



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Consumo de tanino vegetal de acácia por *Aspergillus oryzae*: influência do pH e da concentração inicial

Autor: Tobias Romanzini Putti

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mariliz Gutteres Soares

Coorientador: Dr^a. Franciela Spier

Porto Alegre, janeiro de 2018

Sumário

Sumário	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
1 Introdução	1
1.1 Objetivo	2
1.2 Estrutura do trabalho	2
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Taninos vegetais	3
2.2 Curtimento vegetal	4
2.3 Efluentes líquidos contendo taninos	5
2.4 Fungos filamentosos	6
2.4.1 <i>Aspergillus oryzae</i>	7
2.5 Cultivos microbianos	7
3 Materiais e Métodos	10
3.1 Micro-organismos	10
3.2 Cultivos	10
3.3 Tanino vegetal	11
3.4 Planejamento experimental	11
3.5 Métodos analíticos	12
3.6 Análise estatística	13
4 Resultados	14
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	24
Referências	25

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Paulo e Noeli, pelo amor e apoio incondicionais e por todo o esforço e sacrifício durante a minha formação. Palavras não são suficientes para descrever meu amor por vocês.

À professora Mariliz, por todo o apoio e orientação durante esse percurso, e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À minha coorientadora, Franciela, por toda a dedicação, paciência, incentivo e por todo o conhecimento compartilhado nesse período.

Aos colegas do LACOURO, pelas experiências compartilhadas e por todo o auxílio prestado.

A todos os meus amigos, em especial Arielli, Luiza, Jéssica, Pedro e Victor, pela amizade e incentivo. Obrigado por tornarem essa jornada mais prazerosa, por compartilharem os bons e maus momentos e sempre estarem presente de uma maneira ou outra.

“(...) desejando que as pessoas se lembrem que até a vida mais desesperada é tão maravilhosa.”

Desperate Housewives

Resumo

O crescente aumento do apelo ambiental pela utilização de materiais renováveis levou os taninos vegetais a desempenharem papel importante na indústria, com suas diversas aplicações, sendo a principal delas, sua atuação como agente curtente. O curtimento vegetal vem ganhando força no mercado, porém ainda apresenta dificuldades técnicas no que se refere ao tratamento adequado de suas águas de descarte, tendo em vista as características dos compostos tânicos utilizados. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do pH e da concentração inicial de tanino em cultivos submersos visando otimizar o consumo de tanino de acácia por *Aspergillus oryzae*. Foi realizado um planejamento experimental com um delineamento composto central rotacional, 2², com três pontos centrais e quatro axiais, em dois níveis. As variáveis independentes estudadas foram o pH e a concentração inicial de tanino vegetal no meio, obtendo-se como resposta as variáveis produção de biomassa e consumo de tanino. Observou-se que o maior consumo de tanino ocorreu nas maiores concentrações iniciais de tanino (40 g/L (+1) e 46,15 g/L (+1,41)), enquanto o pH e a interação pH/concentração de tanino não tiveram influência significativa nos resultados. Além disso, foram desenvolvidos modelos matemáticos preditivos para as variáveis resposta. Os fungos filamentosos da espécie *Aspergillus oryzae* foram capazes de consumir, nas condições ótimas de operação estabelecidas, cerca de 80% dos taninos vegetais inicialmente contidos no meio, demonstrando assim que são capazes de biodegradar o tanino de acácia, comumente utilizado como agente curtente pela indústria coureira.

Palavras-chave: curtimento vegetal, tanino vegetal, fungos filamentosos, fermentação submersa, planejamento experimental, *Aspergillus oryzae*.

Lista de Figuras

Figura 1: Curva padrão para tanino de acácia	12
Figura 2: Produção de biomassa (a) e consumo de tanino de acácia (b) nos cultivos de <i>Aspergillus</i> G4, <i>Aspergillus</i> G5, <i>Aspergillus</i> G10, <i>Penicillium</i> G3, <i>Penicillium</i> G8 e <i>Penicillium</i> G11	14
Figura 3: Produção de biomassa (a), consumo de tanino (b) e acompanhamento do pH (c) nos cultivos de <i>Aspergillus oryzae</i> em tanino vegetal de acácia.	16
Figura 4: Superfície de resposta para produção de biomassa em função do pH e da concentração inicial de tanino no meio de cultivo nos diferentes níveis estudados.	20
Figura 5: Superfície de resposta para consumo de tanino em função do pH e da concentração inicial de tanino no meio de cultivo nos diferentes níveis estudados.	21
Figura 6: Produção de biomassa (a), consumo de tanino de acácia (b) e acompanhamento do pH (c) nos cultivos de <i>Aspergillus oryzae</i> em tanino vegetal de acácia, nas três condições validadas.	22

Lista de Tabelas

Tabela 1: Matriz do delineamento composto central rotacional DCCR, 2 ² , com os valores reais e codificados.	11
Tabela 2: Resultados do delineamento composto central rotacional 22 para as respostas da produção de biomassa (XMAX) e consumo de tanino (%).	16
Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) para a biomassa máxima (g/L).	18
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para o consumo de tanino (%).	19
Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) para o consumo de tanino (%).	20
Tabela 6: Resultados experimentais e esperados obtidos para biomassa e consumo de tanino de acácia no cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i>	23

Lista de Abreviaturas e Siglas

PIB – Produto Interno Bruto

DQO – Demanda química de oxigênio

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DCCR – Delineamento composto central rotacional

FES – Fermentação em estado sólido

FSm – Fermentação submersa

TAN – Concentração de tanino (valor codificado)

1 Introdução

O Brasil é um dos países líderes em exportação de couro. Em 2016 foram exportados 193,9 milhões de metros quadrados de couro, representando cerca de US\$ 2,033 bilhões (CICB, 2017). A indústria coureira movimenta em torno de 1% do produto interno bruto (PIB) nacional e emprega aproximadamente 50 mil trabalhadores diretos e indiretos.

O processo de fabricação do couro consiste de diversas etapas. O curtimento é uma das mais importantes, pois visa proteger a pele da ação microbiológica e dos agentes externos. Os principais tipos de curtimento industrialmente utilizados são: a) curtimento mineral, utilizando sais de cromo, e b) curtimento vegetal - utilizando diferentes tipos de taninos vegetais. O cromo ainda é o agente curtente mais utilizado nos curtumes, cerca de 90% da indústria do couro utiliza o cromo em seus processos, entretanto, com a crescente preocupação com o meio ambiente, alternativas a esse tipo de processamento, vem sendo estudadas e desenvolvidas (GIACCHERINI et al., 2017).

A indústria coureira é considerada uma das grandes poluidoras do meio ambiente devido às suas águas de descarte. Os efluentes provenientes dos curtumes possuem grande quantidade de matéria orgânica, elevadas concentrações de sólidos suspensos e nitrogênio orgânico, além de diversos produtos químicos, como detergentes, emulsificantes, biocidas, dentre outros (GUTTERRES et al., 2015). Os tratamentos comuns de efluentes não conseguem reduzir satisfatoriamente parâmetros como a demanda química de oxigênio (DQO), cloretos, sulfetos e amônias, necessitando de tratamentos específicos e, em geral, onerosos. Outro problema encontrado em curtumes que se utilizam do curtimento vegetal, é a presença dos taninos em seus efluentes.

Os taninos são polifenóis, que podem causar sérios danos ao meio aquático. Devido a sua característica recalcitrante e a sua toxicidade aos micro-organismos, a presença de taninos em águas residuárias, dificulta o tratamento comumente utilizado para efluentes (ETIÉGNI; WAKOLI; OFOSU-ASIEDU, 1999). Poucas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm crescimento relatado em meios contendo taninos condensados (catequina) (SAXENA; SHARMILA; PAL, 1995) .

Desta maneira, existe a necessidade de se ampliarem estudos sobre a biodegradação desses compostos. Não existe literatura relacionada ao tratamento biológico com a utilização de fungos filamentosos para esse propósito e, por essa razão, foi o assunto abordado no presente trabalho.

1.1 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do pH e da concentração inicial de tanino em cultivos submersos visando otimizar o consumo de tanino vegetal de acácia por fungos filamentosos da espécie *Aspergillus oryzae*.

Com o objetivo de otimizar a biodegradação de taninos vegetais por fungos do gênero *Aspergillus*, este estudo propôs um planejamento experimental, com delineamento composto central rotacional (DCCR), 2^2 , com três pontos centrais e quatro axiais em dois níveis. Além disso, foram gerados modelos preditivos a fim de estimar o consumo do tanino e a produção de biomassa através da análise estatística.

