



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**

**PRODUÇÃO DE AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO E  
LIPASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS A PARTIR DE SUBPRODUTOS REGIONAIS  
DO CERRADO**

**ELOANE DAIZE GOMES DALLASTRA**

**Palmas – TO**

**2024**

**ELOANE DAIZE GOMES DALLASTRA**

**PRODUÇÃO DE AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO E  
LIPASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS A PARTIR DE SUBPRODUTOS REGIONAIS  
DO CERRADO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Benevides de Moraes

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lina Maria Grajales

**Palmas – TO  
MARÇO/2024**

# FICHA CATALOGRÁFICA

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

D145p Dallastra, Eloane Daize Gomes.  
Produção de agente de controle biológico e lipases por cultivo em estado sólido de fungos filamentosos a partir de subprodutos regionais do cerrado.. / Eloane Daize Gomes Dallastra. – Palmas, TO, 2024.  
102 f.  
  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2024.  
Orientador: Paula Benevides de Moraes  
Coorientador: Lina Maria Grajales  
  
1. Enzimas. 2. Fungo *Metarhizium anisopliae*. 3. Fungo *Aspergillus flavus*. 4. Resíduos agroindustriais. I. Título

CDD 660.6

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**ELOANE DAIZE GOMES DALLASTRA**

**PRODUÇÃO DE AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO E  
LIPASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS A PARTIR DE SUBPRODUTOS REGIONAIS  
DO CERRADO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 12/03/2024

## Banca examinadora

Documento assinado digitalmente  
 **PAULA BENEVIDES DE MORAIS**  
Data: 11/04/2024 09:00:00  
Verificação: <https://verificar.gov.br>

---

**Prof. Dra. Paula Benevides de Moraes (Orientadora)**  
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente  
 **ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU**  
Data: 11/04/2024 09:00:00  
Verificação: <https://verificar.gov.br>

---

**Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu**  
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente  
 **RAIMUNDO WAGNER DE SOUZA AGUIAR**  
Data: 11/04/2024 17:20:00  
Verificação: <https://verificar.gov.br>

---

**Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar**  
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente  
 **ABRAHAM DAMIAN GIRALDO ZUNIGA**  
Data: 30/04/2024 11:30:00  
Verificação: <https://verificar.gov.br>

---

**Prof. Dr. Abraham Damian Giraldo Zuniga**  
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente  
 **ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA**  
Data: 11/04/2024 12:00:00  
Verificação: <https://verificar.gov.br>

---

**Prof. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza**  
Universidade Federal do Amazonas

**DEDICATÓRIA**

Ao meu filho, Davi.

Ao meu marido, Anderson.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Joel e Claudia, por estarem ao meu lado em cada passo que decido dar e por todo amor e zelo.

Ao meu marido Anderson, agradeço por sempre torcer, me incentivar e me ajudar a chegar até aqui.

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Paula Benevides de Moraes e, à minha coorientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Lina Maria Grajales, por me auxiliarem nessa trajetória e contribuírem para que eu me tornasse uma pesquisadora.

À Universidade Federal do Tocantins-UFT e ao Programa de Doutorado da Rede BIONORTE, pela oportunidade oferecida de desenvolver este trabalho.

À equipe técnica do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da UFT.

Ao Grupo de pesquisa Engenharia de Biorreatores, da Universidade Federal do Tocantins (UFT) pelo auxílio no desenvolvimento de experimentos.

À Cooperativa Multifuncional de Economia Solidária do Estado do Tocantins (COOME-SOL) pelo fornecimento de matéria-prima utilizada na pesquisa.

Ao apoio financeiro recebido da PROAP-Bionorte para realização do sequenciamento do isolado fúngico.

Ao financiamento de parte deste trabalho pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (bolsas #2018 /00996-2; #2016/10636-8), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, concede # 448890/2014-3) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 001).

## RESUMO

Atualmente, existe um grande interesse por agentes de controle biológico e enzimas, a exemplo das lipases. Contudo, esses bioprodutos possuem processos de produção que apresentam custos elevados e desafios que devem ser considerados e explorados. Este trabalho teve como objetivo a produção de um agente de controle biológico e lipases, por Cultivo em Estado Sólido (CES) de fungos filamentosos e a valorização de subprodutos regionais. Na primeira fase deste trabalho, foi desenvolvido um biorreator de bandejas em escala piloto que permite a intensificação do processo combinando operações *upstream* e cultivo em um único equipamento. O equipamento possui um sistema de atomização de suspensão de esporos, solução nutritiva e água de resfriamento acima do meio de cultivo e um sistema de esterilização a vapor. Para validar o biorreator foram realizados dois estudos de caso. No primeiro, o agente de controle biológico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 foi cultivado sobre resíduos agroindustriais. A produção de conídios/mL obtida com a mistura de farelo de trigo e quirera de arroz foi de  $(16,7 \pm 0,46) \times 10^8$ , o que é estatisticamente maior ( $\alpha = 0,05$ ) que a produção de conídios de  $(8,59 \pm 1,60) \times 10^8$  cultivados na testemunha (Arroz Tipo I). No segundo estudo de caso, lipases de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 foram produzidas em um resíduo agroindustrial, o bagaço do coco babaçu, e a média da Atividade Enzimática (AE) foi de  $5,64 \pm 0,45$  U/mL com base em 36 cultivos. Na segunda fase deste trabalho, foram produzidas lipases de *Aspergillus flavus*, visando um processo econômico e sustentável. Primeiramente, foi realizada a caracterização morfológica, identificação molecular e avaliação da toxicidade do fungo. Após, foi obtida a cinética de produção de lipases de *A. flavus* por CES, utilizando como substrato o subproduto bagaço do coco babaçu, onde foi observado um valor máximo de AE de 6,13 U/mL, que ocorreu após nove dias de cultivo. Por fim, foi realizado um teste de robustez da linhagem em uma série de bateladas de produção de lipases, a fim de avaliar a capacidade do fungo em manter as suas características morfológicas e produção de lipases, ao reutilizar os seus conídios remanescentes no substrato em cultivos subsequentes. No teste de robustez, o fungo manteve a maioria de suas características morfológicas e apresentou um valor máximo de produção de lipases de 8,7 U/mL no quinto dia de cultivo, no segundo ciclo de reuso dos conídios. Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram que o biorreator de bandejas desenvolvido pode produzir fungos e lipases de forma a reduzir o manuseio, energia, custos e tempo de processo. Além disso, os resultados obtidos através do teste de robustez realizado mostraram um rendimento superior de produção de lipases em menos tempo de cultivo do fungo, tornando possível a obtenção dessa enzima de uma maneira mais econômica, eficiente e sustentável.

**Palavras-chave:** Enzimas; Fungo *Metarhizium anisopliae*; Fungo *Aspergillus flavus*; Resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

Currently, there is great interest in biological control agents and enzymes, such as lipases. However, these bioproducts have production processes that present high costs and challenges that must be considered and explored. This work aimed to produce a biological control agent and lipases, by Solid State Cultivation (CES) of filamentous fungi and the valorization of regional by-products. In the first phase of this work, a pilot-scale tray bioreactor was developed that allows process intensification by combining upstream operations and cultivation in a single piece of equipment. The equipment has an atomization system of spore suspension, nutrient solution and cooling water above the cultivation medium and a steam sterilization system. To validate the bioreactor, two case studies were carried out. In the first, the biological control agent *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 was cultivated on agro-industrial residues. The production of conidia/mL obtained with the mixture of wheat bran and rice grits was  $(16.7 \pm 0.46) \times 10^8$ , which is statistically higher ( $\alpha = 0.05$ ) than the production of conidia of  $(8.59 \pm 1.60) \times 10^8$  cultivated in the control (Type I rice). In the second case study, lipases from *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 were produced in an agro-industrial waste, babassu coconut bagasse, and the average Enzyme Activity (AE) was  $5.64 \pm 0.45$  U/mL based on 36 crops. In the second phase of this work, lipases from *Aspergillus flavus* were produced, aiming for an economical and sustainable process. Firstly, the morphological characterization, molecular identification and toxicity assessment of the fungus were carried out. Afterwards, the production kinetics of *A. flavus* lipases was obtained by CES, using the by-product babassu coconut bagasse as a substrate, where a maximum AE value of 6.13 U/mL was observed, which occurred after nine days of cultivation. Finally, a strain robustness test was carried out in a series of lipase production batches, in order to evaluate the fungus' ability to maintain its morphological characteristics and lipase production, by reusing its remaining conidia in the substrate in subsequent ones. In the robustness test, the fungus maintained most of its morphological characteristics and presented a maximum lipase production value of 8.7 U/mL on the fifth day of cultivation, in the second cycle of conidia reuse. The results obtained in this work showed that the tray bioreactor developed can produce fungi and lipases in a way that reduces handling, energy, costs and process time. Furthermore, the results obtained through the robustness test carried out showed a higher yield of lipase production in less fungus cultivation time, making it possible to obtain this enzyme in a more economical, efficient and sustainable way.

**Keywords:** Enzymes; *Metarhizium anisopliae* fungus; *Aspergillus flavus* fungus; Agro-industrial waste.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da classificação de <i>Aspergillus spp.</i> , em subgêneros, seções e espécies (número entre parênteses).....	19
Figura 2 - Colônia de <i>A. flavus</i> após sete dias em ágar extrato de malte à 28 °C.....	22
Figura 3 - Colônia de <i>A. flavus</i> após sete dias em ágar extrato de levedura à 25 °C.....	22
Figura 4 - Modelo morfogênico de desenvolvimento de conidióforos de <i>A. flavus</i> /adaptado .	23
Figura 5 - Colônias de <i>M. anisopliae</i> IBCB 383 em diferentes meios de cultura.....	25
Figura 6 -Mercado e aplicação de lipases nos anos de 2019 a 2029 .....	28
Figura 7 - Mercado de lipases líquida e em pó.....	29
Figura 8 - Distribuição da palmeira Babaçu ( <i>Attalea speciosa</i> e <i>Attalea phalerata</i> ) no mapa do Brasil.....	31
Figura 9 - Cadeia produtiva do babaçu.....	32
Figura 10- Coco babaçu.....	33
Figura 11 - Bagaço do coco babaçu .....	33
Figura 12 - Diagrama esquemático generalizado dos processos realizados em uma biofábrica .....	40
Figura 13 - Esquema 3D do biorreator de bandeja e seus periféricos .....	44
Figura 14 - Esquema da vista frontal interna do biorreator de bandeja.....	45
Figura 15 - Esquema de bandeja perfurada no fundo e laterais com dimensões em metros ....	46
Figura 16 - Visão externa do biorreator de bandeja e seus periféricos.....	47
Figura 17 - Visão interna do biorreator de bandeja e seus periféricos .....	47
Figura 18 - Atomizadores .....	48
Figura 19 - Entrada de ar e vapor .....	48
Figura 20 - Bandeja perfurada em seu fundo e laterais .....	48
Figura 21 - Gotas de água na parede do biorreator .....	50
Figura 22 - Bandeja com binômio microrganismo-substrato após o cultivo.....	56
Figura 23 - Formação de aglomerados no binômio microrganismo-substrato após o processo de cultivo .....	57
Figura 24 - Bagaço do coco babaçu .....	71

Figura 25 - Colônia de <i>Aspergillus flavus</i> crescida em meio BDA durante sete dias à 28 °C .	76
Figura 26 - Fotografia de <i>Aspergillus flavus</i> ao microscópio óptico: (a) hifas; (b) conídios; (c) vesícula; (d) haste; (e) conidióforo .....	77
Figura 27 - Verso de colônias de <i>A. flavus</i> : (a) Placa controle; (b) Após adição de amônia e incubação .....	78
Figura 28 - Gráfico da cinética de produção de lipases do fungo <i>Aspergillus flavus</i> a partir do bagaço do coco babaçu .....	79
Figura 29 - Colônias do fungo <i>Aspergillus flavus</i> no teste de robustez .....	80
Figura 30 – Gráfico da cinética de produção de lipases durante 13 dias de cultivo no teste de robustez do fungo .....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade lipolítica a partir de diversos fungos e substratos sólidos .....	30
Tabela 2 - Definições de itens da Figura 13 .....	44
Tabela 3 - Média de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425 obtidos de arroz Tipo I tanto em biorreator de bandeja quanto em sacos de polipropileno.....	56
Tabela 4 - Média de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425 obtidos de arroz Tipo I e resíduos agroindustriais tanto em biorreator de bandeja quanto em sacos de polipropileno.....	58
Tabela 5 - Composição química do bagaço do coco babaçu .....	61
Tabela 6 - Diâmetro das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> no teste de robustez.....	81
Tabela 7 - Esporulação de <i>Aspergillus flavus</i> no teste de robustez .....	81

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
2.2.1	Objetivos específicos - Capítulo 1.....	16
2.2.2	Objetivos específicos - Capítulo 2.....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<i>Aspergillus flavus</i> .....	<b>17</b>
3.1.1	Classificação de <i>Aspergillus</i> .....	18
3.1.2	Morfologia de <i>Aspergillus flavus</i> .....	21
<b>3.2</b>	<i>Metarhizium anisopliae</i> .....	<b>23</b>
3.2.1	Classificação de <i>Metarhizium</i> .....	24
3.2.2	Morfologia de <i>Metarhizium</i> .....	25
<b>3.3</b>	<b>Identificação molecular de fungos filamentosos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>Produção de lipases por fungos filamentosos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b>Lipases</b> .....	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Substratos para cultivo em estado sólido</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Cultivo em estado sólido</b> .....	<b>34</b>
<b>3.8</b>	<b>Biorreatores</b> .....	<b>35</b>
	<b>CAPÍTULO I - Desenvolvimento de um novo biorreator de bandejas em escala piloto para cultivo em estado sólido visando a intensificação do processo.</b> .....	<b>37</b>
<b>1.1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>39</b>
<b>1.2</b>	<b>Desenvolvimento do biorreator</b> .....	<b>43</b>
1.2.1	Projeto do biorreator.....	43
<b>1.3</b>	<b>Estudos de caso</b> .....	<b>51</b>
1.3.1	Produção de <i>M. anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425 E LIPASES .....	51

1.3.2	Materiais e métodos.....	53
1.3.2.1	Materiais .....	53
1.3.2.2	Cultivos em Estado Sólido.....	53
1.3.2.3	Estimativa da produção de conídios de <i>M. anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425 .....	54
1.3.2.4	Produção de lipases extracelulares a partir do fungo <i>M. anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425 .....	54
1.3.3	Projeto experimental e análise estatística.....	55
<b>1.4</b>	<b>  Resultados e discussão.....</b>	<b>55</b>
1.4.1	Produção de <i>M. anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425 .....	55
1.4.2	Produção do fungo <i>M. anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425 a partir de resíduos agroindustriais .....	57
1.4.3	Produção de lipases de <i>M. anisopliae</i> (Metsch) IBCB 425.....	59
1.4.3.1	Seleção do substrato.....	59
1.4.3.2	Caracterização do bagaço do coco babaçu .....	60
1.4.3.3	Tamanho das partículas .....	62
1.4.3.4	Atividade enzimática .....	63
<b>1.5</b>	<b>  Conclusões.....</b>	<b>63</b>
<b>1.6</b>	<b>  Estudos futuros.....</b>	<b>64</b>
<b>1.7</b>	<b>  Declaração de novidade e importância.....</b>	<b>65</b>
<b>1.8</b>	<b>  Agradecimentos .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO II - Produção de lipases visando um processo sustentável e a utilização de subproduto regional. ....</b>		<b>66</b>
<b>2.1</b>	<b>  Introdução.....</b>	<b>68</b>
<b>2.2</b>	<b>  Metodologia.....</b>	<b>71</b>
2.2.1	Caracterização morfológica do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....	71
2.2.2	Teste de produção de micotoxinas .....	72
2.2.3	Identificação molecular .....	72
2.2.4	Cinética de produção de lipases do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....	73

2.2.5	Teste de robustez do fungo utilizando conídios remanescentes.....	74
2.2.5.1	<i>Características morfológicas do fungo no teste de robustez</i> .....	75
2.2.5.2	<i>Cinética enzimática no teste de robustez</i> .....	75
2.2.5.3	<i>Teste de esterilidade do material de reuso</i> .....	75
2.2.6	Planejamento experimental .....	76
<b>2.3</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>76</b>
2.3.1	Caracterização morfológica.....	76
2.3.2	Produção de micotoxinas.....	78
2.3.3	Cinética enzimática .....	78
2.3.4	Teste de robustez do fungo.....	80
2.3.4.1	<i>Caracterização morfológica do fungo no teste de robustez</i> .....	80
2.3.4.2	<i>Cinética de produção de lipases no teste de robustez</i> .....	82
<b>2.4</b>	<b>Considerações finais</b> .....	<b>83</b>
<b>2.5</b>	<b>Agradecimentos</b> .....	<b>83</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO INTEGRADORA</b> .....	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam, entre outras reações, a hidrólise das ligações éster de lipídeos gerando álcoois e ácidos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Essas enzimas são extremamente versáteis porque catalisam inúmeras e diferentes reações, sendo utilizadas na indústria de alimentos, de couro, detergentes, produtos farmacêuticos e reações de síntese orgânica (FERRAZ *et al.*, 2018). No entanto, a aplicação dessas enzimas poderia ser ainda maior caso seus custos de produção não fossem tão elevados (FERRAZ *et al.*, 2018).

Os fungos filamentosos possuem a habilidade de crescer em substratos bastante simples e de baixo custo, além da excepcional capacidade de expressar e excretar proteínas, característica relevante no que se refere à maior facilidade no processo de extração e diminuição de custos de produção desses metabólitos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Graças a estas características e ao avanço do conhecimento acerca dos fungos filamentosos, tornou-se possível a exploração de seu potencial para a produção de lipases visando a aplicação industrial.

O fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* é amplamente utilizado no controle biológico de pragas desde a década de 1970 (BARBIERI *et al.*, 2023; FERRON, 1978). Com isso, o desenvolvimento de metodologias para sua produção visa processos eficientes, ambientalmente corretos e a produção de alimentos seguros (DALLASTRA *et al.* 2023). Além desta importante aplicação, atualmente, o fungo *M. anisopliae* também vem sendo estudado para a produção de enzimas, a exemplo das lipases, com resultados promissores (DUARTE, 2018). Outro fungo filamentoso relacionado à produção de lipases é o *Aspergillus flavus*. Este fungo está entre os principais produtores de lipases do gênero e as espécies de *Aspergillus* produzem lipases que desempenham um papel vital no campo industrial (KAVITHA; SHANKARI; MEENAMBIGA, 2021).

A utilização e valorização regional de resíduos agroindustriais e o emprego de fungos filamentosos em processos de CES são uma boa alternativa para ampliar a escala de produção de agentes de biocontrole (DALLASTRA, 2018) e de lipases (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022), e suprir a demanda crescente desta área (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). A capacidade de fornecer produtos com alta estabilidade, menor geração de águas residuais e a utilização de resíduos de baixo custo, tornam o CES uma técnica atrativa do ponto de vista econômico e ambiental (SOCCOL *et al.*, 2017).

Sabe-se que a produção de agentes de controle biológico e metabólitos fúngicos, como as lipases, exige um rendimento suficiente a um custo relativamente baixo. Associado à essa temática, está o conceito de Ecologia Industrial, que visa, além da diminuição de custos de processo, a diminuição da poluição ambiental e da demanda por matérias primas, de modo que, resíduos de um processo possam ser utilizados como matéria prima de outro (SILVA *et al.*, 2016). Dessa forma, a realização de testes de reuso do material remanescente, constituído pelo substrato e fungo após a produção de lipases, objetivando avaliar a robustez do microrganismo de interesse na sua utilização em bateladas subsequentes, se torna válido e estaria em consenso com esses conceitos em um modo de produção mais sustentável.

Com relação à produção de metabólitos fúngicos e agentes de biocontrole por CES em larga escala, a escolha do modelo do biorreator a ser utilizado também é de fundamental importância para o aumento da eficiência produtiva. Embora o CES apresente diversas vantagens quando comparado ao Cultivo Submerso (CS), diversos fatores influenciam o CES dentro de um biorreator e devem ser controlados, tais como, umidade e temperatura, que devem ser manipuladas durante o processo devido a evaporação e a geração de calor decorrente das atividades metabólicas dos microrganismos (LONSANE *et al.*, 1985).

Adicionalmente, o procedimento de aumento de escala é considerado um dos principais gargalos na tecnologia de CES, principalmente devido à dificuldade de reproduzir as condições ideais obtidas em pequenas escalas e unir todas as etapas do processo de produção em um só equipamento (MUSONI *et al.*, 2015). Devido a isso, a escolha do modelo do biorreator a ser utilizado é de fundamental importância para se obter processos eficientes.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo a produção de um agente de controle biológico e lipases por CES de fungos filamentosos e a valorização de subprodutos regionais, em biorreator de bandejas em escala piloto que permite a intensificação do processo combinando operações *upstream* e cultivo em um único equipamento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir um agente de controle biológico e lipases de fungos filamentosos por CES, a partir de subprodutos regionais.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho encontram-se divididos de acordo com o desenvolvimento de dois artigos científicos abordados nos Capítulos 1 e 2.

#### 2.2.1 Objetivos específicos - Capítulo 1

Desenvolver um biorreator de bandejas em escala piloto para a produção de lipases e conídios do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425;

Avaliar as condições de operação do biorreator desenvolvido para a produção de lipases e conídios do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425;

Avaliar a produção de conídios e lipases do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 no interior do biorreator a partir dos resíduos agroindustriais: bagaço do coco babaçu, farelo de soja, farelo de trigo e quirera de arroz;

Avaliar a disposição e as características dos substratos utilizados para a produção de lipases e conídios do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425;

#### 2.2.2 Objetivos específicos - Capítulo 2

Realizar a caracterização morfológica do fungo *A. flavus*;

Realizar a confirmação da identificação molecular do fungo *A. flavus*;

Produzir lipases de *A. flavus* por CES utilizando bagaço do coco babaçu como substrato;

Obter a cinética de produção de lipases por CES de *A. flavus*;

Testar a robustez da linhagem em novas bateladas, utilizando conídios remanescentes no

substrato utilizado para a produção de lipases;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Aspergillus flavus*

*Aspergillus* é um fungo pertencente à família *Trichocomaceae* (subfamília *Aspergillaceae*), ordem *Eurotiales*, subclasse *Eurotiomycetidae*, classe *Eurotiomycetes*, filo *Ascomycota* (DA SILVA *et al.*, 2015). A nomenclatura do gênero foi dada por Antônio Micheli em 1727 (BENNETT, 2009).

*Aspergillus* é um anamorfo (DA SILVA *et al.*, 2015) de diferentes gêneros tais como *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya* e *Petromyces*, suas espécies possuem diversas propriedades fisiológicas diferentes e são, predominantemente, saprófitas, ou seja, degradam matéria orgânica (OLIBONI, 2022). Para sobreviver, realizam uma digestão exógena, através da secreção de ácidos e enzimas no ambiente em volta para a quebra de polímeros grandes em frações menores, tal estratégia permite que estes fungos degradem celuloses, hemiceluloses, pectinas, lipídeos, quitinas e queratinas (BENNETT, 2009).

As espécies de *Aspergillus* estão distribuídas mundialmente e apresentam grande impacto econômico e social (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). Algumas de suas espécies são termotolerantes, podendo crescer sob temperaturas de até 53 °C, e outras são psicrotolerantes, resistindo a baixas temperaturas (OLIBONI, 2022). Essas características, dentre outras, permitem que determinadas espécies possuam grande importância biotecnológica (OLIBONI, 2022).

Entre as aplicações de *Aspergillus* estão a produção de enzimas para utilização na indústria farmacêutica, alimentícia e de combustíveis. Exemplos de enzimas produzidas pelo gênero são as lipases (OLIVEIRA *et al.*, 2017), pectinases (LI *et al.*, 2020), lactases (DE VRESE *et al.*, 2015), amilases (BEHAILU; ABEBE, 2018) e entre outras. Além disso, *Aspergillus* também atua na produção de ácidos orgânicos para utilização na indústria alimentícia, farmacêutica, química e no apoio ao avanço de tecnologias, a exemplo do ácido cítrico (EL-METWALLY *et al.*, 2020) e ácido glucônico (ZHANG *et al.*, 2016).

Entretanto, fungos do gênero *Aspergillus* também são amplamente associados a diversas perdas econômicas, podendo contaminar produtos agrícolas em diferentes estágios, incluindo pré colheita, colheita, processamento e manuseio. Essas contaminações ocorrem devido a produção das micotoxinas denominadas aflatoxinas (AF) (PODGÓRSKA-KRYSZCZUK,

2023).

A produção de aflatoxinas, um metabólito secundário de *Aspergillus*, pode sofrer influência de diversos fatores como: estresse hídrico e precipitação, capacidade de adaptação do genótipo da cultura para o clima e danos causados por insetos e práticas agrícolas (KHLANGWISSET *et al.*, 2011). A capacidade aflatoxigênica se expressa principalmente sob condições de estresse ambiental, sempre e quando seu genótipo inclui a informação envolvida na cadeia metabólica de produção (RANGEL-MUÑOZ *et al.*, 2020). Além das perdas econômicas, esses metabólitos secundários podem causar patologias em seres humanos, tais doenças são referidas como aspergiloses, podendo acometer a pele, olhos, ouvidos, pulmão e outros órgãos (RUDRAMURTHY *et al.*, 2019).

