



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências da Biointeração
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

PEDRO JORGE LOURO CRUGEIRA

Potencial de ativação da radiação Laser em Baixa Potência ou LED no consórcio termo-celulolítico para aplicação na compostagem das fibras de coco verde

Salvador-BA

2015

PEDRO JORGE LOURO CRUGEIRA

Potencial de ativação da radiação Laser em Baixa Potência ou LED no consórcio termo-celulolítico para aplicação na compostagem das fibras de coco verde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

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

**Salvador – BA
2015**

PEDRO JORGE LOURO CRUGEIRA

Potencial de ativação da radiação Laser em Baixa Potência ou LED no consórcio termo-celulolítico para aplicação na compostagem das fibras de coco verde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências de Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida - Orientador_____

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia_____

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Landolfo Silveira Junior_____

Universidade Camilo Castelo Branco

Salvador, BA

2015

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar o curso de mestrado;

Ao meu orientador Professor Paulo Almeida e co-orientador Professor Antônio Pinheiro, pela liberdade e confiança referente ao presente trabalho, por todo o aprendizado que suscitou em mim, bem como da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis;

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

Ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Biofotônica da FOUFBA por terem cedido seus equipamentos, especialmente ao doutorando Gustavo Santos, pelo acompanhamento e ensinamentos durante a realização de análises.

As bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, Adriana Teixeira, Flavia, Julia Sampaio, Mariana Ponzio e Poliana Crespo pela grande ajuda, companheirismo e parceria em todos os trabalhos realizados no LABEM.

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

A Jacson Nunes dos Santos por oferecer apoio incondicional em todos os momentos de desenvolvimento desta pesquisa;

Aos meus pais, Raul Jorge e Maria Eduarda pela confiança e apoio em toda minha vida acadêmica;

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

Às minhas filhas, Mariana e Sofia por terem me servido de fonte de inspiração para superar os obstáculos encarados ao longo desta formação;

À minha tia Fernanda pelo encorajamento e apoio concedidos assim como por todas as refeições deliciosas que partilhou comigo em momentos difíceis.

À Rosa por toda a inspiração e confiança.

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

CRUGEIRA, Pedro Jorge Louro. Potencial de ativação da radiação Laser em Baixa Potência ou LED no consórcio termo-celulolítico para aplicação na compostagem das fibras de coco verde. 103 f. il. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

A sustentabilidade é um dos temas da atualidade da sociedade contemporânea, enfrentando algumas dificuldades advindas do crescimento exponencial da população e sua evolução, criando-se a necessidade de gerenciar, tratar e dispor de forma adequada os resíduos gerados. Nesse sentido, as usinas de compostagem são das alternativas existentes as mais viáveis, configurando-se como uma solução segura e de longo prazo, obtendo-se um produto final de maior valor agregado. O agronegócio de coco verde é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos lignocelulolíticos, sendo estes considerados como um dos recursos naturais renováveis mais abundantes deste planeta. A grande disponibilidade desses materiais, assim como, sua composição criou a necessidade e a oportunidade de se tornarem uma fonte de matéria-prima para a produção de compostos orgânicos e fertilizantes de forma sustentável. Pode-se utilizar catalisadores de forma a viabilizar tal processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito da luz Laser de baixa potência (LBP) ou do diodo emissor de luz (LED) na atividade metabólica de um consórcio microbiano termo-celulolítico, visando a sua bioestimulação bem como a degradação mais rápida, eficaz e viável de compostos celulósicos presentes nos resíduos de coco verde. Através do conhecimento da cinética do consórcio microbiano e dos estudos das cinéticas de declínio sob diferentes concentrações de fonte de carbono, elaborou-se um protocolo específico de emissão de radiação para o consórcio em estudo, em condições de estresse nutricional, de forma a impulsionar um desequilíbrio celular e consequente absorção de fótons visíveis por biomoléculas intracelulares. Realizou-se seis irradiações LBP (660 nm) ou LED (632±2 nm) com intervalos de tempo de 12 h nas amostras em privação de nutrientes, testando cinco densidades de energia, 5 J/cm², 10 J/cm², 13 J/cm², 15 J/cm² e 20 J/cm², para cada uma das fontes luminosas. Na avaliação dos resultados obtidos foi possível concluir através da análise de resposta microbiana que a emissão de luz LBP ou LED no espectro vermelho desenvolveu um processo de bioestimulação no consórcio termo-celulolítico, reforçando que a fotobioestimulação não está associada às propriedades específicas da luz Laser. Em ambas as fontes emissoras de luz utilizadas a dose energética que propiciou uma resposta mais eficaz à bioestimulação foi a de 13 J/cm². Sendo esta, utilizada para irradiar o consórcio, com fontes de luz diferenciadas (LBP ou LED) a ser inoculado nas leiras de compostagem. A análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos ao longo do processo de compostagem demonstrou que as leiras inoculadas com o consórcio exposto à emissão de luz LBP ou LED no espectro vermelho, promoveu o desenvolvimento de temperaturas mais elevadas e um aumento da atividade microbiológica desencadeando um aumento da velocidade dos processos microbianos e do processamento das fibras de coco verde, representando uma maior eficácia e aumento da viabilidade econômica do processo.

Palavras-chave: Resíduos, compostagem, consórcio termo-celulolítico, Laser de Baixa Potência, LED, bioestimulação.

CRUGEIRA, Pedro Jorge Louro. Low Power Light Laser or LED radiation activation potential in thermocellulolytic consortium applied for composting green coconut fibers.103 f.il. 2015. Master Dissertation - Institute of Health Science, Federal University of Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Sustainability is one of the main themes in today's society, facing challenges to tackle the population exponential growth and evolution. It implies the need to manage, treat and properly dispose the generated waste. In this sense, composting mills are the most viable alternatives as they offer secure, long-term solutions, resulting in a higher added value final product. The green coconut agribusiness is responsible for generating large amounts of lignocelluloses waste, considered one of the most abundant renewable natural resources in this planet. The wide availability of these materials, as well as their composition have created the need and the opportunity to turn them into a source of raw material for the production of sustainable organic fertilizers. Catalysers may be used to facilitate this process. The objective of this study was to evaluate the possible effect of low power light laser (LPL) or Light Emitting Diode (LED) on the thermal-cellulosic microbial consortium metabolic activity, seeking its bio-stimulation, a faster and effective degradation as well as viable cellulosic compounds found in the green coconut waste. Through the microbial consortium knowledge of kinetics and studies of decline kinetics under different carbon source concentrations, a specific protocol of radiation emission in nutritional stress conditions has been elaborated to the consortium under study in order to boost cell imbalance and consequent absorption of visible photons by intracellular biomolecules. Six LPL (660 nm) or LED (632 ± 2 nm) irradiations were performed at time intervals of 12 hours in samples under nutrient deprivation, testing five energy densities 5 J/cm^2 , 10 J/cm^2 , 13 J/cm^2 , 15 J/cm^2 to 20 J/cm^2 for each of the light sources. By assessing obtained results it was possible to conclude through microbial response analysis that the emission of LPL or LED light in the red spectrum developed a bio-stimulation process in the thermal-cellulosic consortium, thereby reinforcing the notion that photo bio-stimulation is not associated with specific properties of laser light. In both sources of light emissions applied, 13 J/cm^2 was the energy density which provided a more effective response as it was used to irradiate the consortium, with different light sources (LED or LPL) to be inoculated in compost piles. The analysis of physico-chemical and microbiological parameters during the composting process demonstrated that piles inoculated with the consortium exposed to the emission of LPL or LED light in the red spectrum, promoted the development of higher temperatures and an increased microbial activity. This generated a speed increase of microbial processes and the processing of green coconut fiber, demonstrating more efficiency and a higher economic viability of the process.

Key words: Waste, composting, thermocellulolytic consortium, low power light laser, LED, biostimulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da arquitetura de parede celular vegetal contendo celulose, hemicelulose e lignina.	21
Figura 2. Fases do processo de compostagem.	25
Figura 3. Fluxograma descrevendo a sequência experimental adotada neste trabalho.	44
Figura 4. Aparelhos utilizados para emissão de luz.	48
Figura 5. Irradiação de amostras em câmara de fluxo laminar.	50
Figura 6. Processamento da matéria prima.	52
Figura 7. Análise da degradação do papel de filtro (triplicata da diluição 10^{-3}).	57
Figura 8. Cinética de crescimento do consórcio microbiológico em meio mineral descrito por Czapek.	58
Figura 9. Imagens capturadas de microscopia de fluorescência das morfologias e arranjos dos micro-organismos envolvidos no consórcio.	59
Figura 10. Comparação das cinéticas de crescimento irradiadas por LBP e LED versus controle.	60
Figura 11. Imagens captadas de microscopia de fluorescência do consórcio em fase exponencial, formando biofilme.	61
Figura 12. Taxa de mortalidade com diferentes porcentagens de fonte de carbono.	62
Figura 13. Sobreposição das cinéticas microbianas com três diferentes porcentagens de fontes de carbono.	63

Figura 14. Placas de petri das amostras quantificadas 12 horas após a última irradiação.....	64
Figura 15. Taxa de mortalidade do consórcio sob privação de nutrientes.	65
Figura 15. Continuação	66
Figura 16. Taxas de mortalidade versus dose energética emitida.	69
Figura 17. Variações de aeração ao longo do experimento.	70
Figura 18. Variações de temperatura ao longo do experimento.	71
Figura 19. Variação de umidade interna nas três leiras, ao longo do experimento.	74
Figura 20. Variação de umidade ambiente nas três leiras, ao longo do experimento.	75
Figura 21. Variações de pH ao longo do experimento.	77
Figura 22. Halos de hidrolise após coloração com vermelho congo, nas amostras coletadas ao final de 24 h de processamento.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio sintético.	45
Tabela 2 - Meio mineral Czapek.	46
Tabela 3 - Parâmetros de emissão de luz utilizados no estudo de uma única emissão.	47
Tabela 4 - Tempo de exposição da emissão das radiações nas diferentes densidades de energia.	50
Tabela 5 - Parâmetros de emissão de luz utilizados no inoculo para as leiras.	52
Tabela 6 - Meio amônia-carbonato de cálcio.	54
Tabela 7 - Quantificação de <i>Nitrosomonas</i> ao longo do processo de compostagem.	78
Tabela 8 - Quantificação de micro-organismos celulolíticos ao longo do processo de compostagem.	79
Tabela 9 - Índices de atividade celulolítica ao longo do tempo.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CH ₄	Metano
C/N	Relação carbono versus nitrogênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCPIP	2,6 Diclorofeno-indofenol
CMC	Carboximetilcelulose
LBP	Laser de Baixa Potência
LED	Díodo emissor de luz
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
NH ₃	Amônia
NMP	Número Mais Provável
O ₂	Molécula de oxigênio
P	Fósforo
PBS	Solução tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucléico
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVO GERAL	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	RESÍDUO DO COCO VERDE.....	20
3.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DA CASCA DE COCO VERDE	21
3.3	COMPOSTAGEM.....	24
3.4	PARÂMETROS QUE AFETAM O PROCESSO DE COMPOSTAGEM.....	27
3.4.1	AERAÇÃO	27
3.4.1	TEMPERATURA.....	29
3.4.2	UMIDADE	30
3.4.3	GRANULOMETRIA	31
3.4.4	RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO (C/N).....	32
3.4.5	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	33
3.4.6	POPULAÇÃO MICROBIANA.....	34
3.5	CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO LASER E LED	35
3.6	BIOMODULAÇÃO	37
3.6.1	BIOESTIMULAÇÃO	39
3.7	EFEITO DA LUZ EM MICRO-ORGANISMOS	42
4.	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PESQUISA	44
4.2	COLETA DE AMOSTRAS	45
4.3	SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS TERMO – CELULOLÍTICOS.....	45
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIOLÓGICO EM MEIO MINERAL.....	46
4.5	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE UMA ÚNICA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO LBP OU LED, NO CONSÓRCIO MICROBIANO	47
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE FONTE DE CARBONO	48
4.7	VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO DA APLICAÇÃO DE LUZ LBP OU LED NO CONSÓRCIO MICROBIANO	49

4.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO CONSÓRCIO ATIVADO POR LBP OU LED, DE CATALISAR O PROCESSO DE COMPOSTAGEM	51
4.8.1. LOCAL DE PESQUISA.....	51
4.8.2. MATÉRIA-PRIMA	51
4.8.3. PROCESSAMENTO E CORREÇÃO NUTRICIONAL DO RESÍDUO	51
4.8.4. EXPERIMENTO DE COMPOSTAGEM	52
4.8.5. MONITORAMENTO DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM.....	53
4.8.5.1.QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO GÊNERO <i>Nitrosomonas</i>	54
4.8.5.2.QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS	55
4.8.5.3.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA MEDIANTE O TESTE DO VERMELHO CONGO.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO CELULOLÍTICO	57
5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIANO	58
5.3 ESTUDO DA INFLUÊNCIA, DE UMA ÚNICA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO LBP OU LED, NO CONSÓRCIO MICROBIANO	60
5.4 ESTUDO DAS CINÉTICAS DE DECLÍNIO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FONTE DE CARBONO	61
5.5 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO DA LUZ LBP OU LED NO CONSÓRCIO MICROBIANO	63
5.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO CONSÓRCIO ATIVADO POR LBP OU LED, DE CATALISAR O PROCESSO DE COMPOSTAGEM	70
5.6.1 AERAÇÃO.....	70
5.6.2 TEMPERATURA.....	71
5.6.3 UMIDADE	73
5.6.4 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	75
5.6.5 QUANTIFICAÇÃO DE <i>Nitrosomonas</i>	77
5.6.6 QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLITICOS	78
5.6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA MEDIANTE DESCOLORAÇÃO COM VERMELHO CONGO.....	80
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICE A – Estudo da influência de privação de nutrientes em diferentes porcentagens de fonte de carbono	96

APÊNDICE B – Comparação dos resultados estatísticos (ANOVA) das diferentes doses energéticas estudadas.....	97
APÊNDICE C - Resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos no monitoramento das leiras de compostagem, ao longo do tempo.	98
APÊNDICE D – Comparação de resultados obtidos, através do método ANOVA, das temperaturas nos vários tempos monitorados nas leiras de compostagem.....	100
APÊNDICE E - Procedimento de Leitura e cálculo do NMP	102
ANEXO A - Tabela utilizada de NMP para determinação de resultados.....	103

1. INTRODUÇÃO

Apesar da sustentabilidade ser um dos temas mais atuais da sociedade contemporânea, o crescimento exponencial da população humana concomitantemente com a sua evolução resulta na necessidade de gerenciar, tratar e dispor de uma forma adequada, ou seja, ambientalmente correta os resíduos por ela gerados (LEVY, 2006).

No último século, o desenvolvimento tecnológico resultou em uso excessivo de recursos e modificou os padrões de consumo da população, causando a formação de grandes quantidades de diversos tipos de resíduos, tornando a sua gestão cada vez mais complexa e problemática. A origem dos resíduos é bastante diversificada devido a ampla faixa de atividades humanas desempenhadas hoje em dia. Com a responsabilidade de criarmos garantias de um ambiente sustentável para as futuras gerações, torna-se essencial o desenvolvimento de medidas que minimizem os impactos ambientais negativos. Esse aspecto propiciou o incentivo de diversas pesquisas visando o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento e processamento de resíduos, capazes de trazer benefícios ambientais, sociais e econômicos (FORMOSINHO, 2010).

Os resultados divulgados em 2010 pela Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais, revelaram que o país produziu 195 mil toneladas de resíduos por dia, sendo que a matéria orgânica representa mais de 50 % do peso total. A pesquisa ainda revela que 42,4 % dos resíduos não foram destinados adequadamente e acabaram em lixões ou aterros controlados.

A disposição ambientalmente inadequada dos resíduos verdes produz gases de efeito estufa, bem como descargas de poluentes, como, por exemplo, o chorume, que são lixiviados continuamente e podem contaminar os solos, as águas subterrâneas e superficiais. Na realidade, em qualquer aterro sanitário, cerca de 45 a 58 % dos resíduos orgânicos, numa base de massa seca, é transformado em gás metano (CH₄) (LEVY, 2006).

O Brasil é, sem dúvida, um dos países que possuem a maior biomassa do mundo e a maior extensão territorial cultivável, potenciais estes que devem ser mais bem explorados. Por outro lado, o acentuado crescimento do agronegócio brasileiro o coloca em posição de destaque no processo de desenvolvimento do país (MATTOS et al., 2006). Os avanços significativos implicaram no aumento do consumo de insumos e da geração de resíduos nas atividades agropecuárias.

O agronegócio do coco verde é extremamente importante devido a uma grandeza enorme, seja na geração de divisas, emprego, renda ou alimentação. A procura por alimentos

naturais, a aplicação de tecnologias de processamento, as novas alternativas de apresentação do produto e a perspectiva de sua exportação contribuem para aumentar o consumo e incrementar sua rentabilidade ao longo do tempo. Sendo que, o aumento de sua produção passou a ser uma tendência natural, causando um conseqüente aumento na geração de resíduos sólidos (MATTOS et al., 2006).

Por outro lado, nas regiões tropicais do Brasil, a produção sazonal de forragem é um fato concreto e tem causado enormes prejuízos à pecuária nacional pois a maioria dos produtores não se prepara para suplementar seus rebanhos no período de escassez de alimentos de boa qualidade. Frente a esse problema buscam-se soluções que possam suprir esta deficiência alimentar. Uma das alternativas é o aproveitamento de resíduos e subprodutos agroindustriais na alimentação animal, capaz de contribuir para atender as exigências nutricionais, num contexto de viabilidade econômica e disponibilidade. Além disso, a utilização de subprodutos, na nutrição animal, está totalmente de acordo com os princípios da conservação do meio ambiente (VIEIRA, 2013).

Um dos principais desafios para a problemática dos resíduos orgânicos no Brasil está no campo do seu gerenciamento e na introdução de novas tecnologias de tratamento. Nesse sentido, as usinas de compostagem são das alternativas existentes as mais viáveis, configurando-se como uma solução segura e de longo prazo, obtendo-se um produto final de maior valor agregado (PARADELA, 2014).

A compostagem envolve a biodegradação de resíduos orgânicos em substâncias húmicas, com redução real de volume, o qual é estabilizado e adequado para uso como um promotor de melhorias do solo (BANEGAS et al., 2007). Trata-se de um processo biológico aeróbio, controlado e desenvolvido por uma população diversificada de micro-organismos que promovem a transformação da matéria orgânica em um produto final estável (BARI; KOENING, 2001; LIANG et al., 2003). O componente ativo mediando a biodegradação e o processo de conversão da matéria orgânica é a comunidade de micro-organismos residente no resíduo orgânico.

Existem várias formas de acelerar o processo de compostagem dos resíduos orgânicos, entre elas, a vermicompostagem e a compostagem com adição de micro-organismos eficientes, usualmente organismos específicos presentes na natureza que catalisam o processo de decomposição da matéria orgânica. Estes métodos podem reduzir o tempo de duração do processo em até 50 %. A catálise através de micro-organismos se destaca pelo fato de executarem o processo de compostagem e ao mesmo tempo exercerem o papel de aumentar a

diversidade microbiana, melhorar a qualidade de solos, saúde, crescimento, rendimento e qualidade das culturas (HIGA; WIDIDANA, 2007).

As pesquisas realizadas para o desenvolvimento de processos biotecnológicos voltados ao tratamento, processamento e destinação final de resíduos sólidos orgânicos no Brasil, mais especificamente de aceleradores de degradação, compostos por micro-organismos e/ou enzimas, ainda não são expressivos e de grande contribuição para a solução dos problemas enfrentados por todas as regiões do país (HIGA; WIDIDANA, 2007).

Vários trabalhos científicos realizados por Karu, ao longo da década de 80 (KARU et al., 1983, 1989; KARU, 1987) encetaram bases para o entendimento dos mecanismos moleculares associados aos efeitos da luz sobre as células, mais especificamente sobre os processos metabólicos que estão envolvidos na biomodulação. Hoje em dia é fato de consenso que existe um mecanismo universal da ação da luz na cadeia respiratória de células eucarióticas e procarióticas com enzimas terminais da cadeia redox, atuando como fotoceptores (KARU; KOLYAKOV, 2005). As respostas celulares advêm de reações primárias, desenvolvendo uma série de outras reações secundárias em cadeia. Segundo Karu (2003), a resposta celular à fotobioestimulação não está associada às propriedades específicas da luz laser, como a coerência, criando-se a oportunidade de trabalhar com fontes emissoras de luz não coerentes como os dispositivos emissores de luz LED, sendo estes mais baratos, de fácil manuseio, operando com correntes elétricas relativamente baixas, em comparação com os lasers.

A influência do laser em baixa potência (LBP) sobre a bioestimulação de diferentes populações bacterianas tem sido permanentemente discutida na literatura (DIAS et al., 2009; ENWEMEKA et al., 2009; NUSSBAUM et al., 2002; PEREIRA et al., 2014). Vários estudos sobre o efeito da radiação laser em bactérias indicam resultados bioestimulantes ou proliferativos, postulando que tais efeitos se devem às modificações geradas pelo aumento do aporte energético provido pela radiação na cadeia respiratória das bactérias (KIPSHIDZE et al., 2001). Por outro lado, postula-se que o efeito bactericida da terapia fotodinâmica de baixa potência, na membrana bacteriana, ocorre em virtude da absorção de fótons por cromóforos endógenos, com concomitante produção de moléculas altamente reativas e citotóxicas, que provocam a ruptura da membrana e morte bacteriana (NUSSBAUM et al., 2002; BENVINDO et al., 2008).

A absorção de fótons visíveis por biomoléculas intracelulares específicas e a consequente bioestimulação ocorre sobretudo quando a célula se encontra afetada por uma desordem funcional, ou seja, em condições de estresse (KARU, et al., 1999; LUBART, et al., 1997). Por essa razão, foi estimulado um estresse nutricional no consórcio em estudo, de

forma a impulsionar um desequilíbrio celular e se torne mais fácil de observar os efeitos induzidos pela absorção da irradiação pelas moléculas fotoceptoras, correspondendo a mudanças químicas ou físicas primárias provocando por outro lado uma sequência de reações bioquímicas secundárias nas células.

O efeito da luz laser de baixa potência não deriva do calor, as diferentes variações de energia de radiação mostram que seu efeito está limitado a certas regiões espectrais, sendo necessário estudos complementares para que se possa identificar e caracterizar com maior precisão o sentido da biomodulação (inibitório ou estimulatório).

O objetivo deste trabalho é avaliar o possível efeito da luz LBP ou LED na atividade metabólica de um consórcio microbiano termo-celulolítico, visando acelerar a sua multiplicação bem como a degradação mais rápida, eficaz e viável de compostos celulósicos presentes nos resíduos de coco verde.

A ativação do metabolismo celular do consórcio, através da emissão de uma fonte luminosa (LBP ou LED), em sinergia com o poder de catálise dos micro-organismos termo-celulolíticos, pretende impulsionar uma nova etapa no processamento e destinação final ambientalmente correta dos resíduos orgânicos celulósicos, criando uma nova ferramenta para o desenvolvimento da alimentação animal e contribuindo para a degradação dos arranjos mais complexos dos materiais lignocelulósicos.

2. OBJETIVO GERAL

- Verificar o potencial de ativação da radiação LBP ou LED no metabolismo celular do consórcio termo-celulolítico para aplicação na compostagem das fibras de coco verde.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e quantificar o consórcio de micro-organismos termo-celulolíticos coletados em leira de compostagem;
- Determinar a cinética de crescimento do consórcio em meio mineral Czapek;
- Estudar o comportamento do consórcio microbiológico com diferentes concentrações de fonte de carbono (carboximetilcelulose);
- Estudar a influência de uma única aplicação de LBP ou LED na região do vermelho, no consórcio através da análise das cinéticas de crescimento;
- Verificar se a resposta celular à fotobioestimulação não estar associada às propriedades específicas da luz Laser, como a coerência.
- Verificar o potencial efeito da aplicação de radiação LBP ou LED no metabolismo dos micro-organismos sob estresse nutricional.
- Avaliar a capacidade do consórcio ativado por LBP ou LED, de catalisar o bioprocessamento de compostagem das fibras do coco verde.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESÍDUO DO COCO VERDE

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

O Brasil possui cerca de 280 mil hectares cultivados de coqueiro, os quais estão distribuídos, praticamente, em quase todo o território nacional, mas com uma maior concentração no Nordeste e parte da região Norte. Favorecidas pelas condições de clima tropical, ambas as regiões detêm aproximadamente 75 % da produção de coco brasileiro. Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores mundiais, ocupando o quarto lugar, com uma produção de cerca de três milhões de toneladas ano (GONÇALVES et al., 2014). A tendência é sem dúvida, o aumento da produção e de sua produtividade, visto o incremento tecnológico na cultura e, principalmente, o avanço da fronteira agrícola com cultivo de coqueiros do tipo anão e híbridos (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011).

A previsão facilmente diagnosticável é o aumento crescente no consumo do coco verde, seguindo a tendência natural da industrialização de sua água gerando um aumento do resíduo, que corresponde a 85 % do peso do fruto (MATTOS et al., 2006).

Volumes significativos e crescentes dos resíduos do coco são depositados e expostos ao meio ambiente tornando-se um foco para a proliferação de doenças, atraindo vetores, entre eles, ratos e insetos como o mosquito *Aedes aegypti*. Além disso, são usualmente descartados, em lixões e aterros sanitários, provocando impactos sobre a qualidade do ar, do solo e da água através da mistura com os resíduos pré-existentes que interagem química e biologicamente como um reator (ROSA et al. 2002). No entanto, os resíduos do coco verde, apesar de poderem representar um grande problema ambiental para as áreas consumidoras, podem constituir-se em valiosa fonte de matéria-prima, para obtenção de compostos orgânicos estáveis de aplicação no solo, para alimentação animal e até mesmo para a produção de etanol de segunda geração. Mas torna-se de extrema importância, que se consiga obter uma hidrólise mais eficiente dos carboidratos complexos que a constituem (ALBUQUERQUE, 2013).

3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DA CASCA DE COCO VERDE

A biomassa vegetal é essencialmente constituída por polissacarídeos: celulose, hemicelulose e lignina e representam cerca de 90 % da biomassa de carbono disponível na biosfera (figura 1). Formam uma estrutura rígida e complexa, constituindo a parede celular vegetal, com as seguintes composições, celulose (40-50 %), hemicelulose (15-30 %) e lignina (10-30 %) (ALBUQUERQUE, 2013).

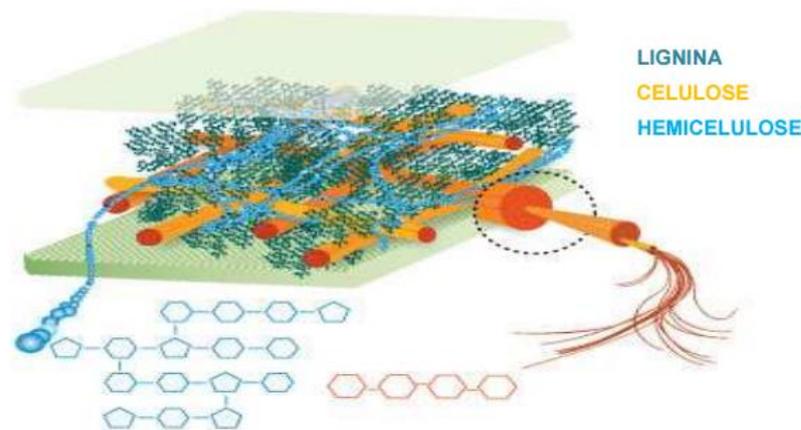


Figura 1. Esquema da arquitetura de parede celular vegetal contendo celulose, hemicelulose e lignina.
Fonte: BORTOLAZZO, (2011).