1.2 Estrutura do trabalho

O presente trabalho encontra-se dividido em 5 capítulos. No capítulo introdutório são apresentados o objetivo deste trabalho, além de sua contextualização. O capítulo 2 fará uma revisão bibliográfica abordando os conceitos básicos para o melhor entendimento do trabalho, como a definição dos diferentes tipos de tanino, sua utilização industrial, o tratamento dos resíduos contendo os compostos, dentre outros. O capítulo 3 versa sobre os materiais e métodos aplicados para o desenvolvimento do presente estudo. O capítulo 4, com base na metodologia abordada no capítulo 3, apresenta os resultados experimentais obtidos além de discutir sobre os dados obtidos. Por fim, o capítulo 6 apresenta as conclusões deste trabalho além de apresentar alternativas a serem desenvolvidas em trabalhos futuros. Além disso, ao final do trabalho, encontram-se as referências bibliográficas utilizadas para a elaboração deste estudo.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Taninos vegetais

Taninos vegetais são compostos polifenólicos, derivados do metabolismo secundário de plantas. Possuem elevado peso molecular – geralmente de 500 a 3000 Da – e são altamente solúveis em água (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998; SPENCER et al., 1988). Esses compostos são encontrados em cascas, folhas, raízes e troncos de diferentes espécies de vegetais (FALCÃO; ARAÚJO, 2011) e diferem dos demais compostos fenólicos naturais pela sua capacidade de precipitar proteínas de soluções (HASLAM, 1988; SPENCER et al., 1988). Nas plantas, os taninos operam como mecanismo de defesa contra ação de micro-organismos, porém sua forma de atuação ainda não é completamente entendida (AYRES et al., 2014).

Haslam (1988), entre muitos autores, classificou os taninos em dois grandes grupos: a) condensados e b) hidrolisáveis. Taninos condensados são flavonóides que passaram por reações de condensação e polimerização, formando oligômeros com grau variável de polimerização (RADEBE et al., 2013), encontrados amplamente em angiospermas e gimnospermas, principalmente plantas lenhosas, representando cerca de metade da matéria seca presente na casca dessas árvores (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002). Alguns dos taninos condensados, mais utilizados industrialmente, são o quebracho (*Schinopsis lorentzii*) e a mimosa/acácia negra (*Acacia mearnsii*) (KARDEL et al., 2013).

De acordo com RADEBE et al. (2013), os taninos hidrolisáveis são derivados do ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico), geralmente esterificados em um núcleo de carboidratos, principalmente glicose. Enquanto os taninos condensados têm a tendência de se polimerizar quando na presença de ácidos ou enzimas, os hidrolisáveis sofrem hidrólise na presença destes compostos. São encontrados, majoritariamente em folhas, frutas e vagens de dicotiledôneas. Os tipos mais comuns de taninos hidrolisáveis de utilização comercial são os taninos de castanheiro (*Castanea sativa*) e o de tara (*Caesalpinia spinosa*) (CHABAANE et al., 2011).

Os taninos possuem as mais diversas utilidades. Seu consumo por seres humanos é objeto de estudo de diversas pesquisas, que apontam sua capacidade anti-inflamatória, cicatrizante e como possíveis agentes anticarcinogênicos

(MONTEIRO et al., 2005). Comercialmente, os taninos possuem inúmeras aplicações, como: flocculantes (BELTRÁN-HEREDIA; SÁNCHEZ-MARTÍN; DÁVILA-ACEDO, 2011); adesivos resinados (SPINA et al., 2013); anticorrosivos (PERES; CASSEL; AZAMBUJA, 2012); agentes farmacêuticos (QUIDEAU et al., 2011); espumas (MARTINEZ DE YUSO et al., 2014); dentre outros. Contudo, a sua principal, e mais antiga, aplicação se dá na indústria coureira, que emprega os taninos vegetais no curtimento das peles, como alternativa à utilização dos sais de cromo no processo. O curtimento via taninos vegetais proporciona ao couro características singulares, como a preservação de marcas e falhas naturais, além de apresentar menores riscos ao meio ambiente, se corretamente tratados, por serem substâncias naturais e biodegradáveis (SPIER et al., 2015).

2.2 Curtimento vegetal

O principal uso comercial dos taninos vegetais ocorre na indústria coureira, durante a etapa de curtimento das peles. O curtimento tem por objetivo a estabilização do colágeno da pele, que, até então, está suscetível ao ataque de micro-organismos, aos efeitos das condições do ambiente e ao estresse termomecânico (SUNDAR; RAGHAVA RAO; MURALIDHARAN, 2002; SPIER et al., 2015). Estas propriedades são obtidas através de processos com agentes curtentes minerais – mais comumente os sais de cromo; ou agentes orgânicos, como os taninos vegetais. Grande parte da indústria do couro ainda se utiliza do curtimento mineral, porém, a crescente preocupação com o meio ambiente levaram os curtumes a buscar novas formas de processamento das peles – sendo o curtimento vegetal uma das alternativas já amplamente utilizadas (SUNDAR; MURALIDHARAN, 2017).

O processo de curtimento ocorre em duas etapas. Primeiramente as moléculas de tanino difundem através da pele para, então, serem fixadas. A ação curterte exercida pelos taninos vegetais se dá por meio de ligações de hidrogênio dos grupos fenólicos dos tanantes com certos grupos básicos ligados a cadeia polipeptídica. O elevado número de pontes de hidrogênio disponíveis garante uma alta estabilização da estrutura do colágeno (HEIDEMANN, 1997; SPIER; GUTTERRES, 2016). Fatores como tamanho da partícula, temperatura, pH e concentração de curterte podem influenciar na etapa de difusão das moléculas. Devido à grande variabilidade das interações químicas e do grande número de

classes de substâncias é difícil prever o modo de interação dos curtentes vegetais com o colágeno da pele (SPIER; GUTTERRES, 2016).

O curtimento vegetal proporciona, em geral, um produto mais firme, com toque cheio e armado, e com coloração característica do tanino, em geral em tons de bege a marrom e podem ser facilmente polidos, lixados ou escovados. O couro vegetal possui baixa solidez à luz e os tingimentos conferem coloração esmaecida. Há curtimentos que combinam taninos vegetais com outras substâncias, como sais metálicos de alumínio e titânio, por exemplo, aumentando assim, a estabilidade hidrotérmica do material. É possível ainda combinar curtentes orgânicos e sintéticos, atribuindo características específicas e diferenciadas ao couro (GUTTERRES, 2016).

2.3 Efluentes líquidos contendo taninos

A presença de taninos em águas de descarte dificulta o tratamento comumente utilizado para efluentes. Na presença destes compostos, a água adquire forte coloração, sendo de difícil eliminação por métodos comuns (ETIÉGNI; WAKOLI; OFOSU-ASIEDU, 1999). Os taninos são, também, moléculas recalcitrantes - podem afetar e inibir o crescimento microbiano - tornando-se tóxicos para os sistemas de tratamento de efluentes via lodo ativado (SHARMILA; PAL, 1995; HE et al., 2007; SAXENA). Além disso, a elevada carga orgânica também é uma preocupação. Efluentes gerados no curtimento vegetal apresentam uma demanda química de oxigênio (DQO) que varia entre 3000 e 10000 mg/L e uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que pode chegar a até 4000 mg/L (GENSCHOW; HEGEMANN; MASCHKE, 1996; GUTTERRES et al., 2015), o que torna o processo de tratamento oneroso.

Oxidação química, floculação, adsorção, troca iônica, ozonização e certos tipos de tratamento biológicos são alguns dos métodos disponíveis com resultados satisfatórios para remoção de taninos de águas residuárias (ROMERO-DONDIZ et al., 2015). Os processos biológicos de tratamento industriais visam reduzir o teor de matéria orgânica dos efluentes de elevada DQO e apresentam vantagens econômicas em comparação com a oxidação química (DOGRUEL et al., 2006). Entretanto, a elevada concentração de taninos e outros compostos com baixa biodegradabilidade – entre eles, resíduos de metais – podem inibir esse tipo de tratamento (LOFRANO et al., 2013). Efluentes ricos em taninos, e compostos

polifenólicos em geral, são inibidores de biomassa, em especial da biomassa nitrificante, e precisam operar com elevados tempos de retenção de sólidos para obter uma nitrificação estável e a hidrólise completa da fração orgânica, sendo mais um fator a encarecer o processo (SZPYRKOWICZ; KAUL, 2004; MUNZ et al., 2009).