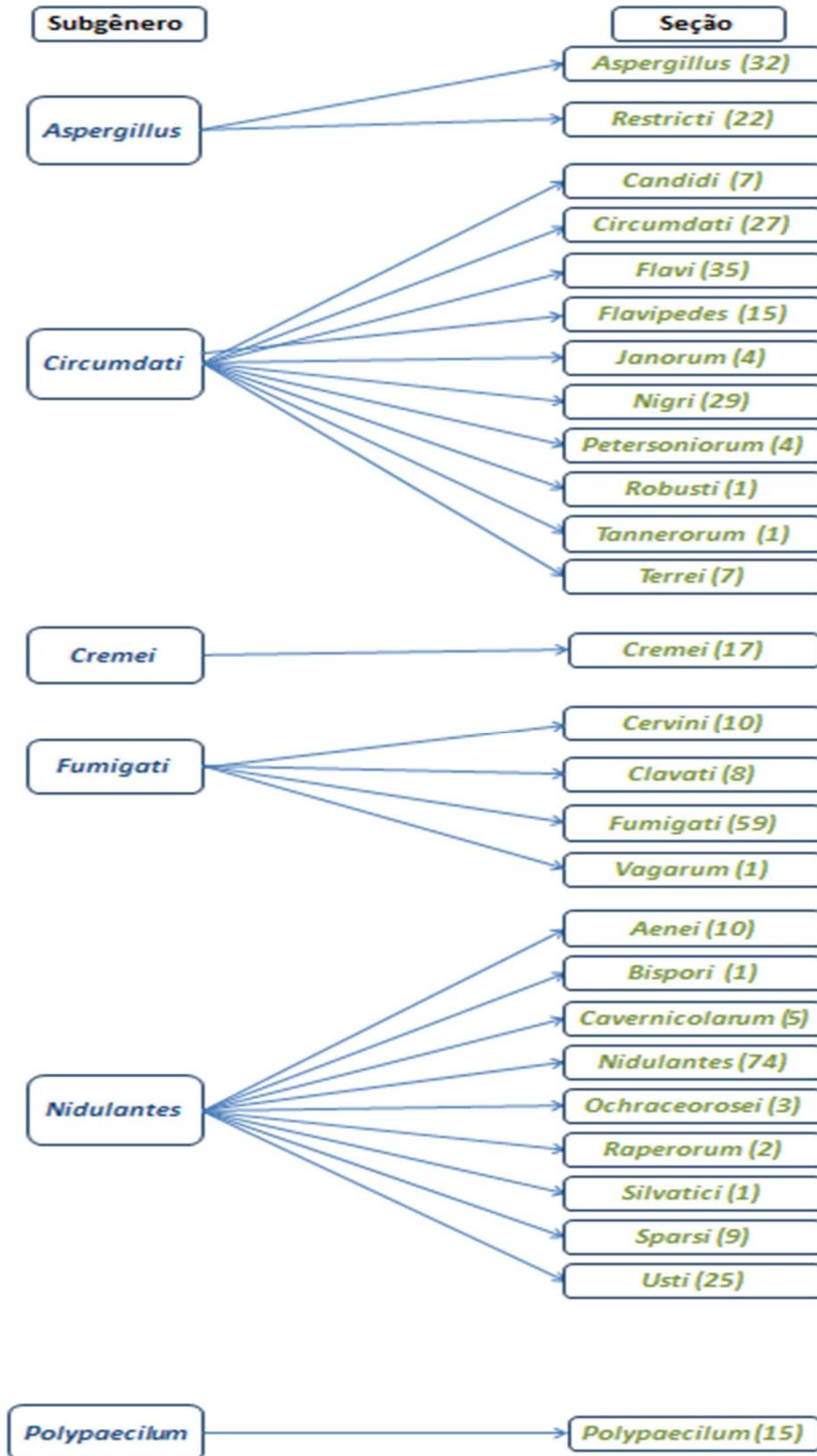
### 3.1.1 Classificação de *Aspergillus*

Em um estudo recente, LIU *et al.*, (2022), apresentam uma classificação moderna de *Aspergillus*. Os autores mantêm *Aspergillus* como o único nome legal que representa o gênero e, *Aspergillus glaucus*, como espécie-modelo. Todos os gêneros e espécies teleomórficas relacionadas (nomes) foram abolidos, combinados ou removidos independentemente (LIU *et al.*, 2022). Com relação ao número de espécies, o estudo mais recente contempla um total de 446 (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). A taxonomia de *Aspergillus* é complexa e sofre muitas mudanças com o tempo. A cada nova tecnologia de identificação, suas espécies vão sendo realocadas e novas espécies são igualmente descobertas (SOUZA, 2018).

O gênero *Aspergillus* encontra-se dividido em seis subgêneros: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Polypaecilum* (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). A família *Trichocomaceae*, à qual o gênero *Aspergillus* está inserido, encontra-se subdividida em *Aspergillaceae* (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Hamigera*, *Leiothecium*, *Monascus*, *Penicilliopsis*, *Phialomyces*, *Sclerocleista*, *Warcupiella* e *Xeromyces*), *Trichocomaceae* (*Rasamsonia*, *Sagenomella*, *Talaromyces*, *Thermomyces* e *Trichocoma*) e *Thermoascaceae* (*Byssochlamys/Paecilomyces* e *Thermoascus*) (LIU *et al.*, 2022).

Segundo LIU *et al.*, (2022), o gênero encontra-se dividido em 27 seções: *Restricti*, *Aspergillus*, *Aenei*, *Bispori*, *Cavernicolarum*, *Ochraceorosei*, *Nidulantes*, *Raperorum*, *Silvatici*, *Sparsi*, *Usti*, *Candidi*, *Circumdati*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Janorum*, *Nigri*, *Petersoniorum*, *Robusti*, *Tannerorum*, *Terrei*, *Cervini*, *Clavati*, *Fumigati*, *Cremeri*, *Polypaecilum* e *Vargarum* (Figura 1).

Figura 1- Esquema da classificação de *Aspergillus spp.*, em subgêneros, seções e espécies (número entre parênteses)



Fonte: HOUBRAKEN et al., 2020.

Segundo VARGA *et al.*, (2011), *A. flavus* (*Petromyces flavus*) (HORN *et al.*, 2009) está inserido no subgênero *Circumdati* seção *Flavi*. Esta seção contém algumas das espécies mais importantes do gênero, sendo aplicadas e estudadas na área da biotecnologia, alimentação e saúde, e, para fins de segurança alimentar, devido principalmente à produção de micotoxinas por parte de grande número dessas espécies, a identificação correta é de grande importância (FRISVAD *et al.*, 2019).

Embora tenha sido bastante estudado, a sistemática do gênero *Aspergillus* ainda apresenta constantes mudanças (SOUZA, 2018). Segundo FRISVAD *et al.*, (2019), para identificações mais confiáveis devem ser levados em consideração estudos combinando fisiologia, morfologia e sequenciamento.

Baseado nisso, recentemente, FRISVAD *et al.*, (2019) apresentaram uma atualização na taxonomia da seção *Flavi* e foram descritas oito novas espécies usando uma abordagem combinando fisiologia, morfologia e sequenciamento. Segundo os autores, filogeneticamente, a seção *Flavi* está dividida em oito clados e a seção contém 33 espécies. Os resultados dos autores são mostrados abaixo e estão relacionados com a capacidade de cada espécie produzir micotoxinas, e quais micotoxinas cada espécie produz.

- Duas espécies produzem apenas aflatoxina B1 e B2: *A. pseudotamarii* e *A. togoensis*;
- 14 espécies são capazes de produzir aflatoxina B1, B2, G1 e G2: *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. cerealis*, *A. arachidicola*, *A. inisclerotigenes*, *A. mottae*, *A. luteovirescens* (anteriormente *A. bombycis*), *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. sergii* e *A. transmontanensis*.
- Uma cepa de *A. bertholletius* pode produzir o precursor imediato da aflatoxina 3-O-metilsterigmatocistina;
- Uma cepa de *Aspergillus sojae* e duas cepas de *Aspergillus alliaceus* produziram versicolorinas;
- Cepas de formas domesticadas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, *A. oryzae* e *A. sojae*, respectivamente, perderam sua capacidade de produzir aflatoxinas;
- Três cepas (*A. caelatus*, *A. subflavus* e *A. tamarii*) são incapazes de produzir aflatoxinas.
- Todas as espécies nos clados filogeneticamente mais distantes (*A. alliaceus*-, *A. coremiiformis*-, *A. leporis* e *A. avenaceus-clade*) são incapazes de produzir aflatoxinas.
- Três das quatro espécies do clado *A. alliaceus* podem produzir a micotoxina ocratoxina A (*A. alliaceus*, *A. eoalliaceus* e *A. vandermerwei*)

- Oito espécies produziram a micotoxina ácido tenuazônico: *A. bertholletius*, *A. caelatus*, *A. luteovirescens*, *A. nomius*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii* e *A. tamarii*;
- A micotoxina relacionada ao ácido ciclopiazônico foi produzida por 13 espécies: *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. bertholletius*, *A. cerealis*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. mottae*, *A. oryzae*, *A. pipericola*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudotamarii*, *A. sergii* e *A. tamarii*;
- *A. hancockii* produziu speradina A, um composto relacionado ao ácido ciclopiazônico;
- *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. cerealis*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. pipericola* e *A. sergii* produziram pequenos escleródios contendo a micotoxina aflatrem;
- O ácido kójico foi encontrado em todas as espécies da seção *Flavi*, exceto *A. avenaceus* e *A. coremiiformis*;
- Apenas seis espécies da seção não produziram nenhuma micotoxina conhecida: *A. aspearensis*, *A. coremiiformis*, *A. lanosus*, *A. leporis*, *A. sojae* e *A. subflavus*.

### 3.1.2 Morfologia de *Aspergillus flavus*

As colônias de *A. flavus* podem apresentar-se, inicialmente, com uma cor esbranquiçada em sua superfície e com textura cotonosa na fase inicial. Posteriormente, alterações na sua coloração podem ser observadas, evoluindo para verde, amarelo, castanho ou preto conforme cada espécie do gênero (COSTA *et al.*, 2020). Em geral, *A. flavus* apresenta escleródios de cor marrom escuro para preto (RANGEL-MUÑOZ *et al.*, 2020), que são estruturas de resistência constituídas por múltiplas hifas agregadas.

Nas Figuras 2 e 3, são mostradas fotografias de colônias de *A. flavus* em ágar extrato de malte e ágar extrato de levedura, respectivamente, onde pode ser observada a variação da coloração para a mesma espécie a depender do meio de cultura utilizado.

Figura 2 - Colônia de *A. flavus* após sete dias em ágar extrato de malte à 28 °C



Fonte: PODGÓRSKA-KRYSZCZUK (2023)

Figura 3 - Colônia de *A. flavus* após sete dias em ágar extrato de levedura à 25 °C

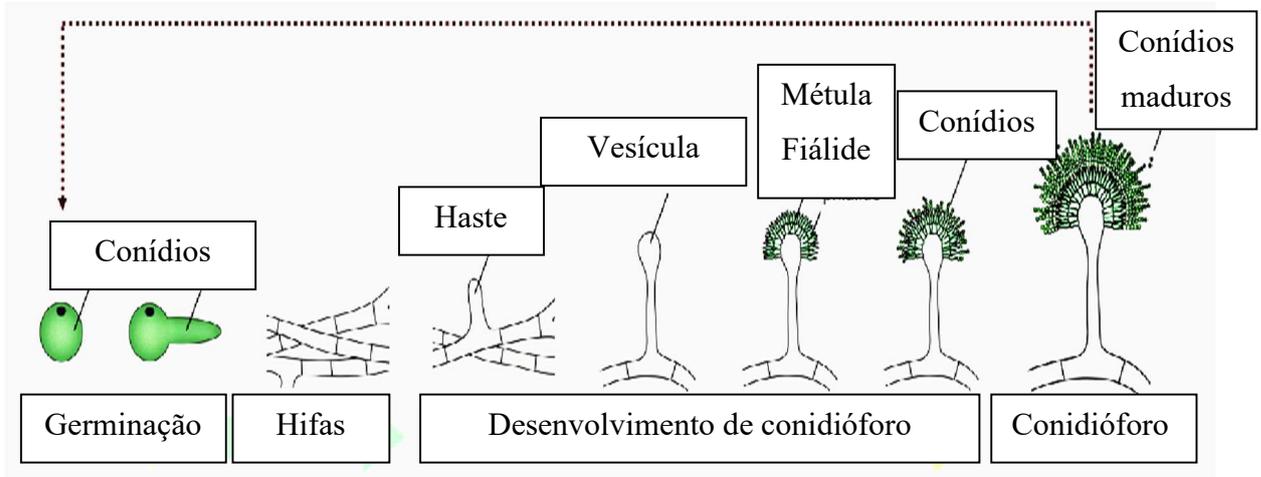


Fonte: PICKOVA *et al.* (2021)

Com relação às características microscópicas de *A. flavus*, destacam-se os conidióforos com hastes longas e grossas que terminam com uma vesícula globosa coberta com uma camada de fiálides, seguida de conídios em cadeia (DA SILVA *et al.*, 2015). Os conídios de *A. flavus* medem de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro (LOHMAR *et al.*, 2019).

Na Figura 4, é mostrado um modelo de desenvolvimento de conidióforos de *A. flavus* onde é possível observar as suas estruturas básicas.

Figura 4 - Modelo morfogênico de desenvolvimento de conidióforos de *A. flavus*/adaptado



Fonte: CHO *et al.* (2022).

### 3.2 *Metarhizium anisopliae*

*M. anisopliae* é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado no controle biológico de pragas. Este microrganismo tem sido utilizado com sucesso no Brasil desde a década de 1970 na cultura da cana-de-açúcar para controlar populações de *Mahanarva posticata* (BAPFUBUSA NIYIBIZI *et al.*, 2023; BARBIERI *et al.*, 2023; FERRON, 1978). Apesar da grande importância econômica, ambiental e dos aspectos relacionados à segurança alimentar, o controle microbiano de pragas, em particular a produção de *M. anisopliae*, é ainda muito artesanal e desprovida de tecnologias e controles sofisticados no processo (DALLASTRA *et al.*, 2023). Devido à crescente procura pelo controle microbiano, aliado aos custos altos dos processos, novas metodologias devem ser avaliadas e devem estar alinhadas com práticas que não agridam o meio ambiente, além do desenvolvimento de equipamentos eficientes (DALLASTRA *et al.*, 2023).

Quando o fungo *M. anisopliae* coloniza os seus hospedeiros ocorre uma sequência sincronizada de eventos de ordem mecânica, bioquímica e enzimática, representadas pelas fases de adesão, germinação, formação de apressórios, formação do grampo de penetração, penetração, colonização, reprodução e disseminação do patógeno (ALVES, 1990).

Muitos estudos têm se dedicado a descrever o processo de infecção dos fungos sobre os hospedeiros, sendo observado que esse processo é complexo e multifatorial. Estes microrganismos infectam através da penetração da cutícula do inseto. A infecção começa com a fixação de formas dispersivas unicelulares do fungo, por exemplo, conídios ou blastósporos, à cutícula do inseto. A expressão de uma variedade de enzimas hidrolíticas, por exemplo,

proteases, quitinases e lipases, e outros fatores, promovem a germinação e o crescimento do fungo em toda a superfície do hospedeiro. Durante este processo, o fungo produz inúmeras estruturas de infecção especializadas que podem incluir pinos de penetração e/ou apressórios, que permitem a penetração, liberação de toxinas e morte do hospedeiro (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013).

Como mencionado anteriormente, os fungos filamentosos, a exemplo do *M. asinopliae*, crescem em substratos simples e tem a capacidade de excretar proteínas. Estes fatores e a maior facilidade no processo de extração desse tipo de metabólito extracelular, levam ao interesse da comunidade científica em avaliar a produção de enzimas deste fungo, a exemplo das lipases, para as mais diversas aplicações. Ainda não há muitos estudos do emprego de *M. anisopliae* para a produção de lipases, mas alguns trabalhos já foram publicados com resultados promissores (DUARTE, 2018).

### 3.2.1 Classificação de *Metarhizium*

*M. anisopliae* foi descrito pela primeira vez em 1879, recebendo o nome de *Entomophthora anisopliae* e, em 1883, Sorokin passou a denomina-lo *M. anisopliae*, nome utilizado até os dias atuais (ALVES, 1990). O fungo encontra-se classificado no Filo *Ascomycota* e pertencente à família *Clavicipitaceae* (CATÃO, 2016).

Em 1976, foram admitidas duas variedades para esta espécie, sendo que, a distinção de ambas se deu no tamanho dos conídios. A variedade *minor* (*M. anisopliae* var. *anisopliae*), apresenta conídios curtos, medindo de 3 a 9 µm, e a variedade *majus* (*M. anisopliae* var. *majus*), apresenta conídios mais longos, medindo de 9,1 a 18 µm (ALVES, 1990).

Em 1994, outra tentativa de classificação baseada em características morfológicas e coloração dos conídios propôs três espécies: *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album*, com duas variedades: *M. anisopliae* var. *majus* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CURRAN *et al.*, 1994).

Nos anos 2000, foi realizado um estudo da descrição do gênero utilizando abordagens moleculares, através das sequências de ITS (*internal transcribed spacers*). Tal análise levou à manutenção das espécies já descritas, porém acrescentou mais duas variedades a *M. anisopliae* e cinco a *M. flavoviride* (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000). Em 2009, estudos constataram que o gênero é composto por 12 espécies (*M. anisopliae*; *M. acridum*; *M. brunneum*; *M. globosum*; *M. guizhouense*; *M. lepidiotae*; *M. majus*; *M. pinghaense*; *M. robertsii*; *M. album*; *M. flavoviride*; *M. frigidum*) (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009).

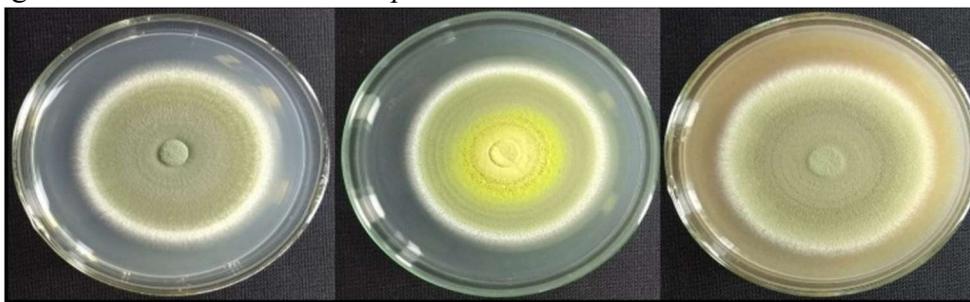
### 3.2.2 Morfologia de *Metarhizium*

*Metarhizium* possuem hifas septadas e produzem esporos assexuais denominados conídios (CATÃO, 2016). Os conídios podem apresentar medidas de 3 a 18  $\mu\text{m}$  (ALVES, 1990) e estão sobre estruturas especializadas chamadas de conidióforos (CATÃO, 2016).

Macroscopicamente, SALDANHA *et al.*, (2022) verificaram em isolados de *Metarhizium spp.* que, inicialmente as colônias apresentam coloração branca, tornando-se amarelas com o início da produção de conídios que se concentram mais ao centro e, com o amadurecimento, conferem às colônias colorações que variaram em tonalidades de verde-oliva. Alves (1990) também relatou uma variação na coloração do fungo, em que os conídios apresentam tons que variam do verde claro a escuro, acinzentados, ou esbranquiçados com manchas verdes.

Como mostrado na Figura 5, a coloração das colônias de *Metarhizium* podem se apresentar de diversas formas para o mesmo isolado, a depender do meio de cultura utilizado. Na Figura 5, as colônias foram obtidas em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), meio completo e suco de vegetais, respectivamente.

Figura 5 - Colônias de *M. anisopliae* IBCB 383 em diferentes meios de cultura



Fonte: SALDANHA *et al.* (2022).

### 3.3 Identificação molecular de fungos filamentosos

A biologia molecular tem se expandido com novas perspectivas na classificação, identificação e diferenciação de espécies de fungos, o que antes era impossível realizar por estudos morfológicos, pelas suas limitações (TIAGO; OLIVEIRA; LIMA, 2014). Segundo SOUZA (2018), a classificação e identificações errôneas são comuns através de estudos morfológicos devido à falta de experiência com o gênero e semelhança fenotípica entre espécies. E, para sanar essa problemática, podem ser utilizadas as técnicas moleculares

(TIAGO; OLIVEIRA; LIMA, 2014).

Entre as técnicas de biologia molecular utilizadas para a caracterização de espécies de fungos entomopatogênicos estão os métodos de *barcoding*, com base na reação em cadeia da polimerase ou “*polymerase chain reaction*” (PCR) (FEGAN *et al.*, 1993) e utilização do espaçador interno transcrito (ITS) (LYRA, 2014).

Na Micologia, regiões específicas do genoma, como o ITS, localizado entre regiões altamente conservadas, são frequentemente usadas para a identificação do isolado (LYRA, 2014). Durante os últimos anos o ITS de DNA nuclear tem sido usado como alvo para analisar a diversidade fúngica e recentemente foi selecionado como o marcador padrão para *barcoding* de DNA fúngico (LIMA, 2015). A identificação molecular através do *barcoding* de DNA de fungos tornou-se uma parte integrada e essencial da pesquisa em ecologia fúngica e forneceu novos *insights* sobre a diversidade e ecologia de muitos grupos diferentes de fungos, possibilitando o estudo do microrganismo em seu estágio micelial e não apenas por meio de corpos de frutificação (BELLEMAIN, 2010).

Segundo estudos, utilizar a região do ITS em estudos de caracterização molecular em fungos apresenta alguns pontos positivos, dentre eles, o pequeno tamanho das regiões do ITS (cerca de 500-800pb), que permite fácil amplificação por PCR; A natureza multicópia da repetição rDNA, o que torna estas regiões fáceis de amplificar, mesmo em amostras diluídas ou degradadas e alta variabilidade desta região entre espécies distintas morfológicamente (BRIDGE; ARORA, 1998).

### **3.4 Produção de lipases por fungos filamentosos**

Os fungos filamentosos, a exemplo do *A. flavus* e *M. anisopliae*, são bons produtores de enzimas extracelulares. Esse fato, além de permitir a sobrevivência dos fungos no ambiente, vem despertando o interesse na produção e aplicação dessas enzimas nas mais diversas áreas de aplicação por conferirem uma maior facilidade no processo de extração e a diminuição de custos de produção desses metabólitos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Um exemplo dessas enzimas são as lipases (BENNETT, 2009; GREWAL *et al.*, 2021) e, devido a isso, diversos estudos vêm sendo realizados para a produção deste metabólito (KAVITHA; SHANKARI; MEENAMBIGA, 2021; DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022).

*A. flavus* está entre os principais produtores de lipase do gênero (KAVITHA; SHANKARI; MEENAMBIGA, 2021). As espécies de *Aspergillus* produzem lipases que desempenham um papel vital no campo industrial (KAVITHA; SHANKARI;

MEENAMBIGA, 2021). Diversos estudos foram realizados abordando *Aspergillus* e a produção de lipases. EZEMA *et al.*, (2023), em um trabalho recente e inédito, isolaram *A. flavus* de sementes de melancia e observaram a produção de uma nova lipase que, através da constatação por meio de técnicas moleculares e bioquímicas, pode ser utilizada em uma ampla gama de aplicações. Neste mesmo contexto, visando suprir o crescente interesse da utilização das lipases microbianas nos últimos anos, FAOUZI *et al.*, (2015) isolaram uma lipase de *A. flavus* em curtume tradicional da cidade de Fez, em Marrocos e constataram a sua estabilidade em diversas condições. Outro exemplo da associação de lipases e *A. flavus* foi dado por SILVA, SOUZA, SOUZA (2022) na região da Floresta Amazônica, apresentando seus resultados como um potencial bioproduto para as estratégias de desenvolvimento da bioeconomia na Amazônia.

Outros estudos da produção de lipase por CES apresentam resultados promissores. Com valores de AE de 7 U/g para *A. flavus*, 9 U/g para *Aspergillus niger* e 8,13 U/mL para *Aspergillus fumigatus* (KAVITHA; SHANKARI; MEENAMBIGA, 2021).

Os estudos relacionados ao fungo *M. anisopliae* ainda são bastante direcionados ao controle biológico de pragas, porém, há relatos na literatura de *M. anisopliae* como produtor de proteases, quitinases e lipases (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022; DUARTE, 2018; DUTRA, 2020; SILVA *et al.*, 2005). A partir dos resultados promissores obtidos nestes trabalhos e levando-se em consideração que este fungo excreta enzimas naturalmente para garantir sua sobrevivência, torna-se válido realizar estudos que viabilizem a utilização deste fungo para a produção de lipases.

### 3.5 Lipases

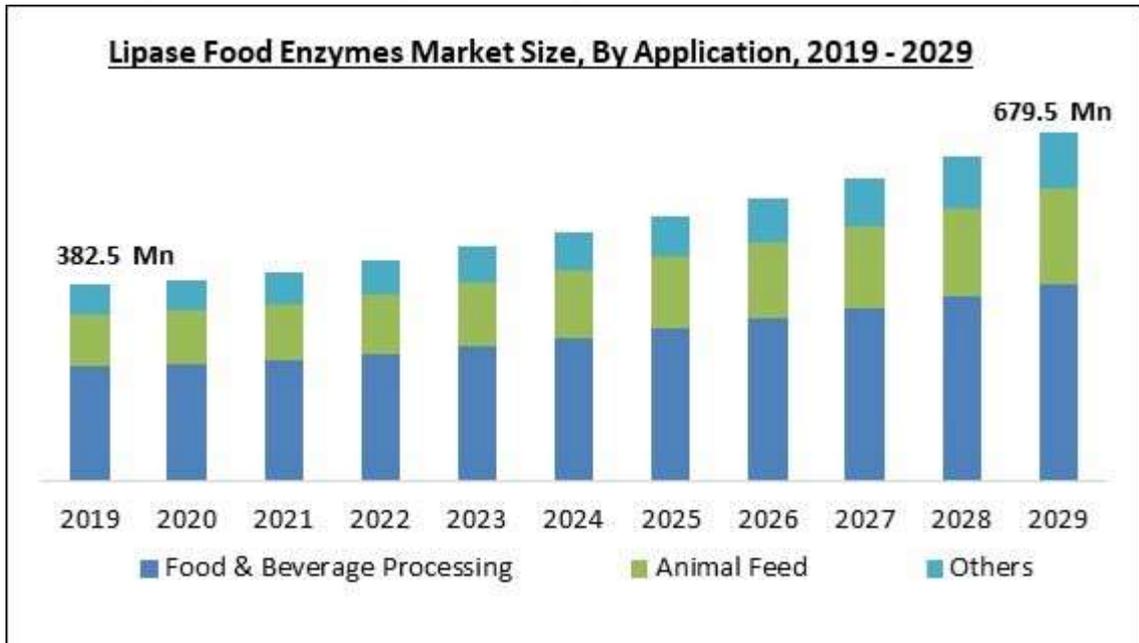
As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam, entre outras reações, a hidrólise das ligações éster de lipídeos gerando álcoois e ácidos graxos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Enzimas são catalisadores notavelmente eficazes, responsáveis por milhares de reações químicas envolvidas nos processos biológicos dos sistemas vivos ou *in vitro* (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Os processos enzimáticos apresentam uma série de vantagens quando comparados com os processos químicos convencionais catalisados ou não, sendo que as velocidades das reações mediadas por enzimas são superiores em relação àquelas não catalisadas, por um fator de  $10^8 - 10^{10}$  (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017).