A Celulose é um dos principais constituintes da biomassa vegetal, molécula mais abundante na natureza, composta por cadeias lineares de D - glicose, unidas por ligações β -1,4 com alto grau de polimerização e elevado peso molecular, principalmente, em sua forma cristalina que confere a alta resistência ao rompimento de suas ligações por substâncias químicas e agentes físicos (MALBERBE, 2003).

Sua estrutura linear, conferida pelas ligações glicosídicas possibilita a união das cadeias de celulose pelas ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, em toda a sua extensão, formando assim, camadas de polímeros, designadas por microfibrilas de celulose, podendo ter uma espessura de 5 a 12 nm (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As moléculas de celulose agregadas na forma de microfibrilas apresentam regiões altamente compactas (cristalinas) e áreas menos ordenadas (amorfas), onde as fibras apresentam maior distância uma das outras. O grau de cristalinidade destas microfibrilas, a existência de

outros polímeros associados à matriz celulósica, e por outro lado as falhas encontradas (microporos) são de extrema importância, pois podem influenciar na susceptibilidade da molécula de celulose ser degradada através de enzimas microbianas (ALBUQUERQUE, 2013).

A celulose está ligada externamente a um heteropolissacarídeo de baixo peso molecular, a hemicelulose. Sua cadeia é formada por açúcares curtos, linear e altamente ramificados, que se ligam coesamente entre si e às microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo as ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa (CARVALHO et al., 2005). A nível estrutural é mais parecida com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. Sua estrutura ramificada e de cadeias laterais interage facilmente com a celulose conferindo estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

Outro constituinte da parede celular é a lignina de alto peso molecular e estrutura irregular. A lignina é um composto polifenólico (fenilpropanoide) apresentando uma conformação tridimensional e amorfa, representando 20% a 30% do total dos lignocelulósicos (AZEVEDO; ESPOSITO, 2004).

Embora exista uma estreita ligação entre a celulose, hemicelulose e a lignina, estes compostos não estão distribuídos de uma forma uniforme na parede celular. A celulose forma um esqueleto constituído por substâncias estruturais (hemicelulose) e envoltórias (lignina). A lignina fornece suporte à parede celular, sendo constatada através do complexo de microfibrilas, que além de conferir resistência aos ataques microbiológicos ao material lignocelulósico, é o principal obstáculo ao ataque enzimático.

As enzimas que mais se destacam na hidrólise da celulose são as celulases, biocatalisadores específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, resultando na produção final de glicose, de grande interesse industrial. Porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade na barreira constituída pela lignina, da parede vegetal, sendo este o principal problema para que estas enzimas consigam desencadear o processo de degradação da celulose (ALBUQUERQUE, 2013). Por outro lado, verificamos que na natureza existe uma grande diversidade de micro-organismos que produzem celulases, apesar de apenas uma pequena parte ser capaz de degradar a celulose natural, ou seja, serem verdadeiramente celulolíticos (RUEGGER et al., 2004).

A ação de degradação e mecanismo de funcionamento das celulases produzidas por bactérias são menos conhecidos que o de fungos. Toda bactéria celulolítica secreta endoglucanases, com propriedades diferentes e a maioria demonstra pequena atividade na estrutura cristalina da celulose. De qualquer forma, algumas celulases de origem bacteriana

possuem mecanismos de hidrólise semelhantes aos descritos para as enzimas produzidas por fungos. Já foram caracterizadas algumas exoglucanases, mas apenas uma minoria atuou sinergicamente com a endoglucanase na hidrólise da estrutura cristalina da celulose (BÉGUIN, 1990), porém julga-se necessário mais estudos nesta área.

É de salientar que, segundo Lynd et al. (2002), existem mecanismos de controle da síntese de celulases, sendo que a produção é reprimida quando as concentrações de fonte de carbono metabolizáveis são elevadas nos organismos. Também se verifica, em vários sistemas que a síntese de celulases é induzida por um substrato como a celobiose, que é gerado quando a celulose está em baixas concentrações, resultado da atividade da celulase β -glucosidase associada à atividade da transglucosidase.

Destacam-se três grandes grupos de celulases que estão envolvidas no processo de hidrólise da celulose, as endoglucanases que agem de forma aleatória, clivando as ligações β -1,4-glucosídicas, dentro da molécula de celulose, as celobiohidrolases ou exoglucanases, que agem de forma progressiva em extremidades redutoras ou não redutoras da celulose, liberando a glicose e principalmente a celobiose como produtos e finalmente a β -glicosidase, enzima que hidrolisa a celobiose, originando como produto final unidades de glicose (FLORENCIO, 2011). Estas enzimas são encontradas em diferentes organismos, desde fungos, bactérias e até protozoários (LIMA et al., 2001).

Uma vasta diversidade de recursos de biomassa está disponível para a conversão em bioprodutos, como, constituintes de plantas, bioprodutos processados, material de origem marinha, subprodutos de origem animal e resíduos industriais.

A lignocelulose é o principal componente das plantas lenhosas, representa uma das mais importantes fontes de matéria renovável. As propriedades de seus componentes fazem dela um substrato de grande valor biotecnológico (MALBERBE et al., 2003).

Um dos resíduos verdes lignocelulósicos em maior abundância no Brasil é a casca de coco verde com a composição descrita anteriormente das fibras celulósicas. Podem ser obtidas do epicarpo e mesocarpo do fruto do coqueiro, o coco, e são caracterizadas por sua dureza, atribuída ao elevado teor de lignina, semelhante ao da madeira (CORRADINI, 2009). Segundo Bismark et al. (2001), o coco verde possui um teor de celulose em torno de 36-43 %, de lignina em torno de 41-45 % e de hemicelulose 0,15-0,25 %.

3.3 COMPOSTAGEM

É fato concreto, que a produção agrícola no Brasil gera toneladas de resíduos ao longo do ano, em particular, nas regiões tropicais, onde milhares de toneladas de casca de coco são descartadas todos os dias gerando um problema ambiental. O Brasil descarta até 6,7 milhões de toneladas de casca de coco por ano (GONÇALVES et al., 2014). Como é de conhecimento geral esse resíduo tem um tempo de degradação bastante longo, de aproximadamente oito anos, tornando-se um grave problema de saúde pública, assim como para o desenvolvimento sustentável, pois o seu descarte e sua destinação final normalmente inadequados e em completo desacordo com a Política Nacional de Resíduos, Lei Federal nº 12.305/2010. O problema existe especificamente nas áreas de alto consumo da água de coco que são sem dúvida as regiões do Nordeste do Brasil, pois contemplam os maiores produtores nacionais e onde se encontram a maioria das indústrias de extração de água de coco (BITENCOURT; PEDROTTI, 2008).

Na natureza, a degradação da matéria orgânica ocorre naturalmente e sem prazo e tempo definidos. De forma a tornar este bioprocessamento mais eficiente desenvolveu-se a técnica da compostagem, que tem por finalidade acelerar com qualidade a estabilização da matéria orgânica, estabelecendo condições ambientais e parâmetros definidos, a fim de obter um composto orgânico estável que poderá ser aplicado ao solo com a finalidade de melhorar suas características sem ocasionar riscos ao meio ambiente (COELHO, 2008).

A compostagem se apresenta no contexto dos resíduos sólidos como uma alternativa sustentável de tratamento dos resíduos orgânicos, além de representar uma forma de destinação ambientalmente correta, obtém-se um produto com capacidade de melhoramento do solo.

Segundo Fernandes e Silva (1996), a compostagem é praticada desde a História antiga e, até recentemente, de forma empírica. No entanto, somente a partir de 1920, com Albert Howar, o processo passou a ser pesquisado cientificamente e realizado de forma racional.

Segundo Haug (1993), o processo de compostagem é definido como a decomposição biológica e estabilização de substratos orgânicos, sob condições que permitam atingir temperaturas elevadas (60 a 75°C) resultantes do calor produzido biologicamente, originando um produto final estável, isento de agentes patogênicos e de sementes e que traz benefícios quando aplicados ao solo.

São inúmeras as definições descritas na literatura para compostagem, mas aquela que obtém maior aceitação foi definida por Sousa, (2008) como um processo de valorização de resíduos orgânicos, sólidos e semissólidos, esse processo de valorização é desempenhado por micro-organismos em condições adequadas, nomeadamente de oxigênio, humidade e

nutrientes. Durante a degradação dos resíduos orgânicos verifica-se um aumento da temperatura, associada à libertação de energia pelo processo (exotérmico) que origina um produto estabilizado, denominado de composto, produção de dióxido de Carbono (CO_2), água (H_2O) e libertação de substâncias minerais. O autor ainda acrescenta que se pretende que o composto esteja livre de patogênicos de forma a poder ser utilizado em diversas aplicações.

No processo de compostagem podem-se distinguir duas fases típicas de maior relevância, a fase de degradação ativa ou bioestabilização e a fase de maturação ou umificação, como se pode verificar através da representação na figura 2.

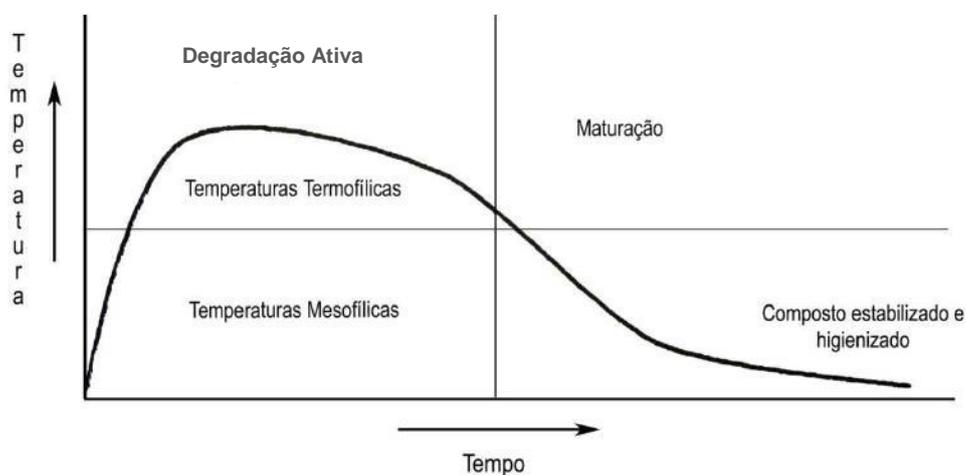


Figura 2. Fases do processo de compostagem.

Fonte: EPSTEIN, (1997).

Na fase ativa verifica-se a rápida e intensa biotransformação da matéria orgânica, onde se estabelecem temperaturas elevadas, resultantes do processo de degradação, realizado por micro-organismos, envolvendo processos exotérmicos. É nesta fase que ocorre libertação de energia na forma de calor, dióxido de carbono (CO_2) e vapor de água. Constata-se um elevado consumo de oxigênio (O_2) pelos micro-organismos e alterações facilmente visíveis na massa de resíduos em compostagem (SANTOS, 2007).

Na fase de maturação, constata-se uma progressiva diminuição da temperatura. É caracterizada pela perda de fitotoxicidade do material residual, onde a microbiota presente atinge um equilíbrio dinâmico obtendo-se a síntese de substâncias húmicas. Nesta fase podem-se realizar alguns testes simples para verificar o grau de maturação do composto (PROSAB, 1996).

Em relação ao complexo de micro-organismos presentes durante a compostagem, verifica-se a proliferação de vários grupos como, bactérias (actinomicetes) e, fungos,

dependendo do meio. Estes micro-organismos podem ser classificados segundo suas temperaturas ótimas de crescimento, sendo designados por psicrófilos (0 a 25 °C), mesófilos (12 a 45 °C) e termófilos (acima de 40 a 85 °C), (PROSAB, 1996). Vale salientar que estes intervalos não são estáticos, mas intervalos ótimos para a proliferação de determinado grupo de micro-organismos.

É do conhecimento geral que no início do processo de compostagem existe um período de latência, correspondendo à colonização da matéria orgânica a ser compostada pelos micro-organismos residentes. Em esta fase é característico um aumento da proliferação dos micro-organismos mesófilos, que degradam preferencialmente as fontes de carbono prontamente metabolizáveis e solúveis, como, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos ou polímeros de acesso fácil, o que provoca um aumento exponencial da temperatura da biomassa devido à libertação de calor, pela ação dos micro-organismos mesófilos. Este aumento de temperatura inibe o crescimento de mesófilos e provoca a proliferação de micro-organismos termófilos. Nesta etapa as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis já estariam exauridas, restando os polissacarídeos constituintes da biomassa, como a celulose, hemicelulose e lignina, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. O resultado deste processo é a degradação do material vegetal em polímeros menores e um aumento da temperatura (SANTOS, 2007).

À medida que as fontes de carbono são menores, ocorre a redução da atividade biológica e a redução da temperatura, permitindo a proliferação dos micro-organismos mesófilos novamente. Verifica-se que nesta fase o composto apresenta um odor mais agradável (PROSAB, 1996).

Vários métodos têm surgido com o objetivo de acelerar o processo de compostagem de resíduos sólidos orgânicos, muitos deles empregam cepas de várias espécies de *Bacillus*, bolores como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Myriodontium* e *Pleurotus* (MOLLA *et al.*, 2002), sejam termofílicos ou não, *Cellulomonas*, fixadores de nitrogênio como *Azotobacter* em culturas líquidas ou granulados (NEKLYUDOV *et al.* 2008). A patente brasileira (ROBERTO, L. S. PI9803631-9, 1998) indica que no processo são utilizadas várias composições de micro-organismos e nutrientes, sendo uma delas constituída de amônia, oxigênio, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* e micro-organismos como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Spirillum*, que são misturados aos diversos resíduos. São incorporados diversos elementos químicos de forma a equilibrar o balanço de massas e conseqüentemente, catalisar o bioprocessos, como óxido de manganês, uréia, sulfato de zinco, molibdato de sódio (FRANCISCO, 2015).

Outra patente brasileira (MOURA, 1994), faz referência a um biorreator específico ao qual é adicionado apenas oxigênio puro (94 %), acelerando desta forma a atividade dos micro-organismos oriundos naturalmente do processo e conseqüentemente uma diminuição do período de compostagem.

Vários estudos têm sido realizados para aperfeiçoar o processo de compostagem, através da introdução de inoculos compostos de micro-organismos, alguns deles modificados, assim como a melhoria da retenção de nitrogênio no composto final (FERNANDES, 2012).

A capacidade dos micro-organismos para processar a matéria orgânica depende da sua habilidade para produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato. Quanto mais complexo o substrato, mais amplo e complexo é o sistema enzimático requerido. Através da ação sinérgica dos micro-organismos, compostos orgânicos complexos são degradados em pequenas moléculas mais fáceis de serem hidrolisadas pela ação de um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos (TUOMELA et al., 2000).

A meta é melhorar a ação dos micro-organismos celulolíticos, através de emissão de luz visível e conseqüente estimulação do seu metabolismo celular de forma a obter uma catálise da degradação das fibras de coco verde.

3.4 PARÂMETROS QUE AFETAM O PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Vários parâmetros relacionam-se com o processo de compostagem influenciando o seu desenvolvimento e o produto final obtido, tais como: umidade, pH, temperatura, relação carbono nitrogênio (C/N), composição do resíduo, aeração, granulometria e micro-organismos inoculados. Estes parâmetros estão fortemente interligados de tal forma que a não otimização de um pode afetar o restante e, conseqüentemente, compromete a dinâmica de todo o processo.

3.4.1 AERAÇÃO

Durante o processo de compostagem, o desempenho de parâmetros físicos deve ser avaliado constantemente. A avaliação multivariada de parâmetros pode apontar para um ponto ótimo durante a biodegradação da biomassa, incluindo o estudo das variáveis envolvendo a composição do resíduo, a concentração e a produção de adenosina trifosfato (ATP), geração de calor, atividade enzimática e as taxas de evolução no consumo de oxigênio e na produção de dióxido de carbono (LIANG et al., 2003; GOMEZ et al., 2006; VIEIRA, 2013).

Sendo a compostagem um processo em que a microbiota presente utiliza o oxigênio para realizar a oxidação da matéria orgânica, a frequência de aeração deve ser estabelecida para garantir um aporte de O_2 adequado de forma a assegurar altas taxas de biodegradação, eliminação de patógenos e estabilização da matéria orgânica. No entanto, deve-se ter em atenção a frequência de aeração, pois quando em excesso pode provocar o resfriamento da leira de compostagem, reduzindo a atividade microbiana existente, colocando em causa o sucesso do processo de degradação (METCALF; EDY, 2003).

A maioria dos estudos realizados relatam uma concentração de oxigênio mínima de 5% para assegurar as condições de aerobiose do processo e uma faixa considerada ideal de concentração de O_2 de 5 % a 15 % (BERTH et al., 2007; HEBERTS et al., 2005). Quando existe escassez de oxigênio na leira de compostagem desenvolvem-se processos anaeróbios, que geralmente leva a acidificação do material, e o composto final será de baixa qualidade.

Segundo Ge et al. (2006), durante o processo de compostagem aeróbica, quanto maior for a exposição do material orgânico ao oxigênio, maior será a sua velocidade de decomposição. Através dos estudos realizados por Sundberg (2005), verificou-se que o aumento de taxas de arejamento no início do processo resultou em um aumento da atividade microbiana, pH e formou um composto final mais estável. Por outro lado, Rasapoor et al. (2008), compararam diferentes taxas de aeração no processo de compostagem e verificaram que taxas baixas e médias de aeração tiveram maiores impactos na obtenção de nitrogênio ideal no composto e propiciaram temperaturas ideais para o desenvolvimento do processo. Sundberg, (2005) conclui, que as taxas de aeração devem ser maiores para o arrefecimento do composto do que para o suprimento de oxigênio. Valente et al. (2009), constataram que a atividade microbiana do material orgânico em compostagem ocorre na presença de quantidades muito reduzidas de oxigênio.

Sendo assim, é fato que energia, nutrientes, e água são necessários para que ocorra desenvolvimento microbiano e em termos da compostagem aeróbica, faz-se necessário o arejamento das leiras o qual fornece o oxigênio necessário para o crescimento da sua microbiota e para arrefecer o composto. Vários processos de compostagem têm sido desenvolvidos para o tratamento de diferentes resíduos em diferentes condições físicas, químicas e biológicas. Os sistemas utilizados em grande escala incluem leiras naturalmente gaseificadas, sistemas de aeração forçada e sistemas de tuneis, enquanto os sistemas em pequena escala incluem compostagem estática ou rotativa (FRANCISCO, 2015; SUNDBERG, 2005).

3.4.1 TEMPERATURA

A temperatura constitui-se em um dos fatores mais indicativos da eficiência do processo de compostagem. Ela determina a velocidade dos processos microbiológicos envolvidos e exerce um papel seletivo na evolução e na sucessão das comunidades microbianas durante o período de humificação do material (MIYATAKE; IWABUCHI, 2005). É um indicativo do equilíbrio biológico de fácil monitoramento.

O aumento de temperatura gerado durante o processo de compostagem decorre da quebra de ligações de compostos de carbono orgânico pela atividade microbiana. Cerca de 50 % da energia liberada por estas reações exotérmicas é dissipada na forma de calor, sendo o restante utilizado pela biomassa para o seu metabolismo e crescimento (DIAZ et al., 2003). A evolução da curva de temperatura, nas células de compostagem é função do calor metabólico e da conservação de calor no interior do sistema (LIANG et al., 2003).

Segundo Fernandes e Silva (1996), se a leira de compostagem registrar temperaturas da ordem de 40 a 60 °C no segundo ou terceiro dia é sinal de que o ecossistema se encontra equilibrado, caso contrário, é sinal de que algum ou vários parâmetros físico-químicos não estão sendo respeitados, limitando assim a atividade microbiana.

A temperatura interna nas células de compostagem pode atingir valores acima de 70 °C, o que não é recomendado pois pode desenvolver o processo de volatilização de amônia, principalmente quando se trabalha com resíduos de baixa relação carbono/nitrogênio (C/N), podem insolubilizar proteínas hidrossolúveis como albumina e anular a ação de micro-organismos que não são termotolerantes e até mesmo causar a morte térmica (PIRES, 2013). A enzima celulase, por exemplo, necessária para a clivagem de celulose, diminui sua atividade em um meio cuja temperatura esteja acima de 65 °C.

Por outro lado, o aumento de temperatura durante a compostagem possibilita a eliminação dos agentes patogênicos, assim como larvas, insetos, ovos de parasitas, ervas daninhas e sementes de plantas, sendo que para a sanitização do material são necessárias temperaturas próximas de 55 °C por no mínimo três dias (SANCHUKI, 2011).

Alguns trabalhos realizados por Nagasaki et al. (1985), citados por Miyatake e Iwabuchi (2005), demonstraram uma maior atividade microbiana no período em que as temperaturas são mais elevadas, durante a compostagem, tendo demonstrado que a taxa específica de evolução de CO₂ de micro-organismos é mais elevada a 70 °C quando comparado com compostagem a 50°C e 60 °C. Relataram também que a temperatura para a taxa máxima de absorção de

oxigênio de um micro-organismo é mais elevada do que a temperatura ótima da sua taxa de crescimento.

3.4.2 UMIDADE

A umidade é um dos parâmetros fundamentais que influencia muitos outros fatores que envolvem o processo de compostagem. A cinética de degradação é afetada pela umidade através da difusão de oxigênio, potencial hídrico, atividade da água e das taxas de crescimento microbianas. Estabelecer uma relação entre o teor de umidade e os outros parâmetros físicos é um passo importante para a criação de ementas de compostagem ideais em função do resíduo a ser biodegradado (RICHARD et al., 2013).

Sendo a compostagem um processo biológico que atua na matéria orgânica, é imprescindível a presença de água para satisfazer as necessidades fisiológicas e metabólicas dos micro-organismos que são parte ativa do processo, assim como, prover um meio para o transporte através de difusão e translocação de nutrientes. Se o teor de umidade for demasiadamente baixo, os micro-organismos não exercerão uma biodegradação plena e o processo de compostagem não será bem sucedido (AGNEW; LEONARD, 2003).

Segundo Sundberg (2005), para os micro-organismos não há limite superior para o teor de água. De qualquer forma, para fins práticos, a umidade excessiva iria criar limitações de difusão de oxigênio nas propriedades físicas da mistura e o transporte de nutrientes e substâncias se tornaria difícil e demasiadamente oneroso (SANCHUKI, 2011). Esses problemas culminam com a queda da velocidade de degradação da matéria orgânica acompanhada pela emissão de odores desagradáveis, atração de insetos vetores e formação de chorume (OLIVEIRA et al., 2008).

Um teor de umidade considerado ótimo é aquele que permite uma decomposição microbiana do resíduo orgânico em uma velocidade considerada satisfatória para o processo de compostagem. A umidade considerada ideal para que se obtenha uma atividade microbiana máxima e conseqüentemente para o processo de compostagem é de 50 % a 60 % (GAJALAKSHMI; ABBASI, 2008; OLIVEIRA et al., 2008; TROIS & COUTH, 2012; PIRES, 2013).

É de extrema relevância a natureza do resíduo a ser compostado para que se estabeleça uma faixa do teor de umidade que condicione uma boa degradabilidade e velocidade do processo. Estudos executados por Manios (2004) apresentaram diferentes valores de umidade para cada tipo específico de resíduo, para compostagem de resíduos urbanos indicou um teor

de umidade ótimo de 55 % e 69 %, para resíduo doméstico fresco a faixa ótima de umidade situa-se entre 50 % a 60 % e a umidade ótima para a compostagem de resíduos de casca situa-se entre 60 % a 70 %.

Segundo Sundberg (2005), o equilíbrio entre a água e o oxigênio é complexo em um sistema de compostagem pelo fato de o gás remover a água do processo, visto que a mesma se evapora tornando praticamente impossível manter o mesmo teor de umidade por longos períodos de tempo, sendo a evaporação o principal meio de arrefecimento das células de compostagem. Sendo assim, existe uma relação direta entre o oxigênio fornecido no sistema e o teor de umidade.

3.4.3 GRANULOMETRIA

A matriz física do material orgânico a ser compostado é determinado pela relação área/volume em função do tamanho da partícula a ser processada. O material a processar deve propiciar um suporte estrutural e uma superfície de contato favorável, criando espaços que disponibilizem uma boa aeração do resíduo facultando a movimentação das partículas de oxigênio na biomassa e conseqüentemente a atividade microbiana aeróbica (VIEIRA, 2013).

A decomposição dá-se inicialmente junto da superfície das partículas, onde existe oxigênio difundido na película de água e onde o substrato seja acessível à comunidade microbiana e às suas enzimas extracelulares. Tendo as partículas pequenas uma superfície específica maior a sua decomposição será mais rápida, desde que se estabeleça as condições de arejamento essenciais. Segundo Oliveira et al., (2008) o ideal dos materiais a processar por compostagem é que não sejam superiores a 3 cm de diâmetro. Sabendo que materiais demasiadamente pequenos podem compactar a biomassa e dificultar a aeração necessária para a sua degradação, ou seja, desencadear um colapso estrutural e um alto teor de umidade (AGNEW; LEONARD, 2003; FRANCISCO, 2015).

As dimensões das partículas definem a porosidade, a disponibilidade de oxigênio, a velocidade de clivagem das ligações carbônicas do resíduo, a área de superfície de contato para a fixação da comunidade microbiana e a homogeneidade da biomassa (AGNEW; LEONARD, 2003; VIEIRA, 2013).

3.4.4 RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO (C/N)

Além dos parâmetros físicos, os parâmetros químicos envolvidos no processo de compostagem desempenham um papel fundamental nas diferentes fases da biodegradação.

O carbono e o nitrogênio são elementos essenciais para o crescimento e divisão dos micro-organismos, o primeiro por ser uma das principais fontes de energia e o segundo por ser um elemento essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos dos micro-organismos, revelando-se assim como um dos parâmetros químicos mais importantes e de grande relevância no processo de compostagem (SANCHUKI, 2011).

De acordo com Couth e Trois (2012); Francisco (2015); Oliveira et al., (2008); Richard et al. (2013) a relação de C/N igual a 30:1 é considerada adequada para iniciar o processo de compostagem, podendo ter uma pequena variação em função das características específicas dos resíduos, designadamente com a disponibilidade do carbono, muitas vezes encontrando-se formas mais resistentes à sua degradação biológica.

