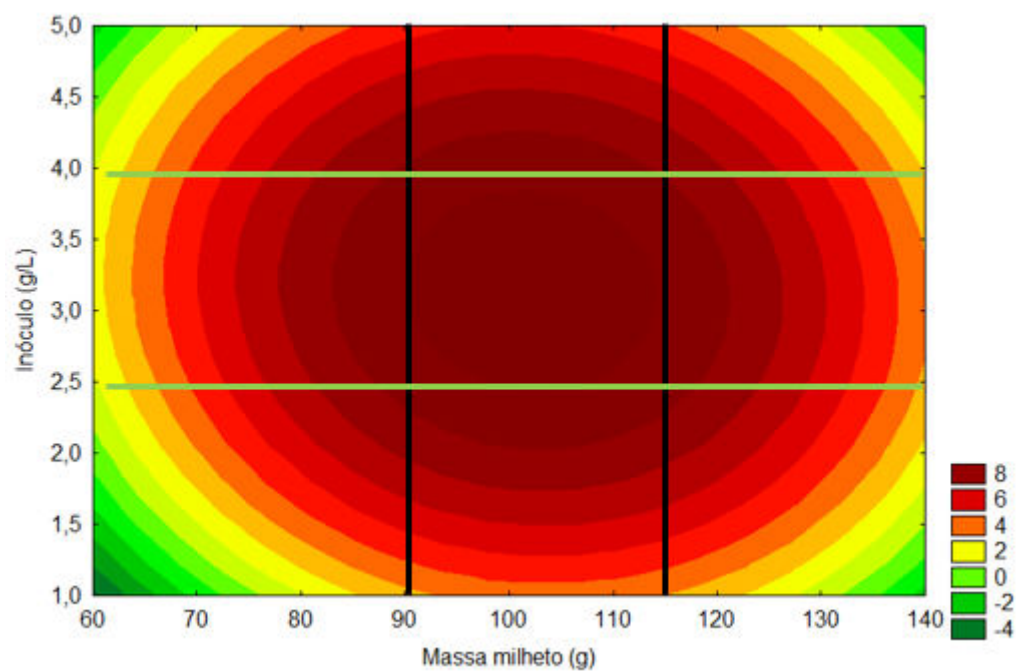
**Figura 4.17** – Curva de contorno para a umidade (%) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade de biomassa seca.



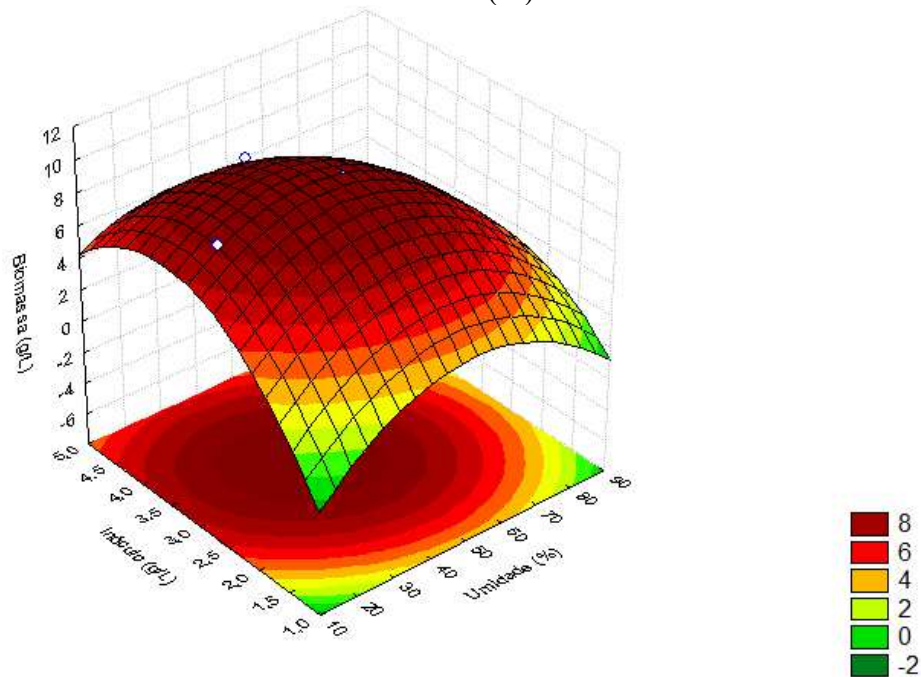
**Figura 4.18** – Superfície de resposta para biomassa seca em relação a inóculo (g/L) e massa de milho (g).