As lipases apresentam destaque no cenário mundial de enzimas pois permitem a catálise de reações de hidrólise e de síntese e a aplicação em vários setores, como por

exemplo, aplicação na indústria têxtil, na indústria de detergentes, atuando como ferramenta de diagnóstico e tratamentos médicos, no tratamento de resíduos e esgotos, na indústria de papel e celulose, na produção de biodiesel e na indústria de alimentos modificando sabores e aromas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

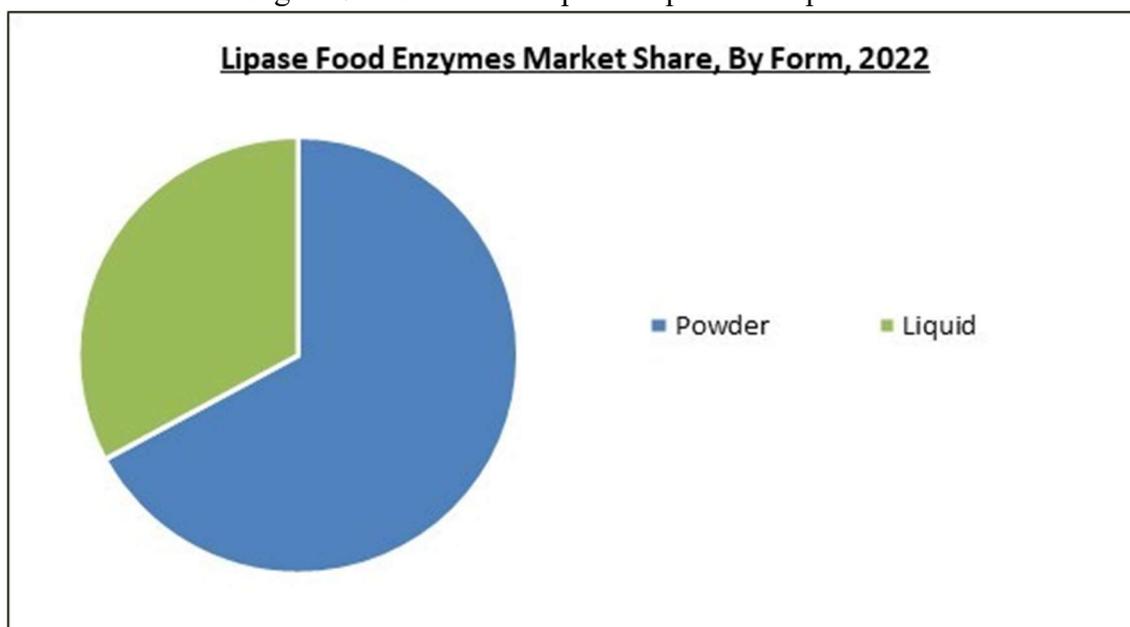
Segundo relatório divulgado por Research And Markets (2023), entre os anos de 2019 a 2029, o mercado global de enzimas alimentares lipase deverá testemunhar um crescimento substancial, atingindo um tamanho de mercado de US\$ 679,5 milhões até 2029, sendo que, a principal aplicação das lipases corresponderá à indústria de alimentos e bebidas, seguida pela aplicação em alimentação animal (Figura 6), e a forma em pó dessas enzimas apresenta preferência no mercado quando comparada a forma líquida (Figura 7).

Figura 6 - Mercado e aplicação de lipases nos anos de 2019 a 2029



Fonte: RESEARCH AND MARKETS (2023).

Figura 7 - Mercado de lipases líquida e em pó



Fonte: RESEARCH AND MARKETS (2023)

Com base em indicadores científicos e tecnológicos, estudos relataram que as lipases, identificadas em 1930, ainda mantêm elevado grau de interesse para aplicação em diversos segmentos industriais. Segundo DUTRA (2020), o mercado mundial de lipases microbianas atingiu 425 milhões de dólares em 2018 e estimou-se 590 milhões de dólares em 2023. Segundo outro levantamento realizado, os valores para o ano de 2019 atingiu 352,0 milhões de dólares e, para 2029, estima-se 679 milhões de dólares (Figura 6).

As lipases podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, entretanto, as lipases microbianas apresentam diversas vantagens, como variedade de atividades catalíticas disponíveis, mais estabilidade, menor custo de produção e a possibilidade de produção em larga escala (CHANDRA *et al.*, 2020).

A disponibilidade e os sólidos conhecimentos de seleção, purificação, preservação, manipulação, bem como condições de cultivo de fungos filamentosos e a busca constante de fontes alternativas de lipases, criam oportunidades para o aprimoramento e/ou descobertas de novas formas de obtenção e aplicação dessas enzimas (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017).

Aumentar a produção e aplicação destas enzimas depende do desenvolvimento de equipamentos simples e práticos e aplicação em escala aumentada, visando sistemas de produção de baixo custo e com processos eficientes. Neste contexto, enquadram-se os biorreatores para CES e a utilização resíduos agroindustriais como substrato.

Alguns exemplos de fungos em CES e seus respectivos valores de atividade lipolítica e substratos utilizados, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade lipolítica a partir de diversos fungos e substratos sólidos

<b>Fungo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade lipolítica</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Arroz quebrado	8 U/mL
<i>Trichoderma harzianum</i>	Torta do óleo de mamona e bagaço da cana de açúcar	4 Ugds-1
<i>Fusarium</i>	Azeite e farelo de soja	5 Ugds-1
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos do óleo de palma	15 UmL-1

Fonte: Panesar *et al.*, (2016)

Além deste, outros estudos utilizando o bagaço do coco babaçu (*Attalea speciosa*) como substrato para a produção de lipases empregando os fungos filamentosos: *Penicillium brevicompactum*, *P. simplicissimum* e *P. verrucosum* foram realizados (AGUIEIRAS *et al.*, 2014; COSTA CAVALCANTI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011) e apresentaram bons resultados.

### 3.6 Substratos para cultivo em estado sólido

O Brasil é um dos principais produtores e fornecedores mundiais de alimentos (NEVES *et al.*, 2021), entretanto, a produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos cuja disposição no meio ambiente causa sérios problemas de poluição. Diante disso, nos últimos anos, a tentativa da utilização desses resíduos tem aumentado e o CES tem se mostrado uma alternativa viável, agregando valor a produtos, minimizando problemas ambientais e valorizando subprodutos regionais (CASCIATORI *et al.*, 2015).

Entre os resíduos agroindustriais utilizados como substrato em CES, para as mais diversas aplicações, estão o bagaço do coco babaçu (DUARTE *et al.*, 2018), o farelo de trigo (CASCIATORI *et al.*, 2015), quirera de arroz, farelo de soja (DALLASTRA *et al.*, 2019) e entre outros.

O Babaçu (*Attalea speciosa*) é uma palmeira de espécie nativa do Brasil, encontrada principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (VALE; GUIMARÃES; MORAIS, 2015). Outra espécie bastante conhecida é *Attalea phalerata*. Ambas difundidas em diversos estados do país (Figura 8) (CARRAZZA *et al.*, 2012)

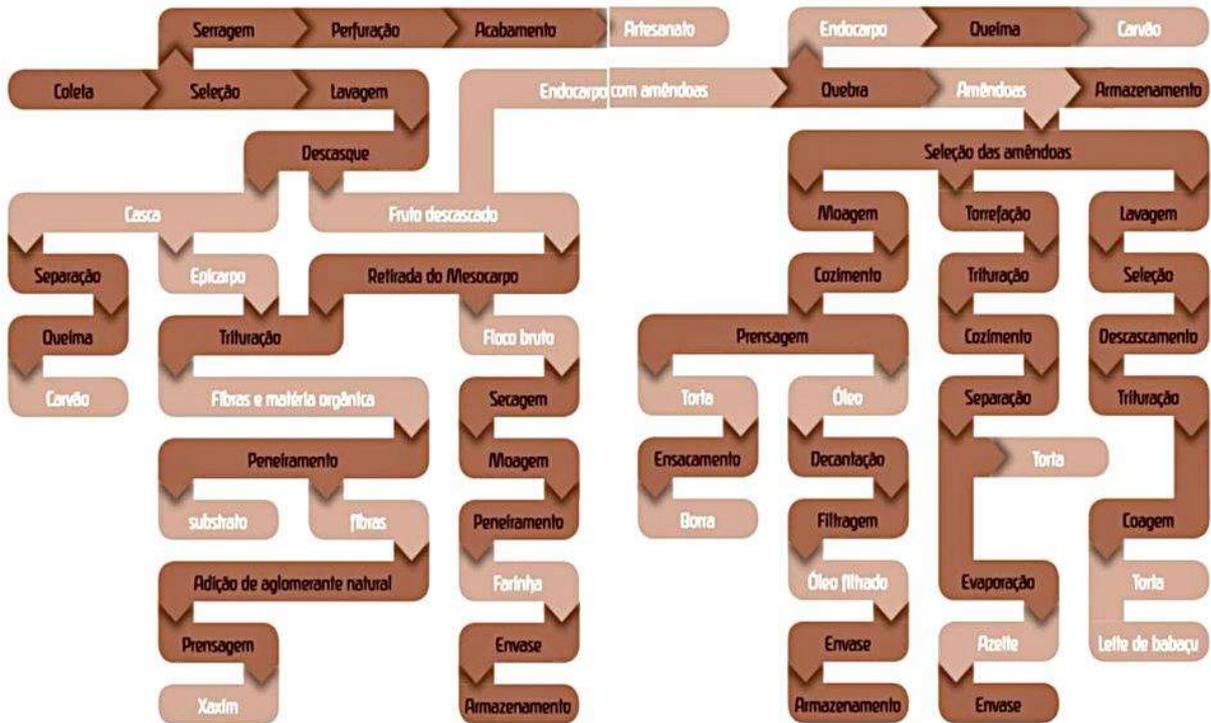
Figura 8 - Distribuição da palmeira Babaçu (*Attalea speciosa* e *Attalea phalerata*) no mapa do Brasil



Fonte: CARRAZZA *et al.* (2012).

A cadeia produtiva do babaçu (Figura 9) é uma das mais representativas do extrativismo vegetal no Brasil em razão da área de abrangência da palmeira babaçu, bem como das inúmeras potencialidades e atividades econômicas que podem ser desenvolvidas a partir dela. Com isso, estudos estão sendo realizados visando o fortalecimento da sua cadeia produtiva, com foco em tecnologias de aproveitamento integral do babaçu em agroindústrias de base familiar (CARRAZZA *et al.*, 2012).

Figura 9 - Cadeia produtiva do babaçu



Fonte: CARRAZZA *et al.* (2012)

O coco babaçu (Figura 10) é bastante apreciado para alimentação humana. No estado do Tocantins, o processamento do coco babaçu possibilita a obtenção de óleo, torta proteica, biomassas energéticas, farinhas amiláceas, álcool amiláceo e carvão ativado. Após a extração de óleo, é gerada a torta de babaçu ou “bagaço do coco babaçu” (Figura 11), este é rico em nitrogênio e carbono, com 19% de proteína, 12% de lipídeos, 9% de carboidratos e 16% de hemicelulose (CARRAZZA *et al.*, 2012), sendo reconhecido como potencial substrato para produção de lipases, devido aos ácidos graxos presentes em sua composição (DUARTE *et al.*, 2018).

Figura 10- Coco babaçu



Fonte: CARRAZZA *et al.*, (2012).

Figura 11 - Bagaço do coco babaçu



Fonte: Da Autora (2023).

O estado do Tocantins é o principal produtor de soja do norte do país (CONAB, 2022). O processamento do grão gera vários tipos de subprodutos, a exemplo do farelo de soja, que é gerado a partir da extração do óleo de soja (CONAB, 2022). O farelo de soja contém aproximadamente 46% de proteína, 4,7% de fibras, e cerca de 0,3% de cálcio e 0,6% de fósforo (TRONI *et al.*, 2016). Devido ao seu perfil nutricional é bastante utilizado como substrato ou suporte para a produção de enzimas por CES (TOMBINI, 2015). No processo de produção do leite de soja, o subproduto gerado é conhecido comercialmente como okara, rico em proteínas, lipídeos e carboidratos, composição que permite sua utilização como meio de cultivo de alta qualidade para processos de cultivo microbiano (TOMBINI, 2015).

A produção de trigo no norte do Brasil ainda é considerada pequena e com algumas áreas experimentais. Já na região nordeste, essa produção se apresenta maior e com

perspectivas de crescimento (CONAB, 2022). O farelo de trigo é a película externa contida na parte comestível do grão de trigo, possui em sua composição aproximadamente 17% de proteínas, 3% de fibras e cerca de 1% de fósforo (TRONI *et al.*, 2016), podendo ser uma boa alternativa de substrato para a produção de enzimas.

O estado do Tocantins está entre os principais produtores de arroz do país. Embora, no ano de 2023, o levantamento mostre uma diminuição das áreas plantadas, devido às condições climáticas (CONAB, 2023). Este grão é o substrato atualmente utilizado na produção do fungo *M. anisopliae* para fins comerciais devido a sua qualidade nutricional e ao seu alto valor energético, no entanto, seu custo é considerado elevado (DALLASTRA *et al.*, 2019). O arroz é composto por 80% de carboidratos, 8% de proteínas, além de apresentar na sua composição minerais como fósforo, ferro e cálcio (SENE *et al.*, 2010). Nas indústrias de beneficiamento de arroz pode ocorrer a quebra desses grãos, gerando um subproduto classificado como quirera de arroz, o que representa um problema econômico para a indústria, pois o mesmo é rejeitado para o consumo humano (PANESAR *et al.*, 2016). No entanto, esse subproduto é considerado uma boa opção como substrato para processos de CES visando a produção de enzimas (CONAB, 2022) (PANESAR *et al.*, 2016).

### 3.7 Cultivo em estado sólido

O CES é um processo que envolve o crescimento de microrganismos em partículas sólidas úmidas, entre as quais há uma fase gasosa contínua e um mínimo de água visível (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006) ou ainda, é um processo que permite o cultivo de microrganismos em substratos não solúveis que apresentem água mínima e suficiente para o desenvolvimento microbiano (RANJBAR; HEJAZI, 2019).

O CES apresenta algumas características vantajosas quando comparado ao Cultivo Submerso (CS). O CES apresenta melhores resultados qualitativos e quantitativos relacionados ao produto desejado, baixo consumo de água e energia, por isso, possui aspectos positivos relacionados à sustentabilidade. Além disso, possibilita a produção de inúmeros bioprodutos e permite a utilização de diversos resíduos sólidos como substrato (RANJBAR; HEJAZI, 2019). A seleção do substrato adequado para CES é extremamente importante, pois este material sólido constitui fonte de nutrientes para o microrganismo e pode atuar como suporte físico ao cultivo (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

O processo de CES tem sido praticado desde os tempos antigos e, atualmente, é aplicada na produção de uma ampla gama de produtos de alto valor agregado a exemplo de

enzimas como lipase (OLIVEIRA *et al.*, 2018), celulase (KHANAHMADI *et al.*, 2018) e L- asparaginase (DORIYA; KUMAR, 2018), compostos aromáticos (TRY *et al.*, 2018), diversos metabólitos secundários biologicamente ativos (PANDEY, 2003) e agentes de controle biológico (DALLASTRA *et al.*, 2019).

No caso das lipases, por exemplo, apesar dessas enzimas apresentarem uma ampla aplicação em diversos setores com perspectivas de crescimento de mercado, essas aplicações poderiam ser ainda maiores, porém, não o são devido ao seu alto custo de produção (DUTRA, 2020). Uma possibilidade de tornar um bioprocessamento economicamente viável é por meio da CES (RANJBAR; HEJAZI, 2019). Porém, os processos de CES apresentam algumas dificuldades no controle de operação e nos fenômenos de transferência de calor e massa e é importante encontrar as melhores condições de operação para o máximo rendimento desses bioprocessos (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006).

Para isso, os processos de CES devem ser ainda mais explorados, tanto em pequena quanto em grande escala, empregando por exemplo, biorreatores que sejam capazes de manter a homogeneidade e integridade do complexo “substrato– microrganismo” e obter o produto desejado (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006).

### **3.8 Biorreatores**

Um biorreator pode ser definido como um recipiente onde organismos são cultivados ou materiais são convertidos ou transformados através de reações específicas de forma controlada (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006). Por meio deste equipamento procura-se fornecer as condições ideais para a obtenção do produto desejado, fornecer barreira contra possíveis contaminações do leito, mantê-lo impedido de ser liberado ao meio externo e conter o processo de cultivo microbiano (DA CUNHA *et al.*, 2020). No projeto de um biorreator devem ser considerados alguns parâmetros importantes para a obtenção de resultados eficazes, tais como: concentração de O<sub>2</sub>, temperatura, gradientes de umidade, aeração e transferência de calor e massa (KHANAHMADI *et al.*, 2018).

Apesar de um biorreator ter como função fornecer condições ótimas para o processo de cultivo microbiano, no decorrer do CES as condições ambientais no interior do equipamento mudam, com isso, é necessário obter mecanismos de controle dessas condições e o sucesso desses procedimentos depende da eficiência dos processos de transporte de calor e massa no leito do substrato (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006). Além disso, os resultados do cultivo serão otimizados de acordo com o tipo de biorreator escolhido para

determinado bioprocesso (DA CUNHA *et al.*, 2020).

Os biorreatores para CES podem ser divididos em quatro grupos. No primeiro grupo estão contidos biorreatores nos quais o leito é estático ou misturado com pouca frequência e o ar circula livremente ao redor, chamados frequentemente de biorreatores de bandeja. O segundo grupo contém os biorreatores de leito estático sobre o qual o ar é forçado, referidos como biorreatores de leito empacotado. No terceiro grupo, o leito é continuamente misturado ou misturado intermitentemente e o ar circula ao redor da cama, mas não é soprado com força, chamados geralmente de biorreatores de tambor rotativo. O quarto grupo conta com biorreatores com leito agitado e ar forçado sobre ele, podendo ser agitados continuamente ou intermitentemente, e são chamados de biorreatores de leito fluidizado (gás sólido) (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006).

Entre os biorreatores de leito fixo, os de bandejas representam o tipo mecânico mais simples e mais utilizado em CES (DORIYA; KUMAR, 2018). Eles são constituídos por uma câmara contendo bandejas individuais uma sobre a outra com um espaço entre elas. O cultivo ocorre nas bandejas as quais possuem fundo perfurado para segurar o substrato sólido e permitir maior aeração (DUTRA, 2020).

A ampla utilização desse tipo de biorreator se deve também à sua tecnologia simples (DORIYA; KUMAR, 2018) e a aplicabilidade de resultados da escala de laboratório em larga escala (mantendo a espessura do leito de substrato) (SOCCOL *et al.*, 2017). Entre suas limitações estão a grande área ocupada e a necessidade dos leitos de substratos se apresentarem com pequena profundidade (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006).

Entre as aplicações dos biorreatores de bandejas estão a produção de alimentos fermentados (TRY *et al.*, 2018), produção de enzimas (DORIYA; KUMAR, 2018) e produção de agentes de controle biológico (DALLASTRA *et al.*, 2019).

Embora os biorreatores de bandejas sejam bastante utilizados, ainda existem diversas limitações atreladas aos processos de CES nesses equipamentos, sendo que, os problemas relacionados à transferência de calor e massa são os mais importantes. Ou seja, pode ocorrer a diminuição da umidade do leito de substratos devido a evaporação da água associada à liberação metabólica de calor (KHANAMAHDİ *et al.*, 2018), acúmulo de calor metabólico no leito do substrato com o aumento da espessura crescente do leito e, a dificuldade na difusão do ar dentro do substrato devido ao crescimento de micélio durante o período de cultivo (VASEGUI *et al.*, 2013).

## CAPÍTULO I

### DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO BIORREATOR DE BANDEJAS EM ESCALA PILOTO PARA CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO VISANDO A INTENSIFICAÇÃO DO PROCESSO.

Artigo publicado em *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, vol 193, 2023<sup>1</sup>

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2023.109526>

<sup>1</sup>Este capítulo apresenta o artigo traduzido para o Português.

#### **Desenvolvimento de um novo biorreator de bandejas em escala piloto para cultivo em estado sólido visando a intensificação do processo.**

Eloane Daize Gomes Dallastra <sup>1</sup>, Ana Caroline Pereira Dias <sup>2</sup>, Paula Benevides de Moraes <sup>1</sup>, Juliana Fonseca Moreira da Silva <sup>3</sup>, Fernanda Perpétua Casciatori <sup>4</sup>, Lina María Grajales <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação da Rede Bionorte, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Quadra 109 Norte Avenida NS 15, 77001-090, Palmas-TO, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Agroenergia Digital, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Quadra 109 Norte Avenida NS 15, 77001-090, Palmas-TO, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Quadra 109 Norte Avenida NS 15, 77001-090, Palmas-TO, Brasil.

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rod. Washington Luís km 235 SP-310, 13565-905, São Carlos-SP, Brasil.

\*Autor correspondente. Fone: +55 (63) 99233-4568. E-mail: [grajales@uft.edu.br](mailto:grajales@uft.edu.br)

#### ABSTRACT

Solid State Cultivation (SSC) processes present high contamination and low productivity rates, as they involve discontinuous processes with multiple manual steps. With the aim of reducing handling in SSC processes, this research developed a pilot-scale tray bioreactor that allows process intensification by combining upstream operations and microbial cultivation in a single piece of equipment. Therefore, a new tray bioreactor was developed with an atomization system of spore suspension, nutrient solution and cooling water above the culture medium. It also incorporates a steam sterilization system. To validate the bioreactor, two case studies were carried out. In the first case study, the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 was cultivated on three types of agro-industrial waste. The production of conidia/mL obtained with the mixture of wheat bran and rice grits was  $(16.7 \pm 0.46) \times 10^8$ , which is statistically higher ( $\alpha=0.05$ ) than the production of the fungus of  $(8.59 \pm 1.60) \times 10^8$  cultivated in the control. (Type I rice). In the second case study, lipases from *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 were

produced in an agro-industrial residue, babassu coconut bagasse, and in type I rice. The average EA was  $5.64 \pm 0.45$  U/mL based on 36 crops. The results showed that the new tray bioreactor can produce fungi and lipases in greater quantities than other systems reported in the literature, while reducing handling, energy, costs and process time.

**Keywords:** Pilot-scale tray bioreactor; Solid state cultivation; *Metarhizium anisopliae* fungus; Lipase production; Agro-industrial waste; Local economy and regional development.

## RESUMO

Os processos de Cultivo em Estado Sólido (CES) apresentam alta contaminação e baixos índices de produtividade, pois envolvem processos descontínuos com múltiplas etapas manuais. Com o objetivo de reduzir o manuseio nos processos de CES, esta pesquisa desenvolveu um biorreator de bandeja em escala piloto que permite a intensificação do processo combinando operações *upstream* e cultivo microbiano em um único equipamento. Assim, um novo biorreator de bandeja foi desenvolvido com um sistema de atomização de suspensão de esporos, solução nutritiva e água de resfriamento acima do meio de cultivo. Também incorpora um sistema de esterilização a vapor. Para validar o biorreator foram realizados dois estudos de caso. No primeiro estudo de caso, o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 foi cultivado sobre três tipos de resíduos agroindustriais. A produção de conídios/mL obtida com a mistura de farelo de trigo e quirera de arroz foi de  $(16,7 \pm 0,46) \times 10^8$ , o que é estatisticamente maior ( $\alpha=0,05$ ) que a produção do fungo de  $(8,59 \pm 1,60) \times 10^8$  cultivados na testemunha. (Arroz Tipo I). No segundo estudo de caso, lipases de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 foram produzidas em um resíduo agroindustrial, o bagaço do coco babaçu e em arroz tipo I. A média da AE foi de  $5,64 \pm 0,45$  U/mL com base em 36 cultivos. Os resultados mostraram que o novo biorreator de bandejas pode produzir fungos e lipases em maiores quantidades do que outros sistemas relatados na literatura, ao mesmo tempo que reduz manuseio, energia, custos e tempo de processo.

**Palavras-chave:** biorreator de bandejas em escala piloto, cultivo em estado sólido, fungo *Metarhizium anisopliae*, produção de lipase, resíduos agroindustriais, economia local e desenvolvimento regional.

## 1.1 Introdução

O Cultivo em Estado Sólido (CES) é uma tecnologia comumente usada para o crescimento de microrganismos em substratos sólidos sem fluxo livre de água (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022; PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2018). O substrato sólido contém umidade suficiente para suportar atividades microbianas sem adição de água (KUMAR *et al.*, 2021; MITCHELL *et al.*, 2000; SINGHANIA *et al.*, 2018). O substrato sólido pode ser a fonte de nutrientes para os microrganismos, onde as reações podem ocorrer na superfície das partículas ou dentro delas, definindo vários mecanismos de transferência de massa (CASCIATORI; THOMÉO, 2018; HARDIN *et al.*, 2002). Além disso, os sólidos também podem ser uma matriz suporte impregnada com nutrientes específicos para o desenvolvimento do microrganismo (DAS; BHAT; SELVARAJ., 2019; RESHMY *et al.*, 2022; SINGHANIA *et al.*, 2018).

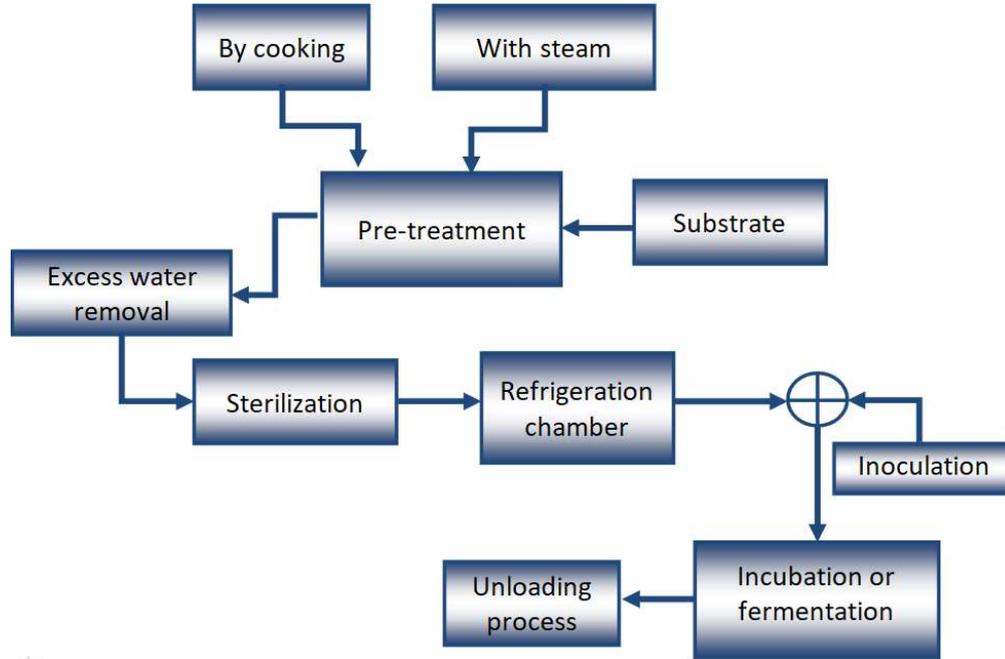
Parte do sucesso do CES se deve ao fato de que os fungos crescem e desenvolvem suas atividades metabólicas favoravelmente. Isso ocorre porque as condições de cultivo são semelhantes ao seu habitat natural em resíduos orgânicos em ambientes com baixa atividade de água (RODRÍGUEZ-RESTREPO *et al.*, 2024; SOCCOL *et al.*, 2017). Como resultado, a possibilidade de usar resíduos sólidos da agroindústria como substratos chama a atenção tanto da comunidade de pesquisa quanto da indústria.

Com pesquisa e desenvolvimento suficientes, esses substratos podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado, como enzimas, fungos, bactérias, ácidos orgânicos, álcoois, polissacarídeos, biopesticidas, biosurfactantes e compostos aromáticos (ASHOK *et al.*, 2017; CHILAKAMARRY *et al.*, 2022), incluindo aplicações na alimentação, indústrias farmacêuticas, cosméticas, de pigmentos, de controle biológico de pragas, entre outras (COUTO; SANROMÁN, 2006; RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005). Além de agregar valor aos resíduos, há um impacto positivo no meio ambiente, pois reduz o descarte inadequado (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022; BHARGAV; PANDA; ALI, 2008).

Quando comparado com o Cultivo Submerso (CS), o CES apresenta vantagens significativas como maior produtividade volumétrica, economia de água durante o processo de cultivo, utilização de fontes de carbono (resíduos agrícolas) de fácil acesso e baixo custo, maior concentração do produto, facilidade de separação e purificação do produto final, maior rendimento e menor possibilidade de contaminação devido à menor atividade de água (DO NASCIMENTO *et al.*, 2021; PANDEY, 2003; RAGHAVARAO; ANGANATHAN; KARANTH, 2003). No entanto, os processos industriais atuais de CES, conforme mostrado no

fluxograma da Figura 12, ainda são muito complexos e envolvem várias etapas manuais e delicadas que exigem muita mão de obra.