2.4 Fungos filamentosos

Os taninos vegetais inibem o crescimento da maioria dos micro-organismos e resistem à biodegradação, sendo, segundo a literatura, os taninos condensados mais resistentes à ação de micro-organismos do que os hidrolisáveis. (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998; SAXENA; SHARMILA; PAL, 1995; HE et al., 2007). É importante salientar que enquanto os taninos hidrolisáveis podem ser utilizados por diversos micro-organismos, poucas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido relatadas por crescerem em presença de taninos condensados (catequina) (SUNDAR; RAGHAVA RAO; MURALIDHARAN, 2002; RAMIREZ-CORONEL, A.; AUGUR, 2003). Para a degradação de compostos flavonoídes, derivados dos taninos condensados, foram descritos dois mecanismos. O primeiro ocorre pela clivagem do anel heterocíclico da catequina, que passa a ácido floroglucinol carboxílico e a ácido protocatéquico. No segundo mecanismo, a quercetina é cortada dando origem a floroglucinol e a 3,4-di-hidroxifenilacetato. Em ambos os mecanismos obtém-se β -cetoacido como composto final, que será utilizado no ciclo do ácido cítrico (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998).

Os taninos são tóxicos para os fungos, bactérias e vírus. A toxicidade dos taninos pode estar associada a diversos mecanismos como inibição de enzimas, privação de substrato e perda de íons metálicos. Em alguns casos pode ainda induzir alterações na morfologia celular (ACAMOVIC; STEWART, 1999). Os micro-organismos desenvolvem vários mecanismos de defesa contra fatores de estresse. Esses mecanismos envolvem secreção de polímeros de ligação, síntese de enzimas resistentes aos polifenóis e até mesmo resistentes a sua biodegradação. Entretanto, muitos micro-organismos desenvolveram mecanismos para superar esses efeitos. Os mecanismos incluem a modificação do tanino, a degradação e a dissociação de complexos tanino/substrato, inativação do tanino por agentes ligantes de alta afinidade, modificação da membrana e sequestro de íons metálicos (BHOITE; MURTHY, 2015).

O gênero *Aspergillus* tem grande importância industrial para a produção de enzimas, e vem sendo estudado como um organismo modelo para tal processo (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). A espécie *Aspergillus niger* é o fungo mais utilizado para a fabricação de enzimas na indústria (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

2.4.1 *Aspergillus oryzae*

A espécie *A. oryzae* é comumente encontrada em cereais e sementes estocadas pós-colheita. Fungos filamentosos, mais comumente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que, eventualmente, contaminem alimentos, ou os materiais usados para a sua fabricação, podem produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários dessas espécies (AMADI; ADENIYI, 2009).

A. oryzae é conhecido por seu grande potencial para produção secretória de diversas enzimas e, com os avanços da biotecnologia, vem tendo grande utilização na produção industrial. Shata (2005) estudou a produção e extração da enzima de coagulação do leite após fermentação em estado sólido (FES) de *A. oryzae* em farelo de trigo. Salihi; Asoodeh; Aliabadian (2017) avaliaram a produção de protease alcalina; enquanto Zangirolami et al. (2000) estudaram a produção de α -amilase. Outro uso comum da espécie, é na indústria oriental de fermentados, onde pode ser utilizado para a fabricação de molho de soja, saquê, tofu e vinagre (MACHIDA; YAMADA; GOMI, 2008).

2.5 Cultivos microbianos

Fermentação é a transformação, enzimaticamente controlada, de matéria orgânica por micro-organismos. Sua aplicação é das mais variadas, sendo utilizada na indústria química, alimentícia, farmacêutica, dentre outras. Desta maneira, é crescente a necessidade de otimização e desenvolvimento de novos processos. Os estudos na área são constantes e envolvem os mais diversos tipos de micro-organismos (SWAMY; SEENAYYA, 1996; DEEPAK et al., 2010; OZCIRAK ERGUN; OZTURK UREK, 2017).

O modo de operação pode ser de três maneiras: processos descontínuos (batelada), descontínuo-alimentado (batelada alimentada) ou ainda, de maneira

contínua. A fermentação descontínua (batelada) pode ser considerada como um sistema fechado, onde a solução nutriente é adicionada em sua totalidade no instante inicial e, após inoculada, nada mais é adicionado ao decorrer do processo, com exceção de oxigênio (via aeração) e eventuais correções de pH necessárias. No processo descontínuo alimentado, nutrientes são adicionados durante o cultivo, enquanto os produtos permanecem no meio até o final da fermentação, podendo, então, iniciar-se nova fermentação enquanto não houver queda de produtividade pelos micro-organismos. O processo de fermentação contínua é caracterizado pela adição constante de meio de cultura, com volume reacional mantido constante pela retirada de caldo fermentado (BORZANI et al., 2001).

Além disso, a fermentação pode ocorrer em estado sólido – sem a presença de água livre no meio, ou submersa. O processo fermentativo em estado sólido (FES) ocorre em um suporte sólido de baixo teor de umidade, em estado não-séptico e natural, produzindo elevadas concentrações de produto com baixa necessidade energética (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001). Este método fermentativo tem diversas aplicações, dentre elas, a produção de alimentos, combustíveis e enzimas. A FES vem sendo amplamente utilizada para o cultivo de fungos filamentosos, em especial do gênero *Aspergillus*, já que há uma melhor simulação do habitat natural do micro-organismo (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001). A FES apresenta algumas vantagens em comparação com a fermentação submersa, como a necessidade de biorreatores de menor volume, redução dos custos do processamento *downstream*, alta produtividade e simplicidade (PÉREZ et al., 2003). Entretanto, apresenta problemas frequentes, como: a dificuldade de transferência de oxigênio para os micro-organismos e o controle da temperatura (DURAND, 2003).

Na fermentação submersa (FSm) considera-se que o meio é essencialmente água. Assim, ajustes de temperatura e pH são bastante simples e não apresentam problemas no escalonamento do projeto, sendo o único cuidado requerido a transferência de oxigênio para os micro-organismos, com a agitação sendo um fator essencial neste processo (DURAND, 2003). Outra vantagem da FSm frente à FES é que a purificação dos produtos obtidos na fermentação submersa é mais fácil, já que os mesmos se encontram diluídos no meio. A FSm é muito utilizada para a extração de metabólitos secundários que precisam ser utilizados na forma líquida (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Os principais fatores que influenciam o crescimento em cultivos microbianos são: temperatura, pH, oxigênio e agitação. Existem três temperaturas cardiais para os micro-organismos: as temperaturas mínimas e máxima, abaixo e acima, respectivamente, das quais não há crescimento, e a temperatura ótima, na qual o crescimento microbiano é máximo. Assim como a temperatura, o pH apresenta valores mínimo, máximo e ótimo. Grande parte dos micro-organismos tem seu ponto ótimo na neutralidade, porém alguns cultivos precisam ser executados em pH ácido ou básico. A variação na quantidade de oxigênio disponível é um fator que se faz sentir no crescimento de micro-organismos aeróbios, para os quais é indispensável, e no de micro-organismos facultativos. No primeiro caso, o efeito se traduz no rendimento da cultura, enquanto no segundo, afeta, além do rendimento, a velocidade de crescimento e, inclusive, os produtos da atividade microbiana. O metabolismo aeróbico é conhecidamente mais eficiente que o anaeróbico, pois fornece uma quantidade maior de energia, que resulta num crescimento mais expressivo. Outro ponto importante é que a via aeróbia tem como produtos resultantes oxigênio e água, enquanto a via anaeróbia tem como resultado uma série de produtos orgânicos. Uma das consequências da aeração é promover uma melhor aeração do meio, favorecendo, assim, os crescimentos aeróbio e facultativo. Além disso, a agitação também favorece a homogeneização dos nutrientes e a dispersão dos produtos metabólicos, o que favorece o crescimento, inclusive, de micro-organismos anaeróbios (BORZANI et al., 2001).

3 Materiais e Métodos

No presente trabalho foi realizado um planejamento experimental com delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², com três pontos centrais e quatro axiais, em dois níveis, visando a otimização das condições de cultivo submerso de fungos filamentosos para a biodegradação de taninos vegetais. As variáveis independentes testadas foram o pH do meio e a concentração de tanino; com o consumo de tanino vegetal e a produção de biomassa, como variáveis dependentes. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 Micro-organismos

Cepas de fungos do gênero *Penicillium sp*, identificadas como Pe G3, Pe G8 e Pe G11, e *Aspergillus sp*, denominadas como Asp G4, Asp G5 e Asp G10, isoladas a partir de amostras ambientais, cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram mantidas em ágar sob refrigeração (4 °C) e inoculados em ágar batata dextrose (PDA) previamente esterilizado. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C até crescimento satisfatório. A identificação das cepas foi realizada conforme descrito por ORTIZ-MONSALVE et al. (2017).