De uma forma geral, uma relação C/N inferior a trinta, o nitrogênio ficará em excesso e poderá ser perdido através da volatilização de gases como a amônia (NH_3) e óxido nítrico (N_2O) o que reduz o valor nutricional do composto orgânico, contribuindo para odores desagradáveis no processo de compostagem e para a emissão de gases de efeito estufa (OLIVEIRA et al., 2008). Por outro lado, no material com elevada relação de C/N, a baixa disponibilidade de nitrogênio vai restringir a estabilidade microbiana do resíduo em compostagem, limitando a síntese de proteínas e conseqüentemente o seu desenvolvimento (MANIOS, 2004).

Durante a compostagem deve-se ter bastante atenção às perdas de nitrogênio por volatilização, podendo ser um fator adicional para que ocorra chuvas ácidas, para além de reduzir a capacidade fertilizante do composto refletindo-se em uma perda económica no produto final. Vários são os fatores que afetam a sua volatilização durante a compostagem: disponibilidade de carbono, tamanho das partículas, teor de umidade e aeração (BARRINGTON, 2001).

Das abordagens possíveis para corrigir a elevada relação C/N é fornecer uma fonte de nitrogênio mineral, sendo a ureia e o nitrato de amônio as mais utilizadas devido à sua eficiência, para que se consiga manter uma intensa atividade respiratória (MANIOS, 2004). Segundo Gomez (1998), entre os materiais ricos em nitrogênio que se podem adicionar ao processo de compostagem para baixar a relação C/N com sucesso, nos resíduos de casca de

árvore, serragem e cavacos de madeira, estão o estrume ou os dejetos de porco, porém o mais frequente é a inclusão de lodo proveniente de estações de tratamento de esgoto.

3.4.5 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

No processo de compostagem o monitoramento do pH também é um parâmetro de relevância. No início do processo geralmente verifica-se um pH ácido, devendo-se ao material utilizado como matéria prima ser de natureza ácida (VALENTE et al., 2009). Nesta fase a acidez tende a aumentar devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos (SUNDBERG, SMARS & JONSSON, 2004). No entanto, a microbiota do processo também influencia os valores de pH durante o processamento da biomassa. Os micro-organismos digerem a matéria orgânica libertando-se ácidos que se acumulam e acidificam o meio, favorecendo o crescimento de fungos e a decomposição dos resíduos celulósicos (OLIVEIRA, et al., 2008). Sendo assim, a fase inicial da compostagem é considerada bastante dinâmica, verificando-se um aumento de temperatura rápido devido a ação dos micro-organismos existentes, variações dos valores de pH e degradação dos composto orgânicos de estrutura mais simples.

Com o desenvolvimento do processo de compostagem e da microbiota termófila verifica-se a hidrólise das proteínas e a liberação de amônia promovendo um aumento no pH da biomassa, para valores alcalinos entre 7,5 a 9,0 (FERNANDES; SILVA, 1996; FRANCISCO, 2015).

O pH é um parâmetro de interesse microbiológico, existindo faixas que podem inibir ou acelerar o desenvolvimento de uma espécie. O processo de compostagem pode ser desenvolvido sob uma ampla faixa de pH entre 4,5 e 9,5, uma vez que a microbiota em geral tem a sua atividade ideal nesta amplitude, pois a maioria das enzimas encontram-se ativas nesta faixa de pH, sendo que as ocorrências de valores extremos são ajustadas pelos próprios micro-organismos ativos no processo (ALMEIDA *et al.*, 2012). Valores de pH fora desse intervalo tendem a diminuir a velocidade de decomposição da matéria orgânica durante a compostagem, tornando o processo muito lento (SANCHUKI, 2011).

3.4.6 POPULAÇÃO MICROBIANA

É constatado uma organização complexa de organismos envolvidos em uma cadeia alimentar dentro do processo de compostagem. Nela cada grupo especializa-se e desenvolve-se numa atividade específica. Trabalham em um balanço populacional que se auto regula dentro do sistema, o que aumenta a eficiência do processo. Valente et al. (2009), evidenciam que o entendimento dos processos microbianos é importante para o conhecimento da ciclagem de nutrientes e da dinâmica da matéria orgânica, já que se sabe que a intensidade da atividade dos micro-organismos decompositores está intimamente ligada à velocidade da biodegradação.

O processo de compostagem é realizado por uma comunidade microbiana diversificada, tais como bactérias, actinomicetos e fungos, podendo estar também presentes protozoários e algas, sabendo que a diversidade da população microbiana depende das condições físico-químicas presentes durante o processo (SCHUCHARDT, 2005).

As comunidades microbianas desenvolvem-se durante as várias fases da compostagem, na primeira fase predominam as bactérias e os fungos mesófilos que são responsáveis pela quebra inicial da matéria orgânica de complexidade menor, o que gera a liberação de calor, na fase termófila os micro-organismos predominantes são os actinomicetos, coexistindo com outras bactérias e fungos termófilos. Após as temperaturas atingirem os 70° C, a biomassa retorna à fase mesófila de duração maior do que a primeira e com outras características físico-químicas devido ao consumo de açúcares e amido. A biota da fase final do processo é predominantemente constituída por protozoários, nematoides, formigas, vermes e uma grande diversidade de insetos (BRUNI, 2005; CARNEIRO, 2012).

Vários estudos têm sido realizados de forma a identificar as comunidades de micro-organismos presentes no início do processo de compostagem, Schloss et al. (2003), utilizaram métodos de biologia molecular revelando uma microbiota bastante diversificada, incluindo bactérias do ácido láctico, espécies do gênero *Bacillus*, actinomicetos e algumas bactérias Gram-negativas. Os mesmos autores ao monitorar experimentos de compostagem descobriram que sequências relacionadas com bactérias lácticas eram mais comuns durante as primeiras 60 horas do processo e sequências do gênero *Bacillus* são predominantes entre 72 e 96 horas. Constataram também que a temperatura aumentou nas primeiras 96 horas de forma constante, o pH caiu após 12 horas e aumentou após 60 horas. Relacionaram ainda que estas alterações estavam relacionadas com alterações das sequências genéticas do gênero *Bacillus* e o retorno posterior para as sequências típicas do gênero *Bacillus* de bactérias lácticas.

Wani e Shinde (1976) realizaram a inoculação com micro-organismos celulolíticos constatando uma catálise do processo de decomposição dos resíduos orgânicos verdes.

Sendo assim, o ideal é que se realize a seleção dos micro-organismos a inocular no processo, de acordo com a especificidade do material a processar, para que se obtenha um processo eficaz, viável e se obtenha um produto de qualidade.

3.5 CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO LASER E LED

A radiação laser é sem dúvida um símbolo do avanço tecnológico, tornou-se uma ferramenta importante nos mais diversos campos do conhecimento, como telecomunicações e na área da saúde. O laser vem promovendo uma verdadeira revolução nas diversas áreas da medicina, fisioterapia, odontologia, entre outras (CHAVANTES et al., 2009).

O termo laser é um acrônimo para “Light Amplification by emission of radiation” que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Esta radiação é do tipo eletromagnético não ionizante, é uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou invisível (SOUZA et al., 2010).

Os lasers apresentam algumas características especiais que os diferem das outras fontes de luz como a emissão de uma onda eletromagnética de um único comprimento de onda, conferindo uma cor específica a cada tipo de laser; em um equipamento de laser as ondas eletromagnéticas apresentam sincronia, ou seja, coerência; as ondas eletromagnéticas são emitidas em uma única direção e paralelas entre si, designando-se por colimação e por último em alguns equipamentos as ondas podem ser polarizadas (BAGNATO et al., 2005).

O comprimento de onda é um fator importante da interação do laser com a matéria, podendo variar desde o infravermelho distante até o ultravioleta. Tecidos biológicos são meios óticos complexos, e a propagação da luz no tecido alvo depende tanto da homogeneidade das estruturas histológicas quanto das propriedades óticas do meio. Tais fatores são determinados pela composição bioquímica, por estruturas moleculares e a condição fisiopatológica do tecido biológico. Essas interações e as composições óticas dos distintos tecidos determinam a distribuição de luz incidente dentro de tecidos, sendo relevante para a geração de qualquer resposta biológica e mais especificamente para o efeito terapêutico (PINHEIRO, 1998). Sendo assim, podemos concluir que cada comprimento de onda terá um tipo diferente de interação com o tecido alvo (BAGNATO, 2007).

Os lasers foram rapidamente introduzidos na medicina, particularmente na cirurgia, utilizando-se de suas propriedades fototérmicas e fotoablativas por serem de alta potência (BAXTER, 2003). Posteriormente foi possível observar efeitos não térmicos benéficos quando aplicado em baixa intensidade (LOW, 2001).

A terapia com LBP incide sobre as reações não térmicas da luz com o tecido ocasionando efeitos fotoquímicos, ou seja, radiações com baixa densidade de potência e baixa densidade de energia, não produz um aumento significativo de temperatura (KARU, 2010).

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

Recentemente, pode-se dizer, que teve início a terceira revolução na óptica com o desenvolvimento dos diodos emissores de luz -LEDs. De uma forma bastante simplificada o seu funcionamento baseia-se em junções p-n (positivo; negativo) que, quando energizado emite luz. O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica de energia é chamado - eletroluminescência (CORAZZA, 2005).

Os LEDs, cada vez mais, estão presentes no nosso cotidiano compondo painéis de computadores, leitores de CDs, controles remotos de televisão, telas de celular, lanternas, sistemas de iluminação em geral, entre outros (HODE, 2004).

Entre as características do LED constam a longa durabilidade, baixo custo, confiabilidade, não geração de calor, dimensões reduzidas, temperatura de cor, alta eficiência energética, isto é, praticamente toda a energia incrementada no LED é transformada em luz e apenas uma pequena fração é perdida na forma de calor, tendo ainda a vantagem de ser bastante sustentável, ou seja, de causar um impacto ambiental reduzido (DOURADO et al., 2011).

A luz emitida pelo LED é ausente de coerência e colimação (BAGNATO, 2002). Na coerência da luz devem-se distinguir dois aspectos essenciais: seu efeito físico e a interação desta luz com as moléculas ou tecidos. A absorção da luz de baixa intensidade pelo sistema biológico, em condições fisiológicas, é de natureza puramente não coerente, devido à taxa de excitação da decomposição da coerência em níveis de elevada magnitude em relação à taxa de fotoexcitação (KARU et al., 2010).

O LED emite luz através de emissão espontânea de radiação. Trata-se de uma fonte de luz monocromática, emitida em uma faixa espectral relativamente pequena, mas ainda é maior do que a do laser. A luz emitida pelas radiações LED vai do comprimento de onda do

ultravioleta ao visível e ao infravermelho, que vai dos 247 aos 1300 nanômetros (nm). As cores mais usadas são: Azul (λ 400-470 nm), Verde (λ 470-550 nm), Vermelho (λ 630-700 nm), Infravermelho (λ 700-1200 nm). Uma das diferenças da radiação LED, em comparação com o laser é a forma como a energia é liberada. Os LEDs não liberam energia suficiente para causar danos aos tecidos humanos e não oferece o mesmo risco de acidentes aos olhos que o laser. A terapia luminosa por luz visível e infravermelha é julgada como sendo de risco insignificante pela Administração de Medicamentos e Alimentos (FDA) e tem sido aprovada para uso em humanos. Dentre outras vantagens sobre o laser inclui-se a possibilidade de combinar comprimentos de onda de vários tamanhos. O LED dispersa a luz por uma superfície maior comparada com o laser e pode ser usada em grandes áreas, resultando em redução no tempo, especialmente benéfico quando se trata de tratamento (DOURADO et al., 2011).

A radiação LED é segura, não é térmica, nem tóxica e invasiva, e não há relato na literatura de efeitos colaterais, quando utilizada em organismos vivos. Porém, deve-se ter em atenção, quando se utiliza o LED pulsado em pacientes com epilepsia ou com fotofobia (BAROLET, 2008).

Desde os primórdios da humanidade que os benefícios da terapia luminosa são usados para o tratamento de diversas patologias da pele, sendo considerada uma das mais antigas modalidades terapêuticas (BAROLET, 2008). Verifica-se uma tendência, nos dias de hoje, em usar agentes terapêuticos que atuem positivamente nas variadas áreas da medicina, e uma das terapias recomendadas é o uso de fonte luminosa, como tem sido usado desde os tempos antigos. De qualquer forma, a utilização de diferentes fontes luminosas e protocolos têm indicado a necessidade de avaliação da eficácia (PINHEIRO et al., 2005).

De acordo com Barolet, (2008), o futuro parece induzir à terapia por fontes luminosas, em especial através da radiação LEDs com métodos inovadores como a fotoprofilaxia, fotopreparação e uso da fotoregulação.

3.6 BIOMODULAÇÃO

O efeito molecular, resultante de aplicações de energias de baixa potência ou intensidade em estruturas bioquímicas da célula, ocasionando normalização das funções celulares é o que designamos por fotobiomodulação. Devemos salientar que a fotobiomodulação só ocorre em organismos que não estejam em homeostase (CHAVANTES et al., 2009).

Ao irradiarmos um organismo vivo, introduzimos energia em um sistema biológico, que utiliza e transforma essa energia para seu consumo próprio. É importante salientar que a dose,

o comprimento de onda, a potência e a superfície irradiada são de extrema importância. A dose de irradiação ou densidade de energia é o parâmetro mais importante na terapia com o laser em baixa intensidade. A fluência tem seus limites mínimos e máximos. Se a dose for extremamente baixa, ou muito alta, não se obterá estimulação, mas sim bioinibição (BAGNATO et al., 2007).

Segundo Karu (1999), uma reação fotobiológica envolve a absorção de um específico comprimento de onda de luz por moléculas especializadas fotorreceptoras. Essas moléculas ao absorverem um determinado comprimento de onda, assumem um estado excitado eletronicamente nos processos moleculares primários que desencadeiam efeitos biológicos em determinadas circunstâncias.

A primeira pesquisadora a demonstrar o efeito fotobiológico do laser em baixa intensidade foi TINA KARU, em 1988, realizando experimentos *in vitro*, descreveu o mecanismo de ação, processo em cascata, do laser na faixa do visível e infravermelho. De acordo com Karu, (1989) o laser na faixa espectral do vermelho age na biorregulação de organelas da célula e na faixa do infravermelho, tem a sua ação no diferencial de potência da membrana citoplasmática. Ao irradiar uma célula no comprimento de onda visível, desencadeia uma reação fotoquímica localizada dentro da mitocôndria, mais especificamente na cadeia respiratória, através de uma reação de oxirredução, ocasionando o incremento ou a depleção da síntese de ATP. Por sua vez, quando a célula é irradiada na faixa do infravermelho, influi alteração no potencial da membrana, levando, ao incremento ou à interrupção na produção de ATP, dependendo da dose administrada. Segundo Smith (2005), com base no modelo de Karu, informa que o laser de baixa intensidade na faixa do infravermelho atua, sobretudo na bomba de sódio/potássio e nos canais de cálcio da membrana celular.

A fotobiomodulação pela luz vermelha ao infravermelho usando laser em baixa intensidade ou diodo emissor de luz tem se mostrado como acelerador no processo de cicatrização de feridas, melhorando a recuperação de lesão isquêmica cardíaca, e atenuando a degeneração de lesão do nervo óptico. Evidências indicam que os efeitos terapêuticos da luz vermelha e infravermelha resultam, em parte, de mecanismos de sinalização intracelular causados pela interação da luz infravermelha com o citocromo C oxidase da molécula do fotoceptor mitocondrial, com isso, propiciando relação entre as ações da luz vermelha e infravermelha no metabolismo oxidativo mitocondrial *in vitro* e *in vivo* (EELLS, 2004).

Segundo Karu (1999), apesar do LED emitir luz em uma banda espectral maior que o laser, afirma que não é necessário alta monocromaticidade da luz, e sim que ela apresente uma largura de banda dentro da faixa de absorção da molécula fotorreceptora. Vários estudos têm demonstrado que a fotoirradiação de baixa intensidade na faixa espectral do vermelho e

infravermelho próximo (λ 630-1000 nm), utilizando lasers ou LEDs, influencia diversos processos biológicos *in vitro e in vivo*, apresentando efeitos biomodulatórios positivos (KARU, 2003; LANZAFAME, 2004; SMITH, 2005).

3.6.1 BIOESTIMULAÇÃO

Nas últimas décadas, a terapia LBP ganhou uma atenção especial na Europa e Ásia no tratamento de vários processos patológicos. Através de vários estudos e experiências tem-se demonstrado que a irradiação LBP na região visível contribuem para a biomodulação do metabolismo celular (KARU, 2010).

Nos organismos animais existe uma função reguladora através de certos fotorreceptores, moléculas de variedade morfológica que se encontram distribuídas nas células, como flavoproteínas, porfirinas, citocromos, tirosinas, asparaginas, entre outras, capazes de absorver um fóton de um determinado comprimento de onda, chegando a provocar uma transformação na atividade funcional e metabólica da célula. Os fotorreceptores específicos interferem no metabolismo celular sem a necessidade de energia luminosa, mas se incidir sobre eles uma radiação com comprimento de onda específico, são capazes de absorver os fótons propiciando a alterações no metabolismo celular. Estes processos são definidos como de bioestimulação (KARU et al., 1984; CONLAN et al., 1996; KUJAWA et al., 2004). Já Mester, (1969) considerou o laser operando em baixa energia como sendo um bioestimulador e, por isso, encontramos na literatura o termo “laser de bioestimulação” utilizado para designar esse tipo de laser.

A luz laser visível induz a uma reação fotoquímica, ou seja, há uma direta ativação da síntese de enzimas (BOLTON, et al., 1995), e essa luz tem como primeiro alvo os lisossomos e as mitocôndrias das células.

As organelas não absorvem luz infravermelha, apenas as membranas apresentam resposta a estímulos desse tipo. As alterações no potencial de membrana causadas pela energia de fótons na faixa próxima do infravermelho induzem efeitos do tipo fotofísico e fotoelétrico, causando excitação de elétrons, vibração e rotação de partes da molécula ou rotação de moléculas como um todo, que se traduzem intracelularmente no incremento da síntese de ATP (COLLS, 1986).

O laser interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP, sobretudo notório quando a célula está em condições de estresse, ou seja, quando o tecido, órgão

ou célula tratado com laser está afetado por uma desordem funcional (KARU, 2003;; LUBART, et al., 1996,1997).

A fotobioestimulação caracteriza-se pela excitação de fluoróforos endógenos, tendo como um dos principais alvos a cadeia de citocromos (a-a₃ ou c) mitocondriais ou de membranas, utilizando-se normalmente, na irradiação do tecido, a radiação na região do vermelho e infravermelho (PEREIRA et al., 2014; LINS et al., 2010).

De acordo com Karu, (2003), a luz irradiante pelo efeito do laser sobre a célula é absorvida por componentes da cadeia respiratória que fazem a tradução do fotossinal. Nesse momento ocorre o aumento da força protomotiva, do gradiente de prótons e do potencial elétrico da membrana. Existe um aumento da concentração de ATP e do potencial redox (oxirredução), ocorrendo posteriormente oxidação de NADH mitocondriais, causando mudança no NADH citoplasmático. Sendo assim, enzimas dos canais de sódio da membrana elevam a relação entre sódio e hidrogênio, com o aumento de sódio, potássio e ATPase intracelular, ocasionando a diminuição da concentração de íons hidrogênio. Isso acarreta modificações na concentração de cálcio intracelular e de AMPcíclico, que são sinais para a síntese de DNA e RNA, por ativação de síntese de ácidos nucleicos e proteínas.

Algumas hipóteses relacionadas com as reações primárias da ação da luz nos fotorreceptores vão de encontro ao citado anteriormente. As mais prováveis seriam:

- a fotoexcitação de certos cromóforos na molécula de citocromo c oxidase, e sua participação essencial na regulação das vias metabólicas, o que se traduz em uma influência no estado de redox e conseqüentemente em uma taxa acentuada de fluxo de elétrons na molécula;
- feixes de espectro de luz vermelha fotoabsorvidos por porfirinas e flavoporfirinas são responsáveis pela geração de oxigênio simples (O₂), portanto estimulam a síntese de RNA e DNA;
- em condições normais na cadeia respiratória a redução de molécula de água produzirá o anión oxigênio (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este aumento na concentração transitória de O₂ e subsequente aumento na concentração de H₂O₂ poderá, então, resultar em resposta secundária como o aumento na concentração intracelular do cátion cálcio (Ca²⁺), alcalinização celular, ativação de Ca²⁺, cátion sódio (Na²⁺), cátion hidrogênio (H⁺) e alterações nas trocas de Na⁺ e Ca²⁺;

- em condições fisiológicas, a atividade do citocromo c oxidase é regulada pelo óxido nítrico (NO) que se une ao centro binuclear do citocromo. O NO compete com o O₂, como um aceptor de elétrons, no processo de redução do citocromo. Existe a hipótese de que a irradiação ative o fluxo de elétrons na molécula de citocromo C oxidase e possa reverter parcialmente o controle do NO sobre o citocromo e com isso aumentar a concentração de O₂ (KARU, 2003).

Sendo assim, podemos concluir que a fotoexcitação induz a mudanças no citocromo c oxidase e nos componentes flavínicos da cadeia NADH- desidrogenase. Por sua vez essas alterações podem proporcionar outras mudanças do potencial redox e modulação de reações bioquímicas na cadeia de amplificação e transdução do sinal fotônico ou cascata de sinalização celular, definindo o mecanismo de reações secundárias a nível celular (KARU, 1999).

Por essa razão podemos concluir que a radiação monocromática das luzes no visível pode ativar o processamento metabólico celular e elevar sua proliferação. Assim os efeitos bioestimulativos são causados por radiação de baixa energia e de curto espaço de tempo (CHAVANTES et al., 2009).

O espectro de ação eletromagnético da luz emitida pelo LED é mais amplo em relação ao do laser. O laser é caracterizado por uma maior concentração da fluência em uma pequena faixa espectral. Enquanto que no LED, a densidade de energia está distribuída em uma banda eletromagnética maior, podendo interagir com um maior grupo de fotorreceptores específicos. Apesar de essa propriedade diferenciar as radiações terapêuticas, há similar concentração de energia na área de ação de ambas, porém com distribuição diferenciada. Sendo assim, a densidade de energia total difere nas luzes incoerentes e coerentes, visto que existe uma menor energia por faixa espectral para o LED em relação ao laser. Mesmo diante dessas diferenças na distribuição da energia, pode-se analisar que há uma ampla janela biológica de absorção da luz nos tecidos biológicos diante da aplicação dessas radiações terapêuticas, permitindo a ação biomoduladora nos respectivos fotorreceptores (DACOSTA et al., 2003).

Através da análise de várias publicações, conclui-se que os resultados clínicos dos lasers apresentam índices terapêuticos, bastante semelhantes à dos LEDs, em relação à bioestimulação. A propriedade coerente da luz laser não tem continuidade quando o raio interage com um tecido, portanto não penetram mais profundamente que a luz LED (CHAVANTES et al., 2009). Experimentos desenvolvidos comparando a luz coerente dos lasers e não coerente dos LEDs, com o mesmo comprimento de onda, intensidade e tempo de irradiação, proporcionaram o mesmo efeito biológico. O uso bem sucedido de LEDs em várias áreas da prática clínica têm vindo a confirmar esta conclusão (YU et al., 2004).

3.7 EFEITO DA LUZ EM MICRO-ORGANISMOS

A ação da luz como agente antimicrobiano é utilizado nas diversas áreas do conhecimento, o seu efeito germicida é baseado na combinação do aquecimento da energia solar térmica radiação UV e luz, demonstrando a sua eficácia para a eliminação de agentes patogênicos (MCGUIGAN et al., 2012). Sendo assim, os efeitos da luz sobre células isoladas têm sido reportados por diferentes autores ao longo do tempo, mesmo antes da existência de aparelhos capazes de emitir luz, como laser e LED. Contudo, pode-se observar, em estudos in vitro, que fatores como comprimento de onda, dose de energia, espécie irradiada, tipo de cultura e cromóforos alvo podem influenciar e diferenciar as respostas biológicas (ENWEMEKA et al., 2009; PINHEIRO et al., 2002; LUBART et al., 2011; BASSO et al., 2011; KARU; KOLYAKOV, 2005).

Pesquisas indicam a luz ultravioleta (UV) e azul (405 nm a 470 nm) como um desencadeador de processos antimicrobianos, sendo a luz UV capaz de interagir com os ácidos nucleicos, principalmente com o DNA formando pontes de pirimidina que culminam em morte celular (ENWEMEKA et al., 2009). A luz azul além de apresentar potencial efeito sobre o DNA pode apresentar um mecanismo distinto, caracterizado pela fotoativação das porfinas, moléculas que podem apresentar-se como fotoceptoras liberando, por sua vez, espécies reativas que interagem com a membrana celular oxidando-a e levando o micro-organismo à morte (ENWEMEKA et al., 2009; LUBARTE et al., 2011).

Baseando-se nas possíveis vias de ação da luz azul, Enwemeka et al. em 2008, e Bumah et al. 2013, evidenciaram a possibilidade do controle microbiano utilizando o espectro azul em células bacterianas in vitro, observando uma ação antimicrobiana em cepas padrão e em cepas resistentes aos antibióticos utilizados como métodos de escolha para o controle dos patógenos estudados, sugerindo que um efeito bactericida semelhante pode ser alcançado em casos de infecções cutâneas humanas.

Por outro lado, a luz vermelha e infravermelha atua em processos bioestimulatórios, sendo absorvida por biomoléculas intracelulares e desenvolvendo uma série de reações em cascata que culminam com a síntese de ATP (KARU, 2010; ALMEIDA et al., 2001). Um dos possíveis mecanismos envolvidos é a ativação do citocromo c oxidase, como um dos fotoceptores responsáveis pela absorção da radiação, elemento chave do processo metabólico da fosforilação oxidativa, desencadeando, em uma primeira fase, a aceleração da transferência de elétrons em razão das alterações determinadas pela fotoexcitação, dos seus centros hemes, sítios de cobre (Cu_A e Cu_B) (KARU; KOLYAKOV, 2005; DIAS; 2009).

Experimentos *in vitro* revelaram que a principal resposta celular para a biomodulação laser induzida ocorre nas variações dos comprimentos de onda entre 635 nm e 805 nm (CHAVANTES, 2003). Em um estudo realizado por Almeida et al. (2001), com fibroplastos de gengiva humana, revelou que a dose administrada de $2\text{J}/\text{cm}^2$ acelerou o crescimento de fibroplastos que estavam em déficit nutricional parcial em todos os grupos estudados. A proliferação celular foi evidenciada tanto para o comprimento visível ($\lambda 670$ e $\lambda 692$ nm) como no vermelho próximo ($\lambda 780$ e $\lambda 786$ nm).

Embora alguns estudos comprovem o efeito de bioestimulação bacteriana (principalmente de cepas *Escherichia coli*) do laser, permanece ainda o paradoxo de estudos que verificaram o efeito bactericida e/ou bacteriostático do laser. Nussbaum et al. (2002), ao irradiar com 660 nm *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*, depararam-se com efeitos marginais ($p = 0,07$) no crescimento celular, com tendência geral de diminuir o crescimento. Porém, em outros comprimentos de onda ($\lambda 630$ e 810 nm) houve um comprovado aumento do crescimento celular. Por outro lado, com o comprimento de onda de 905 nm o crescimento não foi significativo. Os mesmos relatam que, sobre o *Staphylococcus aureus*, não houve efeito geral no crescimento.