Figura 12 - Diagrama esquemático generalizado dos processos realizados em uma biofábrica



Como mostrado na Figura 12, todas as etapas do processo são realizadas em lotes. Primeiramente, um substrato é pré-tratado por cozimento em tanques térmicos ou com vapor até atingir uma consistência firme, que permita ser atacado por um fungo sem resultar em aglomerados. Em segundo lugar, o substrato é retido em peneiras para retirar o excesso de água, seguindo-se a transferência para o local de cultivo. O conjunto substrato-recipiente é então esterilizado em autoclave. Depois disso, o conjunto é levado para uma câmara frigorífica para resfriar por cerca de um dia até atingir a temperatura ambiente (ZHANG; SUN; MA, 2017; GRAJALES *et al.*, 2012). A solução inoculante é então injetada manualmente em cada conjunto estéril em uma câmara de fluxo laminar dentro de uma sala de ar estéril. A incubação posterior é realizada em salas de germinação com temperatura controlada, com ou sem iluminação artificial. Quando a incubação é concluída, o processo de descarregamento é realizado (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022; GRAJALES *et al.*, 2012; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2014; ZHANG; SUN; MA, 2017).

Vários inconvenientes podem ser identificados durante os processos por causa do manuseio extensivo. Isso inclui alta taxa de contaminação, baixa produtividade, bem como ambiente de trabalho insalubre (DA CUNHA *et al.*, 2019). Por estas razões, é muito difícil

desenvolver processos de CES em larga escala. Como tal, é fundamental o desenvolvimento de técnicas e equipamentos como os biorreatores que possam permitir uma operação simplificada e uma maior taxa de produção.

Em geral, os biorreatores são caros e complexos em projeto, pois possuem um grande número de variáveis que devem ser controladas (DURAND, 2003). A arquitetura interna do biorreator deve promover aeração eficiente, manter a uniformidade e a integridade do substrato e facilitar a transição de processos *upstream*, como preparação e esterilização do substrato, para processos *downstream*, como biomassa e recuperação de produtos, bem como lidar com o carregamento e descarregamento do equipamento (RAGHAVARAO; ANGANATHAN; KARANTH, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Ao longo da história, diferentes tipos de biorreatores, como leito empacotado, tambor rotativo, leito fluidizado e bandejas, foram testados para processos de CES (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2021; SINGHANIA *et al.*, 2018). Os biorreatores de bandeja representam o tipo mais econômico devido à sua estrutura simples e facilidade mecânica de construção. Portanto, são os mais utilizados em escala industrial (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022). No entanto, existem algumas desvantagens significativas dos biorreatores de bandeja para CES, incluindo a necessidade de preparar a cultura de microrganismos e o substrato fora do equipamento, distribuição heterogênea potencial dos metabólitos no final do processo, remoção insuficiente de calor do leito estático de partículas, e extração laboriosa do bioproduto (ARORA; RANI; GHOSH, 2018; DA CUNHA *et al.*, 2020; GRAJALES *et al.*, 2012).

Ao combinar várias etapas do processo, como preparação de substrato, esterilização, inoculação, cultivo e descarga em um biorreator econômico, ele superará as desvantagens dos processos de CES existentes em biorreatores de bandeja, diminuindo substancialmente o manuseio, a energia, o tempo e os custos dos processos, justificando sua aplicação (GARRO *et al.*, 2021; GRAJALES *et al.*, 2012). Esta metodologia de combinar várias etapas do processo fazendo reduções notáveis no tamanho do equipamento, visando transformar um processo convencional em um processo mais econômico, produtivo e verde é o conceito fundamental que define a Intensificação do Processo (IP) (TIAN *et al.*, 2018). Portanto, IP é uma integração funcional de equipamentos que permite reduzir o número de operações unitárias, a fim de simplificar o processo, diminuir custos, reduzir o consumo de energia ou a geração de resíduos ao atingir uma determinada meta de produção (SITTER *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017; NIKAČEVIĆ *et al.*, 2012). O desafio associado a esta inovação é enorme, pois existem barreiras à implementação, tais como fiabilidade em tecnologias maduras, riscos

devido à falta de precedentes, falta de conhecimento sobre como e onde aumentar a escala e falta de unidades de escala de processo validadas. Assim, um processo de CES realizado em um novo biorreator de bandejas capaz de compreender as etapas de *upstream*, cultivo e *downstream* em um único equipamento, desempenha um impacto significativo no estado da arte da intensificação do bioprocessamento de CES.

Na última década, o grupo de pesquisa Engenharia de Biorreatores, da Universidade Federal do Tocantins (UFT), vem trabalhando no desenvolvimento de um biorreator de bandejas com todas as características citadas (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022). O equipamento é dotado de diversos recursos internos como *sprinklers*, dreno, válvulas para vapor, laterais para entradas de ar, camisa de resfriamento e quatro bandejas com fundo perfurado. Com a configuração descrita, pretende-se integrar as etapas anteriores e o processo de cultivo em um único aparato, mantendo taxas de produção iguais ou superiores com chances mínimas de contaminação e geração de poluição. No início do processo, é possível realizar a esterilização a vapor *in situ* de todas as partes internas do equipamento e do substrato colocado nas bandejas. Terminada a esterilização, sem vapor na câmara, inicia-se a recirculação da água em temperatura ambiente na camisa de resfriamento. Simultaneamente, dentro da câmara, um fluxo de ar quase saturado entra no biorreator e passa pelo substrato colocado nas bandejas. Então, tanto a camisa de resfriamento quanto o ar ajudam a resfriar o meio poroso até a temperatura ideal de cultivo. Os aspersores internos também podem ser acionados para aspersão de água até atingir o teor de umidade ideal. A inoculação ocorrerá então por aspersão de suspensão de esporos sobre a camada de substrato. Ao longo do cultivo, a água poderá ser substituída, em caso de secagem do substrato. Tanto quanto se sabe, esta nova abordagem não tem precedentes na literatura de CES.

Dado que há grande quantidade de resíduos da agroindústria no Brasil e há um forte desejo de promover o desenvolvimento da indústria regional com produtos de alto valor agregado, a tecnologia CES desenvolvida neste trabalho pode desempenhar um papel fundamental. Assim, essa pesquisa teve como objetivo desenvolver um biorreator de bandeja em escala piloto que aproveite o conceito de intensificação do processo de combinar operações *upstream* e cultivo em um único equipamento. Para validar o projeto do biorreator, foram realizados dois estudos de caso de grande importância para a economia brasileira. No primeiro estudo de caso, foi produzido o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 sobre resíduos agroindustriais. No segundo estudo de caso, foram produzidas lipases de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 em resíduos agroindustriais.

## 1.2 Desenvolvimento do biorreator

### 1.2.1 Projeto do biorreator

O biorreator de bandejas foi projetado com o objetivo de promover uma aeração eficiente para fornecer oxigênio aos microrganismos, mantendo a uniformidade e integridade do substrato. Portanto, o biorreator foi dotado de um sistema de aeração que inclui compressor, filtro, umidificador e rotâmetro. O umidificador consiste em uma coluna de vidro preenchida com esferas de vidro de 3 mm com o espaço restante preenchido com água destilada. O ar passa pelo umidificador tornando-se saturado antes de entrar no biorreator. O sistema de aeração também é utilizado como mecanismo de controle de temperatura e umidade do meio de cultivo.

Outro mecanismo usado para controle de temperatura e umidade é um sistema de pulverização de água esterilizada. É composto por um reservatório de água, uma bomba submersa para transportar a água do reservatório até os aspersores, uma lâmpada ultravioleta que esteriliza a água e dois aspersores localizados na parte superior do biorreator. A fim de reduzir o manuseio extensivo e facilitar a transição de etapas a montante, o sistema de pulverização também é usado para pulverizar a suspensão fúngica acima do meio com o objetivo de inocular o substrato quando o processo se iniciar (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2024).

Embora os sistemas de pulverização e aeração sejam eficazes no controle da temperatura, a camisa de resfriamento fornece o mecanismo mais crítico para atingir a faixa de temperatura alvo durante todo o processo. Isso é obtido pela recirculação da água de resfriamento de um banho termostático (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2024).

A esterilização também é uma etapa crucial a montante. Assim, o biorreator visa realizar a esterilização a vapor *in situ* de todas as partes internas do equipamento e do substrato colocado nas bandejas. O sistema de esterilização é composto por caldeira, tubulações de vapor, válvula redutora de pressão, dreno e sifão termodinâmico para retirar o excesso de umidade gerado durante o processo, um manômetro para monitorar a pressão e temperatura do processo.

Todo o sistema com todas as características mencionadas é ilustrado na Figura 13, mostrando um esquema 3D do biorreator de bandeja e seus periféricos. A Tabela 2 lista os itens mostrados na Figura 13.

Figura 13 - Esquema 3D do biorreator de bandeja e seus periféricos

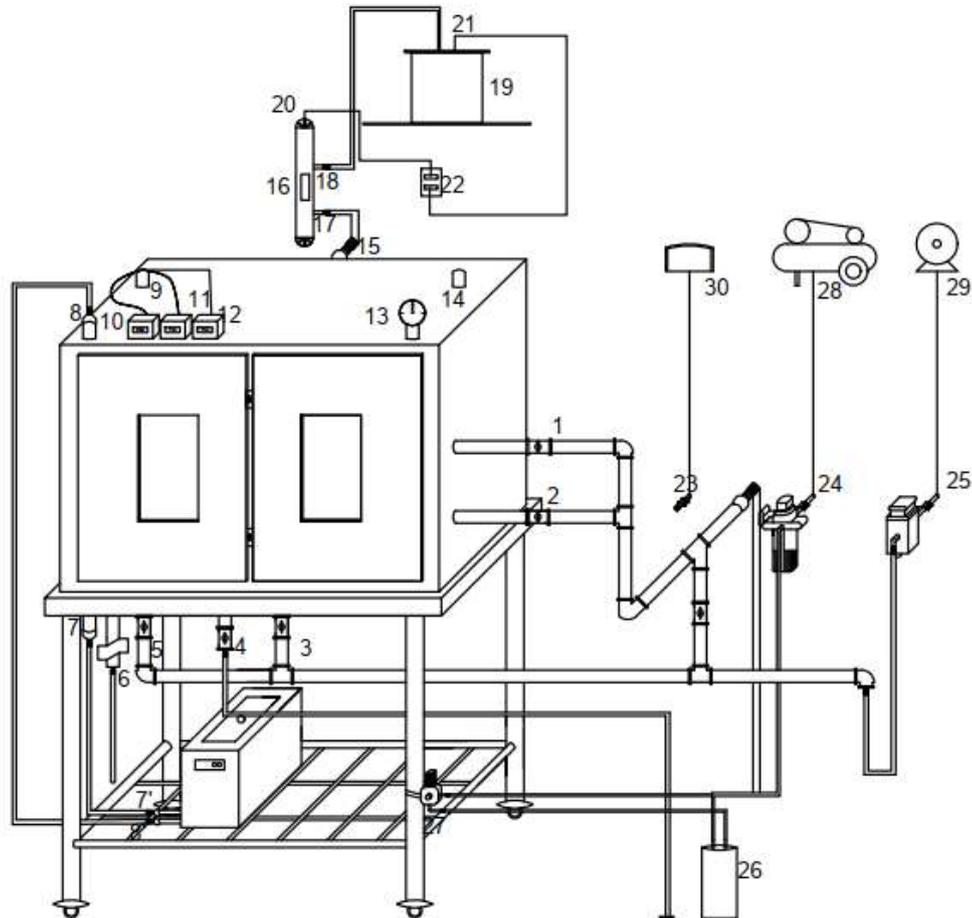


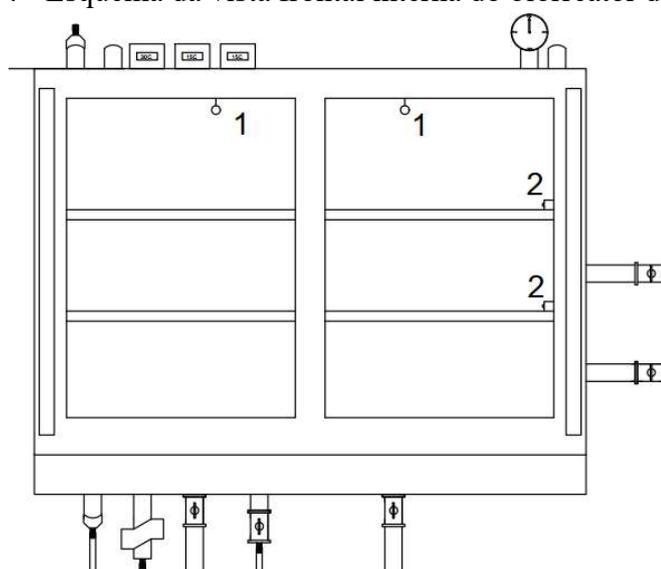
Tabela 2 - Definições de itens da Figura 13

Item	Descrição
1, 2, 3, 5	Entradas de vapor de esterilização e ar úmido
4	Ralo
6	Armadilha termodinâmica
7, 8	Entrada e saída de água da camisa de resfriamento
9	Entrada dos sensores de temperatura dentro do equipamento
10, 11, 12	Displays para os sensores de temperatura
13	Manômetro
14	Abertura para saída de gás
15	Entrada de aspersores
16	Lâmpada ultravioleta
17, 18	Entrada e saída da lâmpada UV
19	Tanque de reserva de água ou inóculo
20	Conexão elétrica da lâmpada UV
21	Bomba submersível
22	Conexão elétrica da bomba submersível
23, 24, 25	Entradas do fornecedor de água, ar e vapor
26	Umidificador
27	Rotâmetro
28	Compressor
29	Caldeira
30	Reservatório de água

Fonte: Dos Autores (2023).

O projeto do biorreator de bandejas foi realizado usando o AutoCAD. A Figura 14 mostra um esquema do interior do biorreator. O item 1 mostra as posições dos aspersores e o item 2 indica as localizações das entradas de ar dentro do biorreator. O interior do biorreator contém quatro bandejas de aço inoxidável perfuradas, cujas dimensões em metros são mostradas na Figura 15. As quatro bandejas são perfuradas em seu fundo e nas laterais para permitir uma boa circulação do ar (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022).

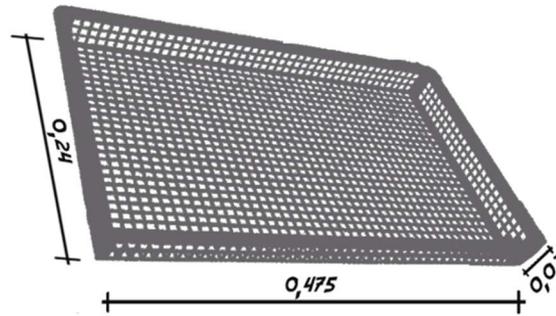
Figura 14 - Esquema da vista frontal interna do biorreator de bandeja



Fonte: DINIZ DA SILVA *et al.* (2022).

Dentro do equipamento foram dispostos três conjuntos de sensores de temperatura. Um conjunto foi posicionado nas bandejas superiores. Outro conjunto foi posicionado nas bandejas inferiores. E, o último conjunto foi posicionado perto da camisa de resfriamento e da saída de ar. Cada conjunto tinha 4 termopares. O primeiro e o segundo conjunto foram dispostos longitudinalmente a 19, 38, 57 e 76 cm ao longo das bandejas, iniciando no fornecimento de ar até o extremo oposto do reator. Devido ao arranjo mecânico do biorreator, os sensores têm a opção de mudar de posição de um experimento para outro, permitindo avaliar as temperaturas em diferentes posições do leito: na superfície das partículas ou no centro do meio cultivado, por exemplo.

Figura 15 - Esquema de bandeja perfurada no fundo e laterais com dimensões em metros



Fonte: DINIZ DA SILVA *et al* (2022).

Conforme apontado na Introdução, o biorreator foi projetado para permitir a intensificação do processo de CES combinando esterilização, inoculação e cultivo, tudo dentro do mesmo equipamento. O objetivo é reduzir a contaminação e otimizar a operação da planta (DALLASTRA, 2018; JESUS, 2017).

### 1.2.2 Construção do biorreator e operacionalidade

O biorreator foi construído pela empresa Elros Empresa Metalinox em Palmas (Brasil). Foi feito de aço inoxidável e apoiado em uma base de 100 cm. As Figuras 16 e 17 mostram fotos da vista externa e interna do biorreator de bandeja e seus periféricos, respectivamente. A Figura 18 mostra os dois aspersores localizados na parte superior do biorreator. Conforme mostrado na Figura 19, o ar úmido e o vapor entram no biorreator através de 50 perfurações distribuídas pela parede direita do biorreator. Por fim, a Figura 20 mostra uma foto de uma bandeja com perfurações em seu fundo e nas laterais.

Figura 16 - Visão externa do biorreator de bandeja e seus periféricos



Fonte: Da Autora (2023).

Figura 17 - Visão interna do biorreator de bandeja e seus periféricos



Fonte: Da Autora (2023).

Figura 18 - Atomizadores

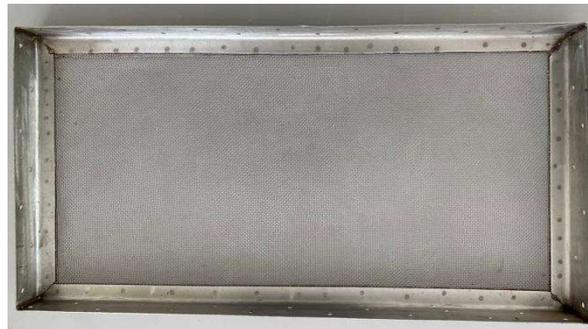


Fonte: Da Autora (2023).

Figura 19 - Entrada de ar e vapor



Figura 20 - Bandeja perfurada em seu fundo e laterais



Fonte: Da Autora (2023).

Vários testes preliminares qualitativos foram realizados com o objetivo de avaliar o desempenho de todo o sistema de cultivo.

Em relação aos processos de esterilização, foram realizados 20 experimentos com o substrato colocado nas bandejas e 20 experimentos sem substrato. Vapor foi injetado na câmara a 105 °C por 40 minutos. Após um processo de incubação de sete dias, a análise microbiológica não mostrou crescimento de fungos ou bactérias. Isso indicou que o mecanismo de esterilização de todas as partes internas do equipamento e do substrato foi eficaz. Assim, realizar esta etapa

do processo *in-situ* pode reduzir significativamente a mão de obra necessária. Consequentemente, minimiza o potencial de contaminação pelo manuseio.

Com relação à resposta térmica do sistema e ao desempenho dos sensores, foram realizadas perturbações de temperatura visando detectar a forma mais eficiente de controlar a temperatura do meio de partículas sólidas com alterações nas principais variáveis do sistema. Assim, as condições operacionais avaliadas neste estudo foram extremas para os dois estudos de caso. Para simplificar a análise, não houve crescimento de microrganismos. Não havia nenhum arranjo estatístico definido para fazê-lo. Apesar dos sensores terem a opção de mudar de posição de um experimento para outro, para esses experimentos os termopares permaneceram na mesma posição. Assim, foram realizados 10 experimentos com bandejas vazias e 10 experimentos com arroz tipo I. A distribuição de temperaturas para os experimentos sem carga, alimentação de ar a 50 °C e 3 L/min mostrou que leva 50 minutos para a jaqueta atingir a temperatura desejada; assim, pode-se dizer que o sistema possui um mecanismo de resposta muito lento. Por outro lado, a inércia térmica é alta quando a temperatura desejada é atingida. Permaneceu estável por aproximadamente 3 horas. As temperaturas detectadas pelos sensores em diferentes posições do biorreator foram muito próximas entre si; seguiram a tendência da temperatura da jaqueta e do ar. Para os experimentos com arroz Tipo I, as partículas estavam inicialmente em temperatura ambiente. Houve uma diminuição de 15 minutos no tempo de aquecimento do meio particulado em relação às bandejas vazias. Para reduzir o tempo de aquecimento do meio particulado, foram realizados 10 experimentos semelhantes aos anteriores, sendo que desta vez a água foi aspergida a 65 °C. Esperava-se que a temperatura das partículas aumentasse significativamente. Porém, deve-se considerar o fato de que a quantidade de água em relação à massa da partícula foi muito pequena. Houve um aumento de aproximadamente 2 °C na temperatura das partículas, o que significa que é um método eficiente para resfriamento instantâneo. Em todos os cenários, as temperaturas medidas a qualquer momento nas diversas posições foram bastante homogêneas. Isto significa que as medidas tomadas foram as mesmas para todas as posições do reator no momento em que os dados foram coletados. A umidade final do arroz foi determinada após cada experimento. A umidade foi constante em  $41,21\% \pm 2,98\%$ , proporcionando condições de umidade constante.

Durante todos os experimentos, foi monitorada a umidade relativa do ar à medida que entrava no equipamento. A umidade relativa média obtida durante todos os experimentos realizados neste estudo foi de  $91,53\% \pm 3,5\%$ . Apesar das variações climáticas em todos os experimentos, a umidade relativa foi constante, proporcionando as condições termodinâmicas de entrada de ar no reator.

Posteriormente, foram realizados 4 cultivos de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 para verificar todo o processo. Após o processo de esterilização e resfriamento do substrato sólido, a suspensão do inoculante e a solução nutritiva foram pulverizadas sobre o substrato colocado nas bandejas. Dado que as condições ótimas para o crescimento do fungo são 28 °C e dez dias, a camisa de resfriamento e o fluxo de ar úmido de 10 L/min foram mantidos a 28 °C durante todo o processo de cultivo. Sensores de temperatura localizados em posições distintas do substrato apresentaram temperaturas de 28 °C ± 2,5°C – faixa de temperatura tolerável por *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425. De acordo com esses resultados, isso mostra que o biorreator pode manter a temperatura estável durante o processo, proporcionando as condições ideais para o crescimento do microrganismo.

Em relação à umidade do substrato, foram realizados 10 experimentos com fluxos de ar úmido e seco. Para experimentos realizados com ar seco, o substrato secou e não houve crescimento de microrganismos. Para experimentos realizados com ar úmido, o substrato é mantido úmido durante os processos de cultivo conforme mostrado na Figura 21. Como resultado, houve produção de conídios. Em resumo, o biorreator de bandejas reteve e manteve a umidade do substrato com ar úmido, proporcionando um ambiente ideal para microrganismo se desenvolver.

Figura 21 - Gotas de água na parede do biorreator



Fonte: Da Autora (2023).

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um biorreator de bandejas em escala piloto que permite a intensificação do processo combinando operações *upstream* e cultivo em um único equipamento. O equipamento é dotado de diversos recursos internos, incluindo *sprinklers*, dreno, válvulas para vapor, laterais para entradas de ar, camisa de resfriamento e quatro bandejas inferiores perfuradas. É capaz de realizar a esterilização a vapor *in-situ* de todas as partes internas do equipamento e do substrato colocado nas bandejas. Após

completar a esterilização, a camisa de resfriamento e o ar ajudam a resfriar o meio poroso até a temperatura ideal de cultivo através de condução e resfriamento evaporativo. Os aspersores internos também podem ser acionados para aspersão da água até atingir o teor de umidade ideal. A inoculação ocorre aspergindo a suspensão dos esporos sobre a camada de substrato. Ao longo do cultivo, a água poderá ser substituída caso o substrato resseque.

Na próxima seção apresentamos dois estudos de caso que foram conduzidos usando esse design de processo inovador. No primeiro, o fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 foi produzido a partir de resíduos agroindustriais. No segundo, foram produzidas lipases de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 sobre resíduos agroindustriais.

### 1.3 Estudos de caso

#### 1.3.1 Produção de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 E LIPASES

O fungo filamentoso *M. anisopliae* tem sido utilizado com sucesso no Brasil desde a década de 1970 em culturas de cana-de-açúcar para controlar populações de *Mahanarva posticata* (BAPFUBUSA NIYIBIZI *et al.*, 2023; BARBIERI *et al.*, 2023; FERRON, 1978). Contudo, *M. anisopliae* ainda é produzido primitivamente. Nas biofábricas, esse fungo é produzido por CES e seu processo de produção envolve diversas etapas manuais, que resultam em altos níveis de contaminação, baixa produtividade e doenças dos trabalhadores (BHANU *et al.*, 2008; GRAJALES *et al.*, 2012). Além disso, por ser um processo manual, é difícil produzir o fungo em larga escala (BHANU *et al.*, 2008);

Além disso, *M. anisopliae* é geralmente cultivada em arroz tipo I (alta qualidade). Como o arroz é um alimento básico na nossa dieta, usá-lo para cultivar o fungo pode comprometer a segurança alimentar (ALLWOOD *et al.*, 2023). Portanto, dada a crescente demanda por controle biológico e segurança alimentar, é desejável encontrar outros substratos para cultivo. Ao mesmo tempo, isso proporciona uma excelente oportunidade para reduzir custos de produção e desenvolver novas tecnologias de produção. Por exemplo, diversos resíduos agroindustriais da região Norte do Brasil podem ser utilizados como substrato, pois contêm proteínas, fibras, carboidratos, amido, nitrogênio e fósforo em sua estrutura, como a quirera de arroz, farelo de soja e trigo (DALLASTRA, 2018). Assim, esses resíduos agroindustriais constituem meios de cultura de enorme potencial para produção de *M. anisopliae*. Além de possuírem importantes propriedades nutricionais, sua grande disponibilidade e baixo custo de

processamento também poderiam promover a indústria regional sem comprometer a segurança alimentar.

Além de ser um pesticida biológico, há relatos na literatura de *M. anisopliae* como produtor de proteases, quitinases e lipases (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022; DUARTE, 2018; SILVA *et al.*, 2005). As lipases (triacilglicerol acil hidrolases EC3.1.1.3) catalisam reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e alcoólise (DURAIARASAN *et al.*, 2016; FEBRIANI *et al.*, 2020; JACOB; SUTHINDHIRAN, 2020). Portanto, as lipases apresentam grande potencial biotecnológico em diversos setores industriais (PRECZESKI *et al.*, 2018). As aplicações mais destacadas estão nas indústrias alimentícia, de couro, de cosméticos, farmacêutica, médica, de detergentes, de papel, têxtil, de tratamento de efluentes e de produção de biodiesel (AL-DHABI *et al.*, 2020; NEMA *et al.*, 2019; UNGCHAROENWIWAT; H-KITTIKUN, 2020; ZARSKA; BARTOSZEK; DZIDA, 2014).

Os substratos usados para produzir lipases devem conter ácidos graxos livres, óleo e acceptor de acila (álcool) (ÁVILA VÁZQUEZ *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2018; RIGO *et al.*, 2010). Considerando a região onde esta pesquisa foi realizada, a agroindústria do babaçu se destaca atualmente. O babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng.) é um dos mais importantes representantes das palmeiras brasileiras. Ele se espalha ao longo dos limites sul da bacia amazônica. Embora existam diversos usos para os derivados do babaçu, seu potencial permanece inexplorado devido à falta de escala e estrutura de produção. Até agora, apenas o óleo e a torta extraídos de suas amêndoas são produzidos industrialmente na prática (SANTANA *et al.*, 2013). O óleo de babaçu contém ácidos graxos, ácidos oleico, mirístico e caprílico com imenso potencial energético, além de potencial para geração de produtos químicos de alto valor (ZARSKA; BARTOSZEK; DZIDA, 2014). A torta de prensagem contém óleo residual que contém ácidos graxos em sua estrutura que podem ser assimilados por *M. anisopliae* durante o CES para produção de lipases (COLLA *et al.*, 2016; DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022; DUTRA, 2020). Neste estudo, o binômio *M. anisopliae*- babaçu de babaçu, microrganismo-substrato, é considerado um sistema produtor de lipase promissor (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022; DUARTE, 2018).