3.2 Cultivos

Os meios de cultura foram preparados, segundo proposto por Cruz-Hernández et al. (2005), contendo (g/L): 4,38 KH₂PO₄; 8,76 (NH₄)₂SO₄; 0,88 MgSO₄·7H₂O; 0,088 CaCl₂·7H₂O; 0,018 MnCl₂·6H₂O; 0,12 FeSO₄·7H₂O, além da adição de tanino vegetal (o *screening* inicial, com as seis cepas de fungos, foi realizado com concentrações de 40 g/L de tanino de acácia). Após o preparo, 50 ml do meio de cultura foram transferidos para frascos erlenmeyers de 250 ml, que foram então inoculados com a utilização de cinco discos de ágar de 7 mm de diâmetro, retirados de forma radial, das bordas para o centro, de uma placa de petri em crescimento ativo. Os ajustes de pH foram realizados utilizando-se ácido

clorídrico (HCl) P.A., 37 % de pureza e hidróxido de sódio (NaOH) P.A., ambos em concentrações de 0,1 e 1M. Os cultivos foram realizados em incubadora rotatória (Solab; SL - 223) a 200 rpm e 30b°C até que se atingisse a fase estacionária de crescimento.

3.3 Tanino vegetal

Para o presente estudo foi utilizado tanino vegetal de acácia negra (*Acacia mearnsii*) em pó, Tanfood (TANAC S.A.).

3.4 Planejamento experimental

A fim de avaliar os efeitos das variáveis independentes no consumo de tanino vegetal do meio pela cepa Asp G10, identificada como *A. oryzae*, foi proposto um planejamento experimental com delineamento composto central rotacional. A Tabela 1 apresenta a matriz codificada do planejamento e os valores das variáveis independentes testadas em cada nível.

Tabela 1: Matriz do delineamento composto central rotacional DCCR, 2², com os valores codificadas e reais.

Ensaio	pH	Concentração de tanino (g/L)
1	-1 (3,5)	-1 (10)
2	+1 (5,5)	-1 (10)
3	-1 (3,5)	+1 (40)
4	+1 (5,5)	+1 (40)
5	-1,41 (3,1)	0 (25)
6	+1,41 (5,9)	0 (25)
7	0 (4,5)	-1,41 (3,85)
8	0 (4,5)	+1,41 (46,15)
9	0 (4,5)	0 (25)
10	0 (4,5)	0 (25)
11	0 (4,5)	0 (25)

A biomassa máxima produzida (g/L) e o consumo de tanino (%) foram as variáveis resposta avaliadas.

3.5 Métodos analíticos

Alíquotas de cultivo foram retiradas em intervalos de 24 h, num total de 120 h. Para a determinação da concentração de tanino no meio, foi utilizado um espectrofotômetro (*PG Instruments Ltd.; T80 + UV/Vis Spectrometer*) utilizando um comprimento de onda de 278 nm obtido por varredura. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração (g/L) por meio de curva de calibração (Figura 1) previamente determinada para o tanino em estudo. A biomassa foi determinada por meio de filtração a vácuo através de filtros (Whatman, 50 mm de diâmetro e poros de 45 µm), sendo a massa remanescente seca em estufa até peso constante a 105 °C (BACCAR et al., 2011). A determinação do pH foi realizada com a utilização de um pHmetro de bancada (Digimed; DM 23).

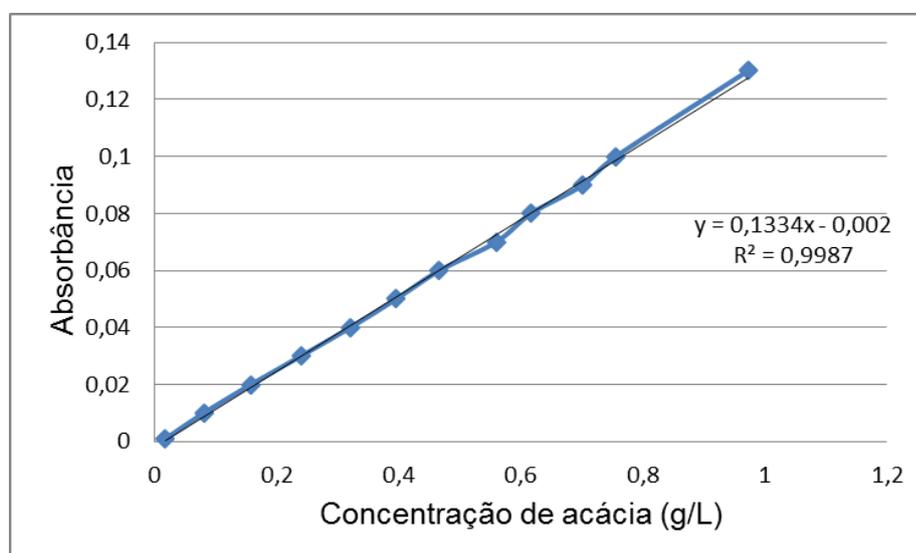


Figura 1: Curva padrão para tanino de acácia

3.6 Análise estatística

Os dados experimentais foram tratados a 95% de confiança ($p \leq 0,05$) através do *software* Statistica 8.0 (StatSoft Inc., EUA).

4 Resultados

Inicialmente, foram realizados cultivos com as cepas de fungos isoladas, denominadas Asp G4, Asp G5, Asp G10 e Pe G3, Pe G8, Pe G11. Conforme mostrado na Figura 2b, ao comparar-se os 6 fungos utilizados nos cultivos, foi possível observar uma remoção no conteúdo de tanino de 75,3% (Asp G4), 12,0% (Asp G5), 74,0% (Asp G10), 97,2% (Pe G3), 97,3 (Pe G8) e 93,0% (Pe G11). A Figura 2a mostra que os fungos do gênero *Penicillium* também apresentaram um maior crescimento, visto que foram verificadas maiores quantidades de biomassa. Os fungos do gênero *Penicillium* demonstraram ser mais eficientes na biodegradação de taninos.

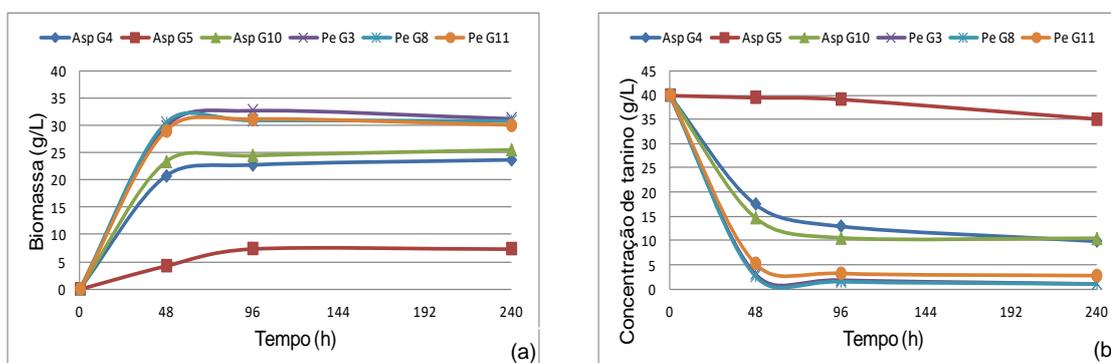


Figura 2: Produção de biomassa (a) e consumo de tanino de acácia (b) nos cultivos de *Aspergillus* G4, *Aspergillus* G5, *Aspergillus* G10, *Penicillium* G3, *Penicillium* G8 e *Penicillium* G11

Levando-se em consideração os resultados obtidos nos testes preliminares (Figuras 2), optou-se por utilizar um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com 3 pontos centrais e 4 axiais a fim de avaliar a influência dos parâmetros pH e concentração de tanino sobre o consumo de tanino, bem como a otimização do mesmo. Foi utilizado a cepa Asp G10, identificado como *Aspergillus oryzae*, por ter apresentado consumo intermediário de tanino vegetal de acácia (74%). Com isso buscava-se otimizar o consumo de tanino por este fungo, visando alcançar valores semelhantes aos obtidos para os fungos do gênero *Penicillium* (cerca de 97%). De acordo com testes anteriores o tanino de acácia foi mais facilmente biodegradado em comparação ao tanino de castanheiro e diante disso, foi utilizado neste trabalho experimental. Estes resultados contradizem a literatura, que afirma que taninos condensados são mais resistentes à degradação enquanto

os taninos hidrolisáveis são mais facilmente degradados (AGUILAR et al., 2004). É importante salientar, que enquanto os taninos hidrolisáveis podem ser utilizados por diversos micro-organismos, poucas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido relatadas por se desenvolverem em taninos condensados (AGUILAR et al., 2004). Otuk; Deschamps (1983) reportaram, pela primeira vez, a capacidade de leveduras de degradarem taninos condensados. Há ainda poucos estudos sobre a degradação de taninos por fungos filamentosos e por esta razão, o mecanismo de degradação ainda não foi completamente desvendado (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998).