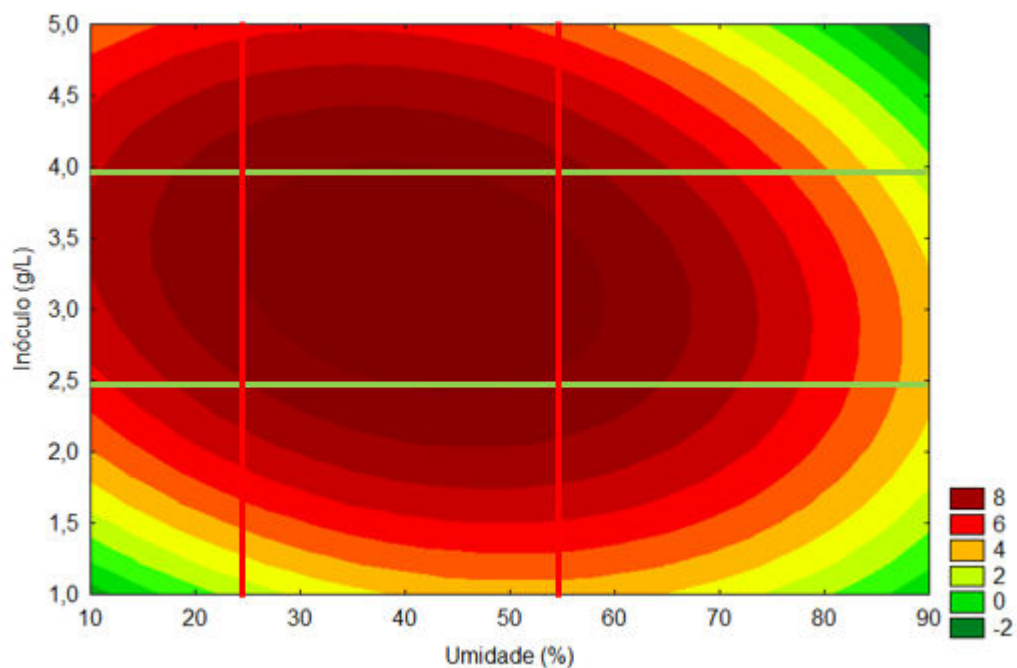
**Figura 4.19** – Curva de contorno para a inóculo (g/L) e massa de milho (g) objetivando a máxima atividade de biomassa seca.



**Figura 4.20** – Superfície de resposta para biomassa seca em relação a inóculo (g/L) e umidade (%).



**Figura 4.21** – Curva de contorno para a inóculo (g/L) e umidade (%) objetivando a máxima atividade de biomassa seca.



A partir da análise das figuras acima, a maior resposta para biomassa seca está associada a quantidades, relativamente altas, de massa de milho e concentração de inóculo, a umidade para este fim, não apresenta uma boa influência. Quando as variáveis X1, X2 e X3 estão nestas faixas, a biomassa seca atinge a concentração média de 9 g/L, tendo a máxima em 9,78 g/L.

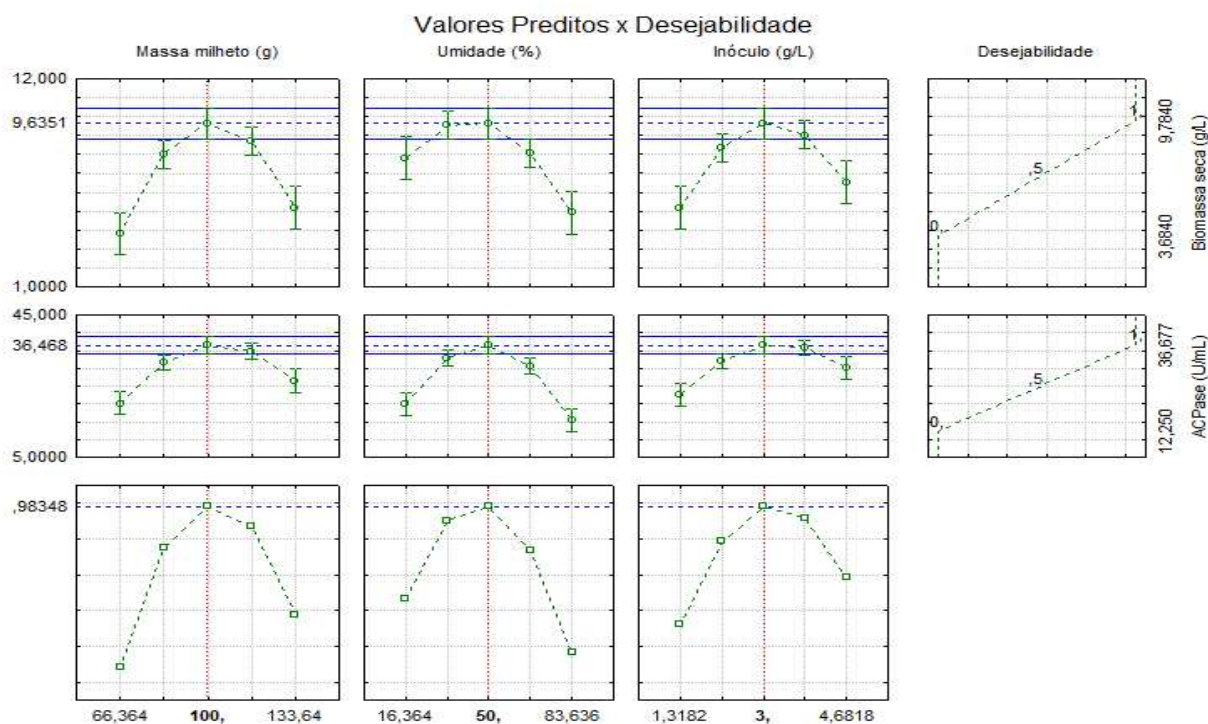
### 4.2.3 Análise conjunta das repostas da atividade da fosfatase ácida (ACPase) e da concentração de biomassa