Portanto, por serem sistemas de baixo custo, originados de fontes renováveis que minimizam os impactos ambientais, neste estudo foi considerada a produção do fungo *M. anisopliae* a partir de farelo de trigo, arroz quebrado e farelo de soja como substratos e a produção de lipases a partir do mesmo fungo utilizando babaçu de coco de babaçu como substrato. Dado o potencial, ambas são tecnologias promissoras que não têm recebido atenção

significativa por parte da comunidade científica, uma vez que, até onde sabemos, não existem estudos sobre a sua utilização para quaisquer aplicações industriais.

### 1.3.2 Materiais e métodos

#### 1.3.2.1 *Materiais*

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 na forma de pó de esporos puro foi adquirido do Laboratório Biocontrol (Brasil). Foi armazenado e mantido a -12 °C antes de ser utilizado.

Farelo de trigo, farelo de soja e quirera de arroz foram os resíduos agroindustriais utilizados como substratos para produção de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425. Arroz tipo I foi utilizado como controle. Todos os substratos foram armazenados em temperatura ambiente antes de serem utilizados. O arroz tipo I e a quirera de arroz foram fornecidos por uma usina de beneficiamento de grãos localizada em Palmas (Brasil). O arroz tipo I e quirera de arroz foram cozidas por imersão em água quente (80 °C) por 4 min, simulando a operação industrial. Para proporções de 1:1 de farelo de trigo e quirera de arroz e 1:1:1 de farelo de trigo, quirera de arroz e farelo de soja, foi adicionada água até o nível de umidade de 30%.

O bagaço do coco de babaçu (*Orbignya speciosa*) utilizado como substrato para a produção de lipases é o resíduo resultante da extração do óleo da castanha de babaçu, que foi fornecido por uma Cooperativa Multifuncional de Economia Solidária do Estado do Tocantins (COOME-SOL) no Brasil. Este foi armazenado a -80 °C e antes de ser utilizado para os cultivos foi descongelado à temperatura ambiente.

#### 1.3.2.2 *Cultivos em Estado Sólido*

Para os cultivos os substratos foram distribuídos em camadas uniformes nas quatro bandejas do biorreator. As bandejas foram então colocadas dentro da câmara do biorreator, que foi hermeticamente fechada. A esterilização do conjunto substrato- biorreator foi realizada com vapor condensante à 105 °C por 40 min. Posteriormente, o meio poroso foi resfriado até 28 °C pela ação conjunta da camisa de resfriamento da câmara e do fluxo de ar subsaturado. Por fim, a suspensão de esporos do fungo e a solução nutritiva foram aspergidas sobre o substrato.

A solução nutritiva previamente esterilizada e resfriada é composta por cloreto de potássio (0,025%), extrato de levedura (0,012%) e 0,01% de surfactante Tween 80 (DALLASTRA, 2018). A suspensão de esporos foi padronizada em  $2 \times 10^7$  esporos/mL (DALLASTRA, 2018). Nenhum agente indutor foi utilizado.

Durante o tempo de cultura em lote, o ar passou através de um leito fixo de partículas sólidas com um fluxo na direção longitudinal das bandejas. Isso é esperado, uma vez que sua vazão foi mantida em 12 L/min sob condição hermeticamente fechada (DALLASTRA, 2018). O processo de cultivo ocorreu por sete dias a 28 °C (DUARTE, 2018).

#### 1.3.2.3 Estimativa da produção de conídios de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425

Após o cultivo, foram retiradas amostras de 10g do meio fungo-substrato para contagem dos conídios produzidos. A solução extratora foi composta por 45 mL de água destilada e 0,01% de surfactante Tween 80. O conjunto conídio-substrato foi agitado manualmente para separar os conídios da matriz. Em seguida, foi filtrado em tecido não tecido (TNT). A estimativa dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer sob microscópio óptico binocular com aumento de 40x. Diluições seriadas foram realizadas quando necessário. Os resultados obtidos foram comparados com um caso controle, no qual foi realizada a produção de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 em sacos de polipropileno utilizando 5 g de arroz tipo I como substrato.

#### 1.3.2.4 Produção de lipases extracelulares a partir do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425

Primeiramente, foi realizada a caracterização do bagaço do coco de babaçu. O teor de umidade, proteínas, gordura bruta (lipídios), cinzas e tamanho de partícula foram determinados usando os seguintes métodos: teor de proteína pelo método Kjeldhal (AOAC, 2000); extração lipídica e quantificação de ácidos graxos utilizando extração com solvente orgânico; teor de umidade pelo método de secagem a 105 °C (AOCS, 2003); cinzas por incineração em forno a 550 °C (AOAC, 2000); e tamanho de partícula usando um conjunto de peneiras Tyler de 10, 14, 20, 24 e 28 mesh (MENESES *et al.*, 2008).

Após o cultivo, foi obtido o extrato enzimático e foi determinada a sua atividade enzimática (AE). Para isso, foram retiradas amostras de 10g do meio fungo-substrato-enzima para obtenção do extrato enzimático. A solução extratora foi composta por 20 mL de tampão McIlvaine (pH 7,0) e 0,25% de surfactante Tween 80 (DUARTE, 2018). O extrato enzimático bruto foi coletado e congelado a  $-4$  °C por 48 h para determinação da AE.

A AE foi avaliada com uma mistura de reação contendo 40mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM pNPP e 25  $\mu$ L de enzima (5 mg/mL) em um volume final de 1 mL. Após 10 min de incubação a 40 °C, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de etanol 96% e a temperatura foi diminuída em banho de gelo a 0 °C. O p-nitrofenol liberado foi monitorado espectrofotometricamente a 420 nm, utilizando uma curva padrão. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 $\mu$ mol de p-nitrofenol por grama por minuto (NICANUZIA *et al.*, 2006).

### 1.3.3 Projeto experimental e análise estatística

Para a produção de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 foram realizados os CES com farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de soja e arroz tipo I como substratos. Foram realizadas proporções de 1:1 de farelo de trigo e quirera de arroz, e 1:1:1 de farelo de trigo, quirera de arroz e farelo de soja, uma vez que experimentos preliminares mostraram a maior produção de conídios em pequena escala (DALLASTRA, 2018).

Para a produção de lipases foram realizados os CES tendo bagaço de babaçu e arroz tipo I (alta qualidade) como substratos. Foram analisadas as proporções 1:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:1.

Tanto para a produção de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 quanto para a produção de lipases, durante os cultivos, os substratos foram distribuídos em camadas uniformes de 1cm, 2cm e 3cm de espessura nas quatro bandejas do biorreator (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022). O delineamento experimental de todos os experimentos foi em blocos casualizados e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Realizamos 4 repetições para cada experimento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software Assistat Versão 7.7.

## 1.4 Resultados e discussão

### 1.4.1 Produção de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425

O sistema de cultivo utilizando arroz como substrato produziu o fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 para as três camadas avaliadas (1, 2 e 3cm de espessura) sob condições controladas de temperatura e umidade dentro do biorreator. A Figura 22 mostra a foto de uma bandeja com o binômio microrganismo-substrato após sete dias de cultivo.

A quantidade de conídios produzidos para as 4 repetições (bandejas e sacolas plásticas) apresentou distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ( $\alpha=0,05$ ). A análise de variância (ANOVA) revelou uma diferença significativa entre os tratamentos ( $\alpha=0,05$ ). O coeficiente de variação (CV) foi de 17,56%. Os tratamentos foram submetidos ao Teste de Tukey ao nível de significância de 5% (Tabela 3).

Figura 22 - Bandeja com binômio microrganismo-substrato após o cultivo



Fonte: Da Autora (2023).

Tabela 3 - Média de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 obtidos de arroz Tipo I tanto em biorreator de bandeja quanto em sacos de polipropileno.

Experimental	Tratamento	Concentração (Conídios/mL)	Desvio padrão (Conídios/mL)
Biorreator	camada de substrato de 1cm de espessura	$12.3 \times 10^8^a$	$2.60 \times 10^8$
	camada de substrato de 2cm de espessura	$19.6 \times 10^8^b$	$3.17 \times 10^8$
	camada de substrato de 3cm de espessura	$10.1 \times 10^8^a$	$3.57 \times 10^8$
Controle	Sacos de plástico	$8.59 \times 10^8^a$	$1.60 \times 10^8$

\*As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

De acordo com a Tabela 3, a produção de conídios para o substrato colocado em camadas de 2 cm é estatisticamente maior ( $\alpha =0,05$ ) do que a produção de conídios para o substrato colocado em camadas de 1 e 3 cm. Também é maior que o controle. Conforme mostrado na Figura 23 havia aglomerados significativos no sistema com camadas de 3cm.

Como é sabido, os aglomerados aumentam o gradiente de temperatura no interior da matriz sólida, ao mesmo tempo que dificultam a passagem de ar através do meio particulado. O arroz cozido pode liberar amido; assim, é possível formar aglomerados. Conseqüentemente,

este continua sendo um dos maiores desafios a serem superados nos processos de produção em escala de microrganismos no CES. Em contrapartida, houve pouca compactação, aglomeração ou ressecamento do meio particulado no sistema de cultivo com camadas de 2cm. Isso significa que, quando a camada de substrato é mais espessa, aumenta a possibilidade de formação de aglomerados. Existem duas maneiras de evitar aglomerados: (I) utilizando uma mistura de resíduos como substrato, e (II) utilizando camadas mais finas para que os resíduos possam funcionar como suporte físico para o processo de cultivo e reduzir a área superficial entre os mesmos. Assim, neste trabalho foram realizados experimentos com misturas de farelo de trigo e quirera de arroz 1:1 e farelo de trigo, quirera de arroz e farelo de soja 1:1:1.

Com base nos resultados pode-se concluir que é possível aumentar gradativamente a escala de produção do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 utilizando o biorreator de bandejas e o substrato em camadas de 2cm de espessura. Experimentos subsequentes utilizando resíduos agroindustriais como substratos foram realizados em espessuras de 2 cm.

Figura 23 - Formação de aglomerados no binômio microrganismo-substrato após o processo de cultivo



Fonte: Da Autora (2023).

#### 1.4.2 Produção do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 a partir de resíduos agroindustriais

Seguindo os mesmos processos no biorreator, foram utilizados três tipos de resíduos agroindustriais. Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam que foi possível produzir o fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 em biorreator de bandejas em escala piloto utilizando resíduos agroindustriais. A produção de conídios obtida com a mistura de farelo de trigo e

quirera de arroz foi estatisticamente maior ( $\alpha=0,05$ ) que a produção do fungo em escala laboratorial com arroz tipo I (testemunha). Esses resultados também mostram que o biorreator pode manter a temperatura e a umidade estáveis durante o processo, proporcionando as condições ideais para o microrganismo desenvolver suas atividades metabólicas independentemente das características nutricionais dos substratos.

Tabela 4 - Média de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) IBCB 425 obtidos de arroz Tipo I e resíduos agroindustriais tanto em biorreator de bandeja quanto em sacos de polipropileno

Experimental	Tratamento	Concentração (Conídios/mL)	Desvio padrão (Conídios/mL)
biorreator	Arroz quebrado, farelo de trigo e farelo de soja	$14.1 \times 10^8^b$	$2.6 \times 10^8$
	Arroz quebrado e farelo de trigo	$16.7 \times 10^8^c$	$0.46 \times 10^8$
	arroz tipo I	$19.6 \times 10^8^c$	$3.17 \times 10^8$
Ao controle	Sacos de plástico	$8.59 \times 10^8^a$	$1.60 \times 10^8$

\*As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey. Fonte: Elaboração própria (2023)

A quantidade de conídios produzidos nas 4 repetições (bandejas e sacolas) apresentou distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ( $\alpha =0,05$ ). A análise de variância (ANOVA) revelou uma diferença significativa entre os tratamentos ( $\alpha=0,05$ ). O coeficiente de variação (CV) foi de 15,16%. Os dados foram submetidos ao teste de comparação de médias (Teste de Tukey) ao nível de significância de 5%.

A mistura de farelo de trigo e quirera de arroz proporcionou ao fungo um crescimento estatisticamente igual ( $\alpha=0,05$ ) ao crescimento do fungo utilizando arroz tipo I. Tanto os fatores nutricionais quanto os físicos poderiam explicar a quantidade satisfatória de conídios produzidos. Comparando as propriedades nutricionais do farelo de trigo e do farelo de soja, o farelo de trigo possui 22% carboidratos e 16% de proteína, enquanto o farelo de soja tem 13% de carboidratos e 43% de proteína (CEBRIÁN; IBARRURI, 2023). Em contraste, o arroz tipo I tem 87% de carboidratos e 8,9% de proteína (JARONSKI, 2023). Ao utilizar substratos alternativos para a produção de fungos, a relação carbono/nitrogênio (C:N) deve ser considerada (JARONSKI, 2023). O excesso de nitrogênio no meio de cultura pode inibir o crescimento de fungos devido ao acúmulo de metabólitos (JARONSKI, 2023). Além disso, o carbono é considerado o elemento mais importante de um meio de cultura, pois auxilia na construção das células e fornece a energia necessária para o metabolismo dos microrganismos (CEBRIÁN; IBARRURI, 2023; MENESES *et al.*, 2008). Para a mistura de farelo de trigo,

farelo de soja e quirera de arroz, o crescimento de conídios foi menor do que no controle. Talvez isso se deva ao excesso de nitrogênio na adição do teor proteico do farelo de trigo e do farelo de soja.

Conforme mencionado anteriormente, a produção de conídios também é influenciada pela conformação física do substrato. A produção de fungos utilizando substratos combinados está intimamente relacionada à aeração e umidade no interior do meio. A estrutura do substrato é tão importante quanto os nutrientes disponíveis, uma vez que o substrato ideal deve promover uma grande área superficial, onde as partículas individuais permaneçam separadas com espaço para aeração e formação de conídios (CEBRIÁN; IBARRURI, 2023; MENESES *et al.*, 2008). Existem vários casos relatados na literatura de utilização de diferentes substratos para produção de *M. anisopliae*. Nestes casos, o farelo de trigo proporciona grande área superficial e, conseqüentemente, boa aeração entre as partículas (DA CUNHA *et al.*, 2019; BARRA-BUCARE; VERGARA; CORTES, 2016).

Além disso, o uso de farelos pode ser uma alternativa viável tanto para baixo custo quanto para boa produção de conídios. Por exemplo, o custo de 1 kg da mistura de resíduos de farelo de trigo, farelo de soja e quirera de arroz é 35,5% inferior ao de 1 kg de arroz tipo 1. Além disso, não há necessidade de pré-tratamentos além da adição de água até 30% de umidade. Em contrapartida, o arroz tipo I deve ser cozido por imersão em água quente, o que aumenta o custo de produção e o gasto energético.

Esta pesquisa mostrou a importância da substituição do arroz tipo I por substratos abundantes, ambientalmente compatíveis e de baixo custo, como alguns resíduos agroindustriais. Também mostrou a importância de desenvolver equipamentos que permitam a intensificação do processo, combinando operações *upstream* e cultivo em um único equipamento, levando a um manuseio mínimo e mantendo condições operacionais estáveis durante todos os processos de CES, podendo ser potencialmente um salto em direção à escala.

### 1.4.3 Produção de lipases de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425

#### 1.4.3.1 Seleção do substrato

Até onde sabemos, não há relatos na literatura sobre a utilização do coco de babaçu para produção de lipases de *M. anisopliae*, apesar de sua estrutura ser rica em ácidos graxos, que podem ser utilizados para produção de lipase. Por outro lado, o arroz tipo I (de alta qualidade) é utilizado industrialmente na produção de conídios por este fungo devido ao seu alto teor de

carboidratos (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2022; GRAJALES *et al.*, 2012; DUARTE, 2018). Os fungos filamentosos utilizam carboidratos para realizar suas principais atividades metabólicas (CASTIGLIONI *et al.*, 2018), o que pode explicar a boa adaptação do fungo a esse substrato. Portanto, foi analisada uma mistura de bagaço de babaçu e arroz tipo I como substrato, realizando experimentos com proporções 1:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:1 para seleção do substrato.

A análise de variância (ANOVA) realizada para as atividades enzimáticas (AE) das 6 concentrações com 4 repetições cada, não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. A AE média obtida para estes tratamentos foi de  $8,33 \pm 2,36$  U/mL. Comparado a outras AEs relatadas na literatura, o sistema apresentou um resultado promissor. Por exemplo, para um processo de produção de lipase por cultivo submerso utilizando arroz como substrato e *M. anisopliae*, foi obtida AE de  $4,48 \pm 3,76$  U/mL (SILVA *et al.*, 2005). Outro sistema utilizando bagaço de cana com *Rhizomucor pusillus* obteve AE de 1,73 U/mL para produção de lipase (CORDOVA *et al.*, 1998). Além disso, Fleury *et al.*, (2014) obtiveram AE de 14,4 U/mL para lipases produzidas a partir de *Aspergillus ssp.* usando farelo de trigo como substrato (FLEURI *et al.*, 2014). Ambos os grupos realizaram a CES, confirmando assim o potencial do resíduo agroindustrial como meio de cultura para a produção de enzimas de alto valor agregado. Pinheiro (2008) realizou experimento com o fungo *Penicillium Verrucosum* por cultivo submerso em meios sintéticos e industriais. A atividade lipolítica obtida foi de 3,15 U/mL, o que além de apresentar atividade inferior à aqui obtida, exigiu maior custo de produção devido ao custo excessivo do meio. Com isso, reduziria a possibilidade de produção da enzima em escala industrial. Ao comparar o processo de produção de lipase com a utilização de substrato sintético ou resíduo orgânico, observa-se que o meio de cultivo composto por resíduo agroindustrial possui maior atividade lipolítica, o que confirma que a produção de lipase por este processo é promissora.

Assim, sugerimos que o bagaço de babaçu é um potencial substrato a ser utilizado para a produção de lipases a partir do fungo *M. anisopliae* por apresentar baixo custo, reduzir o descarte inadequado de resíduos e evitar a utilização de arroz tipo I, produto alimentício com valor agregado devido à industrialização.

#### 1.4.3.2 Caracterização do bagaço do coco babaçu

Composição química do bagaço de coco de babaçu.

A produção de enzimas por CES pode ser afetada pela composição química do substrato. É função do substrato fornecer uma proporção adequada de nutrientes que serão utilizados como

fonte de carbono e nitrogênio para as atividades metabólicas do microrganismo durante o processo de cultivo (DE CASTRO; SATO, 2015).

Esses componentes podem estar presentes naturalmente no substrato ou ser adicionados para fins de suplementação. Assim, a caracterização do bagaço do coco babaçu mostra a composição do resíduo quanto ao teor de nutrientes necessários para a síntese enzimática, como percentual de lipídios, proteínas e teor de umidade do substrato (Tabela 5) (RODRÍGUEZ-RESTREPO *et al.*, 2024).

Tabela 5 - Composição química do bagaço do coco babaçu

Componente	Quantidade (%)
Umidade	7.33 ± 0.22
lipídios	6.33 ± 0.65
Proteína	1.28 ± 0.40
cinzas	0.02 ± 0.01

±: Desvio padrão (com base em três repetições).

Fonte: Elaboração própria (2023)

A produção de lipases é induzida pela presença de lipídeos e proteínas no meio de cultura; portanto, o resíduo da indústria de extração de óleo é considerado um substrato potencial para a produção desta enzima devido ao seu conteúdo lipídico residual (RIGO *et al.*, 2010; DE AZEREDO *et al.*, 2007). Quanto aos lipídios e proteínas, o resíduo do coco babaçu apresenta teores consideravelmente elevados (6,33% de lipídios e 1,28% de proteínas), o que significa que poderia promover a indução e síntese de lipases.

O teor de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam os processos de CES e este, varia de acordo com a natureza do substrato, o tipo de produto a ser sintetizado e as necessidades do microrganismo (PAIVA-GUIMARÃES *et al.*, 2020). A alta umidade resulta em baixa difusão de oxigênio como resultado da redução da porosidade do substrato. O risco de contaminação também aumenta, há redução do volume de gases e, conseqüentemente, redução das trocas gasosas. Por outro lado, baixos níveis de umidade levam à redução do crescimento microbiano e à baixa utilização do substrato (BÜCK *et al.*, 2015; DA CUNHA *et al.*, 2019). Assim, o teor de umidade adequado ao microrganismo envolvido é essencial para o sucesso do processo de cultivo. O teor de umidade inicial do bagaço de babaçu foi de 7,33 ± 0,22%, enquanto a umidade ótima para *M. anisopliae* é de 40%. Portanto, os teores de umidade iniciais permitiram o ajuste da umidade do substrato para que o cultivo fosse conduzido de forma eficiente (DINIZ DA SILVA *et al.*, 2024).

### 1.4.3.3 Tamanho das partículas

O tamanho das partículas do substrato é outro fator importante para a produção de enzimas por CES, pois a área superficial afeta diretamente o crescimento microbiano, a transferência do calor e de massa, além da bioconversão do substrato durante o processo (DE CASTRO; SATO, 2015; TOSUNER, TAYLAN, ÖZMIHÇI, 2019). A distribuição granulométrica do bagaço de babaçu apresentou tamanhos entre 1,40 mm e 1,70 mm, respectivamente, 56,12% e 32,36% (RODRÍGUEZ-RESTREPO *et al.*, 2024). Este tamanho de partícula é considerado pequeno e representa uma maior área superficial para acessibilidade do microrganismo; portanto, há mais substrato disponível para garantir o desenvolvimento das atividades metabólicas, pois pequenas partículas de substrato fornecem grandes áreas superficiais favorecendo a transferência de calor e massa (CHEN; HE, 2012; TADA; AGUDELO; THOMÉO, 2019). No entanto, podem limitar a área de fixação do fungo. Foi observada uma mistura de partículas com diâmetros médios variando de 0,3mm a 1,7mm, cerca de 10% do total. Este fato é positivo para processos de CES, uma vez que uma grande proporção dessas pequenas partículas pode criar aglomerados, limitando a difusão de oxigênio, gerando segregação de partículas, rompendo a matriz sólida e criando regiões com baixa disponibilidade de substrato para os microrganismos (DE CASTRO; SATO, 2015; RUIZ *et al.*, 2012).

Melikoglu, Lin, Webb, (2013) produziram protease e glucoamilase por CES e *Aspergillus awamori* usando resíduo de pão como substrato (MELIKOGLU; LIN; WEBB, 2013). Eles avaliaram o efeito de vários parâmetros, incluindo o tamanho das partículas. O resíduo foi separado por tamanho de partícula, que variou de 5mm a 50mm. Verificou-se que o crescimento microbiano e a produção de enzimas foram diretamente afetados pelo tamanho das partículas. Os melhores resultados para a produção simultânea da enzima foram 56,4 U/g para protease e 73,6 U/g para glucoamilase, ambos obtidos com as partículas de 20 mm de diâmetro. A menor produção de protease foi observada nos cultivos com partículas maiores de 50 mm, o que mostrou efeito do tamanho na produtividade.

A distribuição do substrato nas bandejas do biorreator mostrou que as partículas menores foram depositadas no fundo da bandeja, enquanto as partículas maiores permaneceram na superfície. Acredita-se que essa distribuição tenha interferido na produção da enzima, pois foram observadas variações na atividade da enzima dependendo do local de retirada da amostra. Novos estudos sobre a segregação de partículas com bagaço de babaçu permitirão determinar regiões de maior ou menor produção enzimática, de acordo com a distribuição das partículas

nas bandejas.

#### 1.4.3.4 Atividade enzimática

No total, foram realizadas 36 cultivos e a média da AE foi de  $5,64 \pm 0,45$  U/mL (RODRÍGUEZ-RESTREPO *et al.*, 2024). Como mostrado, esses resultados utilizando o bagaço de babaçu como substrato não suplementado para a produção de enzimas lipolíticas são promissores em comparação com outros da literatura (COLLA *et al.*, 2016; DUTRA *et al.*, 2022; TREICHEL *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2020) principalmente quando o objetivo é utilizá-lo em uma escala maior escala de produção.

Por outro lado, a produção de lipase poderia ser induzida por diferentes agentes lipídicos (RIGOLI FERRAZ *et al.*, 2012). Diferentes óleos têm o efeito potencial de aumentar a AE à medida que aumentam a concentração de lipídios no meio de cultivo (ZAREVÚCKA, 2012). Os valores de AE aqui encontrados também poderiam ser potencializados com o uso de um indutor, pois o objetivo deste estudo é entender a produção a partir do óleo residual contido no próprio substrato. A produção em larga escala desta enzima sem a utilização de indutores é bastante atrativa na prática, uma vez que a utilização de indutores significaria aumento dos custos de produção. Um exemplo muito ilustrativo de agente indutor é o azeite (SILVA *et al.*, 2005); entretanto, seu custo proibitivo inviabiliza sua aplicação. Novos estudos sobre o uso de diferentes indutores, incluindo óleos usados, poderiam permitir a determinação de outras condições ótimas para a produção de lipase de *M. anisopliae* com bagaço de babaçu sendo utilizado como substrato. Posteriormente, serão realizadas análises de custos para avaliar a viabilidade econômica do processo em maior escala de produção.

A preocupação com o reaproveitamento de resíduos agroindustriais é cada vez maior, pois representa uma das maiores fontes de energia renovável disponíveis. Além disso, quando descartado ou utilizado incorretamente, pode ser uma fonte adicional de poluição ao meio ambiente (LEITE; MELO; NUNES, 2020; LOPES *et al.*, 2017). Existem muitos estudos com foco no reaproveitamento de resíduos em processos biotecnológicos, a fim de agregar valor e reduzir a quantidade de material descartado sem explorar o seu potencial (DAMASO *et al.*, 2008), como é o caso do bagaço do coco babaçu. Os resultados aqui obtidos utilizando os processos inovadores descritos podem ser uma tecnologia promissora para produção em larga escala de lipases do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 por CES.

## 1.5 Conclusões

Os resultados mostraram que o novo biorreator de bandejas pode produzir o fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 e lipases em maiores quantidades do que outros sistemas relatados na literatura, demonstrando sua eficácia e eficiência para expansão futura. Isto indica que o projeto do biorreator de bandeja é eficaz na integração das etapas a montante e do processo de cultivo em um único aparelho, mantendo taxas de produção iguais ou superiores com chances mínimas de contaminação e geração de poluição.

Os conídios de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 obtidos no biorreator de bandejas utilizando arroz tipo I ou misturas de resíduos agroindustriais foram estatisticamente maiores em comparação os cultivos conduzidos como controle em sacos de polipropileno. Os resultados dos experimentos realizados com a distribuição do substrato em camadas de 2cm proporcionaram produção de conídios estatisticamente superior ( $\alpha=0,05$ ) aos substratos dispostos nas bandejas com 1 ou 3cm. Esses experimentos também mostraram maior produção de conídios em pequena escala. Para a produção de lipases, a distribuição do bagaço de babaçu nas bandejas do biorreator mostrou que as partículas menores foram depositadas no fundo da bandeja enquanto as partículas maiores permaneceram na superfície. Apesar disso, dentre os substratos analisados, o bagaço de babaçu é sugerido como substrato preferencial na produção de lipase do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425, uma vez que os resultados das atividades enzimáticas obtidas com ele foram superiores aos relatados na literatura, inclusive por meio de cultivo submerso ou sólido e CES suplementado com um indutor.