A otimização mediante o uso de um planejamento fatorial e das superfícies de resposta é prática comum em biotecnologia, utilizada principalmente para a otimização das condições de cultivo (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000). A necessidade de otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos operacionais têm levado a busca por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. A metodologia do planejamento composto central rotacional (DCCR) consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) com inúmeros fatores (variáveis independentes). Baseia-se no emprego de planejamentos fatoriais e tem sido usado com grande sucesso na modelagem de diversos processos biotecnológicos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

A Figura 3 apresenta a produção de biomassa, o consumo de tanino e a evolução do pH do meio ao longo do tempo de cultivo de *Aspergillus oryzae*.

Na Tabela 2 estão apresentadas a matriz do planejamento proposto, bem como as respostas obtidas para a produção máxima de biomassa (X_{MAX}) e o consumo de tanino.

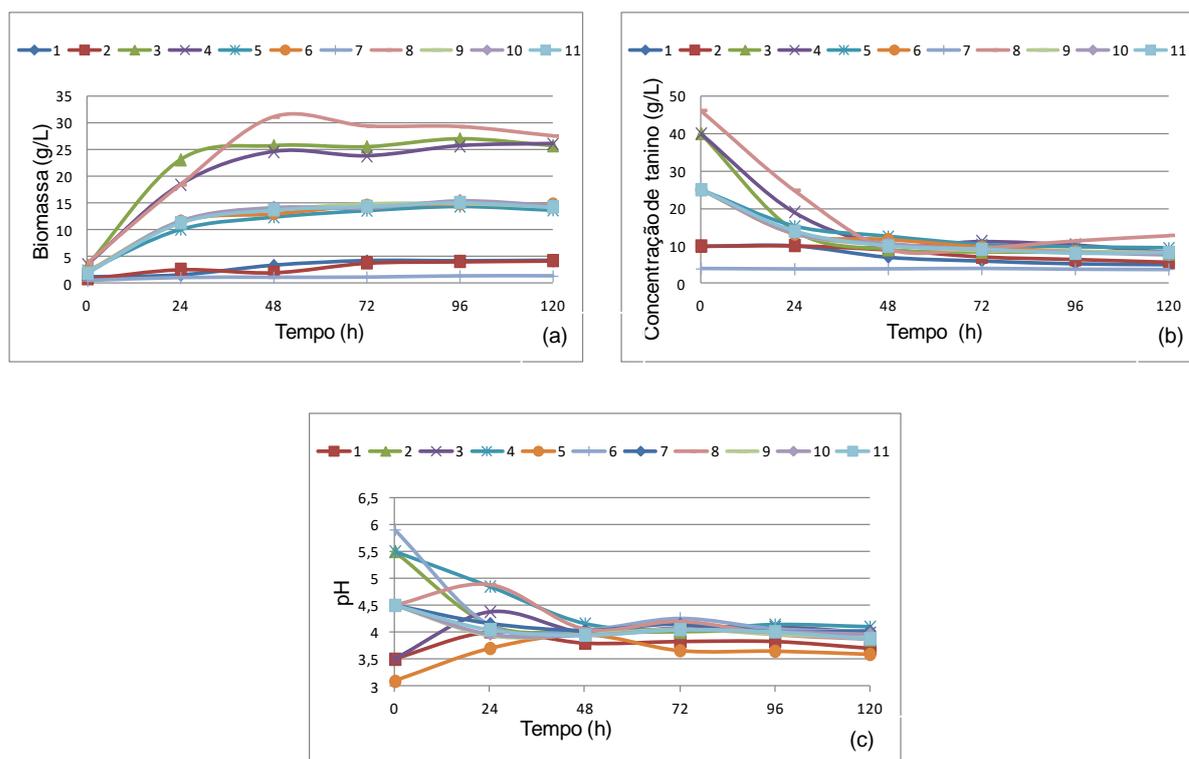


Figura 3: Produção de biomassa (a), consumo de tanino (b) e acompanhamento do pH (c) nos cultivos de *Aspergillus oryzae* em tanino vegetal de acácia.

Tabela 2: Resultados do delineamento composto central rotacional 22 para as respostas da produção de biomassa (X_{MAX}) e consumo de tanino (%).

Ensaio	pH	Concentração de tanino (g/L)	X_{MAX} (g/L)	Consumo de tanino (%)
1	-1 (3,5)	-1 (10)	4,22	49,00
2	+1 (5,5)	-1 (10)	4,27	45,00
3	-1 (3,5)	+1 (40)	27	80,40
4	+1 (5,5)	+1 (40)	26,06	79,05
5	-1,41 (3,1)	0 (25)	14,39	62,50
6	+1,41 (5,9)	0 (25)	14,87	67,20
7	0 (4,5)	-1,41 (3,85)	1,32	3,00
8	0 (4,5)	+1,41 (46,15)	31,07	79,90
9	0 (4,5)	0 (25)	15	66,50
10	0 (4,5)	0 (25)	15,49	66,60
11	0 (4,5)	0 (25)	15,12	67,08

Conforme observado na Figura 3 e na Tabela 2, os melhores resultados, tanto para a produção máxima de biomassa quanto para o consumo de tanino, foram obtidos nos ensaios 3, 4 e 8. Esses ensaios foram realizados com as concentrações iniciais de tanino mais elevadas no meio de cultura (40, 40 e 46,15 g/L, respectivamente). Entretanto, o pH inicial de cada ensaio era diferente (3,5; 5,5 e 4,5, respectivamente), indicando que a variável pH não seria um fator de influência nos resultados alcançados. Tal observação será confirmada com ferramentas estatísticas a seguir.

A aplicação do delineamento composto central rotacional para a otimização de parâmetros de processos biotecnológicos é prática comum, conforme relatado por Colla et al. (2016), que utilizou três planejamentos experimentais em sequência para otimização da produção de lipase em cultivos submersos de fungos filamentosos. Primeiramente foi utilizado um Plackett-Burman para avaliar a influência de nove variáveis na produção de lipase. Em seguida um fatorial completo a fim de estudar a influência do pH e das concentrações de extrato de levedura e óleo de soja sobre a atividade lipolítica e, por fim, a concentração do extrato de levedura e o pH foram otimizadas através de um DCCR 2².

Gajdhane; Bhagwat; Dandge (2016) utilizaram um Plackett-Burman para selecionar os constituintes do meio com maior influência na produção da enzima α -galactosidase (quantidade de farelo de trigo, soja e melão). A otimização foi realizada através de um DCCR que forneceu as quantidades otimizadas dos componentes do meio com farelo de trigo, 4 g; farelo de soja, 0,5 g; melão, 0,5 g. A produção de α -galactosidase obtida experimentalmente teve uma estreita concordância com o valor de predição do modelo que demonstrou ser adequado. Foi observado um incremento de 17,74 vezes da atividade enzimática comprovando assim a otimização do processo.

Já em Saha; Ghosh (2014), apresentaram a otimização da produção de xilanase por *Penicillium citrinum*, com três variáveis independentes (concentração de farelo de trigo no meio de cultura, pH do meio e temperatura de cultivo), com 8 pontos fatoriais, 6 axiais e 6 centrais. As interações entre essas variáveis contribuíram para o aumento significativo da produção de xilanase, que foi cerca de 4 vezes maior do que no meio basal não otimizado.