Ao avaliar o efeito da luz vermelha em outros estudos onde a radiação laser foi utilizada em culturas planctônicas de micro-organismos, tais como os apresentados por Oliveira et al. (2015), Sampaio et al. (2015), e Monteiro et al. (2015), não foi possível observar diferenças significantes entre o controle e os grupos de micro-organismos irradiados com doses energéticas de até $12\text{J}/\text{cm}^2$, contrariando os dados apresentados por Nussbaum et al. (2002).

O efeito antimicrobiano da luz vermelha torna-se mais evidente e menos controverso quando associado a cromóforos específicos, tal como a fenotiazina. Por isso, é possível observar os efeitos letais em bactérias coradas com este composto e posteriormente irradiadas com a luz vermelha, mesmo com baixas concentrações de fenotiazina ($12.5\mu\text{g}/\text{mL}$) (OLIVEIRA et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PESQUISA

O procedimento laboratorial deste trabalho foi didaticamente dividido em duas etapas distintas: estudo do efeito da aplicação de irradiação LBP ou LED no metabolismo dos micro-organismos sob a privação nutricional; avaliação da capacidade do consórcio ativado por radiação Laser ou LED, de catalisar o bioprocessamento de compostagem. Para uma melhor explicação e compreensão deste trabalho apresentamos os pontos de maior relevância em fluxograma (figura 3).

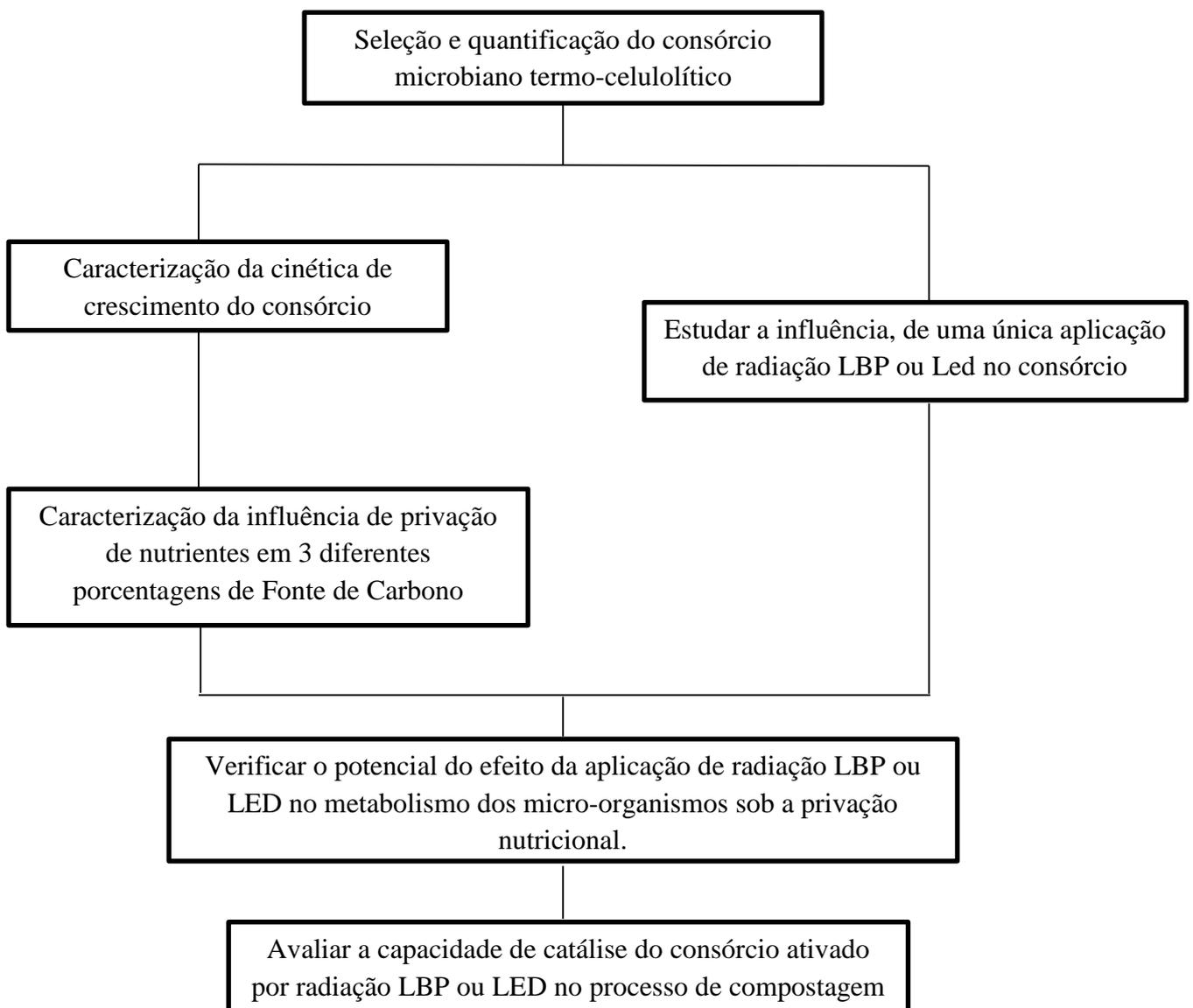


Figura 3. Fluxograma descrevendo a sequência experimental adotada neste trabalho.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em diferentes pontos de várias profundidades na leira de compostagem durante a fase de degradação ativa do processo com temperaturas na ordem dos 65-70 °C. Retiramos 30 alíquotas em pontos diferenciados, perfazendo 100 g, sendo acondicionados em recipiente plástico previamente esterilizado e transportadas em ambiente devidamente refrigerado (4 °C) diretamente para o laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos, da Universidade Federal da Bahia – UFBA.

4.3 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS TERMO – CELULOLÍTICOS

A amostra foi cuidadosamente submetida à extração celular em solução salina (0,85 %) estéril com Tween 80 (0,01 %), à temperatura de 60 °C, durante 2 h em mesa agitadora (Innova 4080-New Brunswick Scientific) a 100 rpm. Obtendo-se assim a diluição 10^{-1} .

Posteriormente, foram realizadas as diluições decimais seriadas, em triplicata, para a realização da técnica do número mais provável (NMP). Obtendo-se a diluição 10^{-2} , retirando-se 1 mL do sobrenadante, oriundo do processo de extração, e cultivado em 9 mL de meio de cultura sintético (tabela 1), contido em tubo de ensaio com tira de papel de filtro (Whatman nº1, previamente cortada na medida de 1cm x 6cm), como fonte de carbono, e assim sucessivamente obtendo as diversas diluições seriadas. Os tubos foram incubados à temperatura de 60 °C por cinco dias.

A identificação do consórcio com capacidades de degradação da celulose foi baseada na análise visual da degradação das tiras de papel de filtro.

Tabela 1 – Meio sintético.

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

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIOLÓGICO EM MEIO MINERAL

Para obtenção da cinética de crescimento do consórcio termo – celulolítico selecionado, foram inoculados 25 mL do consórcio, em Erlenmeyer, contendo 250 mL de meio de cultura mineral descrito por Czapek (tabela 2) tendo como única fonte de carbono o carboximetilcelulose (CMC) e colocado em agitação de 100 rpm a 60°C.

Tabela 2 - Meio mineral Czapek.

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

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

Para determinação da cinética, acompanhamos o crescimento do consórcio durante 72 horas, retirando amostras de quatro em quatro horas, com o objetivo de quantificarmos o número de células em cada amostra, fez-se uso do método de contagem direta da coloração fluorocromática de micro-organismos com o laranja de acridina, utilizando o microscópio de fluorescência (Olympus BX 51, lente U- TVO.5XC-3). Foi também observado a morfologia e organização dos micro-organismos.

A utilização da coloração fluorocromática de micro-organismos através do laranja de acridina foi descrita pela primeira vez por STRUGGER e HILBRICH em 1942. Este foi o início de uma técnica de sucesso, sendo hoje em dia muito utilizada para exames do solo e de água relativamente ao teor microbiano. O laranja de acridina é um corante fluorocromático que se liga aos ácidos nucleicos das bactérias e de outras células (KASTEN, 1967). Através do efeito da luz UV, o laranja de acridina colora de laranja o RNA e o DNA monofilamentar, enquanto que o DNA bifilamentar aparece verde. Devido a esta propriedade tornou-se um método bastante viável de examinar o teor microbiano existentes em uma amostra.

Para quantificar o teor celular em cada um dos pontos analisados, retiramos 1 mL de amostra em triplicata, e submetemos à centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, o pellet foi lavado com solução de PBS estéril (três vezes) e ressuspendido com corante de laranja de acridina, em ambiente ausente de luz, para que este não perdesse as suas propriedades

fluorocromáticas. Após 10 minutos foram retiradas alíquotas de 10 µl e preparadas as lâminas para visualização em microscópio.

Foram fotografados 20 campos de cada amostra, realizadas as contagens e aplicada a seguinte fórmula:

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

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

N = número de células contadas

A = área da lamínula

d = fator de diluição

V_f = volume da amostra

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

4.5 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE UMA ÚNICA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO LBP OU LED, NO CONSÓRCIO MICROBIANO

Neste experimento foi testada a influência da irradiação do consórcio microbiano com LBP ou LED e observadas as possíveis alterações provocadas na cinética de crescimento no consórcio termo - celulolítico em estudo.

As amostras foram irradiadas com aparelho de laser marca Twin flex – Mmoptics São Carlos, SP, Brasil (figura 4) e de LED com protótipo da MMoptics, com os parâmetros de emissão de luz referenciados na tabela 3, utilizando placas de petri. Foi também utilizada uma amostra como controle sem sofrer qualquer tipo de irradiação, para servir de método de comparação.

Tabela 3 - Parâmetros de emissão de luz utilizados no estudo de uma única emissão.

Parâmetros	Laser	LED
Comprimento de onda (nm)	660	632±2
Modo	Contínuo	Contínuo
Tamanho do spot (mm ²)	0,5	4
Potência (mW)	40	145±5
Tempo de exposição (s)	60	40
Densidade de energia (J/cm ²)	12	12

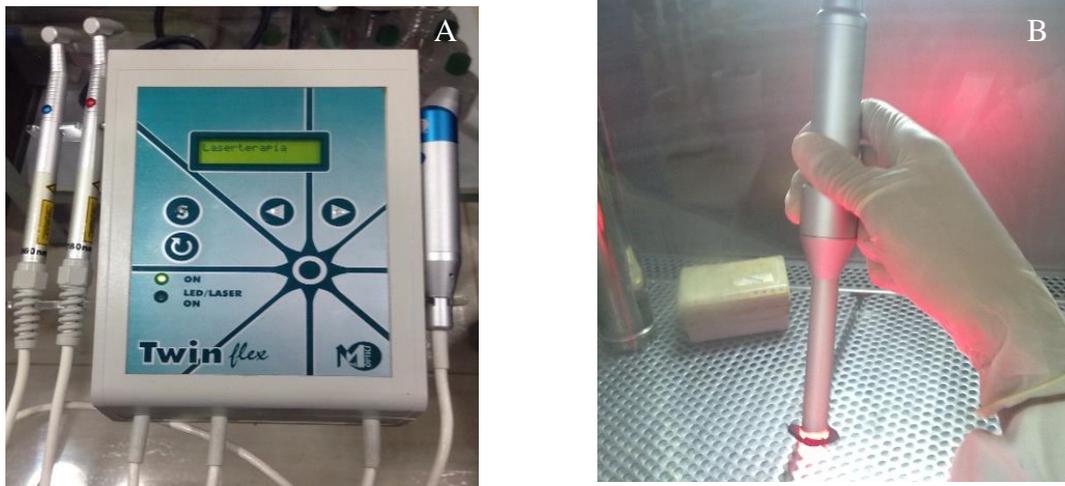


Figura 4. Aparelhos utilizados para emissão de luz. (A) Aparelho de LBP - Twin flex - Mmoptics; (B) Aparelho de LED - protótipo da MMOptics.

Depois de ser efetuado o procedimento de irradiação do consórcio microbiano, inoculou-se em meio de cultura mineral (tabela 2) e em seguida incubou-se à temperatura de 60 °C sob agitação de 100 rpm, retirando amostras em triplicata ao longo do tempo, para realizar a quantificação celular afim de caracterizar suas cinéticas de crescimento. Como referenciado anteriormente a amostra controle, não foi irradiada, mas todo o seu processamento foi exatamente análogo à das amostras que receberam a emissão de luz.

Foi realizada a contagem celular direta pelo laranja de acridina, coletando as amostras ao longo de 72 horas, nos tempos: 4, 8, 12, 18, 20, 24, 48 e 72 horas de incubação, para sua quantificação, bem como a observação da morfologia e organização dos micro-organismos. A metodologia foi similar à descrita na caracterização da cinética de crescimento do consórcio microbiano deste trabalho.

Os resultados foram tratados através do método estatístico de análise de variância simples (ANOVA), com o teste de Tukey, com 95 % de confiança, programa Minitab 14.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE FONTE DE CARBONO

Foi criada uma desordem funcional no consórcio, através de concentrações diferentes de fonte de carbono (CMC) até à privação total de nutriente, para que fosse avaliado o comportamento do consórcio microbiano em condições de estresse. O objetivo foi caracterizar

o comportamento das cinéticas de crescimento perante estas condições, de forma obter os dados necessário para determinar um protocolo de irradiação por Laser de baixa intensidade e LED que melhor atendessem o objetivo deste trabalho.

Sendo assim, retiraram-se alíquotas de 10 mL, ao final de 44 horas de crescimento (consórcio estava na fase estacionária), centrifugou-se a 10.000 rpm durante 10 minutos e lavou-se com solução de PBS, por duas vezes. Posteriormente foram inoculadas em solução salina (0,85 %) com diferentes porcentagens de carboximetilcelulose, 0,5 %, 0,25 % e 0 % e retiradas alíquotas de 1 mL de cada amostra em triplicata, de 4 em 4h, para quantificar o número de células presente pelo método de contagem direta com laranja de acridina, como descrito anteriormente (pagina 46 e 47).

4.7 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO DA APLICAÇÃO DE LUZ LBP OU LED NO CONSÓRCIO MICROBIANO

Com o objetivo de determinar o efeito da irradiação LBP ou LED no metabolismo celular do consórcio termo-celulolítico, ou seja, de verificar se a radiação emitida seria passível de desenvolver um processo de bioestimulação nos micro-organismos em estudo, inoculou-se o consórcio em meio de cultura mineral (tabela 2), com o CMC como única fonte de carbono e incubou-se em mesa de agitação à temperatura de 60 °C a 100 rpm, durante 36 horas. No início da fase estacionária, o consórcio foi submetido a oito horas de privação total de nutrientes, em solução salina (NaCl) 0,85 %, à temperatura de 60 °C, sob agitação de 100 rpm.

Esta redução nutricional estimula o estresse na cultura microbiana e assim torna-se mais fácil de avaliar os possíveis efeitos advindos da emissão da radiação LBP ou da radiação LED emitida. Realizaram-se seis irradiações com intervalos de tempo de 12 horas, tendo sido efetuada a primeira aplicação ao final de 8 horas de privação de nutriente, sendo a cultura mantida em solução salina a 60 °C e a 100rpm, para aplicação das irradiações seguintes. Sendo assim, a última radiação emitida foi aplicada quando as culturas se encontravam com 68 horas de privação de nutrientes.

Foram testadas cinco densidades de energia para cada uma das fontes de luz estudadas, 5J/cm², 10J/cm², 13J/cm², 15J/cm² e 20 J/cm². Os aparelhos emissores de radiação utilizados, assim como, os parâmetros de luz emitidos estão descritos na seção 4.5 deste trabalho.

A cultura foi submetida à radiação em placa petri de vidro em câmara de fluxo laminar (figura 5). Os tempos de irradiação de cada aplicação laser e LED nas diferentes densidades de energia estão explanados na tabela 4.

Tabela 4 - Tempo de exposição da emissão das radiações nas diferentes densidades de energia.

Densidade de energia (J/cm²)	Laser	LED
	Tempo Exposição (s)	Tempo Exposição (s)
5	120	17
10	240	34
13	270	44
15	380	51
20	480	68

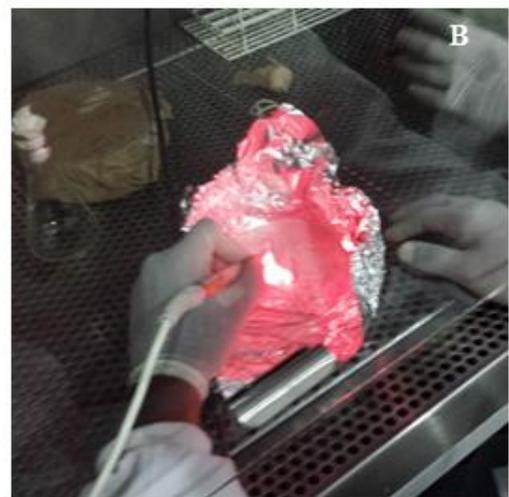
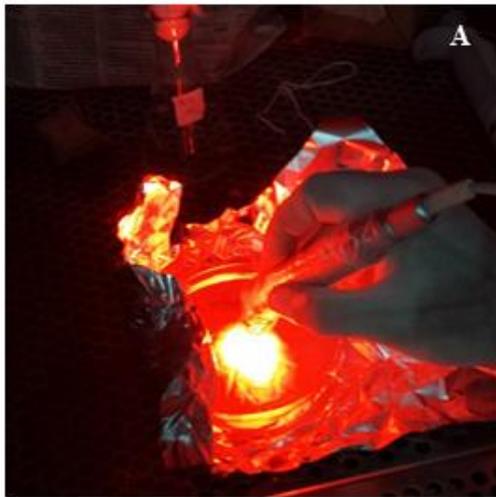


Figura 5. Irradiação de amostras em câmara de fluxo laminar. (A) Irradiação por LED. (B) Irradiação por LBP.

Como pretendeu-se visualizar a possível fotobioestimulação, ou seja, quantificar o número de células viáveis presentes em cada amostra submetida à radiação, realizou-se as diluições seriadas e inoculou-se 100 µl em cada placa de petri com meio de cultura agar nutriente, diluído dez vezes para que não ocorresse choque nutricional. Cada amostra foi coletada doze horas após ser submetida à respectiva radiação. A quantificação do número de colônias foi realizada através do aparelho contador de colônias em placas de petri, após 48h de incubação em estufa (TE – 392/I Tecinial) a 50 °C.

4.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO CONSÓRCIO ATIVADO POR LBP OU LED, DE CATALISAR O PROCESSO DE COMPOSTAGEM

4.8.1. LOCAL DE PESQUISA

Os experimentos de compostagem foram efetivados em um alpendre construído no Instituto de Ciências e Saúde (ICS) e todo o seu monitoramento e determinações laboratoriais realizado no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos no Departamento de Ciências de Biointeração da UFBA, com o apoio do Laboratório de Microbiologia do Centro de Biofotônica da FOUFBA.

4.8.2. MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada para o processo de compostagem foi a casca de coco verde, tendo sido coletadas as amostras junto de uma unidade de processamento de água de coco (Coco Mania Delevery), localizada em São Cristóvão – Salvador. O material coletado foi selecionado através do seu aspecto, tamanho, lote e sem nenhum indicio de putrefação e que não tivesse atingido o estado de maturação.

4.8.3. PROCESSAMENTO E CORREÇÃO NUTRICIONAL DO RESÍDUO

A matéria-prima selecionada foi processada pelo triturador de coco (Trapp TRC 40 - figura 6A) por duas vezes consecutivas de modo a obter fragmentos uniformes de menor tamanho, posteriormente o resíduo foi mensurado e efetivada a correção nutricional de forma a otimizar as condições para o desenvolvimento microbiano. A complementação nutricional utilizada foi de acordo com os estudos desenvolvidos por Francisco (2015), à base de minerais, usando calcário dolomítico ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$) e fosfato de rocha [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{OH}, \text{Cl})$], na proporção 0,64 % e 3 % do peso total do resíduo. Também foi ajustada a relação C/N em cada uma das leiras de compostagem mediante a complementação com 0,83 % de ureia, adicionada de forma fracionada, 50% no início do processo, 25 % após 24 horas e 25 % após 48 horas. Os minerais foram diluídos em água destilada e adicionados ao resíduo sob a forma de spray.

Posteriormente a biomassa foi devidamente misturada para que os compostos adicionados ficassem distribuídos homogeneamente no material a compostar.



Figura 6. Processamento da matéria prima. (A) Máquina de trituração do resíduo (B) Resíduo depois de triturado.

4.8.4. EXPERIMENTO DE COMPOSTAGEM

O experimento de compostagem foi realizado no inverno, início do mês de julho, período com elevado índice de pluviosidade, tendo a duração de 12 dias.

O projeto consistiu na elaboração de três células de compostagem, cada uma delas formadas por 300 Kg de resíduos de casca de coco verde, de configuração geométrica piramidal 1,0 m de base por 0,95 m de altura, permitindo uma aeração mais acessível de forma a evitar a formação de ilhas de anaerobiose e consequente putrefação. A complementação nutricional foi igual em todas elas tendo como diferencial o inoculo adicionado para catalisar o bioprocessamento.

Adicionou-se 35 mL (11,6 %) de inoculo em cada uma das leiras, sendo a leira controle (leira 1) inoculada com o consórcio termo-celulolítico sem qualquer exposição à emissão de luz visível, e as demais o inoculo adicionado (consórcio termo-celulolítico) foi submetido a radiações no espectro visível, com luz LED (leira 2) e LBP (leira 3), de densidade energética de 13 J/cm², de acordo com protocolo utilizado na seção 4.7 (primeiro e segundo parágrafo). Os parâmetros de emissão de luz utilizados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de emissão de luz utilizados no inoculo para as leiras.

Parâmetros	Laser	LED
Comprimento de onda (nm)	660	632±2
Modo	Contínuo	Contínuo
Tamanho do spot (mm ²)	0,5	4
Potência (mW)	40	145±5
Tempo de exposição (s)	270	44
Densidade de energia (J/cm ²)	13	13

4.8.5. MONITORAMENTO DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Para monitorar o processo de compostagem foram executadas análises físico-químicas e microbiológicas com a finalidade de caracterizar os resíduos em compostagem e acompanhar o desenvolvimento da comunidade microbiana celulolítica e nitrificante e o comportamento das variáveis físico-químicas (temperatura, umidade, aeração e pH) diante das mudanças de composição e de estado dos resíduos ao longo do processo. Os parâmetros foram monitorados periodicamente a cada 24 horas.

A aeração interna das leiras de compostagem foi determinada através do Oxímetro da marca MSA ALTAIR 02 PRO.

Para determinação dos valores diários de pH, retirou-se cinco gramas do material em compostagem de cada leira e colocou-se em um tubo de falcon, adicionando-se 20 mL de água destilada, homogeneizando-se por cerca de um minuto no agitador mecânico para posterior aferição no pHmetro, Corning pH meter 430.

Para controle das temperaturas médias diárias do composto aferiu-se a temperatura introduzindo o termômetro em três pontos distintos, no centro e nas extremidades de cada uma das leiras, durante cerca de cinco minutos, registrando-se seus valores.

A temperatura ambiente foi também registrada, por meio de termohigrômetro, no local onde estavam dispostas as células de compostagem.

Os dados obtidos de temperatura interna ao longo do tempo, de cada uma das leiras, foram tratados através do método estatístico de análise de variância simples (ANOVA), com o teste de Tukey, com 95 % de confiança, sendo considerado como resultado estatisticamente significativo, quando se obtém um $p < 0,05$.

A determinação diária da umidade interna de cada leira foi realizada pelo método gravimétrico tomando como base a perda de massa da amostra por dessecação até peso constante, de acordo com Amoedo & Muradian (2001). Sendo assim, das amostras coletadas diariamente foram pesadas cinco g em placa de porcelana e secas em estufa a 105 °C por três horas, as amostras foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente. Posteriormente, as operações de secagem, resfriamento e pesagem foram repetidas até se obter um peso constante da amostra.

O teor de umidade foi determinado usando a seguinte expressão matemática:

$100 \times N / P$, onde:

N – teor de água perdida na amostra; P – peso da amostra.

4.8.5.1. QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO GÊNERO *Nitrosomonas*

A quantificação das *Nitrosomonas* foi determinada pelo número mais provável (NMP), obedecendo ao método empregado na análise de solo por Alexander & Clark (1982) citado por Delgado (2009).

Previamente, preparou-se o meio amônia-carbonato de cálcio (tabela 6) e esterilizado por autoclave a 121 °C sendo o sulfato de amônio esterilizado por filtração e misturado assepticamente com os restantes reagentes. Concomitantemente foi preparado o reagente Griess – Ilosvay de acordo como descrito por Delgado (2009).

Tabela 6 - Meio amônia-carbonato de cálcio.

<i>Componentes</i>	<i>Unidades</i>	<i>Concentração</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	0,302
MgSO ₄ · 7H ₂ O	g/l	0,3
CaCO ₃	g/l	3,33
NaCl	g/l	0,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	g/l	0,03
K ₂ HPO ₄	g/l	1,0

Foram coletadas amostras de 24 em 24 horas, com o objetivo de acompanhar o número de *Nitrosomonas* presentes, ao longo do processo de compostagem, avaliando-se assim, a produção de nitrito através da oxidação da amônia. Coletou-se 25 g de amostra de resíduo em compostagem, proveniente de vários pontos da leira, em saco Stomacher contendo 225 mL de solução tampão fosfato salino (PBS), sendo homogeneizado durante 120 s (vortex Genie 2). Em seguida foram realizadas diluições decimais sucessivas em PBS, iniciando-se com a diluição 10⁻², considerando-se que a amostra já estava na diluição 10⁻¹, até obter-se a diluição 10⁻¹⁰. Transferiu-se de cada diluição um mL de inoculo para os tubos de ensaio contendo nove mL de meio amônia-carbonato de cálcio, em triplicata. Os diversos tubos de ensaio foram incubados a 50°C por um período de sete dias.

Após o período de incubação cada tubo foi submetido ao teste de nitrito adicionando três gotas do reagente Griess – Ilosvay, caso ocorresse o desenvolvimento da coloração vermelho-púrpura, indicativo de nitrito, ou seja, da metabolização da amônia em nitrito, o tubo era considerado positivo. O número mais provável foi determinado com base na tabela proposta por Silva et al., (2007).

4.8.5.2. QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS

A quantificação dos micro-organismos celulolíticos, ao longo do processo de compostagem, foi determinada pelo NMP, de acordo com o método utilizado por Oliveira (2009) em situações similares e citado por Francisco (2015).

Foram coletadas diariamente amostras em diferentes pontos de cada leira, perfazendo um total de 25g e colocadas em saco Stomacher contendo 225 mL de PBS, sendo em seguida homogeneizado durante 120 segundos. As diluições decimais sucessivas e as respectivas inoculações obedeceram ao mesmo critério descrito no NMP das *Nitrosomonas*, tendo como diferencial o meio de inoculação utilizado, meio sintético (tabela 1) com 1 % de CMC de acordo com Nogueira e Cavalcanti (1996), específico para o crescimento de micro-organismos celulolíticos.