Além disso, para ambos os casos, a utilização de resíduos da agroindústria poderia reduzir significativamente o descarte inadequado de resíduos que são uma fonte de energia renovável disponível a baixo custo.

Embora o biorreator mantenha a flexibilidade operacional demonstrada nos dois estudos de caso, é importante enfatizar que os requisitos para outros sistemas são específicos. Assim, cada trinômio microrganismo-substrato-biorreator deve ser cuidadosamente estudado para identificar um sistema produtor promissor.

## 1.6 Estudos futuros

Além da produtividade, estudos futuros sobre o biorreator de bandejas devem focar em outros parâmetros de PI, como consumo de energia e eficiência; analisar a possibilidade de incluir mais bandejas no atual biorreator visando alcançar maior produção em um único processo de cultivo; considerar distribuições de fluxo com diferentes entradas de ar para as

bandejas do biorreator, a fim de manter transferência de calor e massa semelhante do sistema atual; e identificar as variáveis que têm impacto significativo na eficiência energética do biorreator, ao mesmo tempo que quantifica o desempenho de economia de energia do sistema.

Outros trinômios microrganismo-substrato-biorreator devem ser estudados para confirmar a flexibilidade operacional do biorreator. Análises adicionais da distribuição e segregação de partículas também serão necessárias para otimizar o projeto do biorreator e os parâmetros de operação de acordo com as características físicas do meio sólido, possibilitando determinar regiões de maior ou menor produção de acordo com as partículas nas bandejas

### **1.7 Declaração de novidade e importância**

No presente artigo, apresentou-se um biorreator de bandeja em escala piloto que permite a intensificação do processo combinando operações *upstream* e cultivo em um único equipamento. O novo biorreator de bandejas foi desenvolvido com sistema de atomização de suspensão de esporos, solução nutritiva e água de resfriamento acima do meio de cultivo. Também incorpora um sistema de esterilização a vapor. Para validar o biorreator, apresentaram-se dois estudos de caso. No primeiro estudo de caso mostrou-se a produção do fungo *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 em resíduos agroindustriais. No segundo estudo de caso apresentou-se a produção de lipases de *M. anisopliae* (Metsch) IBCB 425 em resíduos agroindustriais

### **1.8 Agradecimentos**

Os autores agradecem a Cooperativa Multifuncional de Economia Solidária do Estado do Tocantins (COOME-SOL) pelo fornecimento da matéria-prima utilizada na pesquisa, o financiamento deste trabalho pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (bolsas #2018 /00996-2; #2016/10636-8), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, concede #448890/2014-3) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 001).

## CAPÍTULO II

### PRODUÇÃO DE LIPASES VISANDO UM PROCESSO SUSTENTÁVEL E A UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTO REGIONAL.

Artigo a ser submetido na revista: Desafios - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins.  
<https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios>

#### **Produção de lipases visando um processo sustentável e a utilização de subproduto regional**

Eloane Daize Gomes Dallastra - Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: eloanedaize@hotmail.com.br | orcid.org/0000-0002-6524-4757.

Paula Benevides de Moraes - Professora no Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia, do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: moraispb@mail.uft.edu.br | orcid.org/0000-0002-5050-5766.

Vinnicius Ávilla Maciel - Graduando em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: vinnicius.avila@mail.uft.edu.br.

Lina María Grajales - Professora no Diplomado Programa de Agroenergia Digital, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: grajales@mail.uft.edu.br | orcid.org/0000-0003-3311-9270.

#### **RESUMO:**

*Aspergillus* é um gênero cosmopolita de fungos ascomicetos e possui grande importância biotecnológica. Entre as aplicações de linhagens deste fungo está a produção de enzimas, entre elas as lipases, para utilização em diversas áreas. Contudo, o custo de produção de lipases é considerado alto, o que implica na necessidade do desenvolvimento de metodologias de baixo custo e sustentáveis. Os objetivos deste estudo foram: obter a cinética de produção de lipases do fungo *Aspergillus flavus* por Cultivo em Estado Sólido (CES), utilizando como substrato o subproduto bagaço do coco babaçu; realizar a caracterização morfológica, a identificação molecular e avaliar a toxicidade do fungo; e realizar um teste de robustez da linhagem em uma série de bateladas de produção de lipases, a fim de avaliar a capacidade do fungo em manter as suas características morfológicas e produção de lipases, ao reutilizar os seus conídios remanescentes no substrato em cultivos subsequentes. Foi possível produzir lipases do fungo *A. flavus* a partir do bagaço do coco babaçu e foi obtida a cinética enzimática do processo. O valor de Atividade Enzimática (AE) máximo foi de 6,13 U/mL e ocorreu após nove dias de cultivo. Foi possível caracterizar morfológicamente e identificar o fungo, de acordo com a literatura. No teste de robustez, o fungo manteve a maior parte de suas características morfológicas e apresentou um valor máximo de produção de lipases de 8,7 U/mL no quinto dia de cultivo, no segundo ciclo de reuso dos conídios. O

valor de AE aumentou no decorrer dos ciclos de reuso e o seu valor máximo foi observado com menos tempo de cultivo (cinco dias), no último ciclo testado. Os resultados obtidos neste teste são bastante positivos, por serem inéditos, implicarem na redução de custos de processo e estarem alinhados com a sustentabilidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus flavus*; Enzima; Cultivo em Estado Sólido; Resíduo Agroindustrial.

**ABSTRACT:**

*Aspergillus* is a cosmopolitan genus of ascomycete fungi and has great biotechnological importance. Among the applications of strains of this fungus is the production of enzymes, including lipases, for use in various areas. However, the cost of producing lipases is considered high, which implies the need to develop low-cost and sustainable methodologies. The objectives of this study were: to obtain the production kinetics of lipases from the fungus *Aspergillus flavus* by Solid State Cultivation (CES), using the babassu coconut bagasse by-product as substrate; carry out morphological characterization, molecular identification and evaluate the toxicity of the fungus; and carry out a strain robustness test in a series of lipase production batches, in order to evaluate the fungus' ability to maintain its morphological characteristics and lipase production, when reusing its remaining conidia in the substrate in subsequent cultures. It was possible to produce lipases from the fungus *A. flavus* from babassu coconut bagasse and the enzymatic kinetics of the process were obtained. The maximum Enzyme Activity (AE) value was 6.13 U/mL and occurred after 9 days of cultivation. It was possible to morphologically characterize and identify the fungus, in accordance with the literature. In the robustness test, the fungus maintained most of its morphological characteristics and presented a maximum lipase production value of 8.7 U/mL on the fifth day of cultivation, in the second cycle of conidia reuse. The AE value increased during the reuse cycles and its maximum value was observed with less cultivation time (5 days), in the last cycle tested. The results obtained in this test are very positive, as they are unprecedented, imply a reduction in process costs and are aligned with sustainability.

**KEYWORDS:** *Aspergillus flavus*; Enzyme; Solid State Cultivation; Agroindustrial Waste.

## RESUMEN:

*Aspergillus* es un género cosmopolita de hongos ascomicetos y tiene gran importancia biotecnológica. Entre las aplicaciones de las cepas de este hongo se encuentra la producción de enzimas, incluidas las lipasas, para su uso en diversas áreas. Sin embargo, el costo de producción de lipasas se considera alto, lo que implica la necesidad de desarrollar metodologías sustentables y de bajo costo. Los objetivos de este estudio fueron: obtener la cinética de producción de lipasas del hongo *Aspergillus flavus* mediante Cultivo en Estado Sólido (CES), utilizando como sustrato el subproducto del bagazo de coco babasú; realizar caracterización morfológica, identificación molecular y evaluar la toxicidad del hongo; y realizar una prueba de robustez de cepa en una serie de lotes de producción de lipasa, con el fin de evaluar la capacidad del hongo para mantener sus características morfológicas y producción de lipasa, al reutilizar sus conidios remanentes en el sustrato en cultivos posteriores. Se logró producir lipasas a partir del hongo *Aspergillus flavus* a partir del bagazo de coco babasú y se obtuvo la cinética enzimática del proceso. El valor máximo de actividad enzimática (EA) fue de 6,13 U/mL y se produjo después de 9 días de cultivo. Se logró caracterizar e identificar morfológicamente el hongo, de acuerdo con la literatura. En la prueba de robustez, el hongo mantuvo la mayoría de sus características morfológicas y presentó un valor máximo de producción de lipasa de 8,7 U/mL al quinto día de cultivo, en el segundo ciclo de reutilización de conidios. El valor de AE aumentó durante los ciclos de reutilización y su valor máximo se observó con menor tiempo de cultivo (5 días), en el último ciclo probado. Los resultados obtenidos en esta prueba son muy positivos, ya que no tienen precedentes, implican una reducción de costes de proceso y están alineados con la sostenibilidad.

**PALABRAS CLAVE:** *Aspergillus flavus*; Enzima; Cultivo en Estado Sólido; Residuos Agroindustriales.

## 2.1 Introdução

As espécies de *Aspergillus* estão distribuídas mundialmente e, atualmente, este gênero contempla 446 espécies, 6 subgêneros e 27 sessões (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). *Aspergillus flavus* está inserido no subgênero *Circumdati* e seção *Flavi*, a qual contém algumas das espécies mais importantes do gênero, sendo aplicadas e estudadas na área da biotecnologia, alimentação

e saúde (HOUBRAKEN *et al.*, 2020).

*Aspergillus* e suas espécies possuem diversas propriedades fisiológicas diferentes e são, predominantemente saprófitas, ou seja, degradam matéria orgânica (OLIBONI, 2022). *A. flavus* produz uma variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares necessárias para o sucesso da colonização e subsequente contaminação por toxinas dos seus substratos (DOLEZAL *et al.*, 2013). Com isso, este fungo é amplamente estudado para a produção de lipases e outras enzimas em uma ampla área de aplicações (KAVITHA; SHANKARI; MEENAMBIGA, 2021).

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam, entre outras reações, a hidrólise das ligações éster de lipídeos gerando álcoois e ácidos graxos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Essas enzimas são extremamente versáteis e podem ser utilizadas na indústria de alimentos, produtos farmacêuticos, reações de síntese orgânica e entre outras (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). No entanto, a aplicação dessas enzimas poderia ser ainda maior caso seus custos de produção não fossem tão elevados (COLLA *et al.*, 2016).

A produção de metabólitos fúngicos, a exemplo das lipases, exige um rendimento suficiente e um custo relativamente baixo (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Dessa forma, é importante explorar estratégias que possam reduzir os custos envolvidos nesses processos. Associado à essa temática, está o conceito de Ecologia Industrial (SILVA *et al.*, 2016), processos de Cultivo em Estado Sólido (CES) e a utilização de diversos resíduos agroindustriais que apresentam baixo custo (KAVITHA; SHANKARI; MEENAMBIGA, 2021).

A Ecologia Industrial visa, além da diminuição de custos de processo, a diminuição da poluição ambiental e da demanda por matérias primas, de modo que resíduos de um processo possam ser utilizados como matéria prima de outro (SILVA *et al.*, 2016). No que diz respeito ao CES, esse processo apresenta custos operacionais baixos, produtividade satisfatória e baixo consumo de energia e água (KAVITHA; SHANKARI; MEENAMBIGA, 2021).

Além disso, o CES possibilita o emprego de diversos resíduos agroindustriais de baixo custo como substrato, que tem se mostrado uma alternativa viável agregando valor a produtos, minimizando problemas ambientais e valorizando subprodutos regionais (CASCIATORI *et al.*, 2015). Alguns exemplos de resíduos agroindustriais utilizados em CES: bagaço do coco babaçu (DALLASTRA *et al.*, 2023; AGUIEIRAS *et al.*, 2014) subprodutos da soja (TULY *et al.*, 2022), da indústria de dendê (PENHA *et al.*, 2016) e entre outros.

O Babaçu (*Attalea speciosa*) é uma palmeira de espécie nativa do Brasil, encontrada principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (VALE; GUIMARÃES; MORAIS,

2015). A cadeia produtiva do babaçu é uma das mais representativas do extrativismo vegetal no Brasil (CARRAZZA; CARLOS CRUZ E ÁVILA; LIMA DA SILVA, 2012). Após o seu processamento para a obtenção do óleo, são gerados subprodutos, a exemplo do bagaço do coco babaçu (DUARTE *et al.*, 2018). Este resíduo vem sendo reconhecido como potencial substrato para produção de lipases devido à presença de ácidos graxos e às suas características nutricionais (DUARTE *et al.*, 2018).

Embora *A. flavus* seja amplamente utilizado para a produção de lipases, não foram encontrados estudos associando este fungo à CES utilizando bagaço de coco babaçu como substrato. Porém, estudos foram realizados utilizando esse resíduo agroindustrial para a produção de lipases para outros fungos, a exemplo de *Metarhizium anisopliae* (DALLASTRA *et al.*, 2023), *Penicillium verrucosum*, *P. brevicompactum* (SILVA *et al.*, 2011) e *Rhizomucor miehei* (AGUIEIRAS *et al.*, 2014) com resultados promissores.

Considerando a ampla aplicabilidade das lipases e a importância de processos mais sustentáveis, com menor custo e que visem a valorização de produtos regionais, como é o caso do bagaço do coco babaçu, este trabalho tem como objetivo obter a cinética da produção de lipases de *A. flavus* utilizando este subproduto e testar a sua robustez em bateladas subsequentes de reuso de seus conídios.

Vale ressaltar que o teste de robustez de *A. flavus* nessas condições é inédito e, para isso, o fungo foi cultivado em bagaço do coco babaçu em processos em série, onde suas principais características morfológicas e a produção de lipases foram analisadas.

## 2.2 Metodologia

Foi utilizado o fungo *A. flavus*, armazenado previamente à temperatura de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Visando a valorização de um subproduto regional, o bagaço do coco babaçu (Figura 24) foi utilizado como substrato para a produção de lipases de *A. flavus* por CES. O resíduo foi armazenado à temperatura de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Figura 24 - Bagaço do coco babaçu



Fonte: Da Autora (2023).

### 2.2.1 Caracterização morfológica do fungo *Aspergillus flavus*

Para a caracterização macro morfológica, colônias de *A. flavus* foram obtidas a partir dos seus esporos por pontos únicos de inóculo no centro de Placas de Petri contendo meio de Batata Dextrose Ágar (BDA), com auxílio de uma alça de platina. As placas foram incubadas em BOD à temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por sete dias. As características observadas foram: coloração, aspecto, diâmetro e presença de escleródios nas colônias, conforme indicado por (KLICH, 2007). Para avaliação do tamanho das colônias foi utilizado um paquímetro. As demais características foram observadas a olho nu e fotografadas.

Para a caracterização micro morfológica foram realizados micro cultivos tendo como base a técnica de Kern e Blevins (1999). Uma Placa de Petri contendo uma lâmina, uma lamínula e um chumaço de algodão foram esterilizados em autoclave à  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Após, um quadrado de aproximadamente  $1 \times 1\text{ cm}$  de uma colônia do fungo crescido em BDA foi cortado com auxílio de um bisturi e transferido para a lâmina contida no interior da Placa de Petri, sobre a qual foi colocada uma lamínula. O chumaço de algodão foi hidratado com água destilada estéril para manter a umidade no interior da placa durante o tempo de incubação (dez

dias) à aproximadamente 28 °C. As lâminas permanentes foram montadas após remoção do fragmento de ágar contendo o micélio do fungo e coradas com Azul de Algodão.

O material foi examinado sob microscópio em objetivas de 10x, 20x e 40x para observação das características microscópicas de *A. flavus*: hifas, conídios, vesícula, haste e conidióforos, estruturas características do fungo e que estão envolvidas no modelo morfogênico de desenvolvimento de conidióforos de *A. flavus* descrito por (CHO *et al.*, 2022).

### 2.2.2 Teste de produção de micotoxinas

A fim de melhor caracterizar a cepa utilizada neste estudo, foi realizado um teste para identificação da produção ou não de micotoxinas pelo isolado. Para isso, o método de vapor de amônia descrito por Salto e Machida (1999) foi utilizado.

O isolado fúngico foi inoculado, em triplicata, no centro de Placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após incubação de cinco dias em estufa a 37 °C, foi adicionado, nas tampas das placas, 2 mL de solução de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 25%. Posteriormente, as placas foram vedadas e incubadas invertidas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa e foi observada a coloração da base das colônias crescidas em comparação a uma placa controle (sem adição de NH<sub>4</sub>OH) (Salto e Machida, 1999), onde fungos produtores de micotoxinas apresentam alteração na coloração no verso da colônia após a adição do NH<sub>4</sub>OH e incubação.

### 2.2.3 Identificação molecular

Para a confirmação da identificação molecular do isolado em estudo, foi realizado o cultivo do fungo em Placas e Petri contendo BDA, durante sete dias, à 28 °C e, este foi transferido para um de caldo extrato de malte (3%) em *shaker* rotativo (150 rpm) à 28 °C por quatro dias. Em seguida, aproximadamente 40 mg de micélio foi coletado para extração de DNA. A extração foi realizada com o Kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega, USA). Após a extração, o DNA foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Brasil).

Os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') foram utilizados para amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA (~600pb), seguindo as condições de ampliações proposta por Santos *et al.*, (2015). Os fragmentos ITS amplificados foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) contendo GelRed™ (Biotium Inc., EUA) e visualizados sob luz ultravioleta em um sistema de fotodocumentador (Loccus Biotechnology, Brasil).

O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene (Alvorada-RS). Os produtos amplificados foram sequenciados em ambas as direções usando os mesmos iniciadores de PCR em um sequenciador automático ABI 3500 XL (Life Technologies, EUA) de acordo com o método Sanger de terminação em cadeia, usando um kit de sequenciamento BigDye Terminator v3. 1 (Life Technologies, EUA).

Para a identificação, as sequências consenso foram testadas contra o banco de dados do GenBank e verificado a porcentagem de identidade. Na busca, ou seja, no Blastn, foi utilizada uma configuração específica para a busca de sequências da região “Internal Transcribed Spacer Region (ITS) para o tipo de fungo e material de referência, que são usadas para análises filogenéticas e de barcoding.

#### 2.2.4 Cinética de produção de lipases do fungo *Aspergillus flavus*

Primeiramente, o fungo foi cultivado em frascos erlenmeyers contendo 50 mL de meio BDA, fechados com tampões de algodão revestidos por tecido do tipo “tecido não tecido” (TNT). Os erlenmeyers contendo o meio e os tampões foram esterilizados em autoclave vertical à temperatura de 120 °C durante 20 minutos. Após o meio solidificar com os frascos inclinados à temperatura ambiente, foi feita a repicagem do fungo em câmara de fluxo laminar vertical. O fungo foi incubado durante sete dias em câmara climatizada BOD sob temperatura de a 28 °C.

Após sete dias de incubação, foi preparada uma suspensão de conídios adicionando ao erlenmeyer uma solução nutriente composta por água destilada, 0,065% de Cloreto de Potássio, 0,033% de extrato de levedura e 0,001% de Tween 80 (DALLASTRA; RAMALHO; AGUDELO, 2019). A solução foi previamente esterilizada em autoclave à temperatura de 121 °C durante 20 minutos. A concentração dos conídios foi estimada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico binocular com aumento de 40 vezes, padronizada em 10<sup>7</sup> conídios/mL e reservada para posterior inoculação dos substratos.

O cultivo de *A. flavus* para a produção de lipases foi realizada em erlenmeyers contendo 10g do subproduto, bagaço do coco babaçu. O substrato teve a sua umidade ajustada para 30%, esterilizado em autoclave e resfriado até a temperatura ambiente. Após, 1 mL da solução inoculante preparada previamente foi adicionada a cada recipiente contendo o substrato. Dessa forma, a umidade do meio foi ajustada para 40%, considerando que *Aspergillus* pode se

desenvolver em umidades de 13% (NICÉSIO; PINTO; FONSECA, 2004) a 53% (OLIBONI, 2022). Os recipientes foram incubados em BOD à temperatura de 28 °C durante 13 dias para a obtenção da cinética enzimática.

Para a obtenção da cinética enzimática, foi determinada a Atividade Enzimática (AE) a cada 24 horas, em triplicata, do primeiro ao décimo terceiro dia de cultivo. Todas foram amostras sacrifício.

A cada 24 horas de cultivo foi obtido o extrato enzimático bruto. Para isso, foi adicionado ao conjunto substrato fermentado+microrganismo uma solução extratora (20 mL) composta por tampão McIlvaine pH 7,0 e 0,25% de tensoativo Tween 80. Em seguida, foi realizada agitação manual até homogeneização e desprendimento dos conídios com as lipases na sua superfície. Após, foi feita a filtração do material em TNT e o extrato enzimático bruto foi coletado e reservado para determinação da AE.

A determinação da AE foi realizada de acordo com o método descrito por Freire et al. (1997) com algumas alterações. Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 19 mL de emulsão (1% de Triton X-100 e 5% de óleo de oliva) em tampão McIlvaine pH 7,0. Essa emulsão foi homogeneizada em *shaker* por 3 min a 37 °C e 200 rpm, em seguida foi adicionado 1 mL do extrato enzimático bruto e incubado por 30 min a 28 °C e 200 rpm. Após incubação a reação foi parada com 20 mL de solução de acetona: etanol 1:1 (v/v) e banho de gelo, os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,1 M até pH final 11. A AE dada em (U/mL) foi determinada de acordo com a Equação (1).

$$AE = [(V_{tf} - V_{ti}) * 1000 * Fd * M] / t \quad \text{Equação (1)*.}$$

\*V<sub>tf</sub>= volume de naoh após 30 min de reação em mL; V<sub>ti</sub> = volume de NOOH usado para titular o branco em mL; M = concentração de NAOH; t = tempo total de reação em min; Fd = fator de diluição.

### 2.2.5 Teste de robustez do fungo utilizando conídios remanescentes

Para avaliar a robustez do fungo foram realizados experimentos de reutilização do material (substrato+conídios remanescentes) retido no filtro de TNT, após obtenção do extrato enzimático. Os conídios remanescentes foram avaliados a cada ciclo de reuso, para isso, em cada batelada subsequente foi determinada a cinética de produção de lipases ao longo de 13 dias de cultivo e foi observada a capacidade do fungo em manter sua morfologia e esporulação.

### 2.2.5.1 Características morfológicas do fungo no teste de robustez

Para realizar a análise das características morfológicas no teste de robustez, o material retido (substrato+conídios remanescentes) foi utilizado para inocular o centro de Placas de Petri contendo BDA, com auxílio de uma alça de platina. As placas foram incubadas à 28 °C em BOD por sete dias e após, foram analisadas morfológicamente de acordo com os experimentos descritos anteriormente, para a caracterização do fungo.

A análise de esporulação do fungo foi realizada a partir de colônias obtidas em Placas de Petri contendo BDA e incubadas em BOD por sete dias. Após o crescimento das colônias foram retirados dois discos de 5 mm de diâmetro de cada colônia (centro e borda), e transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução de Tween 80 a 0,05% v/v. A suspensão foi agitada por aproximadamente 2min em “vortex” ou agitador de tubos para a desagregação dos conídios (VIEIRA *et al.*, 2007). Em seguida, os conídios foram estimados em câmara de Neubauer.

### 2.2.5.2 Cinética enzimática no teste de robustez

Após a produção de lipases do fungo, foram realizados cultivos subsequentes para produção de lipases a partir do material remanescente (substrato+conídios remanescentes) retidos no filtro TNT (após a obtenção do extrato enzimático bruto). Ao material retido foi adicionada a solução nutriente preparada previamente e o material foi homogeneizado, filtrado em TNT e o número dos conídios que passaram pelos poros do tecido foram padronizados em microscópio óptico ( $10^7$  conídios/mL) para posterior produção de lipases em nova batelada. A metodologia do processo de cultivo e da cinética enzimática foi realizada de acordo com o descrito anteriormente para a cinética enzimática sem o reuso dos conídios.

### 2.2.5.3 Teste de esterilidade do material de reuso

Após a obtenção do extrato enzimático bruto o material remanescente (substrato+conídios remanescentes) retido no filtro TNT foi testado quanto a sua esterilidade. Assim como no teste de robustez, o material sólido passou por um segundo processo de filtração em TNT para obtenção do extrato enzimático bruto.

Este extrato enzimático foi diluído em água destilada e inoculado em Placas de Petri contendo BDA. A incubação ocorreu por 72 horas à 28 °C e as placas foram observadas a cada

24 horas para análise do crescimento de colônias. A presença de colônias diferentes das características de *A. flavus* indicariam contaminação microbiológica no material de reuso no teste de robustez, inviabilizando o método.

### 2.2.6 Planejamento experimental

Para as análises do diâmetro das colônias e esporulação, no teste de robustez do fungo, foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), representado por 3 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos consistiram nos dois ciclos de reuso dos conídios do fungo e na produção das lipases e conídios sem a reutilização do fungo. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software Assistat Versão 7.7.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Caracterização morfológica

As colônias do fungo *A. flavus* crescidas em meio BDA durante sete dias à 28 °C apresentaram diâmetro médio de 7,8cm, aspecto pulverulento e coloração verde-amarelo com o fundo branco (Figura 25). Os pontos marrons/pretos observados na fotografia da colônia são denominados escleródios, estruturas de resistência constituídas por hifas agregadas, características deste fungo (RANGEL-MUÑOZ *et al.*, 2020) e que estão associadas também à produção de micotoxinas (HOUBRAKEN *et al.*, 2020; (FRISVAD *et al.*, 2019).

Figura 25 - Colônia de *Aspergillus flavus* crescida em meio BDA durante sete dias à 28 °C

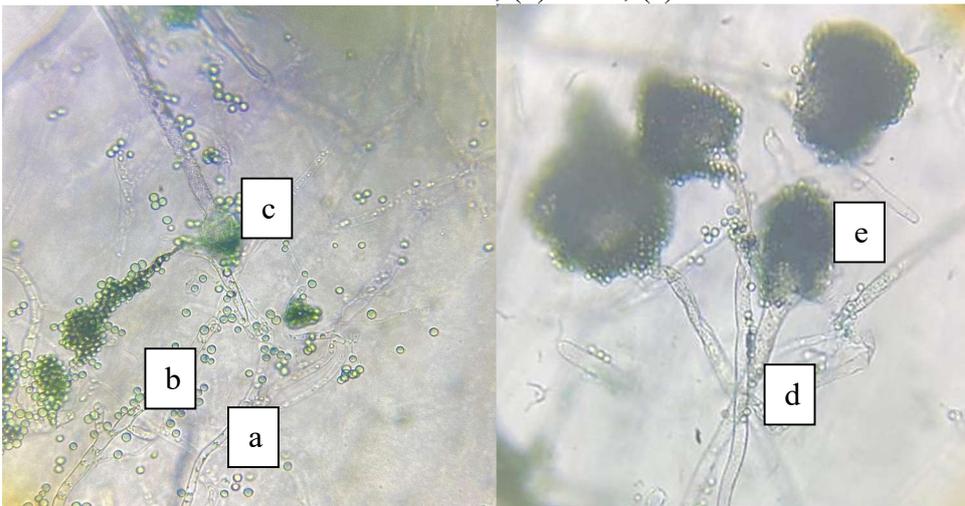


Fonte: Da Autora (2023).