Grande parte dos problemas encontrados em estatística são tratados com a hipótese que os dados são retirados de uma população com uma distribuição de

probabilidade específica. Os principais testes estatísticos têm como suposição a normalidade dos dados, que deve ser verificada antes da realização das análises principais. O teste paramétrico tradicional, baseado na distribuição *t Student*, é obtido sob a hipótese de que a população tem distribuição normal. Nesse sentido, surge a necessidade de certificar-se que essa suposição pode ser assumida. Em alguns casos, assumir a normalidade dos dados é o primeiro passo a se tomar para simplificar as análises. Para dar suporte a esta suposição, consideramos os testes, Qui-quadrado de Pearson (QQ), Kolmogorov-Smirnov (KS), Shapiro-Wilk (SW), Shapiro-Francia (SF), Cramer-von Mises (CM), Anderson-Darling (AD) e JarqueBera, dentre outros. Neste estudo, o teste de Kolmogorov-Smirnov confirmou a distribuição normal dos dados trabalhados.

A Tabela 3 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a resposta produção máxima de biomassa. Com um valor de F calculado (2351,9) 527 vezes superior ao F tabelado (4,46), considera-se que o modelo empírico de segunda ordem é preditivo. Ao nível de confiança de 95%, os coeficientes linear e quadrático da concentração de tanino foram significativos. Após a retirada dos coeficientes não significativos, o modelo matemático que representa a biomassa gerada (g/L) desse planejamento está representado na Equação 1. Onde TAN corresponde a concentração de tanino (valor codificado).

$$\text{Biomassa (g/L)} = 15,10 + 10,84 \cdot \text{TAN} + 0,54 \cdot \text{TAN}^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) para a biomassa máxima (g/L).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	940,76	2	470,38	2351,9
Resíduo	1,61	8	0,20	
Total	942,37	10	94,23	

$$R^2 = 0,9983; F_{\text{TAB}2,8,95\%} = 4,46$$

De acordo com o modelo obtido, pôde-se concluir que a regressão é estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95%. Após a eliminação dos parâmetros não significativos, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9983, explicando 99,83% da variabilidade dos dados.

A Tabela 4 mostra a análise de variância (ANOVA) para o consumo de tanino do meio. Com um valor de F calculado (29,15) 5,7 vezes superior ao F tabelado (5,12), o modelo empírico de primeira ordem foi considerado preditivo. Ao nível de confiança de 95%, apenas o coeficiente linear da concentração de tanino foi significativo. Após a retirada dos coeficientes não significativos, o modelo matemático que representa o consumo de tanino (%) desse planejamento está representado na Equação 2, onde TAN corresponde a concentração de tanino (valor codificado).

$$\text{Consumo de tanino (\%)} = 66,68 + 21,79 \cdot \text{TAN} \quad (\text{Eq. 2})$$

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para o consumo de tanino (%).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	3790,52	1	3790,52	29,15
Resíduo	1170,05	9	130,00	
Total	4960,57	10	496,05	

$$R^2 = 0,7642; F_{\text{TAB1},9,95\%} = 5,12$$

De acordo com o modelo obtido, pôde-se concluir que a regressão é estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95%. Após a eliminação dos parâmetros não significativos, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,7642, explicando 76,42% da variabilidade dos dados obtidos. Diante do baixo coeficiente de determinação obtido optou-se por baixar o nível de confiança a 90% para que se pudesse explicar uma faixa mais ampla de variabilidade dos resultados obtidos.

A Tabela 5 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o consumo de tanino no meio. Com um valor de F calculado (31,35) 10 vezes superior ao F tabelado (3,11), considera-se que o modelo empírico de segunda ordem é preditivo. Ao nível de confiança de 90%, os coeficientes linear e quadrático da concentração de tanino foram significativos. Após a retirada dos coeficientes não significativos, o modelo matemático que representa consumo de tanino (%) desse planejamento está representado na Equação 3, onde TAN corresponde a concentração de tanino (valor codificado).

$$\text{Consumo de tanino (\%)} = 66,68 + 21,79 \cdot \text{TAN} - 10,10 \cdot \text{TAN}^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) para o consumo de tanino (%).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	3790,52	2	1895,26	31,35
Resíduo	483,55	8	60,44	
Total	4960,57	10	496,05	

$$R^2 = 0,9025; F_{\text{TAB}2,8,90\%} = 3,11$$

Conforme o modelo obtido, pôde-se concluir que a regressão é estatisticamente significativa ao nível de confiança de 90%. Após a eliminação dos parâmetros não significativos, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9025, explicando 90,25% da variabilidade dos dados obtidos.

As Figuras 4 e 5 apresentam as superfícies de resposta obtidas a partir dos modelos desenvolvidos (Equações 1 e 2) para avaliar o comportamento das variáveis-resposta frente às variações de pH e da concentração de tanino, buscando uma região ótima de trabalho.

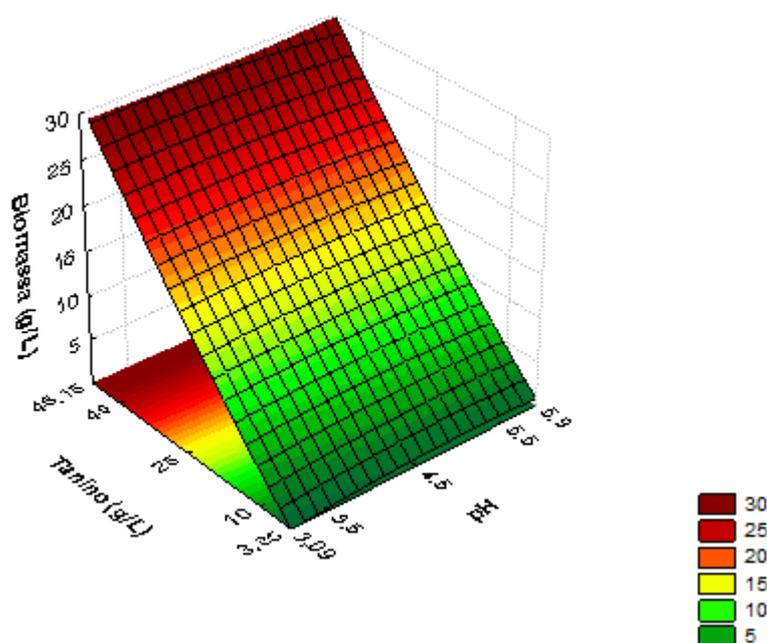


Figura 4: Superfície de resposta para produção de biomassa em função do pH e da concentração inicial de tanino no meio de cultivo nos diferentes níveis estudados.

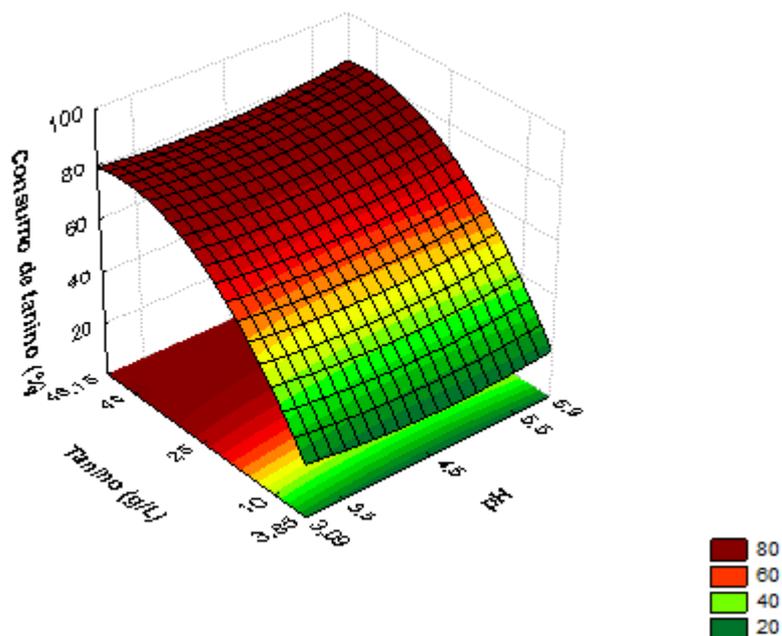


Figura 5: Superfície de resposta para consumo de tanino em função do pH e da concentração inicial de tanino no meio de cultivo nos diferentes níveis estudados.

Na Figura 4 constata-se que as maiores quantidades de biomassa gerada ocorreram em elevadas concentrações de tanino (+1 e +1,41). Na Figura 5 é possível observar que os maiores consumos de tanino ocorreram a partir das concentrações intermediárias (ponto central) até as concentrações mais elevadas de tanino no meio (+1 e +1,41). Nas Figuras 4 e 5, constatou-se que o pH não teve influência significativa nas variáveis dependentes analisadas. Assim sendo, observa-se uma região ótima com concentrações em torno de 40 g/L de tanino, sem influência do pH do meio nos cultivos.