Para determinação do crescimento de micro-organismos celulolíticos foi utilizado o corante 2,6 diclorofeno-indofenol (DCPIP). Tendo sido preparado a partir de 0,2 g de DCPIP e diluído em 30 mL de água destilada. Adicionou-se 45 µl desta solução em cada um dos tubos de ensaio, incubando-se a 50°C. Os tubos foram observados diariamente com o objetivo de verificar se ocorria a descoloração do DCPIP, pois a solução tem coloração azul escuro e a leitura positiva para degradação da celulose é observada pela descoloração do DCPIP, sugerindo sua oxidação pelas bactérias celulolíticas.

O número mais provável foi determinado com base na tabela proposta por Silva et al. (2007).

4.8.5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA MEDIANTE O TESTE DO VERMELHO CONGO

Realizou-se o método da descoloração através do vermelho congo com o objetivo de avaliar a atividade celulolítica nos primeiros dias de compostagem, comparando os índices enzimáticos determinados. Sabendo que a formação do halo em placas de ágar com CMC resulta da clivagem do Carboximetilcelulose em fragmentos menores, os quais o corante vermelho congo não consegue se fixar, visto que o mesmo permanece ligado apenas às regiões onde há ligações β -1,4 glicídicas (CASTRO, 2006).

Retirou-se alíquotas em pontos diferenciados da leira, perfazendo 16,65 g de amostra sendo cuidadosamente submetida à extração em solução salina (0,85 %) estéril com Tween 80 (0,01%), à temperatura de 60°C, durante duas horas em mesa agitadora a 100 rpm. Obtendo-se

assim a diluição 10^{-1} . Posteriormente, foram realizadas as diluições decimais seriadas, em triplicata, para inoculação em meio específico sintético com 1% de CMC, as placas de petri foram incubadas em estufa a 50° C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/l) em tampão Tris HCl 0,1 M. pH 8,0. Decorridos 15 minutos a solução foi descartada e as placas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão. Aguardou-se 15 minutos para a medição dos halos e colônias. Nas cepas produtoras de celulases observa-se um halo de cor clara com as bordas laranja, indicativo das áreas de hidrólise. Esse halo foi medido para posterior cálculo do índice enzimático (NOGUEIRA E CAVALCANTI 1996).

Os índices enzimáticos foram calculados a partir da equação (FLORENCIO, 2011):

$$\text{Índice Enzimático} = \frac{\text{diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{diâmetro do halo da colônia}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que se apresentam foram explanados consoante as várias etapas do desenvolvimento dos experimentos de forma a tornarem-se mais elucidativos. Podendo destacar-se duas fases distintas do presente estudo: verificação do potencial de bioestimulação do consórcio termo-celulolítico através da radiação visível por LBP ou LED e avaliação do poder de catálise desse consórcio irradiado no processo de compostagem das fibras de coco verde.

5.1 SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO CELULOLÍTICO

Através da verificação de degradação das tiras de papel de filtro, foi possível se comprovar a presença de um grupo de micro-organismos que produzem enzimas celulolíticas, com capacidade de hidrolisar os resíduos lignocelulolíticos como fonte de carbono. A degradação do papel de filtro foi total nas triplicatas das diluições iniciais, 10^{-2} , 10^{-3} (figura 7), 10^{-4} e parcial na diluição 10^{-5} , obtendo-se assim, através da tabela do NMP proposta por Silva et al. (2007), a quantificação inicial do consórcio, sendo esta de $4,6 \times 10^4$ NMP/mL de micro-organismos termo – celulolíticos.

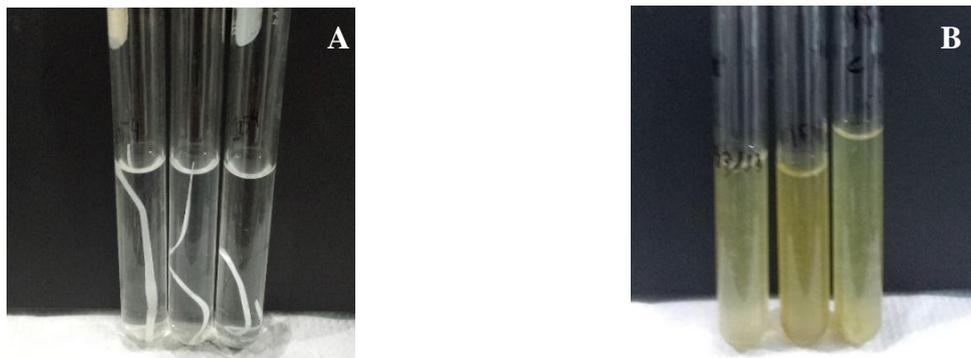


Figura 7. Análise da degradação do papel de filtro (triplicata da diluição 10^{-3}). (A) antes da incubação a 60 °C. (B) depois de 5 dias de incubação a 60 °C (UFBA, 2015).

Um dos maiores obstáculos ao ataque enzimático das fibras lignocelulósicas é a macromolécula, tridimensional de lignina em conjunto com a hemicelulose, constituintes da parede celular dos vegetais (JUNG, 1996), e por essa razão, vários estudos têm sido realizados com a pretensão de remover as mesmas, através de tratamentos ácidos e alcalinos, tratamentos

com explosão a vapor e hidrólise enzimática com lacases e peroxidases produzidas por micro-organismos lignocelulolíticos. Porém, os processos demonstraram que os micro-organismos produtores de enzimas são lentos e os agentes químicos são rápidos, porém destrutivos. Assim, são necessárias novas pesquisas para que se torne este processo economicamente sustentável (SUKUMARAN et al. 2009; MTUI, 2009).

Como o objetivo deste trabalho foi obter um consórcio microbiológico com elevada capacidade de degradação dos polissacarídeos constituintes da biomassa, utilizou-se uma temperatura de incubação de 60°C, de forma a selecionar os micro-organismos termófilos, pois estes, apresentam um maior desempenho na degradação das macromoléculas complexas dos resíduos lignocelulósicos. É de relevância citar que se optou por trabalhar em consórcio microbiano para que os diversos micro-organismos presentes pudessem trabalhar de forma complementar na degradação da biomassa, ou seja, em um processo de simbiose como se observa na natureza.

5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIANO

Acompanhando-se a cinética de crescimento do consórcio, durante 72 horas, verificou-se que nas primeiras oito horas de incubação houve um crescimento exponencial seguido de um declínio, subsequente de uma fase de adaptação para depois entrar em um período de elevada atividade metabólica, fase log bastante acentuada, tendo o seu pico máximo às 36 horas de crescimento. Iniciando-se a fase estacionária com a durabilidade de 16 horas, para se encetar a fase de declínio até ao final do acompanhamento (figura 8).

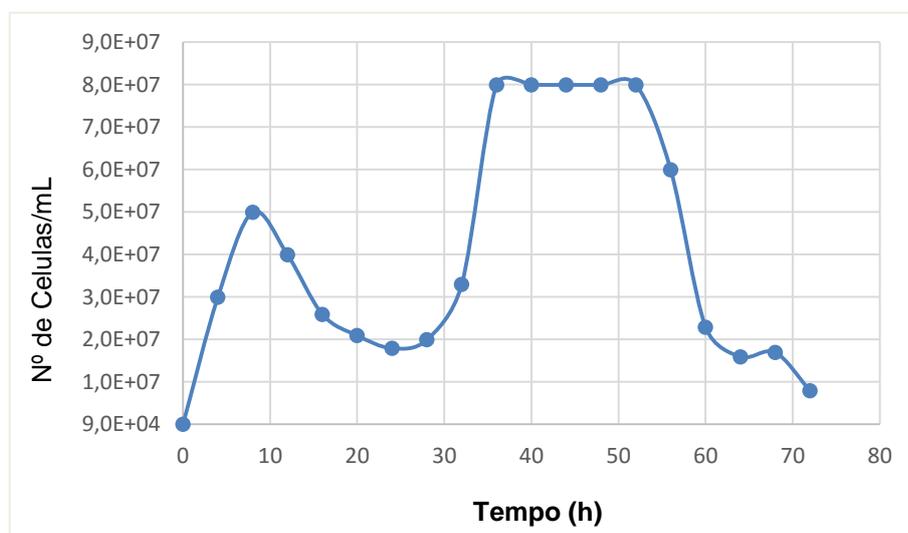


Figura 8. Cinética de crescimento do consórcio microbiológico em meio mineral descrito por Czapek.

Considerando o declínio após as oito horas de incubação, precedido de uma fase exponencial nas primeiras horas de incubação, pode nos levar hipoteticamente a considerar que os micro-organismos presentes tenham aproveitado algumas reservas nutricionais armazenadas para depois iniciarem o processo de degradação da fonte de carbono (CMC) disponível e apresentarem o crescimento considerado padrão para as cinéticas microbianas. Outra hipótese, é a ocorrência inicial da hidrólise da carboximetilcelulose, como fonte de carbono, gerando subprodutos e produtos, como a glicose, de fácil assimilação, estimulando assim, a atividade metabólica celular, visualizada a partir das 28 horas de crescimento.

A microscopia de fluorescência forneceu a oportunidade de identificar, morfológicamente, alguns dos micro-organismos envolvidos no consórcio, dentre eles podemos citar: cocos, diplococos, estreptococos, estafilococos, bacilos, diplobacilos e estreptobacilos (figura 9).

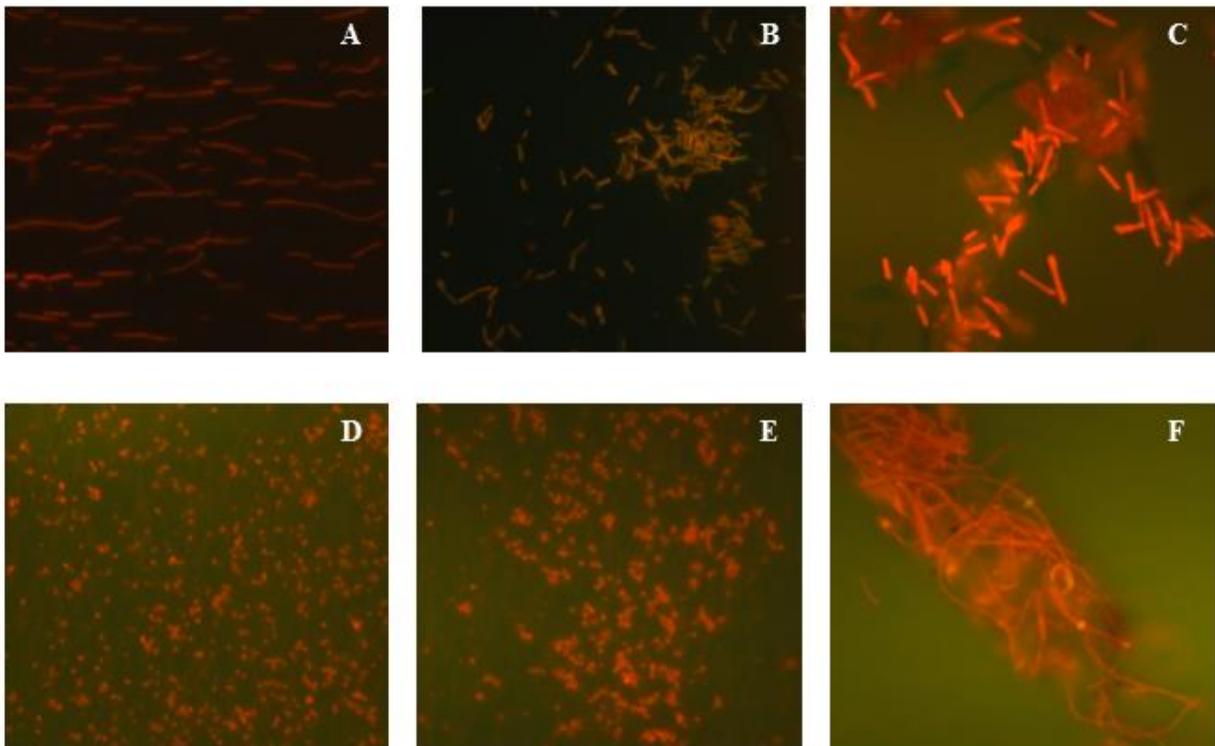


Figura 9. Imagens capturadas de microscopia de fluorescência das morfologias e arranjos dos micro-organismos envolvidos no consórcio. (A) bacilos, diplobacilos e estreptobacilos; (B) bacilos em agregados irregulares; (C) bacilos com endósporos terminais; (D) cocos e diplococos em agregados; (E) cocos em agregados irregulares; (F) Filamentos longos de cocos com endósporos.

5.3 ESTUDO DA INFLUÊNCIA, DE UMA ÚNICA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO LBP OU LED, NO CONSÓRCIO MICROBIANO

Após estabelecer-se a cinética de crescimento do consórcio microbiano, testou-se a possível influência da radiação LBP ou LED no consórcio microbiano, identificando possíveis alterações das suas cinéticas.

Utilizou-se o método da contagem direta com o laranja de acridina por microscopia de fluorescência, para realizar a quantificação celular ao longo do tempo proporcionando a observação da morfologia dos micro-organismos envolvidos e as suas conformações organizacionais, sendo seus resultados tratados através do método estatístico ANOVA, com o teste de Tukey, com 95% de confiança.

Através da análise estatística constatou-se que ao final de 24 horas de incubação, as amostras irradiadas por LBP e LED, apresentaram um aumento do número de células significativo ($P < 0,01$), o que comprova uma resposta biológica particular ao comprimento de onda utilizado pelo fotoceptor, cuja alteração fotoquímica provoca o efeito. Nas amostras quantificadas, ao final de 48 horas de incubação onde foi aplicada a irradiação LBP, a significância manteve-se ($P < 0,01$), o mesmo já não ocorreu nas que receberam a emissão de radiação LED. Podemos observar, através das cinéticas representadas na figura 10, que após as 48 horas de incubação, a cultura irradiada por LED teve uma redução do número de células mais acentuada do que as restantes culturas (irradiadas por LBP e controle), resultando em um número menor de células ao final de 72 horas.

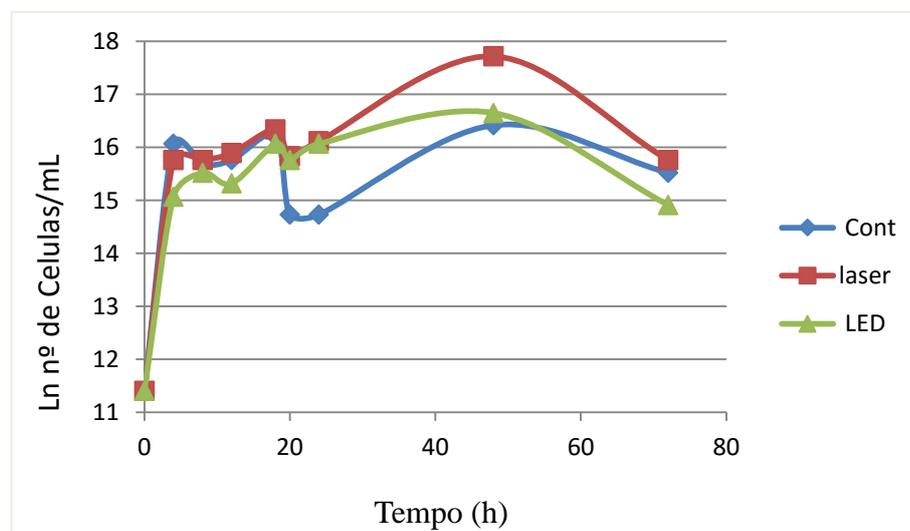


Figura 10. Comparação das cinéticas de crescimento irradiadas por LBP e LED versus controle.

As amostras quantificadas ao final de 24 horas de incubação, demonstraram através da análise estatística, significância, ou seja, evidencia de ativação do metabolismo celular através da absorção da radiação por fotoceptores, desenvolvendo assim, alterações bioquímicas que desencadeiam por sua vez, alterações das propriedades de oxidação redução dos carreadores após a fotoexcitação dos seus estados eletrônicos, resultando em um aporte da síntese de ATP. Este processo incide essencialmente no ciclo respiratório microbiano, desenvolvendo uma série de outras reações em cadeia.

Foi também verificado através do método de microscopia de fluorescência que as amostras irradiadas por LBP ao final de 48 horas apresentavam conformações coesas e bastante agregadas de micro-organismos formando biofilme (figura 11). Julga-se ser de relevância, a realização de novas pesquisas de forma a explorar este processo biológico originado pela emissão de radiação LBP em um consórcio microbiano ambiental, pois poderá vir a fornecer dados fundamentais para outras descobertas.

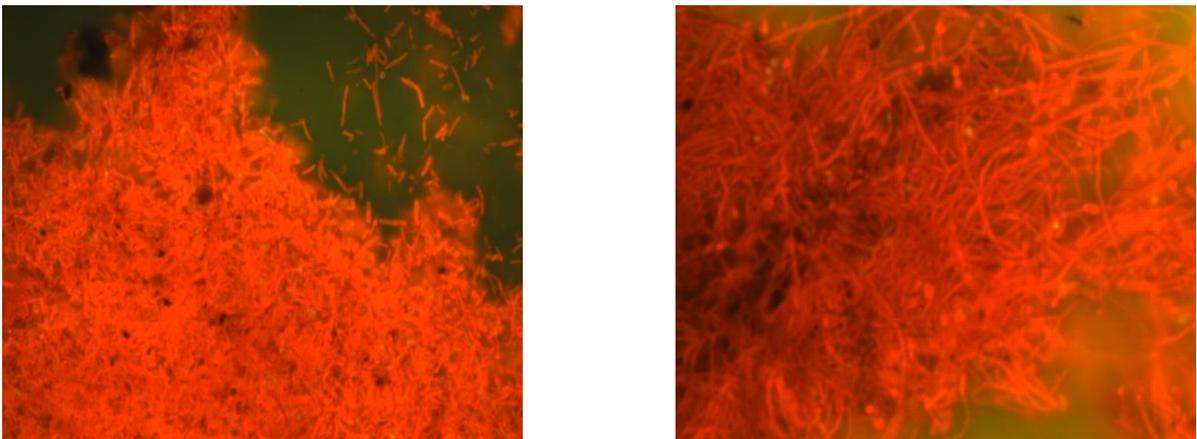


Figura 11. Imagens captadas de microscopia de fluorescência do consórcio em fase exponencial, formando biofilme.

5.4 ESTUDO DAS CINÉTICAS DE DECLÍNIO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FONTE DE CARBONO

Na avaliação do comportamento do consórcio microbiano em estresse nutricional, provocado por diferentes concentrações de CMC em solução salina, foi possível observar de uma forma geral, um declínio do número de células ao longo do tempo, contudo é possível observar que o consórcio microbiano é capaz de apresentar um crescimento tênue em algum período do seu declínio, isto na devida proporcionalidade em relação à quantidade de CMC

disponível no meio. Talvez por utilizar algumas das suas reservas nutricionais armazenadas antes de se iniciar a fase de declínio.

Observa-se, nas análises das regressões lineares apresentadas nos gráficos da figura 12 que o número de células em morte é maior do que aquelas que estão em divisão, constatando-se com maior incidência no meio onde a fonte de carbono está ausente e refletindo-se no declive da regressão linear, conforme era de se esperar. Comparando as regressões lineares dos meios de 0,25 % e 0,5 % de CMC, verificou-se que o declive foi maior no meio de maior concentração de CMC, o que não era previsível, sendo constatado de qualquer forma, uma diferença bastante pequena, da ordem de $0,0178 \text{ h}^{-1}$ e aceitável pois a diferença de concentração da fonte de carbono é de 0,25 % para 0,5 %.

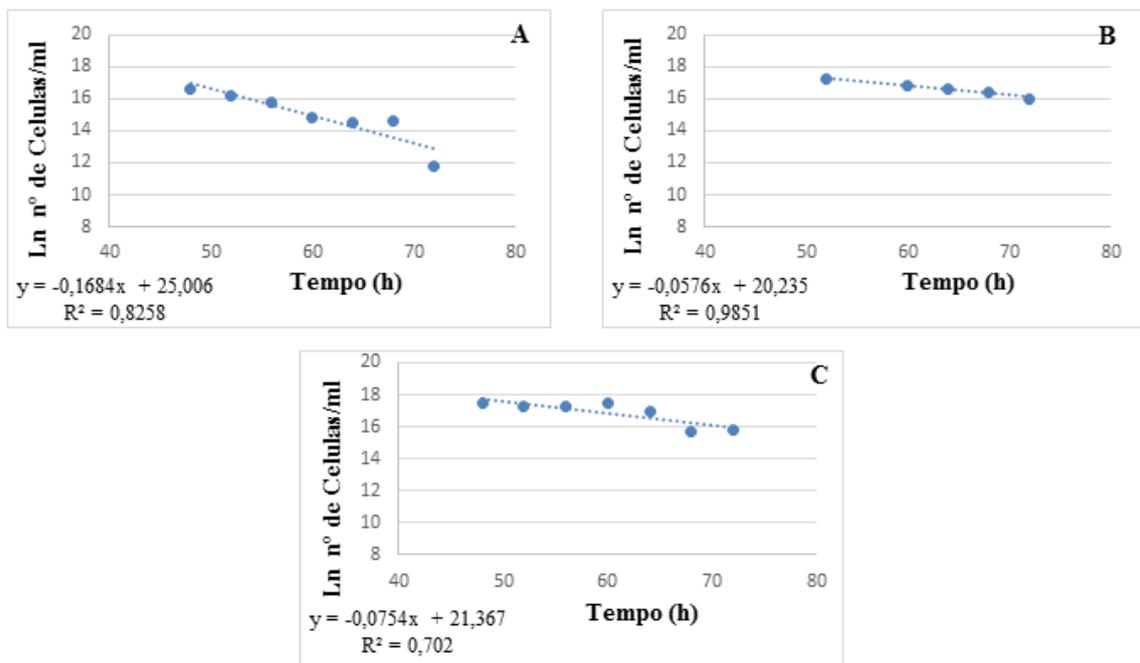


Figura 12. Taxa de mortalidade com diferentes porcentagens de fonte de carbono. (CMC). (A) 0 % de fonte de carbono; (B) 0,25% de fonte de carbono; (C) 0,5% de fonte de carbono.

Através da análise das cinéticas podemos concluir que a fase de morte, propriamente dita, ocorre pelo menos quatro horas antes, nos micro-organismos presentes no meio sem qualquer fonte de carbono, quando comparados aos do meio com 0,25 % de CMC e cerca de 10 h antes que os micro-organismos do meio com maior concentração de fonte de carbono (figura 13). Apesar de ser possível observar as diferenças nas cinéticas, no tempo a partir de 52h, estas foram insignificantes, já no tempo de 56 h elas se apresentam com algum significado

estatístico, comparando as cinéticas do meio de 0,5 % de CMC, com a dos outros dois meios de cultura já referenciados.

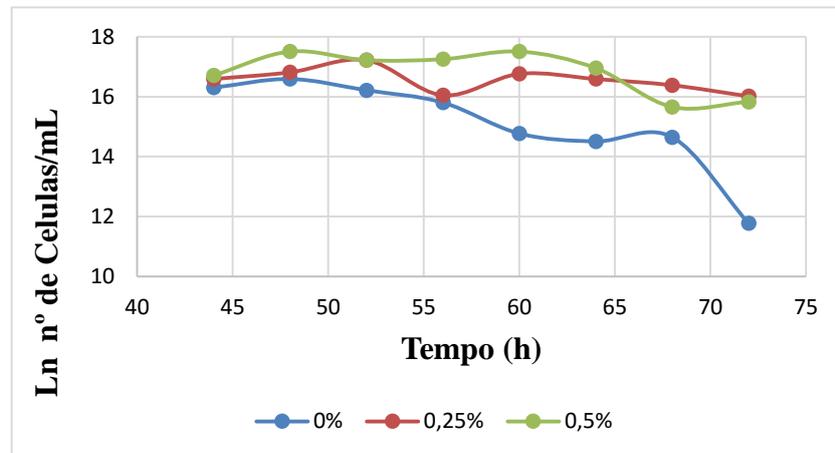


Figura 13. Sobreposição das cinéticas microbianas com três diferentes porcentagens de fontes de carbono.

O objetivo do estudo das cinéticas de crescimento com variações nas porcentagens de fonte de carbono foi conhecer as reações do consórcio em condições de estresse nutricional para que se pudesse interpretar e determinar um protocolo específico de radiação por LBP ou LED, contemplando os tempos que mais se adequariam, assim como, o número de aplicações das emissões de luz visível necessárias para a possível ocorrência de bioestimulação.

5.5 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO DA LUZ LBP OU LED NO CONSÓRCIO MICROBIANO

Um dos focos principais deste trabalho foi analisar o efeito do espectro de ação visível (LBP- $\lambda 660$ nm e LED- $\lambda 632 \pm 2$ nm) na estimulação do crescimento dos micro-organismos termo-celulolítico, sendo que, a absorção da radiação ocorre sobretudo quando a célula se encontra afetada por uma desordem funcional (CHAVANTES, 2003), assim, o consórcio foi submetido à privação de nutrientes para estimular uma situação de estresse celular.

Realizou-se a quantificação do número de colônias em placas de petri (figura 14), pois esta metodologia forneceu a garantia de uma quantificação de células vivas e através da visualização das colônias constatou-se que as sucessivas radiações nas diferentes doses em estudo (5 J/cm^2 , 10 J/cm^2 , 13 J/cm^2 , 15 J/cm^2 e 20 J/cm^2) mantiveram a sua heterogeneidade, evidenciando que a diferenciação das espécies iniciais se conservava, ou seja, a emissão de luz não desencadeou um efeito bactericida na membrana bacteriana, mesmo na emissão da dose energética de 20 J/cm^2 . Foi também facilmente visualizado uma redução do número de colônias

ao longo do tempo, na amostra controle, como era de esperar devido à ausência de nutrientes no meio e uma nítida diferenciação das quantificações celulares obtidas nas amostras irradiadas por luz visível versus as amostras controle, no final das sucessivas radiações emitidas com ambas as fontes luminosas.