As características observadas estão de acordo com as observadas por outros autores, que constataram colônias com diâmetros de aproximadamente 7 cm, aspecto pulverulento, coloração esverdeada e escleródio de cor marrom para preto (BORGES e COSTA, 2012). Além disso, as colônias de *A. flavus* podem apresentar-se, inicialmente, com uma cor esbranquiçada e, posteriormente, evoluindo para verde, amarelo, castanho ou preto conforme cada espécie do gênero (COSTA *et al.*, 2020).

Após o micro cultivo do fungo e preparo das lâminas foi possível caracterizar *A. flavus* micro morfologicamente. As estruturas básicas são mostradas na Figura 26, onde no item (a) estão indicadas hifas, no item (b), estão indicados conídios (4µm de diâmetro), no item (c), é indicada uma vesícula, no item (d) uma haste, e, no item (e), é indicado um conidióforo.

Figura 26 - Fotografia de *Aspergillus flavus* ao microscópio óptico: (a) hifas; (b) conídios; (c) vesícula; (d) haste; (e) conidióforo



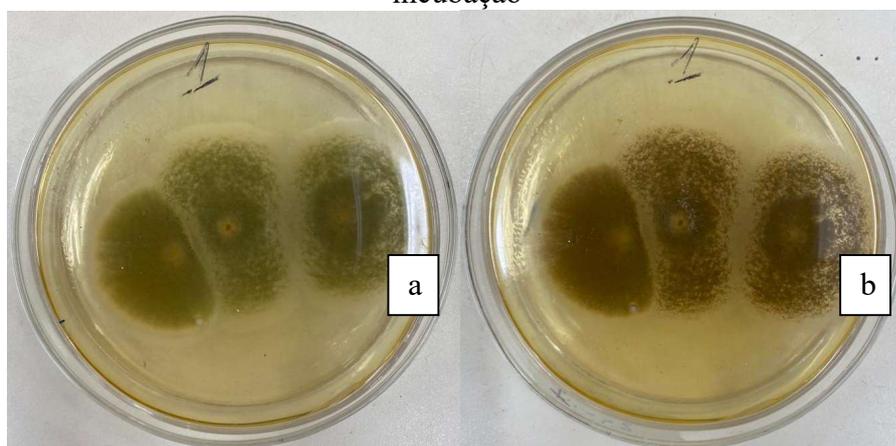
Fonte: Da Autora (2023).

As estruturas observadas constituem o modelo morfogênico de desenvolvimento de conidióforos de *A. flavus* descrito por Cho *et al.* (2022) e, a medida dos conídios (4 µm de diâmetro) está de acordo com os achados de Lohmar *et al.* (2019). Além disso, segundo Da Silva *et al.* (2015), entre as características microscópicas de *A. flavus*, desatacam-se os conidióforos com haste longa, grossa, e termina com uma vesícula globosa coberta com conídios, de acordo com os achados deste estudo.

### 2.3.2 Produção de micotoxinas

O fungo *A. flavus* utilizado neste estudo é produtor de micotoxina, de acordo com o teste realizado segundo a metodologia descrita por Saito e Machida (1999). Após adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e o período de incubação, o verso das colônias apresentaram alteração na coloração. Na Figura 27(a), onde é mostrado o verso de uma colônia controle, é possível observar uma coloração ligeiramente mais esverdeada e menos amarronzada, quando comparado com o verso da colônia (Figura 27 (b)), que corresponde ao verso de uma colônia após adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e incubação.

Figura 27 - Verso de colônias de *A. flavus*: (a) Placa controle; (b) Após adição de amônia e incubação



Fonte: Da Autora (2023).

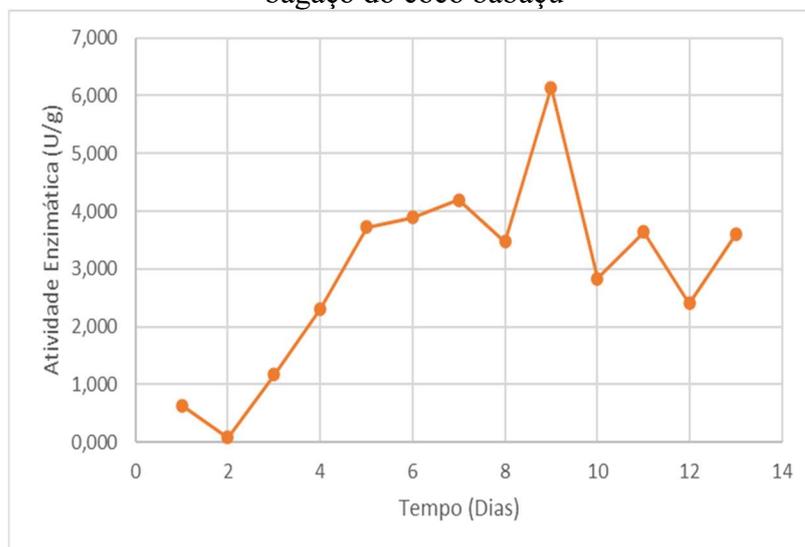
A presença de escleródios, constatada anteriormente e, a alteração da coloração do verso das colônias após realização deste experimento, nos permitem afirmar que a cepa utilizada neste estudo é produtora de micotoxina. Essas análises têm o objetivo de melhor caracterizar o microrganismo em estudo e, os resultados obtidos, não inviabilizam a utilização deste fungo para a produção de lipases, já que diversas espécies de *Aspergillus* são amplamente utilizadas para a produção destas enzimas (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

### 2.3.3 Cinética enzimática

Após a determinação da AE no decorrer dos 13 dias de cultivo foi observado o valor máximo, igual a 6,13 U/mL, após nove dias de cultivo (Figura 28). Este resultado demonstra que não se faz necessário seguir com o CES até o décimo terceiro dia, o que possibilita a

diminuição do custo do processo em termos de gastos de energia e mão de obra.

Figura 28 - Gráfico da cinética de produção de lipases do fungo *Aspergillus flavus* a partir do bagaço do coco babaçu



Fonte: Elaboração própria (2023)

O valor de atividade lipolítica obtido (6,13 U/mL) é semelhante aos valores relatados em outros trabalhos. Palma *et al.*, (2000), por exemplo, obteve 6,5 U/mL utilizando o bagaço do coco babaçu e o fungo *Penicillium restrictum*. Em outro estudo de produção de lipases por cultivo submerso, utilizando meios sintéticos e o fungo *Penicillium Verrucosum*, foi observado AE igual a 3.15 U/mL (PINHEIRO, 2008).

O resultado obtido de produção de lipases a partir do bagaço do coco babaçu é possível, segundo Sokolovská *et al.*, (1998), devido aos resquícios de óleo, ainda com ácidos graxos na sua estrutura, presentes neste resíduo. Devido a esse fator, a utilização desse subproduto viabiliza a diminuição dos custos de produção de lipases através da substituição de meios sintéticos de custos mais elevados e contribui com o desenvolvimento da cadeia produtiva do babaçu na região Norte do Brasil, onde este trabalho foi desenvolvido.

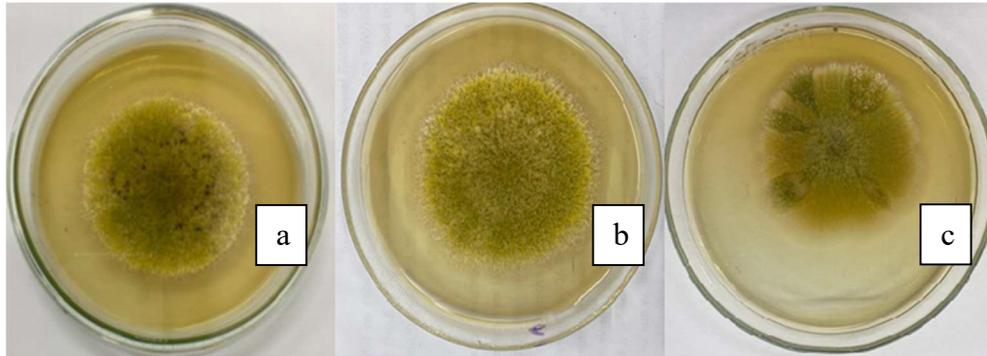
Relacionado à diminuição da AE após os nove dias de cultivo (Figura 28), pode-se afirmar que isso provavelmente ocorre devido à diminuição da fonte de carbono dos óleos presentes no substrato. Segundo Kanmani, Aravind, Kumaresan (2015), a queda na atividade lipolítica ocorre provavelmente porque os fungos filamentosos começam a produzir proteases para processar as outras fontes de carbono menos abundantes. Essas proteases são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes em proteínas e outras enzimas, desnaturando e diminuindo a concentração de lipases.

### 2.3.4 Teste de robustez do fungo

#### 2.3.4.1 Caracterização morfológica do fungo no teste de robustez

Foi possível obter colônias de *A. flavus* no teste de robustez do fungo e, na Figura 29, é possível observar essas colônias, sendo que em (a) é mostrada uma colônia do fungo sem a reutilização dos seus conídios na produção de lipases, em (b), uma colônia do fungo reutilizando os conídios remanescentes 1 vez, e em (c), uma colônia do fungo reutilizando os conídios por 2 vezes.

Figura 29 - Colônias do fungo *Aspergillus flavus* no teste de robustez



Fonte: Da Autora (2023).

As principais alterações morfológicas observadas no teste de reuso foram a presença de escleródios somente na colônia (a), onde não ocorreu a reutilização dos conídios na produção de lipases e, a presença de pequenas manchas esverdeadas no sentido radial das colônias em (c), onde os conídios foram reutilizados 2 vezes.

Como mencionado anteriormente, os escleródios são estruturas de resistência do fungo em estudo, com isso, pode-se dizer que são produzidos em ambientes estressantes para o microrganismo. Ao cultivar este microrganismo em um substrato sólido rico em nutrientes, como é o caso do bagaço do coco babaçu, o fungo obteve condições satisfatórias para seu crescimento, o que pode ter levado à não produção de escleródios nos experimentos subsequentes.

Relacionado à coloração das colônias fúngicas, estas podem variar de acordo com o meio de cultura utilizado (DA SILVA *et al.*, 2015). A partir disso, é provável que o cultivo intercalando o bagaço do coco babaçu e o meio de BDA tenham alterado a coloração das colônias, principalmente em (c), como observado no experimento realizado.

Com relação ao diâmetro das colônias no teste de robustez, é possível afirmar que o reuso dos conídios não afetou esse parâmetro. O diâmetro médio observado para as colônias obtidas no teste de robustez foi de 7,51 cm e os valores não apresentaram diferença significativa entre si ao nível de 5% de significância de acordo com o Teste de Tukey (Tabela 6).

Tabela 6 - Diâmetro das colônias de *Aspergillus flavus* no teste de robustez

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)
Sem reuso	7,80 a*
1 Reuso	7,48 a
2 Reusos	7,25 a

\* Números seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria (2023)

A esporulação do fungo *A. flavus* foi estimada no teste de robustez e o valor médio obtido para os conídios não reutilizados, reutilizados 1 vez e, 2 vezes, foi de  $7,4E+09$  esporos por placa. Os valores apresentaram diferença significativa entre si ao nível de 5% de significância de acordo com o Teste de Tukey (Tabela 7). Sendo que, a esporulação obtida quando os conídios não passaram pelo processo de reuso foi superior à esporulação obtida quando os conídios foram reutilizados 1 ou 2 vezes. Apesar de os valores da esporulação diminuírem no teste de robustez, os valores para o primeiro e segundo reuso dos conídios se mantiveram constantes. Este experimento é importante do ponto de vista que, ao se manter constante o número de conídios no reuso dos mesmos, é possível produzir lipases em bateladas subsequentes, caso contrário, em certo ponto, poderia não haver conídios suficientes para as sequências de cultivos.

Tabela 7 - Esporulação de *Aspergillus flavus* no teste de robustez

Tratamentos	Esporulação (conídios/mL)
Sem reuso	$1,23E+09$ a*
1 Reuso	$5,00E+08$ b
2 Reusos	$5,00E+08$ b

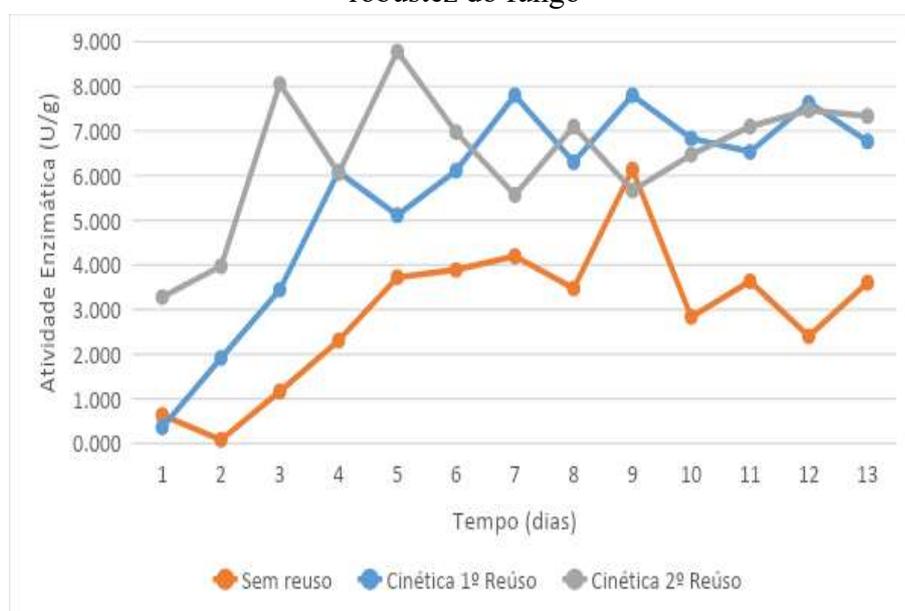
\* Números seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria (2023)

No que diz respeito às características micromorfológicas do fungo *A. flavus* no teste de robustez, não foram observadas alterações na formação de suas hifas, vesículas, hastes, conídios e conidióforos.

### 2.3.4.2 Cinética de produção de lipases no teste de robustez

Na Figura 30, são mostrados os valores de AE obtidos no decorrer dos 13 dias de cultivo, no teste de robustez do fungo. A produção de lipases apresentou valor máximo de AE (8,7 U/mL) no quinto dia de cultivo, no segundo ciclo de reuso dos conídios. Para o primeiro ciclo de reuso dos conídios, o valor máximo de AE (7,8 U/mL) ocorreu após nove dias de cultivo, e, no experimento onde os conídios não foram reutilizados, a AE máxima foi de 6,13 U/mL também após nove dias de cultivo.

Figura 30 – Gráfico da cinética de produção de lipases durante 13 dias de cultivo no teste de robustez do fungo



Fonte: Elaboração própria (2023)

Considerando os valores de AE obtidos, observou-se um aumento de 30% ao se reutilizar os conídios do fungo *A. flavus* em três bateladas subsequentes de produção de lipases. Esta otimização do processo de produção de lipases é extremamente importante, principalmente em processos em larga escala de produção, onde um dos principais fatores observados é a diminuição dos custos e aumento do rendimento. Esta constatação representa um avanço na produção de lipases pelo fungo *A. flavus*, uma vez que, não foram encontrados estudos semelhantes na literatura.

É possível afirmar, a partir dos resultados obtidos neste estudo, que é possível produzir lipases de *A. flavus*, por CES, utilizando o resíduo agroindustrial bagaço do coco babaçu. Os resultados positivos obtidos neste trabalho, incluindo o teste de robustez do fungo, vão de

encontro aos conceitos de Ecologia Industrial, sustentabilidade e fortalecimento da cadeia produtiva e regionalização da produção do substrato utilizado.

## **2.4 Considerações finais**

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os aspectos relacionados à redução de custos de processos, à sustentabilidade e à temática da Ecologia Industrial. Foi possível produzir lipases do fungo *A. flavus* por CES, utilizando como substrato um subproduto produzido regionalmente, o bagaço do coco babaçu.

A cinética de produção de lipases, bem como o teste de robustez do fungo, mostraram que é possível, de acordo com as condições testadas, otimizar o processo de produção dessas enzimas, uma vez que, foi observado uma diminuição dos dias de cultivo para a produção do metabólito de interesse e um aumento do valor máximo de AE ao se reutilizar os conídios remanescentes de cultivos prévios.

Desta forma, os principais objetivos deste estudo foram alcançados e são bastante positivos na área de processos biotecnológicos, pois foi possível a produção de um metabólito de alto valor agregado de forma mais econômica e em concordância com questões da conservação do meio ambiente.

## **2.5 Agradecimentos**

Ao apoio financeiro recebido da PROAP-Bionorte para realização do sequenciamento do isolado fúngico. Ao apoio técnico recebido do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

#### 4 DISCUSSÃO INTEGRADORA

Os fungos filamentosos *M. anisopliae* e *A. flavus* são amplamente distribuídos no ambiente e utilizados em diversas aplicações. *M. anisopliae* é um fungo entomopatôgeno, o qual é estudado principalmente para o controle biológico de pragas, sendo que, devido ao fato de produzir enzimas no decorrer do seu processo de infecção aos insetos hospedeiros, vem despertando interesse da comunidade científica para estudos da produção desse metabólito. *A. Flavus* é mundialmente estudado, incluindo a área de produção de enzimas como as lipases. No entanto, os bioprocessos utilizados para estes fins apresentam custos elevados, alta demanda e diversos desafios tecnológicos, o que torna necessário o desenvolvimento de metodologias mais acessíveis e eficientes.

Levando em consideração os fatores mencionados, com o desenvolvimento deste trabalho, foi possível produzir o agente de biocontrole *M. Anisopliae* e suas lipases e, produzir lipases do fungo *A. Flavus*. Para isso, foi projetado e construído um biorreator de bandejas para a produção de *M. Anisopliae* e suas lipases e, foi aprimorado um processo de produção de lipases de *A. Flavus*, ambos, levando em consideração fatores relacionados a eficiência, economia e sustentabilidade.

Para o desenvolvimento do biorreator, diversos fatores importantes na área de aumento de escala de produção de bioprodutos foram analisados: análise e controle das condições internas do equipamento, como temperatura e umidade; comparação da quantidade dos produtos obtidos em pequena escala com a escala piloto, no interior do biorreator; avaliação da profundidade das camadas dos substratos, suas características e, o tamanho e a distribuição das partículas do substrato, que afetam diretamente o rendimento do processo pelo acúmulo de calor no meio de cultivo e área de ataque do fungo ao meio de cultivo.

Os parâmetros avaliados e os resultados positivos obtidos são de grande importância na área de intensificação de processos biotecnológicos podendo ser aplicados, por exemplo, na produção de outros bioprodutos e emprego de outros substratos e microrganismos no interior do equipamento desenvolvido que, embora tenha apresentado flexibilidade operacional nos dois estudos de caso (Capítulo I), pode apresentar requisitos específicos para outros sistemas microrganismo-substrato-biorreator. Levando isso em consideração e, a partir dos resultados satisfatórios obtidos para a produção de lipases do fungo *A. Flavus* em escala de frascos, torna-se válido sugerir a análise da produção desse metabólito em escala piloto no interior do equipamento desenvolvido.

A produção de lipases do fungo *A. flavus* (6,13 U/mL) alcançou valores promissores e

próximos aos encontrados na literatura para sistemas semelhantes utilizando diversos fungos filamentosos e substratos sólidos. Estudos como este, em escala de frascos, onde foram avaliados os substratos, condições físicas e químicas e tempos de cultivo, por exemplo, são bastante relevantes e podem ser aplicados na área tecnológica de aumento de escala de produção de outros bioprodutos.

A cinética de produção de lipases de *A. flavus* permitiu propor um número de dias de cultivo menor (nove dias) que o testado (13 dias), dispensando dias a mais que significariam gasto de energia e mão de obra desnecessários para o processo. Com isso, as condições avaliadas e/ou obtidas, podem ser utilizadas para aprimorar o processo de produção das lipases de *A. flavus* em escala piloto, no biorreator de bandejas.

No que diz respeito ao teste de reuso dos conídios de *A. flavus* para a produção de lipases, os resultados obtidos são também bastante positivos. Onde foi possível aumentar o valor da AE (8,7 U/mL) em um menor tempo de cultivo (cinco dias), no segundo ciclo de reuso dos conídios do fungo. Estes dados também podem ser aplicados em uma escala maior de produção, permitindo assim, um processo de produção desse metabólito de forma ainda mais econômica, sustentável e de escala aumentada. Da mesma forma, um teste de robustez do fungo *M. anisopliae* também pode ser realizado. Assim, um processo produtivo que embora já possa ser considerado eficiente, através do desenvolvimento do novo biorreator, pode se tornar ainda mais atrativo no que diz respeito aos temas da sustentabilidade e redução de custos.

Relacionado ao uso de resíduos agroindustriais produzidos regionalmente, pode-se afirmar que o desenvolvimento deste trabalho pode vir a contribuir significativamente para o desenvolvimento local e regional, pela evolução da cadeia produtiva do coco babaçu, por exemplo. Além disso, a utilização dos resíduos farelo de soja, farelo de trigo e quirera de arroz, representam uma diminuição dos custos dos bioprocessos estudados, por apresentarem custos menores comparados com meios sintéticos e a redução de danos ambientais pelo descarte inadequado desses resíduos.

Por fim, no que diz respeito a realização de trabalhos futuros, visando um processo de esterilização mais rápido, sugere-se um ajuste na vedação da porta do biorreator, uma vez que, o processo atualmente demora cerca de 40 minutos para obter resultado satisfatório e, com o ajuste na referida vedação, será possível uma maior pressão de vapor no interior do equipamento e, conseqüentemente, um menor tempo de processo.

## 5 CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento deste trabalho de tese foi possível produzir um agente de controle biológico e lipases, a partir do CES dos fungos filamentosos *M. anisopliae* e *A. flavus*, respectivamente. Os resultados obtidos estão de acordo com os aspectos relacionados à redução de custos de processos, à sustentabilidade e à intensificação de processos biotecnológicos.

O biorreator de bandejas, desenvolvido na primeira fase deste trabalho, permitiu produzir o agente de biocontrole, *M. anisopliae* e suas lipases, de maneira satisfatória utilizando resíduos agroindustriais como substrato. O equipamento se mostrou eficaz na integração das etapas a montante e do processo de cultivo o em um único aparelho,

Na segunda fase deste trabalho de tese, foi possível produzir lipases por CES do fungo *A. flavus* a partir de um subproduto regional. A cinética de produção de lipases obtida, bem como o teste de robustez do fungo mostraram que é possível, de acordo com as condições testadas, otimizar o processo de produção dessa enzima. Ou seja, a AE máxima obtida foi possível em um menor tempo de cultivo, atendendo assim, um fator bastante relevante em se tratando de processos em escala aumentada, onde o tempo e custo de processos são extremamente importantes.

Além disso, a utilização e a valorização regional de resíduos da agroindústria no desenvolvimento deste trabalho de tese, possibilitam desenvolver a economia local e regional, além de reduzir o descarte inadequado de fontes de energia renovável disponíveis a baixo custo.

Desta forma, pode-se afirmar que os processos desenvolvidos, tanto por meio do biorreator de bandejas, quanto através do reuso dos conídios do fungo *A. flavus* para a produção de lipases, são um avanço na área da biotecnologia, onde foi possível a produção de um agente de biocontrole e lipases, um metabólito de valor agregado, de forma mais econômica, eficiente e em concordância com questões da conservação do meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, 2014.
- AL-DHABI, N. A.; ESMAIL, G. A.; GHILAN, A. K. M.; ARASU, M. V. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 474–479, 2020.
- ALLWOOD, J. G.; WAKELING, L. T.; POST, L. S.; BEAN, D. C. Food safety considerations in the production of traditional fermented products: Japanese rice koji and miso. **Journal of Food Safety**, n. January, p. 1–10, 2023.
- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. **Manejo integrado de pragas**, v. 4, p. 147–176, 1990.
- AOAC, H. W. International A: Official Methods of Analysis of the AOAC International. **The Association: Arlington County, VA, USA**, 2000.
- AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Urbana, Ill: AOCS, 2003.
- ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects. **Journal of biotechnology**, v. 269, p. 16–34, 2018.
- ASHOK, A.; DORIYA, K.; RAO, D. R. M.; KUMAR, D. S. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. May 2016, p. 11–18, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>>.
- ÁVILA VÁZQUEZ, V.; AGUILERA FLORES, M. M.; HERNÁNDEZ CASAS, L. F.; MEDELLÍN CASTILLO, N. A.; ROCHA URIBE, A.; CORREA AGUADO, H. C. Biodiesel Production Catalyzed by Lipase Extract Powder of *Leonotis nepetifolia* (Christmas Candlestick) Seed. **Energies**, v. 16, n. 6, 2023.
- BAPFUBUSA NIYIBIZI, I. A.; HANNA, R.; KEKEUNOU, S.; MEMBANG, G.; FIABOE, K. K. M.; MAHOT, H. C.; FOMUMBOD ABANG, A.; KUMAR, P. L.; FOTSO KUATE, A. Potential of Cameroon-indigenous isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as microbial control agents of the flea beetle *Nisotra uniformis*. **Biocontrol Science and Technology**, 2023.
- BARBIERI, A.; RICO, I. B.; SILVEIRA, C.; FELTRIN, C.; DALL'AGNOL, B.; SCHRANK, A.; LOZINA, L.; KLAFKE, G. M.; RECK, J. Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 3, p. 102147, 2023.

BARRA-BUCAREI, L.; VERGARA, P.; CORTES, A. Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (metschn.) sorokin 1883 in different substrates. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 76, n. 4, p. 448–454, 2016.

BEHAILU, A.; ABEBE, G. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 9, n. 2, 2018.

BELLEMAIN, E. ITS as an environmental DNA barcode for fungi : An in silico approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 189, p. 1–9, 2010.

BENNETT, J. W. *Aspergillus*: A primer for the novice. **Medical Mycology**, v. 47, n. SUPPL. 1, 2009.

BHANU PRAKASH, G. V. S.; PADMAJA, V.; SIVA KIRAN, R. R. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1530–1537, 2008.

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 231-295, 2008.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, 2009.

BORGES, V. P.; COUTO, M. A. P. G. Estudo macroestrutural em cepas de referência de *Aspergillus flavus* em grãos de amendoim irradiados. **Higiene Alimentar**. v. 26, p. 163–168, 2012.

BÜCK, A.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; TSOTSAS, E. Model-based control of enzyme yield in solid-state fermentation. **Procedia Engineering**, v. 102, p. 362–371, 2015.

CARRAZZA, L. R.; CARLOS CRUZ E ÁVILA, J.; LIMA DA SILVA, M. **Babaçu (*Attalea* spp.) Aproveitamento Integral do Fruto e da Folha do.** [s.l: s.n.]1–68 p.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; ZANELATO, A. I.; THOMÉO, J. C. Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 114–123, 2015.

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Heat transfer in packed-beds of agricultural waste with low rates of air flow applicable to solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, v. 188, p. 97–111, 2018.