As superfícies de resposta e as curvas de contorno para a atividade da fosfatase ácida (ACPase) indicaram que a região que maximiza a produção de fosfatase ácida indicou massa de milho na faixa de 90g e 120g, umidade de 35% e 55% e concentração de inóculo de 2,5g/L e 4,0 g/L.

Já para a concentração de biomassa a análise das superfícies de resposta em conjunto com as curvas de contorno indicaram que para a maximização da concentração de biomassa deve estar entre massa de milho de 90 g e 115 g, umidade de 25% e 55% e concentração de inóculo de 2,5g/L e 4,0 g/L. Analisando a interseção das variáveis para as duas respostas estudadas encontra-se massa de milho 90 g e 115 g, umidade de 35% e 55% e concentração de inóculo de 2,5g/L e 4,0 g/L.

A definição do ponto dentro das faixas selecionadas pela análise da superfície de resposta foi realizada utilizando-se a função desejabilidade pelo programa *Statistica*. Com a desejabilidade foi possível determinar a condição que otimizava simultaneamente a atividade da fosfatase ácida (ACPase) e da concentração de biomassa considerando a influência conjunta das três variáveis independentes avaliadas, massa de milho, umidade e concentração de inóculo, conforme mostrado pela Figura 4.22.

**Figura 4.22.** Perfis da função desejabilidade para maximização simultânea das repostas atividade da fosfatase ácida (ACPase) e da concentração de biomassa.



De acordo com a Figura 4.22 os três perfis da parte superior são relativos à variação da concentração da biomassa com cada fator. Os três perfis do meio são relativos à variação da atividade da fosfatase ácida (ACPase). O quarto perfil de cada uma dessas linhas apresenta a faixa de desejabilidade aceitável para a maximização de cada resposta ( $0 \leq d_i \leq 1$ ). Os três perfis da parte inferior mostram a desejabilidade global, com valor 0,987. Esse resultado revela um alto nível de confiabilidade para a aplicação desse método de otimização simultânea, realizado a partir dos resultados experimentais, pois o seu objetivo é de que a desejabilidade fique o mais próximo da unidade.

Dessa forma, as condições decodificadas que simultaneamente otimizam as duas respostas são 100g para massa de milho, 50% umidade e 3g/L para a concentração de inóculo. Esses valores estão de acordo com as análises feitas para as faixas ótimas em relação massa de milho, umidade e concentração de inóculo, com base nos resultados obtidos com as superfícies de resposta e curvas de contorno das Figuras 4.8 a 4.13 e das Figuras 4.17 a 4.22.

#### 4.2.4 Validação do modelo nas condições otimizadas

Após a determinação desta condição ótima (50% umidade; 100 g massa de milho; 3 g/L de inóculo), ela foi reproduzida experimentalmente, e os resultados são mostrados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** – Resultados obtidos para fermentação sólida com cultivo com água destilada e extração enzimática com Tween 80, utilizando o substrato milho.

| FES – Cultivo com água destilada e extração enzimática com Tween 80 utilizando milho |             |                |      |                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------|------|------------------------|
| Tempo (dias)                                                                         | Umidade (%) | Biomassa (g/L) | pH   | Fosfatase ácida (U/mL) |
| 0                                                                                    | 50          | 3,00           | 4,00 | 0,00                   |
| 3                                                                                    | 50          | 2,58           | 4,01 | 13,06                  |
| 5                                                                                    | 50          | 3,80           | 4,05 | 18,90                  |
| 7                                                                                    | 50          | 6,22           | 4,00 | 24,63                  |
| 9                                                                                    | 50          | 9,27           | 4,06 | 36,09                  |