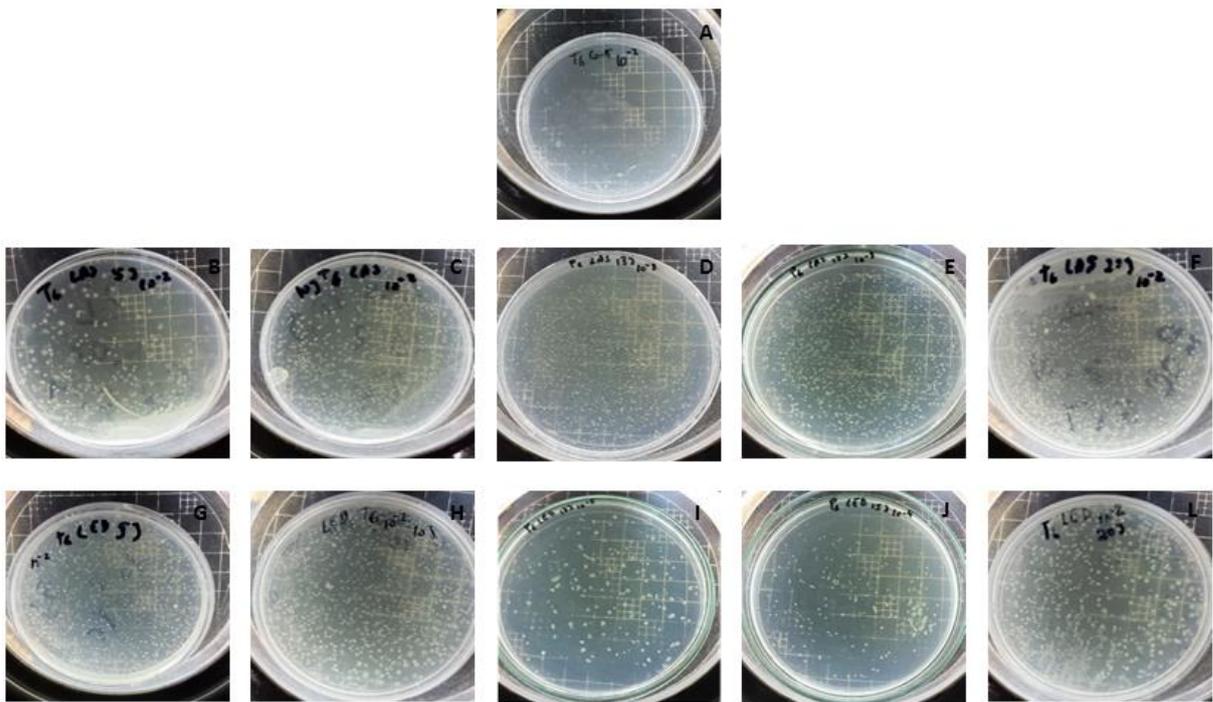


Figura 14. Placas de petri das amostras quantificadas 12 horas após a última irradiação. (A) Controle (10^{-2}); (B) Amostra irradiada por LBP, $5\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-2}); (C) Amostra irradiada por LBP, $10\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-2}); (D) Amostra irradiada por LBP, $13\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-3}); (E) Amostra irradiada por LBP, $15\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-3}); (F) Amostra irradiada por LBP, $20\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-2}); (G) Amostra irradiadas por LED, $5\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-2}); (H) Amostra irradiada por LED, $10\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-2}); (I) Amostra irradiada por LED, $13\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-5}); (J) Amostra irradiada por LED, $15\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-4}); (L) Amostra irradiada por LED, $20\text{J}/\text{cm}^2$ (10^{-2}).

Com o objetivo de avaliar os resultados das quantificações celulares obtidos, utilizou-se dois métodos de análise estatísticos como ferramenta de forma a embasar o estudo deste trabalho.

Ao analisar os resultados, através do método estatístico ANOVA, verificou-se que a partir da terceira emissão de luz LBP ou LED, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nas amostras irradiadas foram significativamente maiores do que o número observado nas amostras controle, onde não houve qualquer emissão de radiação, com exceção para as amostras avaliadas no tempo de 56 h expostas à radiação LED na dose energética de 5 e 10 J/cm^2 . Este resultado sugere que o comprimento de onda emitido assim como o número de exposições desenvolve diferentes efeitos nos cromóforos, podendo estimular a macromolécula

a alterar a sua geometria, assim como transferir energia aos elétrons, desencadeando o processo de síntese de ATP na célula (CHAVANTES et al., 2009)

Para uma melhor avaliação do efeito da irradiação LBP e LED no consórcio microbiano, efetuaram-se as cinéticas de crescimento ao longo do tempo, para as diferentes doses energéticas emitidas, em condições de privação de nutrientes, de forma a facilitar a visualização de efeitos bioestimulatórios no consórcio. Cada ponto da figura 15 representa a relação do logaritmo neperiano (Ln) das unidades formadoras de colônias versus tempo de privação nutricional, sendo possível analisar os resultados através das determinações das taxas de mortalidade de cada uma das culturas irradiadas em comparação com as amostras controle.

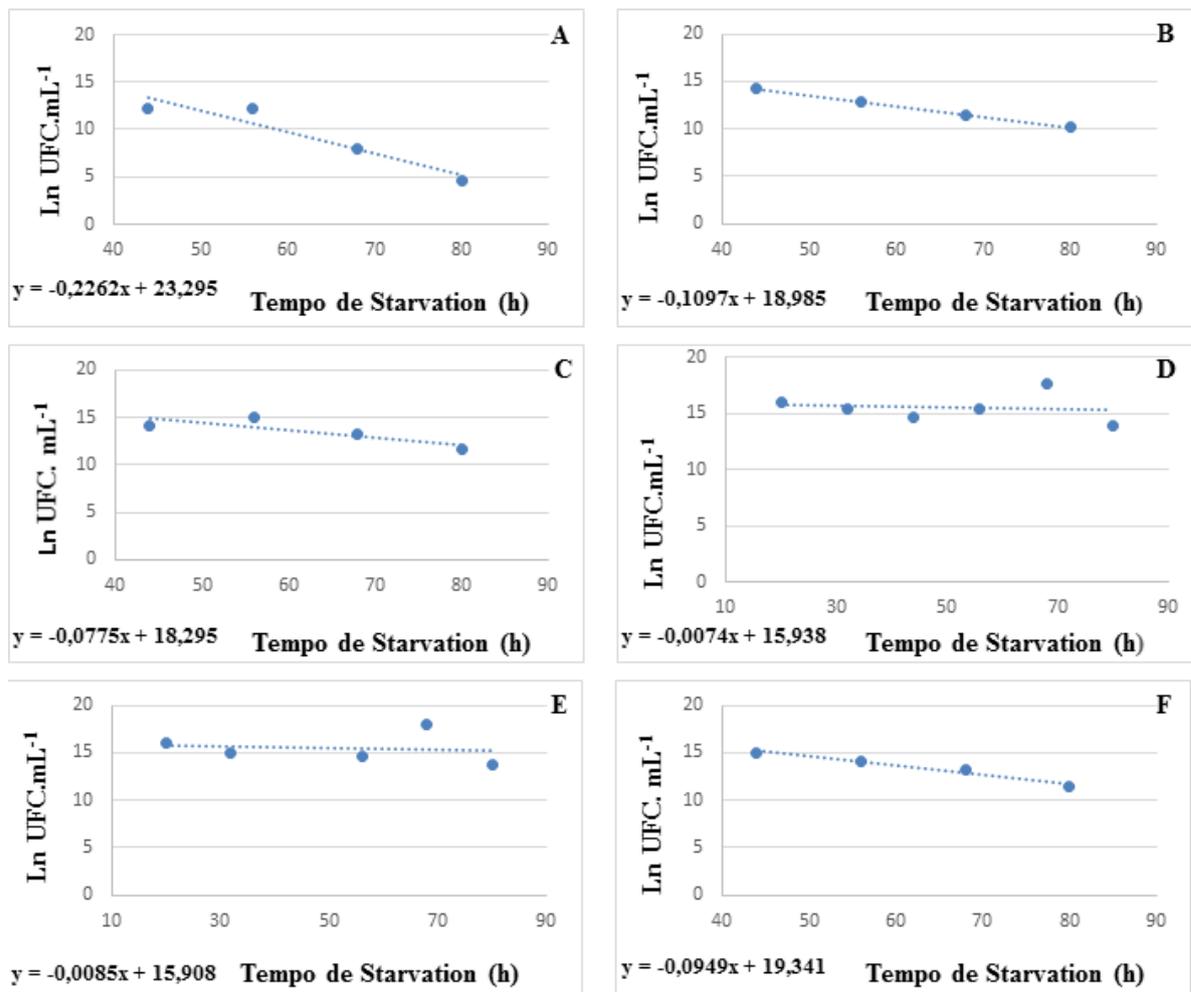


Figura 15. Taxa de mortalidade do consórcio sob privação de nutrientes. (A) Amostra controle; (B) Amostra irradiada por LBP, 5J/cm²; (C) Amostra irradiada por LBP, 10J/cm²; (D) Amostra irradiada por LBP, 13J/cm²; (E) Amostra irradiada por LBP, 15J/cm²; (F) Amostra irradiada por LBP, 20J/cm²; (G) Amostra irradiadas por LED, 5J/cm²; (H) Amostra irradiada por LED, 10J/cm²; (I) Amostra irradiada por LED, 13J/cm²; (J) Amostra irradiada por LED, 15J/cm²; (L) Amostra irradiada por LED, 20J/cm².

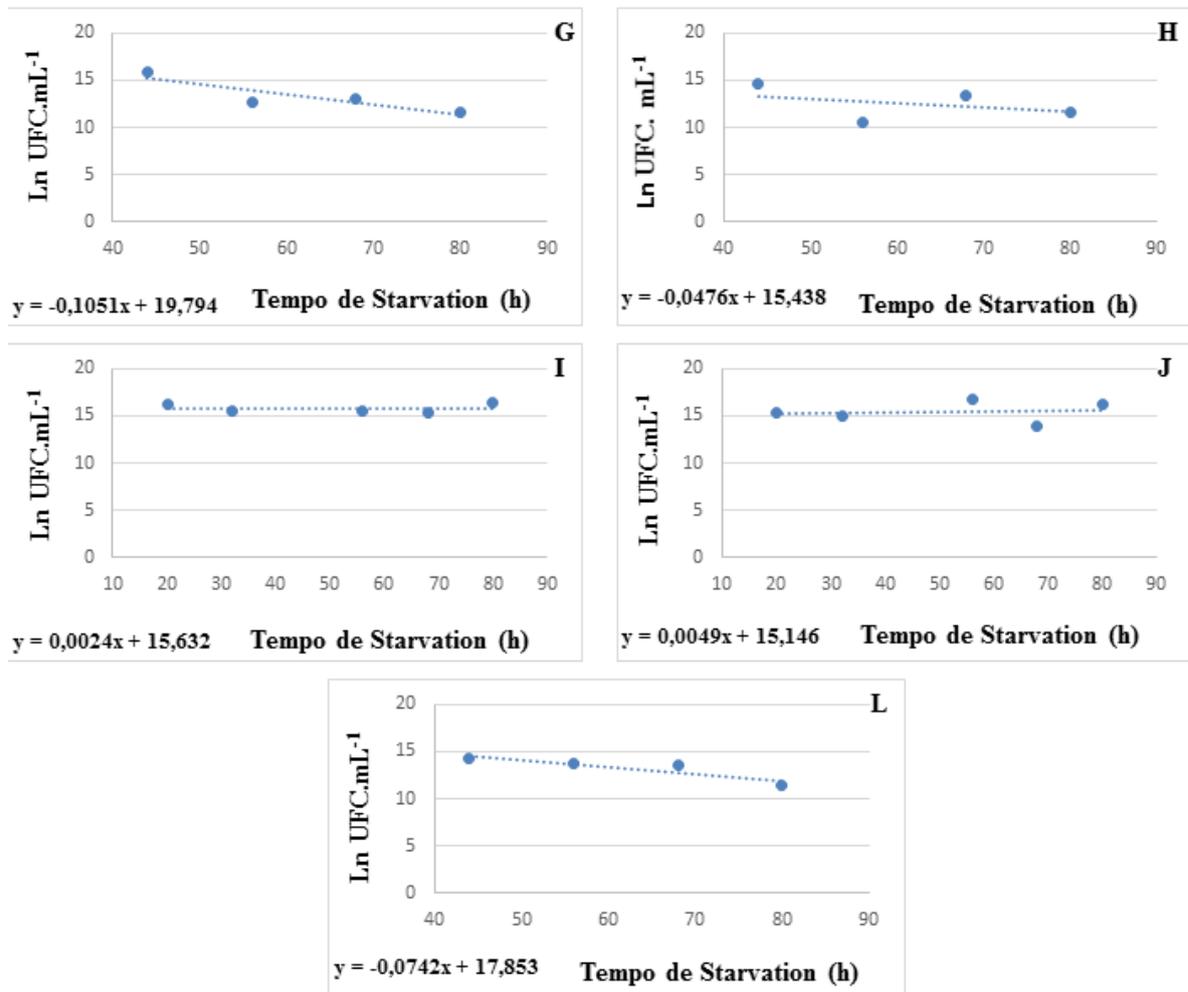


Figura 16. Continuação

As velocidades de crescimento, na sua grande maioria apresentam-se negativas, conforme esperado, pois as células morrem a uma taxa maior que excede à de produção de novas células, sendo que a taxa de mortalidade é em função da população viável e das características do meio sem qualquer fonte de carbono. Adotou-se a taxa de mortalidade, para avaliar a resposta fotobiológica do metabolismo celular e consequente síntese de ATP, nas amostras irradiadas.

No gráfico da figura 15A constatou-se que a taxa de mortalidade das amostras controle foi de $0,2262 \text{ h}^{-1}$, sendo maior do que em qualquer das amostras irradiadas por LBP ou LED. Averiguando as velocidades de decaimento das diversas amostras é nítida uma diferenciação das taxas de mortalidade das amostras irradiadas por luz visível em comparação com o controle, sugerindo a veracidade da proposição de ativação do metabolismo celular do consórcio microbiano através de luz visível, destacando-se de forma clara a resposta obtida nas doses

energéticas de 13 (figura 15D e 15I) e 15 J/cm² (figura 15E e 15J) em ambas as fontes luminosas. Como se observa na figura 15D e 15E as taxas de mortalidade das amostras irradiadas por LBP nas doses energéticas de 13 e 15 J/cm² estão muito próximas da inversão para uma fase de crescimento adaptativa, onde a produção de novas células se equilibram com aquelas que morrem, ou seja, o declive da reta de regressão linear é muito próximo da nulidade.

Nas amostras irradiadas por LED nas doses energéticas de 13 (figura 15I) e 15 J/cm² (figura 15J) a produção de novas células foi superior à taxa de mortalidade obtendo-se um declive positivo, uma velocidade de crescimento de 0,0024 h⁻¹ e de 0,0049 h⁻¹, sugerindo a bioestimulação dos micro-organismos através da radiação emitida no consórcio, desencadeando um processo de produção de novas células superior ao número de células mortas, como se pode observar nas figuras 15I e 15J.

Observando as taxas de morte das amostras irradiadas com a dose energética de 5 J/cm² (figura 15B e 15G), constatou uma taxa de mortalidade menor em comparação com as amostras controle, de qualquer forma os resultados obtidos sugerem uma resposta à emissão de luz visível menor do que as restantes doses em estudo, sendo que as amostras expostas à radiação de 10 J/cm² (figura 15C e 15H) na região do vermelho, as velocidades de decaimento foram menores em comparação com as amostras controle e as irradiadas com 5 J/cm², sendo efetivo para ambas as fontes luminosas utilizadas. Verificou-se também, que os resultados obtidos nas amostras irradiadas com a dose energética de 20 J/cm² (figura 15F e 15L), demonstraram um aumento das taxas de mortalidade em comparação com a dose energética menor de 15 J/cm², sugerindo uma tendência de declividade negativa mais acentuada a partir desta dose energética.

Segundo KARU (2010), os fotoceptores envolvidos no processo de bioestimulação são enzimas terminais da cadeia respiratória: citocromo c oxidase e o citocromo bd oxidase em células procarióticas de *Escherichia coli* no caso da radiação na região do vermelho ao infravermelho próximo. Vale salientar que condições experimentais podem interferir no estado de oxidação/redução do citocromo c oxidase que só participa na ação de fotoceptor primário quando está na sua forma intermediária.

Para desenvolver-se um processo de biomodulação é necessário que o fotoceptor represente uma estrutura chave, capaz de regular uma via metabólica, como por exemplo os componentes da cadeia redox (ALBERTS, 2004).

Neste estudo constatou-se a existência de processos bioestimulatórios desencadeados pela ação de luz no espectro visível, na banda espectral do vermelho, laser (λ660 nm) e LED (λ632±2 nm) no consórcio termo-celulolítico. Tendo como hipótese mais promissora para as moléculas envolvidas na absorção da luz, enzimas da cadeia respiratória como o citocromo c

oxidase (sítios de cobre redox ativos Cu_A e Cu_B) ou a oxidase alternativa, citocromo bd oxidase, caracterizada pela alta afinidade ao oxigênio, ambas com metais em seu grupo prostético propícios a assumir um estado eletrônico excitado a partir do qual, em certas circunstâncias, podem levar a efeitos biológicos primários (aumento de ATP). Sabendo que o sítio heme Cu_A reduzido tem como espectro de absorção ótimo 620 nm e o sítio heme Cu_B oxidado o pico do espectro de absorção em 680 nm, para desencadear um aumento de proliferação celular (KARU; KOLYAKOV, 2005; DIAS, 2009).

As mudanças químicas ou físicas primárias conseguidas pela radiação luminosa nas moléculas fotoceptoras são seguidas por uma cascata de reações bioquímicas secundárias. Estas reações ocorrem na ausência de luz, podendo acontecer após horas ou dias da emissão da irradiação (DEVLIN, 2003). O processo é complexo e de grande abrangência, podendo a cadeia respiratória controlar todo o mecanismo de homeostase celular, por exemplo através da emissão da radiação é possível alterar o pH e o estado redox da célula. Para além da enzima transportadora antiporte Na^+/H^+ , outros carreadores de ions, cation sódio (Na^+), cation potássio (K^+), enzima ATPase e enzimas que controlam níveis de AMPcíclico em uma célula são também ativados pela irradiação e outras respostas secundárias à irradiação podem surgir na membrana plasmática (KARU; KOLYAKOV, 2005; DIAS, 2009). As reações inerentes à emissão de luz que desencadeiam respostas biológicas estimulatórias são vastas e influenciam uma grande parte do metabolismo da célula, culminando com o aumento da proliferação celular.

Plotaram-se os gráficos da velocidade de decaimento versus as doses energéticas irradiadas (figura 16) com a finalidade de determinar qual das doses estudadas desenvolveria uma melhor resposta para uma efetiva bioestimulação. Constatou-se através dos mesmos, que em ambas as fontes emissoras de luz utilizadas as doses energéticas que sugerem uma resposta mais eficaz à bioestimulação são as de $13 J/cm^2$ e a de $15 J/cm^2$. Sendo assim, determinou-se os vértices das funções quadráticas obtidas para cada uma das fontes luminosas utilizadas, para indicar-nos qual seria a melhor dose a ser utilizada para a biomodulação do consórcio a ser inoculado no processo de compostagem das fibras de coco verde. O vértice da linha de tendência polinomial (função quadrática) cujas radiações foram efetuadas com LBP situa-se no ponto (13,285, -0,025), enquanto o determinado para as radiações elaboradas com LED localiza-se no ponto (13,26, -0,0102).

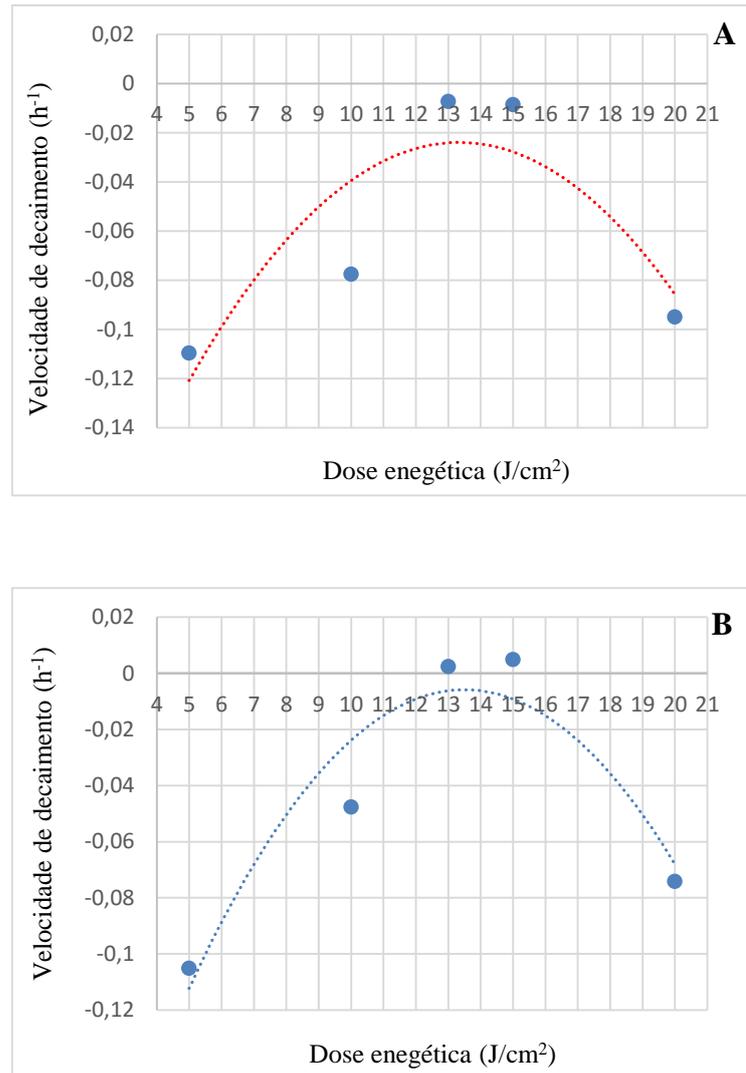


Figura 17. Taxas de mortalidade versus dose energética emitida. (A) Amostras irradiadas por laser; (B) Amostras irradiadas por LED.

Sendo assim, através da determinação dos vértices da função quadrática torna-se mais evidente que a dose energética que propiciou uma melhor resposta estimulatória foi a de 13 J/cm^2 , em ambas as fontes de luz estudadas. Por outro lado, a quantificação celular realizada ao longo do tempo, indica que após a última irradiação, as amostras expostas à dose energética de 13 J/cm^2 demonstraram um número de células viáveis superiores às amostras irradiadas com a dose de 15 J/cm^2 , constatando-se que nesse período todas as amostras expostas a radiação nas diferentes doses energéticas apresentaram diferença estatística significativa, quando comparadas às amostras controle.

5.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO CONSÓRCIO ATIVADO POR LBP OU LED, DE CATALISAR O PROCESSO DE COMPOSTAGEM

5.6.1 AERAÇÃO

A aeração favorece a oxigenação, secagem e diminuição do volume do material a ser compostado, a partir do fornecimento de oxigênio para atividade microbológica, remoção da umidade da massa em compostagem e remoção do calor, diminuindo a temperatura da biomassa.

Ao longo do período de compostagem, a aeração foi realizada de três em três dias e a concentração de oxigênio situou-se entre 18,2 % e 20,8 % (figura 17), o que sugere uma elevada atividade microbiana e consequente oxidação da matéria orgânica. A concentração de oxigênio até às 144 h de processamento teve uma maior amplitude de variação, estabilizando a partir deste momento, nos valores em torno de 20 %, apresentando a leira controle valores mais elevados e uniformes neste último período.

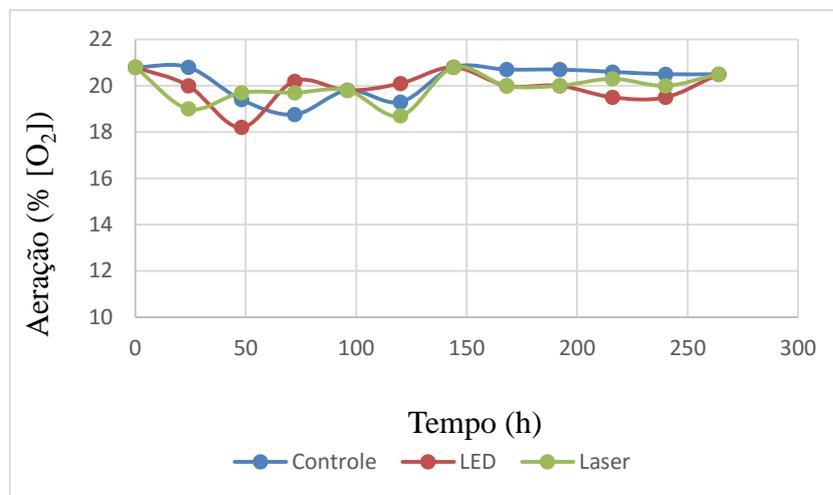


Figura 18. Variações de aeração ao longo do experimento.

Ge et al. (2006), afirmou que durante o processo de compostagem aeróbica, quanto maior for a exposição do material orgânico ao oxigênio, maior será a sua velocidade de decomposição e estudos realizados por Sundberg (2005), consolidam os resultados obtidos, indicando que valores elevados de taxas de arejamento no início do processo resultam em um aumento da atividade microbiana, pH e formam um composto final mais estável.

Os autores Berth et al. (2007); Heberts et al. (2005); Haug, (1993), indicam uma concentração de oxigênio mínima de 5% para assegurar as condições de aerobiose do processo e uma faixa considerada ideal de O₂ de 5% a 15%, sendo que a escassez de oxigênio nas leiras de compostagem desenvolve processos anaeróbios, acidificação da biomassa e o composto final obtido será de baixa qualidade.

De uma forma geral, verificou-se que desde o início do processo até ao tempo de 144 h, as leiras revelaram uma instabilidade maior nas concentrações de oxigênio, período este, que se registrou temperaturas mais elevadas, sugerindo uma atividade microbiana mais acentuada, precedendo uma fase mais estável, mas com concentrações ainda elevadas de oxigênio em todas as leiras (a rondar os 20 %).

5.6.2 TEMPERATURA

Através da análise dos valores obtidos de monitoramento diário da temperatura constatou-se uma tendência crescente, desde as primeiras horas do processo tendo-se atingido o pico mais alto na leira controle (leira 01) e na leira inoculada com o consórcio termocelulolítico exposto à radiação por LBP (leira 03), ao final de 48 h do processo, enquanto que na leira inoculada com o consórcio exposto à emissão de luz visível LED (leira 02) o pico máximo atingiu-se ao final de 72 h do início do processo de compostagem, como se pode verificar através do gráfico da figura 18. Obtendo-se nas diversas leituras efetuadas, temperaturas da ordem dos 70 °C na leira 03, da ordem dos 68 °C na leira 02, sendo que a leira 01 teve como temperatura máxima 58 °C, registrando-se temperaturas ambiente, nesta fase do experimento entre 26,4 °C a 27 °C (praticamente 1/3 das temperaturas atingida nas leiras 02 e 03).

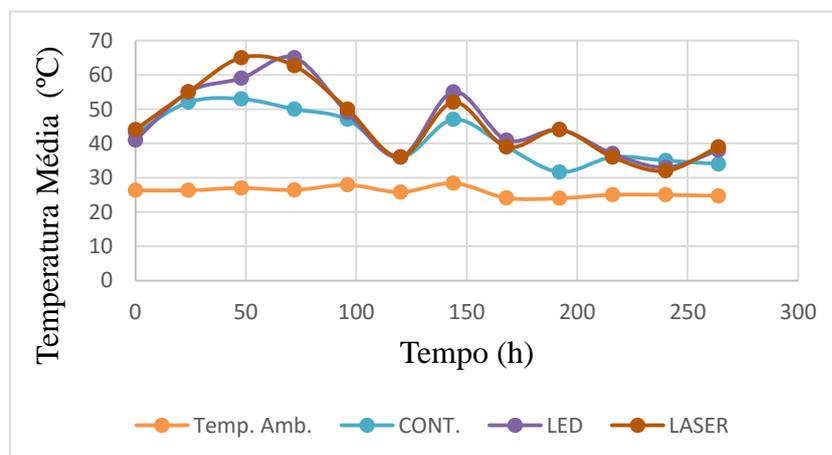


Figura 19. Variações de temperatura ao longo do experimento.