4.1 Validação do modelo matemático para biomassa e consumo de tanino

De acordo com os resultados obtidos, optou-se por validar 3 condições distintas. Condição 1: referente ao ensaio 2 (10 g/L de tanino; pH 5,5); condição 2: referente ao ensaio 3 (40 g/L de tanino; pH 3,5) e condição 3: referente ao ensaio 9 (25 g/L de tanino; pH 4,5). Estas condições foram escolhidas a fim de verificar se os resultados obtidos experimentalmente apresentam concordância com o valor predito pelo modelo em diferentes níveis (-1, +1), bem como nos pontos centrais.

Nas condições descritas, foram realizados ensaios, acompanhando-se a cinética de crescimento celular (biomassa), o consumo de tanino e o pH ao longo do cultivo (Figura 6).

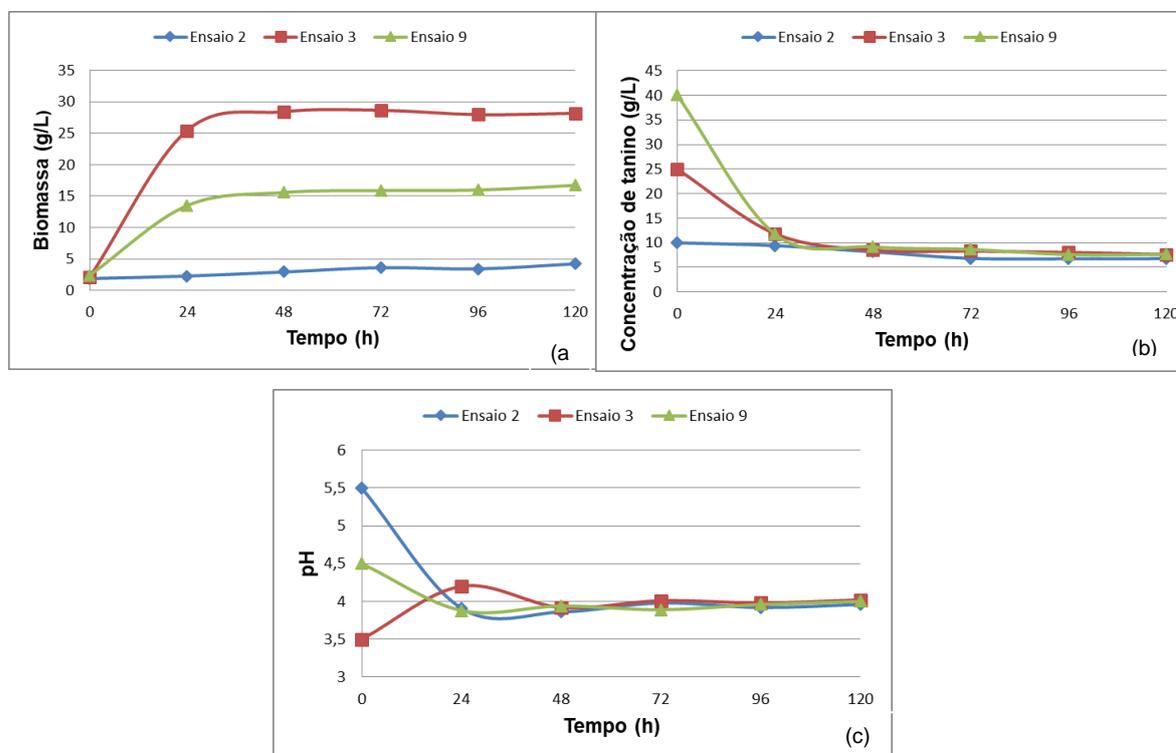


Figura 6: Produção de biomassa (a), consumo de tanino de acácia (b) e acompanhamento do pH (c) nos cultivos de *Aspergillus oryzae* em tanino vegetal de acácia, nas três condições validadas.

A Tabela 6 apresenta o desvio relativo entre os resultados preditos pelo modelo e os obtidos experimentalmente para biomassa e consumo de tanino.

De acordo com a Tabela 6, constata-se que a condição 3, a qual se refere ao ensaio 9, ponto central do planejamento, é a que melhor valida o modelo com um desvio relativo inferior a 1%, ou seja, com valores muito próximos aos previstos pelo modelo.

No que diz respeito à otimização do consumo de tanino de acácia pelo fungo *Aspergillus oryzae* pode-se dizer que esta não se mostrou tão eficiente quanto o esperado, uma vez que apresentou um pequeno incremento, passando de 74% para 80,4%. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que o pH não exerceu a influência esperada nos cultivos bem como que nos testes preliminares já se trabalhava, mesmo sem conhecimento, com a concentração ótima de substrato, de

aproximadamente 40 g/L de tanino. É importante salientar que apesar disso, o estudo apresenta relevância por apontar quais as melhores condições de cultivo além de gerar equações capazes de predizer de forma eficiente os resultados a serem obtidos.

Tabela 6: Resultados experimentais e esperados obtidos para biomassa e consumo de tanino de acácia no cultivo de *Aspergillus oryzae*.

	Biomassa (g/L)	Consumo de tanino (%)
Condição 1*		
Valor predito	4,8	34,79
Valor experimental	4,27	32,5
Erro relativo (%)	- 12,41	- 7,04
Condição 2**		
Valor predito	26,48	78,37
Valor experimental	27,00	80,4
Erro relativo (%)	1,9	2,51
Condição 3***		
Valor predito	15,10	66,68
Valor experimental	15,00	66,5
Erro relativo (%)	0,66	0,27

* 10g/L de tanino; pH 5,5.

** 40g/L de tanino; pH 3,5.

*** 25g/L de tanino; pH 4,5.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente estudo demonstrou que, apesar das características biocidas dos taninos vegetais, em especial dos taninos condensados, foi possível obter valores satisfatórios para o consumo destes via biodegradação por fungos filamentosos da espécie *Aspergillus oryzae*. O consumo obtido foi de cerca de 80%, para as condições ótimas de cultivo, nas quais foi utilizada uma elevada concentração inicial de tanino no meio de cultura, em torno de 40 g/L. Constatou-se ainda que não houve influência direta do pH ou de sua interação com a concentração de tanino.

Os resultados para produção de biomassa e consumo de tanino, obtidos experimentalmente, demonstraram uma estreita concordância com o valor predito pelo modelo matemático, apresentando um desvio relativo inferior a 1% (ponto central), demonstrando assim ser adequado para prever os resultados a serem obtidos experimentalmente.

Como houve boa adaptação dos fungos a elevadas concentrações de taninos vegetais condensados, seria interessante, em uma próxima etapa, o seu cultivo em efluentes reais de curtumes, buscando avaliar seu desempenho frente as misturas de compostos comumente presentes nas águas residuárias da indústria coureira, como óleos, biocidas, sais, entre outros. Outra opção seria alterar parâmetros de cultivo, como a relação C/N, por exemplo, a fim de buscar a obtenção de produtos de interesse comercial, como lipídios, proteínas, entre outros.