A partir dos resultados obtidos verificamos máxima produção de fosfatase ácida de 36,09 U/mL e biomassa 9,27 g/L onde o pH se manteve constante e ácido em torno de 4. Todos os resultados corroboram com os resultados de produção de fosfatase ácida obtidos na literatura e que foram já discutidos nesse trabalho.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obteve-se as seguintes conclusões:

- Os testes preliminares foram fundamentais para definir os meios de cultivo específicos para produção da fosfatase ácida. Os melhores resultados foram para o método de cultivo com água destilada estéril e extração com Tween 80, condições selecionadas para Delineamento Composto Central. Nessa etapa foi possível verificar o potencial de produção enzimática de *Trichoderma harzianum*.
- Com o Delineamento Composto Central foi possível desenvolver equações de atividade da fosfatase ácida (U/mL) e biomassa para o microrganismo *Trichoderma harzianum* usando 3 parâmetros que são: massa de milho (g), concentração celular (g/L) e umidade (%).
- O substrato milho utilizado na fermentação em estado sólido promoveu uma produção de fosfatase ácida de 36 U/mL e biomassa de 9,00 g/L, nas condições 100 g para massa de milho, 50% de umidade e 3 g/L para concentração de inóculo demonstrando seu grande potencial de aplicação.

## 6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar técnicas de extração e purificação das ACPases produzidas por FES;
- Estudar a razão massa/volume de solvente;
- Aplicar as ACPases produzidas pelo fungo *Trichoderma harzianum* no crescimento de raízes, como por exemplo *Arabidopsis*;
- Estudar a fermentação sólida não estática (reatores com agitação e aeração forçada);
- Reciclar fósforo de materiais orgânicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDOO, K.E.; HENRY, R.; WOOD, B.J.B. Solid state fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v.28, p.201-237, 1982. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)70236-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70236-3).
- ALEKSIEVA, P. and MICHEVA-VITEVA, S. Regulation of extracellular acid phosphatase biosynthesis by phosphates in proteinase producing fungus *Humicola lútea* 120-5. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 570-575, 2000. [https://doi.org/10.1016/s01410229\(00\)00237-4](https://doi.org/10.1016/s01410229(00)00237-4).
- ALMEIDA, C. N. S., ARAÚJO, B. R., JEAN MARCEL RODRIGUES PINHO, J. M. R., PAIVA, C. A. O., GOMES, E. A., SANTOS, F. S. 2015. **Atividade de Fosfatases em Solo Cultivado com Milho em Resposta à Adubação com Fertilizantes Organominerais Associados a Microrganismos Solubilizadores de Fosfato**. XXXV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Centro de convenções – Natal RN. <https://doi.org/10.1590/s0100-06831998000300005>.
- AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. **Methods Enzymol.** 1966; 8:115– 118. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08014-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08014-5).
- AOYAMA, H., SILVA, T. M.A., MIRANDA, M. A., FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 6, 896-900, 2003. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000600019>.
- ARAÚJO, T. R. **Reaproveitamento de glicerol para produção de bioprodutos: biopolímeros**. 82f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2014.350>.
- AURORA, S. et al. Oxygen uptake rate as a tool for on-line estimation of cell biomass and bed temperature in a novel solid-state fermentation bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1923-2>.
- BARBOSA JÚNIOR, Altino; POLIZELI, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes. **Estudos de fosfatases ácidas alcalinas produzidas pelo fungo *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis* em cultivos submersos e substrato sólido**. 2006.Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. <https://doi.org/10.29381/0103-8559/2020300192-9>.
- BADER, A. N., SALERNO, G. L., COVACEVICH, F., e CONSOLO, V. F. (2019). Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of King Saud University - Science**. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>.
- BAKKER, C. **Avaliação e produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo de farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1487-19049-178154>.
- BEHERA, B. C., YADAV, H., SINGH, S. K., MISHRA, R. R., SETHI, B. K., DUTTA, S. K., e THATOI, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. **Journal of**

**Genetic Engineering and Biotechnology**, 15(1), 169–178.

<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>.

BOYCE, A. and WALSH, G. Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis*. **Journal Biotechnology**, v. 132(1), p. 82–87, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.028>.

BUCHERT, J.; HEIKINHEIMO, L. New cellulase processes for the textile industry. EU—project report. **Carbohydr Eur.** 1998; 22:32–34. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0\\_4](https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_4).