Sendo a temperatura um dos fatores que determina a velocidade dos processos microbiológicos envolvidos e exerce uma seleção da evolução da microbiota existente no processo, o aumento de temperatura verificado nas primeiras horas, em todas as leiras, culminando com os picos máximos em 48 h e 72 h é resultado da inoculação do consórcio termo-celulolítico, ocasionando uma catálise do processo de compostagem, antecipando assim a fase termófila. Este foi um dos propósitos deste estudo visto que a finalidade foi a degradação dos polissacarídeos constituintes da biomassa como a celulose, hemicelulose e lignina cuja a degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares frequentes na fase termófila do processo.

Fernandes e Silva, (1996) observaram que temperaturas nas leiras de compostagem, da ordem de 40-60 °C no segundo ou terceiro dia é sinal de que o ecossistema se encontra equilibrado, respeitando os vários parâmetros físico-químicos propícios ao desenvolvimento de uma atividade microbiana intensa. Por outro lado, Pires (2013) afirma que temperaturas internas nas células de compostagem acima de 70 °C não é recomendado pois pode desenvolver processos de volatilização de amônia.

Como se pode observar na figura 18 os picos de temperatura nas leiras 02 e 03 foram idênticos (65 °C) e por sua vez superiores ao da leira 01 (53,3 °C), complementando a proposta que ambas as fontes de luz visível emitidas aos inoculos desenvolveu a bioestimulação da atividade microbiana. Posteriormente verificou-se um decréscimo das temperaturas nas três leiras em simultâneo culminando em 36 °C, ao final de 120 h, registrando-se neste momento uma temperatura ambiente de 25,8 °C.

É de relevância salientar que segundo Sanchuki (2011), a sanitização do material a compostar foi alcançada, pois o processo manteve-se com temperaturas próximas de 55 °C por três dias consecutivos, eliminando agentes patogênicos assim como larvas, insetos e ovos de parasitas, ervas daninhas e sementes de plantas.

Após cinco dias de compostagem acompanhou-se um acréscimo dos valores de temperatura nas três leiras por 24 h até atingir-se 144 h do processo. Mais uma vez se verificou valores de temperatura mais elevados para as leiras 02 (55 °C) e 03 (52 °C) em comparação com o valor obtido na leira controle (47 °C). Em seguida, observou-se um decréscimo nas várias leiras, tendo as leiras 02 e 03 como ponto de inflexão o tempo de 168 h, temperatura a rondar os 40 °C, registrando-se na leira controle a continuidade de decréscimo dos valores de temperatura obtidos. Após este momento os declives da curva são contrários, tendo as leiras 02 e 03 uma inclinação positiva contrária à leira controle. Posteriormente as temperaturas das leiras com inoculo exposto à radiação visível decrescem culminando com a temperatura de 37 °C e

36 °C. A partir das 216 h do processo, pela primeira vez, obteve-se valores de temperatura na leira controle maiores do que os obtidos nas leiras 02 e 03, até atingir-se o tempo de 250 h, invertendo-se neste momento os declives das curvas representativas de cada leira, retomando assim a tendência demonstrada ao longo do acompanhamento do processo de compostagem.

Através da análise estatística pelo método de variância simples (ANOVA), com o teste de Tukey, com 95% de confiança, considerou-se como resultado estatisticamente significativo, quando se obteve um $p < 0,05$.

Sendo assim, comparando os resultados de temperatura nas três leiras, ao longo do processo de compostagem verificou-se significância estatística para a leira inoculada com luz visível emitida por LED, relativamente à leira controle, nos seguintes tempos de monitoramento: 72 h, 144 h, 192 h e 264 h, enquanto que a leira inoculada com o consórcio irradiado por LBP registrou valores significativos versus a leira controle, nos tempos de monitoramento de 48 h, 144 h, 192 h e 264 h.

Os valores de temperatura obtidos durante o experimento e o período de seus picos máximos, sugerem que a adição de inóculo em todas as leiras pode ter contribuído para a antecipação da fase térmofila e para que se tenha mantido por um período relativamente longo, demonstrando uma intensificação de degradação do resíduo por parte da microbiota termocelulolítica adicionada. Para além disso verificou-se um aumento da temperatura significativo nas leiras que foram tratadas com o inóculo exposto à emissão de luz visível sugerindo assim o processo de bioestimulação desencadeado pelos fotoceptores presentes no consórcio termocelulolítico.

5.6.3 UMIDADE

No geral, a umidade registrada no experimento foi elevada, considerando a faixa citada por Oliveira et al. (2008); Pires, (2013), de 50 % a 60 % como sendo a ideal para o bom desempenho do bioprocessamento de compostagem. Verificou-se nas primeiras 72 h valores de umidade interna entre 70 % a 82 %, pertencendo o registro mais elevado à leira controle (figura 19), podendo estes valores serem um reflexo da elevada umidade inicial do coco verde, em torno de 79,43 % (FRANCISCO, 2015).

Os valores obtidos de umidade interna durante o período de 72 a 168 h de processamento estiveram entre 60 % e 78 % nas leiras em avaliação, observando-se valores superiores na sua grande maioria do intervalo, na leira 02, com exceção para o tempo de 120 horas. No tempo

monitorado às 192 h verificou-se um dos valores mais baixos da leira 02, registrando-se uma umidade de 46%, contrariando os valores observados na leira controle (70 %) e na leira 03 (74 %). A partir deste momento ambas as leiras registraram um decréscimo de umidade até ao final do monitoramento, obtendo-se uma umidade final na leira controle de 40%, na leira 02 de 42 % e na leira 03 de 46 %.

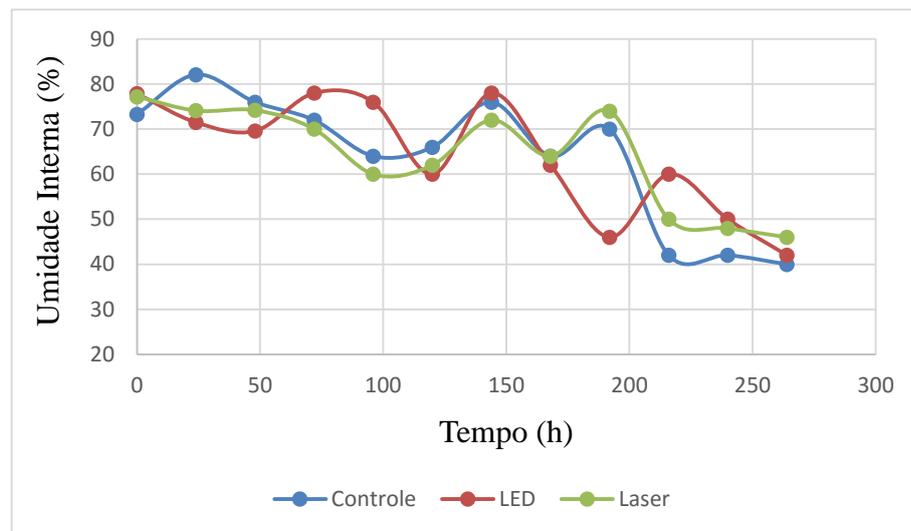


Figura 20. Variação de umidade interna nas três leiras, ao longo do experimento.

Os valores verificados de umidade interna foram superiores ao esperado, tendo-se constatado uma tendência decrescente ao longo do bioprocessamento, com maior visibilidade a partir das 192 horas de compostagem (leira 01 e 03), o que se torna aceitável, pois segundo Sundberg (2005), o gás remove água do composto em forma de vapor, fenômeno que desempenha um papel importante no arrefecimento da pilha quando atinge temperaturas muito elevadas. Por outro lado, estudos executados por Manios (2004) apresentaram diferentes valores de umidade para cada tipo de resíduo indicando como umidade ótima para a compostagem de resíduos de casca, valores de 60 % a 70 %, sugerindo assim, os resultados obtidos como cabíveis.

A umidade ambiente foi também um dos parâmetros a ter em conta, podendo ser influente na umidade da biomassa durante o processo. Ao longo do período de compostagem a umidade ambiente situou-se entre 39 % e 75 % (figura 20), o que sugere a possibilidade de ter influenciado os teores de umidade interna registrados da biomassa ao longo do experimento.

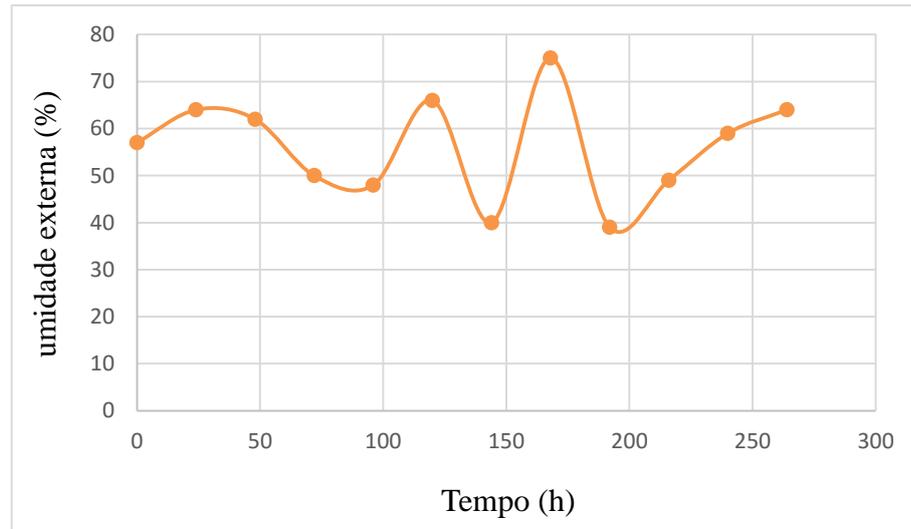


Figura 21. Variação de umidade ambiente nas três leiras, ao longo do experimento.

É importante equacionar que as leiras foram arejadas de três em três dias, para obtenção de níveis de oxigênio necessários para o desenvolvimento da microbiota essencial ao processo, desenvolvendo um arrefecimento do composto e conseqüentemente uma redução da umidade interna. Sundberg, (2005), afirma que o equilíbrio entre a água e o oxigênio é complexo em um sistema de compostagem pelo fato de o gás remover a água do processo, visto que a mesma se evapora tornando praticamente impossível manter o mesmo teor de umidade por longos períodos de tempo, sendo a evaporação o principal meio de arrefecimento das células de compostagem. Constatou-se que os níveis mais elevados de umidade interna obtidos (48, 72 e 144 h) sobrepõem-se aos períodos onde se registrou as maiores determinações de temperatura, evidenciando uma decomposição microbiana do resíduo durante este período e conseqüentemente um nível de umidade considerado aceitável para a atividade da microbiota presente na biomassa.

5.6.4 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

O monitoramento diário do pH, demonstrou valores a rondar o pH neutro desde o início do processo, registrando-se na leira controle e na leira 02 valores idênticos de 6,8, enquanto na leira 03 o pH inicial foi mais alcalino registrando o valor de 7,63 (figura 21). Sugerindo que a correção nutricional efetuada equilibrou a biomassa permitindo que a ação microbiana possa ser desempenhada na sua totalidade. Sanchez-Monedero *et al.* (2001), compostaram uma mistura de bagaço de sorgo com casca de pinheiro enriquecida com 1 % de ureia, tendo

constatado que a rápida hidrólise da ureia levou ao rápido aumento de pH em poucas horas. Estudos efetuados por Almeida et al. (2012), indicam que o processo de compostagem pode ser desenvolvido em uma ampla faixa de pH entre 4,5 e 9,5 uma vez que os micro-organismos crescem melhor, pois a maioria das enzimas encontram-se ativas nesta faixa de pH.

Posteriormente assistimos a um acréscimo dos valores de pH nas três leiras, surgindo o pico máximo na leira 03 (7,92), às 24 horas de processamento, sendo que as duas outras leiras registraram o seu pico máximo ao final de 48 horas do processo, tendo a leira 02 atingindo o valor de 8,18 e a leira controle de 7,73. Verificando-se neste período temperaturas próximas 60 °C, o que desenvolve a microbiota termófila.

Fernandes e Silva (1996) afirmam que a fase termófila é acompanhada de rápida elevação do pH, que se explica pela hidrólise de proteínas e liberação de amônia, tornando o pH alcalino. Visto que todas as leiras foram inoculadas com o consórcio termo-celulolítico os resultados obtidos de pH, no início do experimento refletem junto com os valores de temperatura uma antecipação da fase termofila do processo, ou seja, uma catálise do processamento da biomassa.

A partir das 48 h observou-se um decréscimo em simultâneo das três leiras até às 120 h do processo, registrando-se pH idênticos na leira controle (6,26) e na leira 02 (6,35) enquanto que a leira 03 obteve o valor de 6,6. A partir deste momento os valores de pH das três leiras apresentam variações pequenas até ao pico mínimo de cada leira (240 h), onde a leira controle registra o valor mínimo de 5,34 a leira 02 apresenta o valor de 5,9 e a leira 03 o resultado de 6,32. Como se pode observar a leira controle apresenta um valor mais baixo de pH (figura 21).

De uma forma geral, os valores de pH registrados sugerem as condições ideais ao processo de compostagem, pois situam-se na faixa exigida por micro-organismos que participam do bioprocessamento, apresentando as leiras inoculadas com o consórcio tratado por emissão de luz visível em grande parte do experimento valores mais alcalinos de pH em consonância com os valores de temperatura obtidos, o que sugere uma atividade microbiana maior.

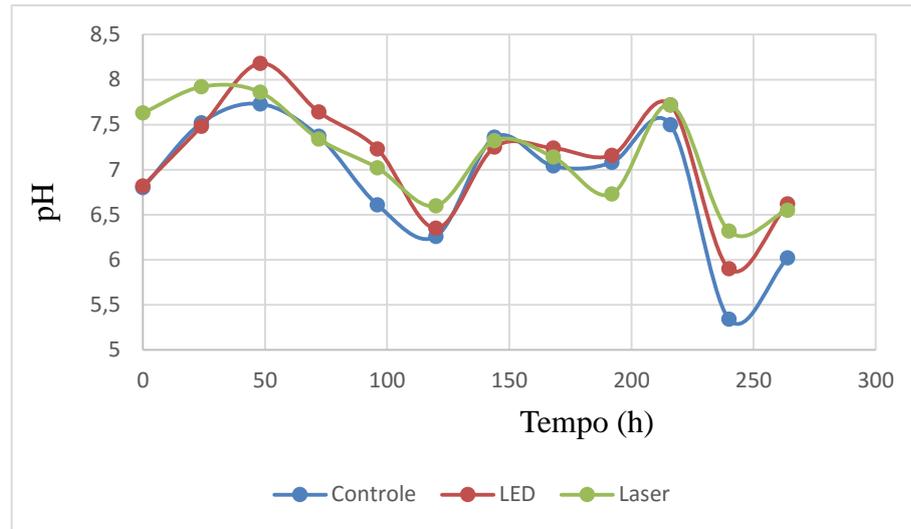


Figura 22. Variações de pH ao longo do experimento.

5.6.5 QUANTIFICAÇÃO DE *Nitrosomonas*

Cerca de 98% do nitrogênio presente no solo está associado à matéria orgânica, através dos micro-organismos nitrificantes presentes na compostagem o nitrogênio orgânico transforma-se em nitrogênio amídico e depois em nitrogênio amoniacal, aumentando assim o pH, pela reação alcalina característica da amônia. *Nitrosomonas* e *Nitrobactérias* transformam esse nitrogênio amoniacal em nitrato, produto final do nitrogênio orgânico. No final da compostagem todo o nitrogênio orgânico deverá estar mineralizado na forma de nitrato.

Com o objetivo de quantificar as *Nitrossomonas* empregou-se a técnica de tubos múltiplos e sua determinação foi através do NMP, tornando-se mais uma ferramenta para monitorar o processo de degradação do resíduo e avaliar com mais precisão a capacidade de bioestimulação da luz visível emitida nos inoculos das leiras 02 e 03.

Nas primeiras 24 h observou-se a presença de *Nitrossomonas* apenas na leira 03 (tabela 7), refletindo a existência de nitrogênio amoniacal através do elevado pH registrado (7,92). A geração de amônia é considerada como indicador da atividade biológica em resíduo com alto teor de nitrogênio (PAGANS *et al.* 2005), contudo o resíduo de coco verde tem uma relação C/N elevada (60/1), provavelmente a ureia que foi adicionada para balanço de massas seja a responsável pela geração de amônia, no início do processo na leira 03. De uma forma geral, a leira 03 teve um crescimento do número de *Nitrossomonas* até às 120 horas de monitoramento, observando-se de qualquer forma, a presença reduzida destes micro-organismos às 144 horas. Esta atividade microbiana é observada nos valores de temperatura obtidos durante este período, refletindo-se posteriormente em uma diminuição dos valores de pH registrados, a partir das 216

horas, propondo que o nitrogênio amoniacal foi transformado em nitrito através da ação das *Nitrosomonas*, identificadas durante o processo de compostagem.

Tabela 7 - Quantificação de *Nitrosomonas* ao longo do processo de compostagem. Leira 01- leira controle; Leira 02 – inoculo irradiado por LED; Leira 03- inoculo irradiado por LBP.

TEMPO (horas)	LEIRA 01 (NMP/g)	LEIRA 02 (NMP/g)	LEIRA 03 (NMP/g)
0	< 3,0	< 3,0	1,5x10 ²
24	< 3,0	< 3,0	2,1x10 ²
48	2,4x10 ³	2,1x10 ²	2,1x10 ²
72	< 3,0	2,4x10 ³	3,5x10 ²
96	< 3,0	< 3,0	1,5x10 ²
120	1,5x10 ²	1,2x10 ³	1,1x10 ⁵
144	2,4x10 ³	2,4x10 ³	9,3x10 ²
168	1,1x10 ⁵	< 3,0	< 3,0
192	1,5x10 ²	< 3,0	< 3,0
216	< 3,0	< 3,0	< 3,0
240	< 3,0	< 3,0	< 3,0
264	< 3,0	< 3,0	< 3,0

Nas leiras controle e 02, verificou-se a presença de *Nitrossomonas* às 48 h de processamento, tendo-se registrado neste período elevados valores de pH e de temperatura em ambas as células, observando-se na leira controle a presença destes micro-organismos até uma fase mais tardia, 192 horas, representando uma degradação do resíduo mais lenta, em relação à leira 02 e 03. Constatou-se que nas leiras 02 e 03 nos últimos cinco monitoramentos não houve presença expressiva de *Nitrosomonas*, sugerindo que o nitrogênio orgânico deverá estar na forma de nitrito ou na sua forma mais mineralizada de nitrato, valorizando o composto final obtido.

5.6.6 QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLITICOS

A quantificação dos micro-organismos celulolíticos foi efetuada utilizando-se a técnica de tubos múltiplos e revelada através da descoloração do DCPIP, sugerindo sua oxidação.

Pelos resultados apresentados na tabela 8, pode-se constatar, que o número de micro-organismos celulolíticos foram superiores nas leiras em que o inoculo foi exposto a radiações visíveis no espectro vermelho, comparativamente à leira controle inoculada apenas com o consórcio sem qualquer emissão de luz, com exceção para o último monitoramento efetuado em que as leiras se encontravam com uma comunidade microbiana mesófila. Essa diferença é notória desde o primeiro monitoramento realizado, sugerindo autenticidade à hipótese levantada neste trabalho sobre o potencial de bioestimulação da luz visível no metabolismo celular do consórcio, comprovando assim, a existência de fotoceptores capazes de absorver os fótons emitidos provocando uma transformação na atividade funcional e metabólica da célula.

Tabela 8 - Quantificação de micro-organismos celulolíticos ao longo do processo de compostagem. Leira 01- leira controle; Leira 02 – inoculo irradiado por LED; Leira 03- inoculo irradiado por LBP.

TEMPO (horas)	LEIRA 01 (NMP/g)	LEIRA 02 (NMP/g)	LEIRA 03 (NMP/g)
0	$\geq 2,4 \times 10^5$	$\geq 2,4 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^9$
24	$\geq 2,4 \times 10^5$	$\geq 2,4 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^9$
48	$\geq 2,4 \times 10^5$	$\geq 2,4 \times 10^9$	$\geq 2,1 \times 10^{10}$
72	$\geq 2,4 \times 10^5$	$\geq 2,4 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^9$
96	$\geq 2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^9$
120	$\geq 2,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^9$
144	$\geq 2,4 \times 10^5$	$\geq 2,4 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^9$
168	$\geq 2,4 \times 10^5$	$\geq 2,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{10}$
192	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$
216	$4,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$	$2,4 \times 10^{10}$
240	$7,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$
264	$4,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$

Os valores quantificados de micro-organismos celulolíticos, nas leiras em que o inoculo foi exposto à radiação por luz visível, mantiveram-se constantemente elevados em todos os pontos monitorados, com a exceção para o último registro realizado (264 h), observando-se uma diminuição em todas as leiras supervisionadas, com maior magnitude nas leiras 02 e 03. Na leira controle verificou-se um aumento do número de micro-organismos celulolíticos mais tardio, ocorrendo no período de 192 a 240 horas, registrando-se, neste momento, temperaturas que desenvolvem a microbiota mesófila, ou seja, não correspondendo ao período que se obteve

temperaturas mais elevadas, de 48 a 72 horas, propícias à colonização de uma microbiota termófila, sugerindo assim, uma possível proliferação de outros micro-organismos responsáveis pela atividade metabólica ocorrida e consequente temperatura obtida.

Nas leiras inoculadas com o consórcio irradiado por luz visível é nítido uma antecipação da comunidade microbiana termófila para os primeiros dias de compostagem (48 e 72 horas), diminuindo o período inicial de latência e estimulando a degradação das macromoléculas mais complexas presentes na biomassa, desde o início do processo. Por outro lado, os micro-organismos celulolíticos mantiveram-se constantes e disponíveis no processo por um longo período de tempo, podendo refletir uma atividade metabólica considerada estável e duradoura.

Goyal, Dhull & Kapoor (2005), afirmam através de estudos das atividades das celulasas e xilanases, que a celulose e hemicelulose são ativamente degradadas durante os primeiros 60 dias no caso da compostagem tradicional, constatando um aumento da atividade das celulasas ao longo do processo até se atingir o seu pico máximo aos 30 dias, seguido de um período de declínio entre 30 a 60 dias. Neste experimento, as leiras com o inoculo tratado com emissão de luz, obtiveram a população mais alta nos primeiros dias, portanto muito mais cedo em relação ao constatado pelos autores supracitados, sugerindo um aumento da velocidade de decomposição dos substratos, provavelmente pela capacidade de catálise dos inoculo adicionados. Segundo Lei & VanderGheynst (2000), o gerenciamento do processo de compostagem através da adição de micro-organismos específicos pode ser uma alternativa para aumentar a velocidade de decomposição dos substratos. Sendo assim, através da emissão de luz no espectro vermelho pretendeu-se bioestimular os micro-organismos do consórcio, resultando em um incremento de ATP, capaz de melhorar o poder de catálise do inoculo termo-celulolítico adicionado nas leiras 02 e 03.

5.6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA MEDIANTE DESCOLORAÇÃO COM VERMELHO CONGO

Após o período de incubação de 24 h das amostras em meio sintético CMC 1 % e descoloração com vermelho congo, observou-se a existência de formação de halos nos cultivos das amostras coletadas das três leiras em estudo ao longo do tempo de compostagem. Avaliou-se os primeiros dias de compostagem, pois foi nesse período que se constatou uma temperatura das leiras mais elevadas, propondo uma atividade microbiana mais intensa.

A formação de halos em placas de ágar com CMC resulta na clivagem da carboximetilcelulose em fragmentos menores que celohexose, à qual o vermelho congo não se

liga. Estes fragmentos pequenos são dispensados da placa na hora da lavagem, visto que o corante vermelho congo permanece ligado apenas às regiões onde existem ligações β -1,4 glicídicas. Segundo Wood (1980), apenas a atividade da endoglucase pode ser esperada para produzir zonas de hidrólises. Estudos realizados por Theather; Wood (1982) demonstram uma forte interação do vermelho congo com polissacarídeos (β 1-4) ligado em unidades D-glucopiranosil fornecendo a base para um ensaio sensível para a detecção de colônias de bactérias produtoras de celulase. Sendo estas, as que mais se destacam na hidrólise da celulose, biocatalisadores específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, resultando na produção final de glicose.

De uma forma geral, os índices enzimáticos determinados ao longo dos primeiros dias de compostagem acompanharam os valores registrados de temperatura. Observou-se, através da tabela 9, que os valores médios dos índices enzimáticos obtidos nas leiras irradiadas por luz visível foram sempre superiores aos registrados na leira controle. Esta registrou o maior valor de atividade celulolítica às 24 horas de processamento da biomassa, sendo provavelmente devido ao consórcio termo-celulolítico adicionado no início do processo.

Tabela 9 - Índices de atividade celulolítica ao longo do tempo. Leira 01 - leira controle; Leira 02 – inoculo irradiado por LED; Leira 03- inoculo irradiado por LBP.

TEMPO (horas)	MÉDIA DOS ÍNDICES ENZIMÁTICOS (mm)		
	LEIRA 01	LEIRA 02	LEIRA 03
0	Sem halo visível	Sem halo visível	Sem halo visível
24	0,44	0,52	0,48
48	0,40	0,55	0,58
72	0,38	0,59	0,55
96	0,36	0,42	0,42
120	0,33	0,35	0,36

Por outro lado, as leiras em que o inoculo foi exposto à radiação no espectro visível apresentaram desde as primeiras 24 horas índices enzimáticos superiores comparativamente à leira controle (figura 22), refletindo as temperaturas registradas e sugerindo uma velocidade de degradação maior em comparação com a leira controle. Embasando a hipótese da bioestimulação provocada pela emissão de radiação no espectro vermelho a que os inoculos foram sujeitos.

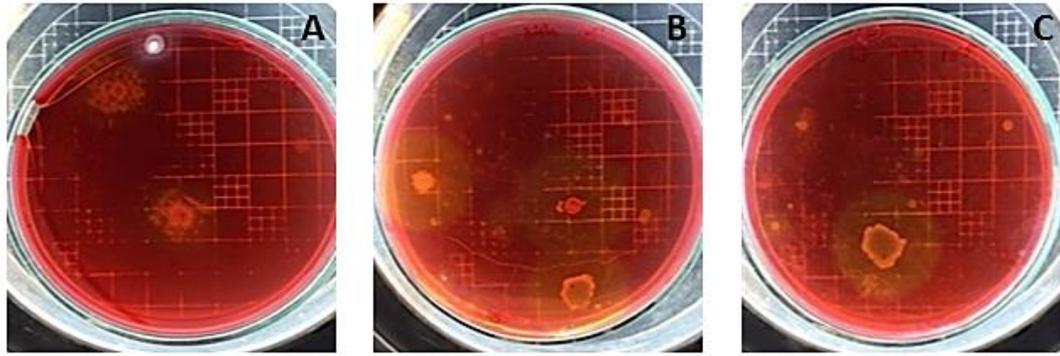


Figura 23. Halos de hidrolise após coloração com vermelho congo, nas amostras coletadas ao final de 24 h de processamento. (A) Leira controle; (B) Leira com inoculo exposto à radiação por LED; (C) Leira com inoculo exposto à radiação por LBP.