Referências

- ACAMOVIC, T.; STEWART, C. S. Plant phenolic compounds and gastrointestinal microorganisms. In: BROOKER, J. D. (Ed.). **Tannins in livestock and human nutrition**. Adelaide. p. 127–129.
- AGUILAR, C.N.; CRUZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIERREZ-SÁNCHEZ, G.; RAMÍREZ-CORONEL, A.; AUGUR, C. Catechin degradation by several fungal strains isolated from Mexican desert. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 426–429, 2004.
- AMADI, J. E.; ADENIYI, D. O. Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1219–1221, 2009.
- AYRES, M. P.; CLAUSEN, T.P.; MACLEAN JR., S. F.; REDMAN, A. M.; REICHARDT, P.B. Diversity of Structure and Antiherbivore Activity in Condensed Tannins DIVERSITY OF STRUCTURE AND ANTIHERBIVORE ACTIVITY IN. [s. l.], v. 78, n. 6, p. 1696–1712, 2014.
- BACCAR, R; BLÁNQUEZ, P.; BOUZID, J.; FEKI, M.; ATTIYA, H.; SARRÀ, M. Decolorization of a tannery dye: From fungal screening to bioreactor application. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 184–189, 2011.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora UNICAMP, 1995.
- BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; DÁVILA-ACEDO, M. A. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 186, n. 2–3, p. 1704–1712, 2011.
- BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins - A current perspective Bhat, T. K., B. Singh, and O. P. Sharma. 1998. Microbial degradation of tannins - A current perspective. *Biodegradation* 9:343–357. **Biodegradation**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 343–357, 1998.
- BHOITE, R. N.; MURTHY, P. S. Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 94, n. May 2013, p. 727–735, 2015.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Fundamentos**. v. 1. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL. **Exportações brasileiras de couros e peles**. [s.l: s.n.].
- CHABAANE, L; TAHIRI, S.; ALBIZANE, A.; ELKRATI, M.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Immobilization of vegetable tannins on tannery chrome shavings and their use for the removal of hexavalent chromium from contaminated water. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 174, n. 1, p. 310–317, 2011.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R.A.; 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**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 461–467, 2016.
- CRUZ-HERNÁNDEZ, M.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; LARA, F.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILAR, C.N. Isolation and evaluation of tannin-degrading fungal strains from the Mexican desert. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 60, n. 11–12, p. 844–848, 2005.
- DEEPAK, V.; ILALANGOVAN, S.; SAMPATHKUMAR, M. V.; VICTORIA, M. J.; PASHA, S. P. B. S.; PANDIAN, S. B. R. K.; GURUNATHAN, S. Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from *Bacillus cereus* NK1 on PHB nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 297–304, 2010.
- DOGRUEL, S.; GENCELI, A.; BABUNA, F. G.; ORHON, D. An investigation on the optimal location of ozonation within biological treatment for a tannery wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 81, n. 12, p. 1877–1885, 2006.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 13, n. 2–3, p. 113–125, 2003.
- ETIÉGNI, L.; WAKOLI, M.; OFOSU-ASIEDU, K. Design of an efficient Tannin extract effluent treatment system. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 39, n. 10–11, p. 321–324, 1999.
- FALCÃO, L.; ARAÚJO, M. E. Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. **Journal of Cultural Heritage**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 149–156, 2011.
- GAJDHANE, S. B.; BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Statistical media optimization for enhanced production of ??-galactosidase by a novel *Rhizopus oryzae* strain SUK. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 301–309, 2016.
- GENSCHOW, E.; HEGEMANN, W.; MASCHKE, C. Biological sulfate removal from tannery wastewater in a two-stage anaerobic treatment. **Water Research**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 2072–2078, 1996.
- GIACCHERINI, F.; MUNZ, G.; DOCKHORN, T.; LUBELLO, C.; ROSSO, D. Carbon and energy footprint analysis of tannery wastewater treatment: A Global overview. **Water Resources and Industry**, [s. l.], v. 17, p. 43–52, 2017.
- GUTTERRES, M. Capítulo III. In: **Tecnologia do Couro para Engenharia Química**. [s.l: s.n.], 2016.
- GUTTERRES, M.; BENVENUTI, J.; FONTOURA, J. T.; ORTIZ-MONSALVE, S. Characterization of Raw Wastewater from Tanneries. **Journal of the Society of Leather, Technologists and Chemists**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 280, 2015.
- HASLAM, E. Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense-A reappraisal. **Journal of Chemical Ecology**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1789–1805, 1988.
- HE, Q.; YAO, K.; SUN, D.; SHI, B. Biodegradability of tannin-containing wastewater from leather industry. **Biodegradation**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 465–472, 2007.

- HEIDEMANN, E. Comparison between chrome and vegetable tanning inferred from collagen bond position. **Das Leder**, [s. l.], v. 28, p. 99–104, 1997.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.
- KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 539–550, 2000.
- KARDEL, M.; TAUBE, F.; SCHULZ, H.; SCHÜTZE, W.; GIERUS, M. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts - review and new aspects. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, [s. l.], v. 86, p. 154–166, 2013.
- LOFRANO, G.; MERIÇ, S., ZENGİN, G. E.; ORHON, D. Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: A review. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 461–462, p. 265–281, 2013.
- MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. **DNA Research**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 173–183, 2008.
- MARTINEZ DE YUSO, A.; LAGEL, M. C.; PIZZI, A.; FIERRO, V.; CELZARD, A. Structure and properties of rigid foams derived from quebracho tannin. [s. l.], 2014.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L. AMORIM, E. L. C. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.
- MUNZ, G.; DE ANGELIS, D.; GORI, R.; MORI, G.; CASARCI, M.; LUBELLO, C. The role of tannins in conventional and membrane treatment of tannery wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 164, n. 2–3, p. 733–739, 2009.
- ORTIZ-MONSALVE, S.; DORNELLES, J.; POLL, E.; RAMIREZ-CASTRILLÓN, M.; VELENTE, P.; GUTTERRES, M. Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. **Process Safety and Environmental Protection**, [s. l.], v. 109, p. 437–451, 2017.
- OTUK, G.; DESCHAMPS, A. M. Degradation d'un tanin condense par plusieurs types de levures. **Mycopathologia**, 1983.
- OZCIRAK ERGUN, S.; OZTURK UREK, R. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 273–277, 2017.
- PERES, R. S.; CASSEL, E.; AZAMBUJA, D. S. Black Wattle Tannin As Steel Corrosion Inhibitor. **ISRN Corrosion**, [s. l.], v. 2012, p. 1–9, 2012.
- PÉREZ, N. ; TORRADO-AGRASAR, A.; LÓPEZ-MACIAS, C.; PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. **Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 2, p. 343–350, 2003.
- QUEIROZ, C. R. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos

- taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 493–497, 2002.
- QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POYUSÉGU, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2011.
- RADEBE, N.; RODE, K.; PIZZI, A.; GIOVANDO, S.; PASCH, H. MALDI-TOF-CID for the microstructure elucidation of polymeric hydrolysable tannins. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 97–107, 2013.
- RAMIREZ-CORONEL, A.; AUGUR, C; Degradation of catechin, a major constituent of coffee pulp by filamentous fungi. **Journées du réseau de mycologie**, [s. l.], 2003.
- ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 284–289, 2001.
- ROMERO-DONDIZ, E. M.; ALMAZÁN, J.E.; RAJAL, V. B.; CASTRO-VIDAURRE, E. F. Removal of vegetable tannins to recover water in the leather industry by ultrafiltration polymeric membranes. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 93, p. 727–735, 2015.
- SAHA, S. P.; GHOSH, S. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 188–196, 2014.
- SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 94, p. 827–835, 2017.
- SAXENA, R. K.; SHARMILA, P.; PAL, Ved. Microbial degradation of tannins Total nitrogen as N. [s. l.], v. 32, p. 259–270, 1995.
- SHATA, H. M. A. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 241–247, 2005.
- SPENCER, C. M.; YA, C.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P. N.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation-some thoughts and observations. **Phytochemistry**, 1988.
- SPIER, F.; FUCK, F. W.; JACINTO, M. A. C.; GUTTERRES, M. Absorption and fixation of vegetable tannins by collagen. **XXXIII IULTCS Congress**, [s. l.], p. 1–7, 2015.
- SPIER, F.; GUTTERRES, M. Biodegradação de Taninos Vegetais Utilizados na Indústria Curtidora. **10º Simpósio de Qualidade Ambiental**. Porto Alegre. 2016.
- SPINA, S; ZHOU, X.; SEGOVIA, C.; PIZZI, A.; ROMAGNOLI, M.; GIOVANDO, S.; PASCH, H.; RODE, K.; DELMOTTE, L. Phenolic resin adhesives based on chestnut (*Castanea sativa*) hydrolysable tannins. **Journal of Adhesion Science and Technology**, [s. l.], v. 27, n. 18–19, p. 2103–2111, 2013.

- SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: a Comparative Study. **Intenational Journal of Science and Nature**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.
- SUNDAR, V. J.; RAGHAVA RAO, J.; MURALIDHARAN, C. Cleaner chrome tanning - Emerging options. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 69–74, 2002.
- SUNDAR, V. J.; MURALIDHARAN, C. Salinity free high tannin fixation vegetable tanning: Commercial success through new approach. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 142, p. 2556–2561, 2017.
- SWAMY, M. V.; SEENAYYA, G. Thermostable pullulanase and α -amylase activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SV9—Optmization of culture conditions for enzyme production. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 157–162, 1996.
- SZPYRKOWICZ, L.; KAUL, S. N. Biochemical removal of nitrogen from tannery wastewater: Performance and stability of a full-scale plant. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 79, n. 8, p. 879–888, 2004.
- ZANGIROLAMI, T. C.; Carlsen, M.; Nielsen, J.; Jørgensen, S. B. Selection and characterization of a high α -amylase-producing variant in glucose-limited continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. **Mycological Research**, [s. l.], v. 104, n. 10, p. 1241–1249, 2000.