BUSTAMANTE, J. (2015). **Producción de proteína microbiana con gabazo de manzana**. 151, 10–17. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>.

CARVALHO, I.M., JÚNIOR, F.B.R. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2003. 26p. ISSN 1517-5111;85. [https://doi.org/10.17138/tgft\(1\)95-96](https://doi.org/10.17138/tgft(1)95-96).

CHAVEZ, M. P. Produção de *Trichoderma* sp. e avaliação de seu efeito em cultivo de Crisântemo. Trabalho de grau - Pontofícia Universidad Javeriana. Bogota. 2006.

CHAIMOVICH, H.; NOME, F. (1970) Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. **Arch. Biochem. Biophys.** 139: 9-16. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90039-1).

CHEN, Y. P., REKHA, P. D., ARUN, A. B., SHEN, F. T., LAI, W.-A., e YOUNG, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, 34(1), 33–41.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>.

CRUZ, A. C. C.; NASCIMENTO, I.; SOUZA, L. S. 2007. **Determinação da toxicidade de diferentes formulações de biodiesel: fosfatase ácida como biomarcador bioquímico**. 22º semana de mobilização científica – SEMOC. Universidade católica de Salvador. Salvador, Brasil. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.117>.

DHILLON, G. S., OBEROI, H. S., KAUR, S., BANSAL, S., e BRAR, S. K. (2011). Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, 34(1), 1160–1167. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001>.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1995. Basic plant pathology methods. 4Q ed., CRC **Lewis Publishers**, Boca Raton 434pp. ISBN:08-493-5921X.

DICKMAN, M. B. e YARDEN, O. Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in filamentous Fungi. **Fungal Genetic Biology**, v. 26, p. 99 – 117, 1999.

<https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1118>.

EMBRAPA. **Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma***. IV curso teórico e prático. 18 a 20 de setembro de 2012. Jaguariúna, SP. Disponível em: [www.cnpma.embrapa.br. https://doi.org/10.47749/t/unicamp.2018.1037020](https://doi.org/10.47749/t/unicamp.2018.1037020).

FARINAS, C. S., PIROTA, R. D. P. B., FONSECA, R. F., NETO, V. B. **Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial.** EMBRAPA, Capítulo 7. 2014. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.357>.

FILHO, G. N. S. e VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **R. Bras. Ci. Solo**, 24:311-319, 2000. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832000000200008>.

GATIBONI, L. C., KAMINSKI, J., RHEINHEIMER, D. S., BRUNETTO, G. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesq. Agropec. Bras., Brasília**, v.43, n.8, p.1085-1091, ago.2008. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2008000800019>.

GARCIA, R.; NEIVA, J.N.M. Utilização da amonização na melhoria da qualidade de volumosos para ruminantes. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 5., Salvador, 1994. Anais. Salvador: Sociedade Nordestina de Produção Animal, 1994. p.41-61. <https://doi.org/10.11606/d.74.2012.tde-19032013-095542>.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.85-101, 2003. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(02\)00122-5](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(02)00122-5).

GOMES, W.; MARTINI RODRIGUES, B.; ANDRÉA FRANCO BURGUIM, J.; MENDEZ SOARES, D.; ETCHEGARAY, A.; KELLY MENDES VALENTE, R.; BORIN NOGUEIRA, A. Tendências de otimização na produção de lipopeptídeos totais por *Bacillus velezensis* 0g revelaram um método de fermentação submerso sustentável usando cascas de batata doce. **Revista Tecnológica**, v. 30, n. 1, p. 107-123, 3 mar. 2022. <https://doi.org/10.4025/revtecnol.v30i1.55243>.

GOMES, E. V.; COSTA, M. N.; PAULA, R. G. AZEVEDO, R. R. SILVA, F. L.; NORONHA, E. F. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self-cell wall protection. **Scientific Reports**. 2015 Dec 9. doi: 10.1038/srep17998. <https://doi.org/10.1038/srep17998>.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELLI, M. de L.T. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 40, p. 201-207, 2004. <https://doi.org/10.1042/ba20030208>.

HANADA, R. E. e COSTA, I. B. **Efeito da inoculação fúngica de *Trichoderma martiale* como agente biocontrole contra podridão parda do cacaueiro.** In: Souza, L. A. G. de, Silva Filho, D. F., Benavente, C. A. T., Noda, H. Ciência e tecnologia aplicada aos agroecossistemas da Amazônia Central. Manaus: Inpa; 2018. p. 133-142. <https://doi.org/10.1590/s0100-54052008000300013>.

HANSEN, G.H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J.C.; LÜBECK, P.S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged jcec JCEC - ISSN 2527-1075. fermentation. **Process Biochemistry**, v.50, n.9, p.1327-1341, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>.