CASTIGLIONI, G. L.; COSTA, J. A. V.; ALEGRE, R. M. Study of lipase production by *Burkholderia cepacia*. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, p. 637–644, 2018.

CATÃO, A. M. L. **Efeito da umidade relativa sobre o desenvolvimento de micélio e conídios de microescleródios de *Metarhizium anisopliae* em formulação peletizada.** 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

CEBRIÁN M, IBARRURI, J, Filamentous fungi processing by solid-state fermentation. in: M.J. Taherzadeh, J.A. Ferreira, A.B.T.-C.D. in B. and B. Pandey (Eds.), *Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng. Filamentous Fungi Biorefinery*, Elsevier, 2023, pp. 251–292, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00003-X>.

CHANDRA, P.; ENESPA; SINGH, R.; ARORA, P. K. **Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review**. [s.l.] BioMed Central, 2020. v. 191–42 p.

CHEN, H. Z.; HE, Q. Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 87, n. 12, p. 1619–1625, 2012.

CHILAKAMARRY, C. R.; MIMI SAKINAH, A. M.; ZULARISAM, A. W.; SIROHI, R.; KHILJI, I. A.; AHMAD, N.; PANDEY, A. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, v. 343, n. September 2021, p. 126065, 2022.

CHO, H. J.; SON, S. H.; CHEN, W.; SON, Y. E.; LEE, I.; YU, J. H.; PARK, H. S. Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus*. *Cells*, v. 11, n. 18, p. 1–17, 2022.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; DE LIMA, M.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 461–467, 2016.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Boletim da Safra 2021**, v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, v. 5, n. 1–4, p. 75–78, 1998.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química Nova*, v. 40, n. 1, p. 85–96, 2017.

COSTA CAVALCANTI, E. D. A.; ESTRADA GUTARRA, M. L.; GUIMARÃES FREIRE, D. M.; DOS REIS CASTILHO, L.; SANT'ANNA, G. L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. SPEC. ISS., p. 79–84, 2005.

COSTA, B. É. G. N.; OLIVEIRA, B. S. de; CORREIA, D. C. da S.; FERNANDES, K. L. de A.; COELHO, L. B. dos M.; LEAL, M. M. F. V.; GUIMARÃES, M. A. L.; MAIA, P.; ALVES, Y. L. C.; LOCATELLI, G. O. Contaminações alimentares por *Aspergillus* spp. e o papel do nutricionista: uma revisão. *Evidência*, v. 20, n. 1, p. 69–80, 2020.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, n. 3, p. 291–302, 2006.

- CURRAN, J.; DRIVER, F.; BALLARD, J. W. O.; MILNER, R. J. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, v. 98, n. 5, 1994.
- DA CUNHA, L. P.; CASCIATORI, F. P.; DE CENÇO LOPES, I.; THOMÉO, J. C. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 11, p. 1757–1768, 2019.
- DA CUNHA, L. P.; CASCIATORI, F. P.; VICENTE, I. V.; GARCIA, R. L.; THOMÉO, J. C. *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in successive cultivations. **Process Biochemistry**, v. 97, n. June, p. 104–111, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.002>>.
- DA SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Taxonomia Polifásica Para Identificação De *Aspergillus* Seção Flavi: Uma Revisão. **Revista Ifes Ciência**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 2015.
- DALLASTRA, E. D. G. **Bench-scale production of the fungus *Metarhizium anisopliae* from agro-industrial waste aiming at applicability in biological control (In Portuguese). Master dissertation (Food Science and Technology)**. 2018. Federal University of Tocantins, 58p, 2018.
- DALLASTRA, E. D. G.; DIAS, A. C. P.; DE MORAIS, P. B.; DA SILVA, J. F. M.; CASCIATORI, F. P.; GRAJALES, L. M. Development of a novel pilot-scale tray bioreactor for solid-state fermentation aiming at process intensification. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 193, n. May, p. 19–21, 2023.
- DALLASTRA, E. D. G.; RAMALHO, E. X.; AGUDELO, L. M. G. Valorização De Resíduos Agroindustriais Para a Produção Do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium Anisopliae* Por Processos De Fermentação Em Estado Sólido. **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química 3**, p. 29–39, 2019.
- DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; DE FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 676–681, 2008.
- DAS, D.; BHAT, R.; SELVARAJ, R. Review of inulinase production using solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 201–209, 2019.
- DE AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA, G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 361–365, 2007.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 6, p. 1085–1093, 2015.
- DE OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G. V.; DE OLIVA-NETO, P.; DO NASCIMENTO, V. M.

G. Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium* sp. (GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 147, n. November 2019, 2020.

DE VRESE, M.; LAUE, C.; OFFICK, B.; SOETH, E.; REPENNING, F.; THOSS, A.; SCHREZENMEIR, J. A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A randomized, controlled, double-blind cross-over trial. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 3, 2015.

DINIZ DA SILVA, M. P.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; GRAJALES, L. M. Heat analysis of a sugarcane bagasse and wheat bran system in rotating drum bioreactor for cellulase production. *In*: GRAJALES AGUDELO, L. M.; SERRA, J. C. V.; COLLICCHIO, E. **Agroenergy: Renewable and Sustainable Energy**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2024.

DINIZ DA SILVA, M. P.; DUTRA, R. S.; CASCIATORI, F. P.; GRAJALES, L. M. A two-phase model for simulation of water transfer during lipase production by solid-state cultivation in a tray bioreactor using babassu residues as substrate. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 177, n. April, 2022.

DO NASCIMENTO, F. V.; DE CASTRO, A. M.; SECCHI, A. R.; COELHO, M. A. Z. Insights into media supplementation in solid-state fermentation of soybean hulls by *Yarrowia lipolytica*: Impact on lipase production in tray and insulated packed-bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 166, p. 107866, 2021.

DOLEZAL, A. L.; OBRIAN, G. R.; NIELSEN, D. M.; WOLOSHUK, C. P.; BOSTON, R. S.; PAYNE, G. A. Localization, morphology and transcriptional profile of *Aspergillus flavus* during seed colonization. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, 2013.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Solid state fermentation of mixed substrate for L-asparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 188–196, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.024>>.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, n. 2, 2000.

DUARTE, L. M. **Lipolytic enzymes production by solid-state fermentation from the fungus *Metarhizium Anisopliae* using coconut babassu wastes and rice type I as substrates (In Portuguese). Bachelor thesis (Food Engineering)**. 2018. Federal University of Tocantins, 40p, 2018.

DURAIARASAN, S.; RAZACK, S. A.; MANICKAM, A.; MUNUSAMY, A.; SYED, M. B.; ALI, M. Y.; AHMED, G. M.; MOHIUDDIN, M. S. Direct conversion of lipids from marine microalga *C. salina* to biodiesel with immobilised enzymes using magnetic nanoparticle. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 1393–1398, 2016.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. v. 13, n. July 2002, p. 113–125, 2003.

DUTRA, L. da S.; COSTA CERQUEIRA PINTO, M.; CIPOLATTI, E. P.; AGUIEIRAS, E. C. G.; MANOEL, E. A.; GRECO-DUARTE, J.; GUIMARÃES FREIRE, D. M.; PINTO, J. C. How the biodiesel from immobilized enzymes production is going on: An advanced bibliometric evaluation of global research. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 153, n. October 2021, 2022.

DUTRA, R. S. Modeling and simulation of water transfer in the lipase production process by solid-state fermentation in tray biorreator (In Portuguese). Master dissertation (Agroener. p. 74, 2020.

EL-METWALLY, M. M.; ELBEALY, E. R.; BELTAGY, D. M.; SHAABAN, M.; EL-KOTT, A. F. Suppressive efficiency of Kojic acid from *Aspergillus tamarii* MM11 against HepG-2 cell line derived from human. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 8, p. 1661–1668, 2020.

EZEMA, B. O.; OMEJE, K. O.; BILL, R. M.; GODDARD, A. D.; SABINUS, S. O.; FERNANDEZ-CASTANE, A. Bioinformatic characterization of a triacylglycerol lipase produced by *Aspergillus flavus* isolated from the decaying seed of *Cucumeropsis manni*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 6, 2023.

FAOUZI, L.; FATIMAZAHRA, E. B.; MOULAY, S.; ADEL, S.; WIFAK, B.; SOUMYA, E.; IRAQUI, M.; SAAD, K. I. Higher tolerance of a novel lipase from *Aspergillus flavus* to the presence of free fatty acids at lipid/water interface. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 9, n. 1, p. 9–17, 2015.

FEBRIANI; AURA, N.; KEMALA, P.; SAIDI, N.; IQBALSyah, T. M. Novel thermostable lipase produced by a thermo-halophilic bacterium that catalyses hydrolytic and transesterification reactions. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. 2–7, 2020.

FEGAN, M.; MANNERS, J. M.; MACLEAN, D. J.; IRWIN, J. A. G.; SAMUELS, K. D. Z.; HOLDOM, D. G.; LI, D. P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 9, p. 2075–2081, 1993.

FERRAZ, J. L. de A. A.; SOUZA, L. O.; SILVA, T. P.; FRANCO, M. Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 20, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/RECEN.2018.01.03>>.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual review of entomology**, v. 23, n. 1, p. 409–442, 1978.

FLEURI, L. F.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE LARA CAMPOS ARCURI, M.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; DELGADO, C. H. O.; NOVELLI, P. K. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 1199–1205, 2014.

FRISVAD, J. C.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C. N.; HONG, S. B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A. J.; ARZANLOU, M.; LARSEN, T. O.; SKLENÁŘ, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their

production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1–63, 2019.

FURNESS, M.; BELLO-MENDOZA, R.; DASSONVALLE, J.; CHAMY-MAGGI, R. Building the ‘Bio-factory’: A bibliometric analysis of circular economies and Life Cycle Sustainability Assessment in wastewater treatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 323, p. 129127, 2021.

GARRO, M.S.; RIVAS, F.P.; GARRO, O.A. Solid state fermentation in food processing: advances in reactor design and novel applications, in: K. Knoerzer, K.B.T.-I.F.P. T. Muthukumarappan, Rivas (Eds.), **Innov. Food Process, Technol.**, Elsevier, Oxford, 2021, pp. 165–182, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23049-7>

GLASSEY, J.; WARD, A. C. Solid state fermentation. **Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses**, v. 13, n. July 2002, p. 217–225, 2015.

GRAJALES, L. M.; XAVIER, N. M.; HENRIQUE, J. P.; THOMÉO, J. C. Mixing and motion of rice particles in a rotating drum. **Powder Technology**, v. 222, 2012.

GREWAL, G. K.; JOSHI, N.; SUNEJA, Y. Pathogenicity of *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S.A. Rehner and Humber isolates against *Spodoptera litura* (Fabricius) and their extracellular enzymatic activities. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, 1 dez. 2021.

HARDIN, M. T.; HOWES, T.; MITCHELL, D. A. **Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors**. v. 97, p. 89–101, 2002.

HORN, B. W.; MOORE, G. G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 101, n. 3, 2009.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; WANG, X. C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENSCH, K.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v. 95, p. 5–169, 2020.

JACOB, J. J.; SUTHINDHIRAN, K. Immobilisation of lipase enzyme onto bacterial magnetosomes for stain removal. **Biotechnology Reports**, v. 25, 2020.

JARONSKI, S. T. Chapter 11 - Mass production of entomopathogenic fungi—state of the art\*\*Mention of trade names or commercial products in this chapter is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the auth. *In*: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I. B. T.-M. P. OF B. O. (SECOND E. [s.l.] Academic Press, 2023. p. 317–357.

JESUS, G. R. **Project of a tray bioreactor for *Metarhizium anisopliae* production by solid state fermentation (In Portuguese)**. Bachelor thesis (Food Engineering). 2017. Federal University of Tocantins, 44p, 2017.

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 3, 2015.

KAVITHA, K.; SHANKARI, K.; MEENAMBIGA, S. S. A review on extraction of lipase from aspergillus species and its applications. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 14, n. 8, p. 4471–4475, 2021.

KHANAHMADI, M.; AREZI, I.; AMIRI, M. sadat; MIRANZADEH, M. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, n. June 2017, p. 272–282, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.005>>.

KHLANGWISSET, P.; SHEPHARD, G. S.; WU, F. **Aflatoxins and growth impairment: A review Critical Reviews in Toxicology**2011.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 6, p. 713–722, 2007.

KUMAR, V.; AHLUWALIA, V.; SARAN, S.; KUMAR, J.; PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124566, 2021.

LEITE, J. S.; MELO, C. S. B.; NUNES, A. J. P. Utilization of rice byproducts as carbon sources in high-density culture of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, 2020.

LI, Q.; RAY, C. S.; CALLOW, N. V.; LOMAN, A. A.; ISLAM, S. M. M.; JU, L. K. *Aspergillus niger* production of pectinase and  $\alpha$ -galactosidase for enzymatic soy processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 134, n. August 2019, p. 109476, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109476>>.

LIU, J.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; SUN, B.; ZHAO, G. Research Progress in Modern Taxonomy and Nomenclature of *Aspergillus*. **Research Progress in Modern Taxonomy and Nomenclature of**. v. 38, p. 109–118, 2022.

LOHMAR, J. M.; PUEL, O.; CARY, J. W.; CALVO, A. M. The *Aspergillus flavus* rtfA gene regulates plant and animal pathogenesis and secondary metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 1–29, 2019.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 6, p. 258–265, 1985.

LOPES, T. R.; CIPRIANO, D. F.; GONÇALVES, G. R.; HONORATO, H. A.; SCHETTINO, M. A.; CUNHA, A. G.; EMMERICH, F. G.; FREITAS, J. C. C. Journal of Environmental Chemical Engineering Multinuclear magnetic resonance study on the occurrence of phosphorus in activated carbons prepared by chemical activation of lignocellulosic residues from the babassu production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 6, p. 6016–6029, 2017.

LYRA, J. M. A de. **Avaliação de ferramentas moleculares para detecção de fungos patogênicos relevantes para a saúde humana**. 2016. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Stepwise optimisation of enzyme production in solid state fermentation of waste bread pieces. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 638–646, 2013.

MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O.; MEMBRILLO, I.; SA, C. **Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains**. v. 99, p. 7842–7847, 2008.

MITCHELL, D. A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. **Introduction to solid-state fermentation bioreactors**. In: **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Heidelberg: Springer Berlin. 2006. p. 33–44.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211–1225, 2000.

MUSONI, M.; DESTAIN, J.; THONART, P.; BAHAMA, J.-B.; DELVIGNE, F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems/Conception de bioréacteurs et mise en oeuvre de stratégies pour la culture de. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 19, n. 4, p. 430–442, 2015.

NEMA, A.; HARITHA PATNALA, S.; MANDARI, V.; KOTA, S.; DEVARAI, S. K.; PATNALA, S. H.; MANDARI, V.; KOTA, S.; DEVARAI, S. K. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 82, 2019.

NEVES, M. F.; GRAY, A. W.; SPERS, E. E.; MIZUMOTO, F. M.; VALÉRIO, F. R.; RODRIGUES, J. M.; JÚNIOR, J. C. de L.; GUISSONI, L. A.; MARTINEZ, L. F.; MONACO, L. C. N.; PRADO, L. S. do; VILLWOCK, L. H.; CÔNSOLI, M. A.; KALAKI, R. B.; FARINHA, R. L.; CAMBAÚVA, V.; MARQUES, V. N. **Ferramentas para o Futuro do Agro: estratégias para posicionar o Brasil como fornecedor mundial sustentável de alimentos, bioenergia e outros agroprodutos**. [s.l.: s.n.]320 p.

NICANUZIA, J.; APARECIDA, J.; CRUZ, B.; PASTORE, G. M.; ALIMENTOS, D. D. C. De; ALIMENTOS, F. D. E. De; PAULO, S. **Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity**. p. 505–509, 2006.

NICÉSIO, S.; PINTO, F. J. A.; FONSECA, M. J. O. **Mofamento por *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp., durante a Armazenagem de Grãos Úmidos, em Diferentes Genótipos de Milho**. In CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, n. 1980, 2004.

NIKAČEVIĆ, N. M.; HUESMAN, A. E. M.; VAN DEN HOF, P. M. J.; STANKIEWICZ, A. I. Opportunities and challenges for process control in process intensification. **Chemical**

**Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 52, p. 1–15, 2012.

OLIBONI, Gabriel Manzi. **Identificação e perfil de sensibilidade de *Aspergillus spp.* presente no ar atmosférico**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2022.

OLIVEIRA, F.; SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; DOMÍNGUEZ, J. M.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1123–1132, 2017.

OLIVEIRA, F.; SALGADO, J. M.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; DOMÍNGUEZ, J. M.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Lipase production by solid-state fermentation of olive pomace in tray-type and pressurized bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1312–1319, 2018.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 357–374, 2013.

PAIVA-GUIMARÃES, A. G. L.; FREIRE, K. R. L.; SANTOS, S. F. M.; ALMEIDA, A. F.; SOUSA, A. C. B. Alternative substrates for conidiogenesis of the entomopathogenic fungus *beauveria Bassiana* (Bals) vuillemin (deuteromycotina: Hyphomycetes). **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 1, p. 133–141, 2020.

PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 84–86, p. 1137–1145, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81–84, 2003.

PANESAR, P. S.; KAUR, R.; SINGLA, G.; SANGWAN, R. S. Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: Progress and prospects. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 208–227, 2016.

PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S. C.; SOUZA, E. F.; FREITAS, S. C.; SANTOS, J. de O.; SALUM, T. F. C. Use of residues from the palm oil agribusiness for the production of lipase by *Aspergillus niger*. **Rural Science**, v. 46, n. 4, p. 755–761, 2016.

PICKOVA, D.; OSTRY, V.; TOMAN, J.; MALIR, F. **Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation** *Toxins* 2021.

PINHEIRO, T. D. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 444–450, 2008.

PODGÓRSKA-KRYSZCZUK, I. Biological Control of *Aspergillus flavus* by the Yeast *Aureobasidium pullulans* In Vitro and on Tomato Fruit. **Plants**, v. 12, n. 2, 2023.

PRECZESKI, K. P.; KAMANSKI, A. B.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; MODKOSKI, T. A.; ROSSETTO, V.; VENTURIN, B.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S. M.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Efficient and low-cost alternative of lipase concentration aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 6, p. 851–857, 2018.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. **Some engineering aspects of solid-state fermentation**. v. 13, p. 127–135, 2003.

RANGEL-MUÑOZ, E. J.; VALDIVIA-FLORES, A. G.; MORENO-RICO, O.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; DE-LUNA-LÓPEZ, M. C.; QUEZADA-TRISTÁN, T.; ORTIZ-MARTÍNEZ, R.; MÁYEK-PÉREZ, N. Caracterización de *Aspergillus flavus* y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, v. 11, n. 2, 2020.

RANJBAR, S.; HEJAZI, P. Modeling and validating *Pseudomonas aeruginosa* kinetic parameters based on simultaneous effect of bed temperature and moisture content using lignocellulosic substrate in packed-bed bioreactor. **Food and Bioprocess Processing**, v. 117, p. 51–63, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.06.006>>.

RESHMY, R.; NARISSETTY, V.; TARAFDAR, A.; BACHAN, N.; MADHAVAN, A.; TIWARI, A.; CHATURVEDI, P.; VARJANI, S.; SIROHI, R.; KUMAR, V.; AWASTHI, M. K.; BINOD, P.; NAGOTH, J. A.; SINDHU, R. An Overview of Cellulase Immobilization Strategies for Biofuel Production. **Bioenergy Research**, n. 0123456789, 2022.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132–1137, 2010.

RIGOLI FERRAZ, L.; SANTOS DE OLIVEIRA, D. dos; FERNANDES SILVA, M.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 243–252, 2012.

RESEARCH AND MARKETS. “Global Lipase Food Enzymes Markets, 2023-2029: Industry Driven by the Growing Demand for Cleaner and More Natural Food Products.” **Focus on catalysts**. (2023): 2. Print. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1351418023003707>. Acesso em: 14/02/2024.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; FERRAZ, F. de S.; DIAS, A. C. P.; ORTIZ, D. L.; ORREGO ALZATE, C. E.; GRAJALES, L. M. Immobilization of lipases from the fungus *Metarhizium anisopliae* ICBC 425 using babassu nut bagasse as substrate on cellulose fibers from lulo stalks. In: GRAJALES AGUDELO, L. M.; SERRA, J. C. V.; COLLICCHIO, E. **Agroenergy: Renewable and Sustainable Energy**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2024.

- RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211–219, 2005.
- RUDRAMURTHY, S. M.; PAUL, R. A.; CHAKRABARTI, A.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. F. **Invasive aspergillosis by aspergillus flavus: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management** *Journal of Fungi*, 2019.
- RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 90–95, 2012.
- SALDANHA, M. A.; WALKER, C.; QUEVEDO, A. C.; PEDRON, L.; MUNIZ, M. F. B.; COSTA, E. C. Morphophysiological characterization of entomopathogenic fungi for the biological control of *Oncideres impluviata*. **Ciencia Florestal**, v. 32, n. 2, p. 776–792, 2022.
- SANTANA, A. A.; DE OLIVEIRA, R. A.; PINEDO, A. A.; KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J. Microencapsulation of babassu coconut milk. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 737–744, 2013.
- SENE, L.; ALVES, L. F. A.; LOBRIGATTE, M. F. P.; THOMAZONI, D. Produção De Conídios De *Metarhizium Anisopliae* Em Meio Sólido À Base De Resíduos Agroindustriais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 449–456, 2010.
- SILVA, B. P. da; SOUZA, J. V. B. de; SOUZA, É. S. de. Production and Characterization of Lipases from *Aspergillus flavus* Isolated from a Soil Sample of the Amazon Rainforest. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 35–43, 2022.
- SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; DE CASTRO, A. M. H.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 2, 2011.
- SILVA, R. R. M.; MEDEIROS, J. Í. M. REGIS, P.O.A.; MORAIS, CRN; MOREIRA, A.C. **A. Ecologia Industrial: Análise de ferramentas e viabilidade**, 2016. Disponível em: <https://anais.eneds.org.br/index.php/eneds/article/view/407/367>. Acesso em: 20/12/2023.
- SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321–326, 2005.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; GOTTUMUKKALA, L. D.; RAJASREE, K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Solid-State Fermentation: Current Trends and Future Prospects. *In: Fermentation Microbiology and Biotechnology, Fourth Edition*. [s.l.] CRC Press, 2018. p. 243–254.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SITTER, S.; CHEN, Q.; GROSSMANN, I. E. An overview of process intensification methods. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 25, p. 87–94, 2019.

SOCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017.  
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>>.

SOUZA, S.C. de. **Diversidade de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* isolados do solo de canga do quadrilátero ferrífero Lavras-MG 2018**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2018.

TADA, É. F. R.; AGUDELO, L. M. G.; THOMÉO, J. C. Water holding capacity and heat transfer aspects of a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in a partially filled rotating drum. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 3, p. 1131–1141, 2019.

TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T. de; LIMA, E. Á. de L. A. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 645–651, 2014.

TIAN, Y.; DEMIREL, S. E.; HASAN, M. M. F.; PISTIKOPOULOS, E. N. An overview of process systems engineering approaches for process intensification: State of the art. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 133, n. March, p. 160–210, 2018.  
TOSUNER, Z. V.; TAYLAN, G. G.; ÖZMIHÇI, S. Effects of rice husk particle size on biohydrogen production under solid state fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 34, p. 18785–18791, 2019.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182–196, 2010.

TRONI, A. R.; GOMES, P. C.; DE CARVALHO MELLO, H. H.; TEIXEIRA ALBINO, L. F.; DA ROCHA, T. C. Chemical and energy composition of broiler feeds. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 47, n. 4, p. 755–760, 2016.

TRY, S.; VOILLEY, A.; CHUNHIENG, T.; DE-CONINCK, J.; WACHÉ, Y. Aroma compounds production by solid state fermentation, importance of in situ gas-phase recovery systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 17, p. 7239–7255, 2018.

TULY, J. A.; ZABED, H. M.; NIZAMI, A. S.; MEHEDI HASSAN, M.; ROKNUL AZAM, S. M.; KUMAR AWASTHI, M.; JANET, Q.; CHEN, G.; DZIDZORGBE KWAKU AKPABLI-TSIGBE, N.; MA, H. Bioconversion of agro-food industrial wastes into value-added peptides by a *Bacillus* sp. Mutant through solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 346, n. December 2021, p. 126513, 2022.

UNGCHAROENWIWAT, P.; H-KITTIKUN, A. Enzymatic synthesis of coconut oil based wax esters by immobilized lipase EQ3 and commercial lipozyme RMIM. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 10–16, 2020.

VALE, S. C. S. do; GUIMARÃES, A. P. M.; MORAIS, P. B. de. Ocorrência e potencial biotecnológico de leveduras associadas aos frutos de *Attalea speciosa* mart ex Spreng. **Journal of bioenergy and food science**, v. 2, n. 4, p. 213–225, 2015.

VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A.; CARVALHO, J. C.; LETTI, L. A. J.; WOICIECHOWSKI, A. L.; KARP, S. G.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MARTÍNEZ-BURGOS, W. J.; PENHA, R. O.; HERRMANN, L. W.; RODRIGUES, A. O.; SOCCOL, C. R. Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 1, n. 2, p. 142–165, 2021.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, 2011.

VASEGHI, Z.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHSENI, S.; MAHJOUR, S. Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: Solid state fermentation in a tray bioreactor. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283–289, 2013.

VIEIRA, P. D. S.; SILVA, W. M. T.; PAIVA, L. M.; ALVES LIMA, E. A. L.; CAVALCANTI, V. L. B. Estudo Da Caracterização Morfológica, Esporulação E Germinação Dos Conídios De *Metarhizium Anisopliae* Var. *Acridum* Em Diferentes Temperaturas. **Biológico**, v. 69, n. 1, p. 17–21, 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. **New Horizons for the Production of Industrial Enzymes by Solid-State Fermentation BT - Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI**. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.; TORRES-PACHECO, I. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 319–340.

WANG, H.; MUSTAFFAR, A.; PHAN, A. N.; ZIVKOVIC, V.; REAY, D.; LAW, R.; BOODHOO, K. A review of process intensification applied to solids handling. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 118, n. January, p. 78–107, 2017.

WU, F.; MA, J.; CHA, Y.; LU, D.; LI, Z.; ZHUO, M.; LUO, X.; LI, S.; ZHU, M. Using inexpensive substrate to achieve high-level lipase A secretion by *Bacillus subtilis* through signal peptide and promoter screening. **Process Biochemistry**, v. 99, n. July, p. 202–210, 2020.

ZAREVÚCKA, M. Olive oil as inductor of microbial lipase. **Boskou, D. Olive oil- Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions**. InTech Europe, p. 457–471, 2012.

ZARSKA, M.; BARTOSZEK, K.; DZIDA, M. High pressure physicochemical properties of biodiesel components derived from coconut oil or babassu oil. **Fuel**, v. 125, p. 144–151, 2014.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; BAO, J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. **Bioresource Technology**, v. 203, 2016.

ZHANG, Y. H. P.; SUN, J.; MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. **Journal of**

**Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 4-5, p. 773-784, 2017.

ZHOU, X.-F.; BURT, J. P. H.; TALARY, M. S.; GOATER, A. D.; PETHIG, R.  
**Development of biofactory-on-a-chip technology**. In: Proc.SPIE, 2000, [...]. 2000. v. 4177,  
p. 227-236.