HAAS, H.; REDL, B.; LEITNER, E.; STOFFLER, G. Penicillium chrysogenum extracellular acid phosphatase: purification and biochemical characterization. **Biochim Biophys**, v.1074(3), p. 392–397, 1991. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90090-4).

HARMAN, G., HOWELL, C., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat. Rev. Microbiol.** 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>.

HOLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, n.2, p.175-186, 2004. ISSN 0175-7598. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>.

ICHIMURA, T., HU, J., AITA, D. Q., e MARUYAMA, S. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and insulin secretion stimulative activity of fermented fish sauce. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96(5), 496–499. doi:10.1016/s13891723(03)70138-8. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(03\)70138-8](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(03)70138-8).

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY - IUBMB. EC 3. **Hydrolase nomenclature**. NC-IUBMB; 2022 [cited 2022 March 22]. Available from: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/>. <https://doi.org/10.1080/15216540500090645>.

JONSSON, C.M., AOYAMA, H. Extração, caracterização parcial e susceptibilidade ao Hg<sup>2+</sup> da fosfatase ácida da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Sci. agric.** (Piracicaba, Braz.). 2009, vol.66, n.5, pp.634-642. ISSN 1678-992X. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162009000500008>.

JUNIOR, A. F. C., OLIVEIRA, L. A., OLIVEIRA A. N., WILLERDING, A. L., LEANDRO MARCIANO MARRA, SILVIA MARIA DE OLIVEIRA-LONGATTI, CLÁUDIO ROBERTO FONSÊCA SOUSA SOARES, FÁBIO LOPES OLIVARES e FATIMA MARIA DE SOUZA MOREIRA (2019). The Amount of Phosphate Solubilization Depends on the Strain, C-Source, Organic Acids and Type of Phosphate. **Geomicrobiology Journal**, 36:3, 232-242. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1542469>.

JUNIOR, F. B.R., MENDES, I.C. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, DF : Embrapa Cerrado, 2003. 26 p. **Embrapa Cerrados**, ISSN 1517-5111; 85. [https://doi.org/10.17138/tgft\(1\)95-96](https://doi.org/10.17138/tgft(1)95-96).

KAPRI, A., e TEWARI, L. (2010). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41(3), 787–795. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822010005000001>.

KAPOOR, M.; NAIR, L.M.; KUHAD, R.C. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, n.1, p.88-97, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.06.009>.

KHAN, M.S., AHMAD, E., ZAIDI, A., OVES, M. (2013). Functional Aspect of Phosphate-Solubilizing Bacteria: Importance in Crop Production. In: Maheshwari, D., Saraf, M., Aeron,

A. (eds) **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity**. Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_10).

KLEIN, C.; AGNE, S. A. A. Phosphorus: from the nutrient to pollutant!. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 1713–1721, 2013. DOI: 10.5902/223611706430. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/6430>. Acesso em: 18 aug. 2022. <https://doi.org/10.5902/223611706430>.

KRELING, V., FALCONE, F.H., KEHRENBURG, C. et al. Campylobacter sp.: Pathogenicity factors and prevention methods—new molecular targets for innovative antivirulence drugs. **Appl Microbiol Biotechnol** 104, 10409–10436 (2020).  
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10974-5>.

KIM, S.J.; JEONG, D.G.; YOON, T.S.; SON, J.H.; CHO, S.K.; RYU, S.E.; KIM, J.H. (2006) Crystal structure of human TMDP, a testis-specific dual specificity protein phosphatase: Implications for substrate specificity. **Proteins**. 324(5): 1041-50.  
<https://doi.org/10.1002/prot.21197>.

LATEEF, J. K.; OLEKE, K. E. B.; GUEGUIM, S. O.; OYENIYI, O. R.; ONIFADE, A. O.; OYELEYE, O. C.; OLADOSU, A. O.; OYELAMI. Improving the quality of agrowastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. **World J. Microbiol. Biotechnology**, v. 24, p. 2369-2374, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9749-8>.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p. BR15.3; 574.192, N4251.

LEITÃO, V.O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*, **Biotechnology Letters**, v. 32(8), p. 1083-1088, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0264-2>.

LEITE, P., SOUSA, D., FERNANDES, H., FERREIRA, M., COSTA, A. R., FILIPE, D., SALGADO, J. M. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407>.

LEVI YAFETTO. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis, **Heliyon**, Volume 8, Issue 3, 2022, e09173, ISSN 2405-8440. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>.

LI, Z.; WANG Z.; PENG G.; YIN Y.; ZHAO H.; CAO Y.; XIA Y. Purification and characterization of a novel thermostable extracellular protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 1961-1968, 2006. <https://doi.org/10.1271/bbb.60136>.

LIMA, M. C. R. **Caracterização Bioquímica de uma fosfatase ácida produzida por *Trichoderma harzianum***. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2006.  
<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/1267>.

LIMA, F. A.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. **Produção em fermentação submersa e avaliação da imobilização de fosfatases ácidas de *Trichoderma* sp.** Tese de Doutorado defendida na Universidade Federal de Uberlândia, Engenharia Química, Uberlândia. 2022. <https://doi.org/10.14295/2596-2221.xviceel.2018.212>.

LIMA, F. A., ROLA, J.C., GOMES DE FREITAS, M. M., , AFONSO, J. M. M.A., RESENDE, M.M. Acid Phosphatase Immobilization and Production Study by *Trichoderma* spp. in Soybean Molasses. **Chemical Engineering Technology**. 45, No. 00, 1–7. <https://doi.org/10.1002/ceat.202100208>.

LORITO, M., WOO, S.L., SCALA, F., 2004. **Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante: i funghi.** agroindustria 3, 181–195.

LYNCH. J. P AND DEIKMAN, J. **Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes.** American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, E.U.A. 401 p. 1998.

MACEDO, D.M. ***Duosporium yamadatum*: produção massal, formulação e associação com herbicidas para o controle de tiririca.** Orientador: Robert Weingart Barreto. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MARGALEF, O.; SARDANS, J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M.; MOLOWNY-HORAS, R.; JANSSENS, I. A.; CIAIS, P.; GOLL, D.; RICHTER, A.; OBERSTEINER, M.; ASENSIO, D.; PEÑUELAS, J. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. **Scientific Reports**. Tokyo, v. 7, P. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01418-8>.

MONTEIRO, V. N., e SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos: **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**. Goiânia, v.3, n.5, ano 3, jan/jun 2009. <https://doi.org/10.19142/rpq.v3i5.83>.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid-state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.3, p.1119-1127, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822011000300033>.

NAKAGI, V. S., JÚNIOR, J. M. P. **Caracterização da atividade da fosfatase ácida de *Penicillium Implicatum*.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Jaboticabal, São Paulo. 2007. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.117>.

NAHAS, E., BANZATTO, D. A., e ASSIS, L. C. (1990). Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. **Soil Biology and Biochemistry**, 22(8), 1097–1101. doi:10.1016/0038-0717(90)90035-x. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90035-x](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90035-x).

NAZARI M, SMITH DL. A PGPR-produced bacteriocin for sustainable agriculture: a review of thuricin 17 characteristics and applications. **Front Plant Sci** 2020:11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00916>.

NEUMAN, H. (1968) Substrat selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase. **J.Biol. Chem.** 243: 4671-4676. Volume 243, Issue 18, 25 September 1968, Pages 4671-4676. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93171-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93171-6).

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Can J Microbiol.** 1996; 42:1039–1044.  
<https://doi.org/10.1139/m96-133>.

ORNELA, P. D.O, GUIMARÃES, L.H.S. **Co-purificação e caracterização das fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzidas em fermentação submersa**. Dissertação de mestrado em biotecnologia. Unesp, São Paulo.2017. oai: repositorio.unesp.br:11449/151602.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S. l.], v. 7, n. 3, 2012.  
<https://doi.org/10.54372/sb.2021.v16.3105>.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. Nova Deli: **Asiatech**, 2001. 221p.

PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; SASSANO, C.E.N.; SATO, S.; MORAES, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, New York, v.56, n.3, p.371-375, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(02\)00209-1](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(02)00209-1).

PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, E. S. B.; ANDRADE, A. M., FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico**, 102. ISSN: 1679-6535. Agosto, 2005 Fortaleza, CE. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.357>.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, p.161-179, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>.

RAZAK, D. L. A.; RASHID N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 33-38, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.11.003>.

RAIMBAULT, M. General, and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

RAMADA, M. H.; STEINDORFF, A. S.; BLOCH, C. J. R.; ULHOA, C. J. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, 2015.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.201400546>.

REINOSO, B. (2015). **Diseño de un fermentador de bandeja a escala piloto para la producción de enzimas con actividad ligninolítica y celulolítica a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en medio sólido con aserrín de eucalipto**. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial EPN.  
<https://doi.org/10.24275/uami.b5644r55p>.

RICHARDSON, A. E. (2001). **Functional Plant Biology**, 28(9), 897.  
<https://doi.org/10.1071/PP01093>.

ROBINSON, T., SINGH, D. AND NIGAM, P. (2001) Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55: 284-289. <https://doi.org/10.1007/s002530000565>.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; NETO, V.B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.912-919, 2011. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2011000800018>.

SADH, P.K., DUHAN, S. e DUHAN, J.S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresour. Bioprocess.** 5, 1 (2018).  
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>.

SANTIN, Ana Paula. **Estudo da secagem e da inativação de leveduras saccharomyces cerevisiae**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SANTOS, T.C.; ROCHA, T.J.O.; OLIVEIRA, A.C.; FILHO, G.A.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arq. Inst. Biol.**, v.80, n.1, p.65-71, 2013. <https://doi.org/10.1590/s1808-16572013000100010>.

SANTOS et al. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Quím. Nova** vol. 31 no.8 São Paulo 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800010>.

SHAO, A. Z.C. SUN, S.G. FAN, X. XU, W. WANG, E. AMOMBO, Y.L. YIN, X.N. LI, G.Y. Wang, H.L. Wang, J.M. Fu Moderately low nitrogen application mitigate the negative effects of salt stress on annual ryegrass seedlings PeerJ, 8 (2020), p. e10427.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.10427>.

SILVA, L.L, LANNES, S. L., ANDRADE, J.A. **Atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em genótipos de milho**. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, 2020. <https://doi.org/10.11606/d.11.2019.tde-20191108-102635>.

SIMÕES, M. L. G. **Controle biológico de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa do cacaueiro, por diferentes espécies e linhagens de *Trichoderma* spp.** [Tese de Doutorado]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2010. <https://doi.org/10.47749/t/unicamp.2016.967457>.

SOUZA, A. A. **Produção e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum* (ALL42)**. 2011.82f. Dissertação (Mestre em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2011. <https://doi.org/10.28933/ajg-2020-01-2005>.

SOUCHIE, E. L.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; CAMPELLO, E. F. C.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. **Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 183-193, Mar. 2006.

Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 15 jan. 2006.

<https://doi.org/10.1590/s0001-37652006000100016>.

TARABOULSI-Jr, F.A. **Enzimas microbianas na conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico usando reatores descontínuo-alimentado e contínuo com membrana.**

Dissertação de mestrado defendida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2010, 98p. <https://doi.org/10.11606/d.9.2011.tde-28072010-113005>.

TRAN, T. H.; HURLEY, B. A.; PLAXTON, W. C. Feeding hungry plants: The hole of purple acid phosphatase in phosphate nutrition. **Plant Science**, v. 179, p. 14-27, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.005>.

ULHOA, C.J., PEBERDY, J.F. Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Current Microbiology** 23, 285–289 (1991).

<https://doi.org/10.1007/BF02092032>.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R.

Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.1-20, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>.

VICENT, J. B.; CROWDER, M. W.; AVERILL B. A.; Trends Biochem. Sci. 1992, 17, 105.

VASSILEV S.V., BAXTER D., ANDERSEN L.K., VASSILEVA C.G. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, 89 (2010), pp. 913–933.

ZIMMER, K. R., BORRÉ, G. L., TRENTIN, D. S., JÚNIOR, C. W., FRASSON, A. P., GRAEFF, A. A., GOMES, P., MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009. <https://doi.org/10.31514/rliberato.2009v10n14.p123>.

ZHAO, L.; LIU, Q.; ZHANG, YA-QING; CUI, QING-YU; LIANG, YUAN-CUN. Effect of acid phosphatase produced by *Trichoderma asperellum* Q1 on growth of Arabidopsis under salt stress, **Journal of Integrative Agriculture** 2017, 16(6): 1341–1347.

[https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(16\)61490-9](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(16)61490-9).

ZHANG, G. Q.; CHEN, Q. J.; SUN, J.; WANG, H. X.; HAN, C. H. Purification and characterization of a novel acid phosphatase from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. **J Basic Microbiol.** 2013; 53:1–8. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200218>.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 42, p. 209-234, 2002.

<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.42.083001.144616>.

WANG, W.; YANG, S. Solid State Fermentation and Its Applications. In: Yang, S. (ed.). Bioprocessing for value- added products from renewable resources. **Elsevier**, 2007. cap.18, p.465-489. <https://doi.org/10.1016/b978-044452114-9/50019-0>.

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**. Volume 8, edição 3, março de 2022, e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Assessment of pro-tease activity in hydrolyzed extracts from SSF of hair waste by and indigenous consortium of microorganisms. **Waste Management**, v.49, p.420-426, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.045>.

## APÊNDICE 1

### Curva de calibração para Fosfatase Ácida (ACPase)

Para construção da curva foi comprada um fosfatase ácida de trigo germinado da empresa Sigma Aldrich<sup>TM</sup> e utilizada a metodologia descrita na seção 3.9