Observou-se um decréscimo de atividade celulolítica em todas as leiras nas determinações realizadas das amostras coletadas ao final de 120 h de processamento, vivenciando neste momento uma microbiota mesófila, própria das temperaturas registradas neste período.

É de realçar que a visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas podem interferir no corante proporcionando falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (CASTRO, 2006).

6. CONCLUSÃO

6.1 CONCLUSÃO GERAL

Diante do abordado neste trabalho foi possível concluir-se através da análise da resposta microbiana que a emissão de luz LBP ou LED no espectro vermelho desenvolveu um processo de fotobioestimulação no consórcio termo-celulolítico, indicando modificações geradas pelo aumento do aporte energético celular provido pela radiação na cadeia respiratória bacteriana. Verificou-se também que a resposta celular à fotobioestimulação não está associada às propriedades específicas da luz Laser, como a coerência.

O acompanhamento dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos ao longo do processo de compostagem demonstraram que as leiras inoculadas com o consórcio exposto à emissão de luz LBP ou LED na região do vermelho promoveu o desenvolvimento de temperaturas mais elevadas e uma fase termófila antecipada e mais longa, para além de se constatar um aumento da atividade microbiológica desencadeando um aumento da velocidade dos processos microbianos e do processamento das fibras de coco verde. A bioestimulação do inóculo através de LBP ou LED no espectro vermelho, proporcionou um aumento do poder de catálise da degradação das fibras de coco verde, representando uma maior eficácia e aumento da viabilidade econômica do processo.

6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

6.2.1 ESTUDO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO LBP OU LED NO METABOLISMO DO CONSÓRCIO TERMO-CELULOLÍTICO

a) No estudo de uma única aplicação de radiação LBP ($\lambda 660$ nm) ou LED ($\lambda 632 \pm 2$ nm) no consórcio microbiano termo-celulolítico constatou-se um aumento na proliferação microbiana nas amostras irradiadas por ambas as fontes luminosas.

b) O método de microscopia de fluorescência revelou conformações coesas e bastante agregadas de micro-organismos formando biofilme, nas amostras expostas à radiação LBP ao final de 48 h de sua aplicação. Julga-se ser de relevância, a realização de novas pesquisas de forma a explorar este processo biológico, pois poderá vir a fornecer dados fundamentais para outros estudos.

c) A simulação da desordem funcional pela ausência de nutrientes propicia a ocorrência e a determinação de alterações metabólicas celulares, obtendo-se uma resposta biológica estimulatória de crescimento celular significativa do consórcio, a partir da terceira emissão de radiação LBP ($\lambda 660$ nm) ou LED ($\lambda 632 \pm 2$ nm) em relação às amostras controle. Sugerindo que o número de exposições desenvolve diferentes efeitos nos cromóforos, podendo estimular a macromolécula a alterar a sua geometria, assim como transferir energia aos elétrons, desencadeando o processo de síntese de ATP na célula (CHAVANTES et al., 2009). Por outro lado, a cascata de reações bioquímicas desencadeadas pelas alterações primárias provocadas pela radiação através do fotoceptores podem acontecer após horas ou dias da emissão da irradiação.

d) Em ambas as fontes emissoras de luz utilizadas a dose energética que propiciou uma resposta mais eficaz à fotobioestimulação foi de 13 J/cm^2 .

e) A resposta biológica através de uma única aplicação em ambas as fontes luminosas foi menor comparativamente com a emissão de aplicações sucessivas de radiação com intervalos de tempo de 12 h, utilizando comprimentos de onda iguais na região do vermelho.

f) A resposta celular à fotobioestimulação não está associada às propriedades específicas da luz Laser, como a coerência.

6.2.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO CONSÓRCIO ATIVADO POR RADIAÇÃO LBP OU LED, DE CATALISAR O BIOPROCESSO DE COMPOSTAGEM

a) A maior proliferação do número de micro-organismos celulolíticos nas leiras de compostagem, no início do processo, comprovaram que a radiação visível emitida ao consórcio em ambas as fontes luminosas, estimularam o seu crescimento.

b) Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos ao longo do processo de compostagem demonstraram que as leiras inoculadas com o consórcio exposto a radiação visível desenvolveram um ecossistema equilibrado, evidenciando temperaturas mais elevadas

por um longo período, determinando uma intensa atividade microbiana celulolítica, culminando com a catálise do bioprocesso de degradação das fibras de coco verde.

7. REFERÊNCIAS

- AGNEW, J.; LEONARD, J. **The physical properties of compost.** Compost Science and Utilisation. V. 11, 238-264p, 2003.
- ALBERTS B, JONHSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. **Biologia molecular da célula. 4. Ed. Porto Alegre: Art. Med, 2004.**
- ALBUQUERQUE, É. D. **Aumento da Atividade celulásica para a hidrólise da casca de coco verde pela aplicação da alta pressão hidrostática.** Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, RENORBIO, 31-35p, 2013.
- ALEXANDER, M.; CLARK, F. E.. “Nitrifying bacteria”. In C. A. Black (ed.), **Methods of soil analysis, part 2.** Chemical and microbiological properties, pp. 1477 – 1483. American Society of Agronomy. Madison, Wis. 1982.
- ALMEIDA, L. L.; RIGAU J.; ZANGARO, RA.; GUIDUGLI, N.J.; JAEGER M. M. **Comparison of the Low-Level Laser Therapy Effects on Culture Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irrdiance and Same Fluence.** In Lasers Surg Med 179-84p, 2001.
- ALMEIDA *et al.* **Unidades de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos Urbanos.** Apostila para a gestão de municipal de resíduos sólidos urbanos. Paraná, 2012.
- ANEJA. K.R. **Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology.** Deptt. of Microbiology, Kurukshetra University, Kurukshetra (Haryana) India, 2003.
- AZEVEDO, J.L.; ESPOSITO, E.. **Fungos: Uma introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, p.451- 490, 2004
- BAGNATO, V.S. **Uso de LEDs (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora.** BR n. PI0200200-0, 23 jan. 2002.
- BAGNATO, V. S.; KURASHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L. G.; SIBATA, C. H.; ALLISON, R. R. **Photodiagnosis and photodynamic Therapy.** PDT experience in Brazil: A regional profile. USA, vol. 2, 107-118p, 2005.
- BAGNATO V. S.; MARIYAMA L. T. **Dosimetria na terapia com laser de baixa intensidade.** J Bras Laser, v. 1, 26-29, 2007.
- BANEGAS, V.; MORENO, J. L.; MORENO, J. I.; GARCIA, C.; LEON, G.; HERANDEZ, T. **Composting anaerobic and aerobic sewage sludges using two proportions of sawdust.** Waste Management V. 10, 1317 - 1327p, 2007.
- BARI, Q. H.; KOENING, A. **Effect of air recirculation and reuse on composting of organic solid waste.** Resource conservation & recycling, Amesterdam, v.3, 93-111p, 2001.
- BARLAZ, M. A. **Microbial studies of landfills and anaerobic refuse decomposition.** 541-557p, in C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter (ed) Manual of environmental microbiology, American Society for microbiology, Washington, D. C.1997.

- BARRINGTON, S.; CHOINIERE, D.; TRIGUI, M.; WILLIAM, K. **Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses**. *Bioresource Technology*, V. 83, p. 189–194, 2001.
- BASSO F. G.; OLIVEIRA C. F.; FONTANA A.; KURACHI C.; BAGNATO V. S.; SPOLIDÓRIO D. M. P.; HEBLING J.; COSTA C. A.; **In Vitro Effect of Low-Level Laser Therapy on Typical Oral Microbial Biofilms**. *Braz Dent J*, p.502-510, 2011.
- BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, Sheila. **Eletroterapia. Eletroterapia prática baseada em evidências**. 2. Ed. Barueri: SP: Manole, 2003.
- BÉGUIN, P. **Molecular biology of cellulose degradation**. *Annual Review of Microbiology*, v.44, p.219-248, 1990.
- BENVINDO et al. **Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias in vitro**. *Fisioterapia e Pesquisa*, v. 15, nº 1, São Paulo, 2008.
- BERTHE, L.; DRUILHE, C.; MASSIANI, C.; TREMIER, A.; GUARDIA, A. **Coupling a respirometer and a pycnometer, to study the biodegradability of solid organic wastes during composting**. *Biosystems Engineering* N° 97, 75 - 88p, 2007.
- BISMARCK, A.; MOHANTY, A. K.; ARANBERRI-ASKARGORTA, I.; CZAPLA, S.; MISRA, M.; HINRICHSEN BAND, G.; SPRINGERA, J. **Surface characterization of natural fibers; surface properties and the water up-take behavior of modified sisal and coir fibers**. *Green Chemistry*. Cambridge, v.3, p.100–107, 2001.
- BITENCOURT, D.V.; PEDROTTI, A. **Usos da casca de coco: Estudo da viabilidade de implantação de usina de beneficiamento de fibra de coco em Sergipe**. *Revista Fapese*. v.4, p.113-114, 2008.
- BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. The direct effect of 860 nm light on cell proliferation and on succinic dehydrogenase activity of human fibroblasts in vitro. *Laser Therapy*, v.7, p. 55-60, 1995.
- BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências com área de concentração em Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p. 21; 2011.
- BUCKERIDGE, M.S., SILVA, G.B. & CAVALARI, A. A. **Parede Celular**. In: Kerbauy, G.B. (ed). 2ed. *Fisiologia Vegetal*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. Pg. 165-181, 2008.
- BUMAH V. V.; MASSON-MEYERS D. S.; CASHIN S. E.; ENWEMEKA S. CHUKUKA. **Wavelength and Bacterial Density Influence the Bactericidal Effect of Blue Light on Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)**. *Photomedicine and Laser Surgery*, p. 1-7, 2013.
- CARNEIRO, L. J. **Compostagem de resíduos agroindustriais: revolvimento, inoculação e condições ambientais**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel/PR, 2012
- CARVALHO, G. B. M. et al., **Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos**. *Revista Analytica*, 14, 54-57p, 2005.

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

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

COELHO, F. C. **Composto Orgânico**. Programa Rio Rural- Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento. V.3,4p, 2008.

COLL, J. **La terapia laser hoy**. 3ed. C.D. L. Barcelona, Espanha, 1987.

CONLAN, M. J., Rapley, J. W. and Cobb, C. M. **Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation**. A review. J. Clin. Periodontol. 23, 492-496, 1996.

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

CORRADINI, E., ROSA, D. S., MATTOSO, L. H. C., MACEDO, B.P., PALADIN, P.D. **Cultivars of immature coconut fibers**. Revista Brasileira de Fruticultura. v.31, 837-846, 2009.
DEVLIN T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. Tradução da 5ª edição americana. São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

COUTH, R.; TROIS, C., **Cost effective waste management through composting in Africa**. Waste Management, v. 32, p. 2518–2525, 2012.

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

DIAZ, L. F.; SAVAGE, G. M. **Factors that affect the process**. In: L. F. Diaz, M. de Bertoldi, W. Bidlingmaier, E. Stendiford (ed.) *Compost Science and Technology*. Elsevier, Amesterdam. p. 49-64, 2007.

DELGADO, T. C. **Avaliação de bactérias nitrificantes em filtros biológicos submersos aerados**. Dissertação de mestrado, Rio Grande do Sul, 2009

DOURADO DM, FÁVERO S, MATIAS R, CARVALHO P de T, da CRUZ-HÖFLING MA. **Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1** Fernandes, M.J.C. (2012). **Avaliação do processo a implementar numa central de compostagem: formulação de misturas de resíduos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto – Universidade do Porto, Portugal. *venom photochemistry and photobiology*, 418–426p, 2011.

EELLS, J. T. et al. **Mitochondrial signal transduction in accelerates wound by near-infrared light therapy**. *Mitochondrion*, v. 4, 559-567p, 2004.

ENWEMEKA, C. S. **Standard Parameters in Laser Phototherapy**, Photomedicine and Laser Surgery, v. 26, N 5, p. 411. 2008.

ENWEMEKA, C. S. et al., **Blue 470-nm light kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Vitro**, Photomedicine and Laser Surgery, v. 27, 2009.

ENWEMEKA, C. S. **Intricacies of Dose in Laser Phototherapy for Tissue Repair and Pain Relief**. Photomedicine and Laser Surgery. Volume 27, Number 3, Pp. 387–393. 2009.

FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. **Manual prático para a compostagem de biossólidos**. UEL- Universidade Estadual do Paraná. Londrina, 9-44p, 1996.

FERNANDES, M.J.C. **Avaliação do processo a implementar numa central de compostagem: formulação de misturas de resíduos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto – Universidade do Porto, Portugal, 2012.

FLORENCIO, C. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

FORMOSINHO, S.; PIO, C.; BARROS, J. & CAVALHEIRO, J. **Parecer Relativo ao Tratamento de Resíduos Industriais Perigosos**. Aveiro: Comissão Científica Independente de Controlo e Fiscalização Ambiental da Co-Incinerção, 2010.

FRANCISCO, P. **Compostagem Biotecnológica acelerada para produção de ração ou adubo a partir de resíduos de lixo verde**. Dissertação de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências e Saúde da Universidade Federal da Bahia, p. 28-31, 2015.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I. **A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures**. J Photochem Photobiol B: Biol, v. 11, p. 87-95, 1991.

GARCEZ, A. S. **Laser de Baixa Potência: Princípios Básicos e aplicações clínicas na Odontologia** /Aginaldo Silva Garcez, Martha Simões Ribeiro, Silvia Cristina Núñez, - Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

GE, B.; MCCARTNEY, D.; ZEB, J. **Compost environmental protection standards in Canada**. Journal of Environmental Engineering and Science N° 5, p. 221 - 234, 2006.

GOLDMAN, L. **The biomedical laser: technology & clinical applications**. New York: Springer Verlag, 5-25p, 1981.

GOMEZ, R.; LIMA, F.; FERRER, A. **The use respiration índices in the composting process: a review**. Waste Mangement and Reserch. N° 24, p. 37-47, 2006.

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

GOYAL, S.; Dhull, S.K., & Kapoor K.K. **Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity.** Bioresource Technology, v. 96, p. 1584–1591, 2005.

HAUG, R. T. **The practical handbook of composting engineering.** Lewis Publishers, Boca Raton, USA, 1993.

HERBETS et al. **Compostagem de resíduos sólidos orgânicos: aspectos biotecnológicos.** 2005. Disponível em: <http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/download/68/111>, acessado em 18 de Julho de 2015.

HIGA, T.;WIDIDANA, G.N. **The concept and theories of Effective Microorganisms: A New Dimension for Nature Farming.** pp. 20-22, 2007. In J.F. Parr, S.B. Hornick, and M.E. Simpson (eds). Proceedings of the 2nd International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S.Department of Agriculture, Washington, D.C, USA.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LANZAFAME, R. J. **Revolution and Revelation.** *J. Clin Laser Med Surg*, v.22, n.1, p 1-2, 2004.

LEVY, J.; CABEÇAS, A. **Resíduos Sólidos e Urbanos: Princípios e Processos.** AEPSA, 2006.

LEI, F.; VANDERGHEYNST, J.S. **The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting.** *Process Biochemistry*, v. 35, p. 923–929, 2000.

LIANG, C.; DAS, K. C.; MCCLENDON, R. W. **The influence of temperature and moisture content regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend.** *Bioresource technology*, Amsterdam, v. 86, p. 131-137, 2003.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.) **Biotechnologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blucher LTDA, cap. 1, 11-20p, 2001.

LINS, R. D. A. U.; DANTAS, E. M.; LUCENA, K. C. R.; CATÃO M. H. C. V.; GRANVILLE-GARCIA, A. F.; NETO, L. G. C. **Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo.** *Anais Brasileiros de dermatologia*, v. 85, nº6 Rio de Janeiro, 2010.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. **Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology.** n.3, v.66, 506-577p, 2002.

LOSEV, O. V. **Independently reported the creation of LED** in Russian, German, and British scientific journals but his research was ignored at that time, 1927.

LOW, J. **Eletroterapia explicada: princípios e prática.** São Paulo, Manole, 472p, 2001.

LUBART, R.; LIPOVSKI A.; NITZAN Y.; FRIEDMANN H.; **A possible mechanism for the bactericidal effect of visible light.** Artigo de revisão, *Laser Therapy* 20.1: 17-22, 2010.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; GROSSMANN, N.; ADAMER, M.; SHAINBERG, A. **The role of intracellular calcium oscillations in photobiostimulation.** *Laser Technol*, v.6, n.3, p.79-84, 1996.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYAKOV, M.; SHIMAN, A.; GROSSMAN, N.; ADAMEK, M.; SHAINBERG, A. **The effect of He: He Laser (633nm) radiation on intracellular Ca²⁺ concentration in fibroblasts.** *Laser Therapy*, v.9, p.115-120, 1997.

MALBERBE, S.; CLOETE, T. E. **Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications-** a review. *Environment Science Biotchnology*, Frankfurt, v.1, 105-114p, 2003.

MANIOS T. **The composting potential of diferente organic solid westes.** Experience from the island of craté. *Environment International*, v. 29, p. 1079– 1089, 2004.

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

MATTOS, A. L. A.; ROSA, M. F.; CRISÓSTOMO, L. A. BEZERRA, F.C. CORREIA, D.; VERAS, L. G. C. **Beneficiamento da casca de coco verde.** 2006. Disponível em: http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3830.pdf, acesso em 11 de Junho de 2014.

MCGUIGAN, K. G.; CONROY R. M.; MOSTER H.; PREEZ M.; UBOMBA-JASWA E.; NEZ P. F. **Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top.** *Journal of Hazardous Materials*, p. 235– 236; 29– 46, 2012.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and reuse.** The McGraw-Hill Companies, Inc. New York, NY, 2003.

MESTER, E. **A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban.** *Orv Hetilap*, v.107, p.1012, 1966.

MIYATAKE, F.; IWABUCHI, K. **Effect of compost temperature on oxygen uptake rate, specific growth rate and enzymatic activity of microorganisms in dairy cattle manure.** *Bioresour Technol*, p. 961-5, 2005.

MOLLA, A.H., FAKHRU-RAZIF, A., Abd-Aziz, S., Hanqfi, M.M., Roychoudhury, P.K., and Akan, M.Z., **Bioresour. Technol**, v. 85, n. 3, p. 263–272, 2002.

MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G. A.; ORIENTI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; ROCCA, M.; TORRICELLI, P.; MARTINI, L. GIARDINO, R. **Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In Vivo experimental study.** *Lasers Med Sci*, v.13, p.293-298, 1998.

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

NEKLYUDOV, A. D., FEDOTOV G. N. and IVANKIN, A. N. **Intensification of Composting Processes by Aerobic Microorganisms: A Review.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 44, n. 1, 6–18p, 2008.

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

NUSSBAUM EL, LILGE L, MAZZULLI T. **Effects of 810-nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: comparison of continuous wave and frequency modulated light.** *Lasers Surg Med*. 31:343-51, 2002.

OLIVEIRA, E. C. A.; SARTORI, R. H.; GARCEZ, T. B. **COMPOSTAGEM.** Universidade de São Paulo. 2008. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Compostagem_000fhc8nfqz02wyiv80efhb2adn37yaw.pdf, acesso em 18 de Junho 2014.

OLIVEIRA, N. C. **Seleção de micro-organismos com potencialidades para biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados**. Dissertação de mestrado, Goiás, 2009.

OLIVEIRA, V. R.; FREIRE F. M.; VENTURIN, R.; CARRIJO, O. A.; MACARENHAS, M. H. T. **Caracterização química de substratos para produção de hortaliças**. 2002. Disponível em:
<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/cpna2002c.pdf>,
 acesso em 15 de Junho 2014.

OLIVEIRA, S. C. P. S.; MONTEIRO, J. S. C.; PIRES-SANTOS, G M.; SAMPAIO, F. J. P, FÁTIMA ANTÔNIA APARECIDA ZANIN, F. A. A.; ANTÔNIO L. B. PINHEIRO, A. L. B. **Evaluation of the efficacy of photodynamic antimicrobial therapy using a phenothiazine compound and Laser ($\lambda 660$ nm) on the interface: macrophage vs *S. aureus***. Mechanisms for Low-Light Therapy X, edited by Michael R. Hamblin, James D. Carroll, Praveen Arany, Proc. of SPIE Vol. 9309, 2015.

PARADELA, C. S. **Projeto piloto de compostagem acelerada**, Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente, Universidade do Porto – Faculdade de Engenharia, “Manuel Pereira”, p.1-2, 2014.

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

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

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

PIRES, C. S. **Tratamento dos resíduos orgânicos como cumprimento da política nacional de resíduos sólidos: Análise dos planos municipais da bacia do alto Tietê**. 2013.

PÖNTINEN, P. J. **Low level laser therapy as a Medical treatment modality**. Tampere: Art Urpo, p.13-17, 1992.

POURREAU-SCHNEIDER, N.; AHMED, A.; SOUDRY, M.; JACQUEMIER, J.; KOPP, F.; FRANQUIN, J. C.; MARTIN, P. M. **Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts**. Am J Pathol, v.137, n.1, p.171-178, Jul. 1990.

PROSAB. **Manual prático para a compostagem de biossólidos**. Londres: Universidade Estadual Londrina, 1996.

RAMOS, L. P. **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials**. Quimica Nova, São Paulo, v.26, n.6, p.863-871, 2003.

RICHARD, T. L; HAMELERS, H.V.M.; VEEKEN, A.; SILVA, T. **Moisture Relationships in Composting Processes**. Compost Science & Utilization. v. 10, n. 4, p.286-302, 2013.

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

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Jureia-Itains.** São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v.27, p.205-211, 2004.

SANTOS, J.D. **Caracterização físico-química e biológica em diferentes laboratórios de produtos obtidos a partir da compostagem de resíduos orgânicos biodegradáveis.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Zoologia e Antropologia: Faculdade de Ciências - Universidade do Porto, Portugal, 2007.

SANCHEZ-MONEDERO, M.A.; ROIG, A.; CEGERRA, J. & BERNAL, M.P. **Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures.** Biores. Technol., 78:301-308, 2001.

SANCHUKI, C. E. **Estudo da Compostagem Acelerada de Cama de Frango.** Dissertação de mestrado. Paraná, 2011.

SCHUCHARDT, F. **Composting of organic waste.** Environmental Biotechnology. Concept and applications. 2005.

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

SMITH K. C. **Laser (and Led) therapy is phototherapy.** Photomed laser surg., 23, p.78-80, 2005.

SOUSA, D.M.F. **Aplicação do processo de compostagem na estabilização de dejectos de coelho.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Ambiente e Ordenamento - Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

SOUZA F.H.M, RIBEIRO C.F.; WEIGERT S., SCHMIDT J.V.; FABRICIO L.Z.; ATAÍDE D.S.T. **Estudo comparativo de uso de Laser Diodo (810nm) versus Luz Intensa Pulsada (filtro 695nm) em epilação axilar,** 2010.

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

SUNDBERG, C.; SMARS, S., JONSSON, H. **Low pH as a inhibiting fator in the transition from mesophic to thermophilic phase in composting.** Bioresource Technology, v. 95, p. 145–150, 2004.

SUNDBERG, C. **Improving Compost Process Efficiency by Controlling Aeration, Temperature and pH.** Tese apresentada a Universidade Sueca de Ciências Agrícolas como requisito para aquisição de grau de Doutor, Uppsala (2005).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3ª edição. Editora Artmed, p.719, 2004.

TUOMELA, M., VIKMAN, M.; HATAKKA, A., ITAVAARA, M. **Biodegradation of lignina in compost environment: a review**. Bioresource technology, Washinton, v.72, 169-183p, 2000.

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

VIEIRA, M. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de composto orgânico a partir da degradação acelerada de resíduos de poda de árvores**. Tese apresentada ao programa da Rede Nordeste de Biotecnologia para requisito para aquisição de grau de Doutor, 2013.

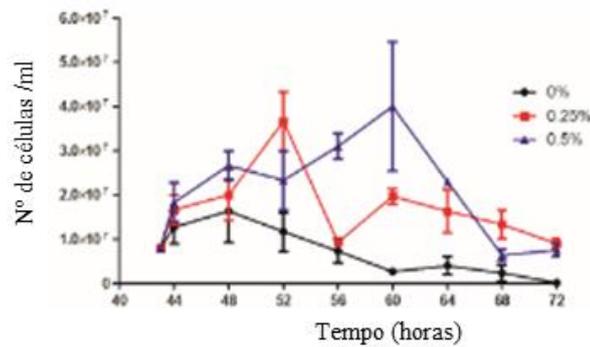
WOOD, P.J.; TEATHER, R.M. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** v.43, p.777-780, 1982.

WOOD T. M.; SADDLER, J. N. **Increasing the availability of cellulose in biomass materials**. In: Methods in Enzymology, New York, v. 160, p. 3-11, 1988.

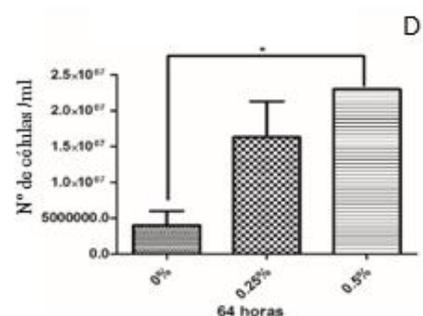
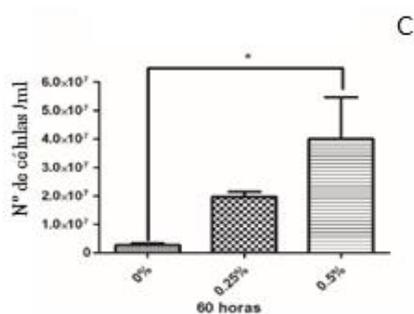
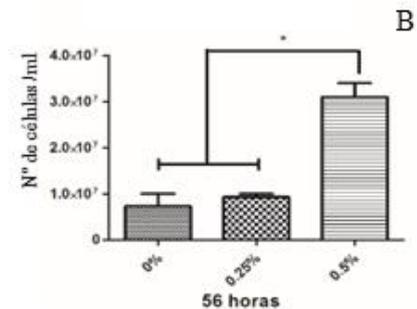
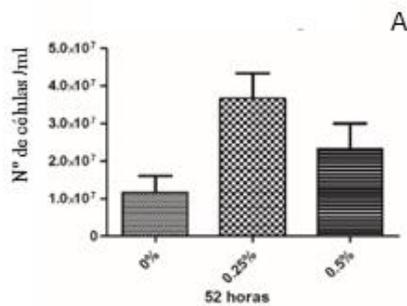
YU. VLADIMIROV A. et al. **Princípios fotobiológico de aplicações terapêuticas de radiação laser**. Bioquímica Moscou - Volume 69, Number 1 /Janeiro de 2004.

APÊNDICE A – Estudo da influência de privação de nutrientes em diferentes porcentagens de fonte de carbono

Gráfico de análise estatística ANOVA, comparando o comportamento de diferentes porcentagens de fontes de carbono ao longo do tempo.

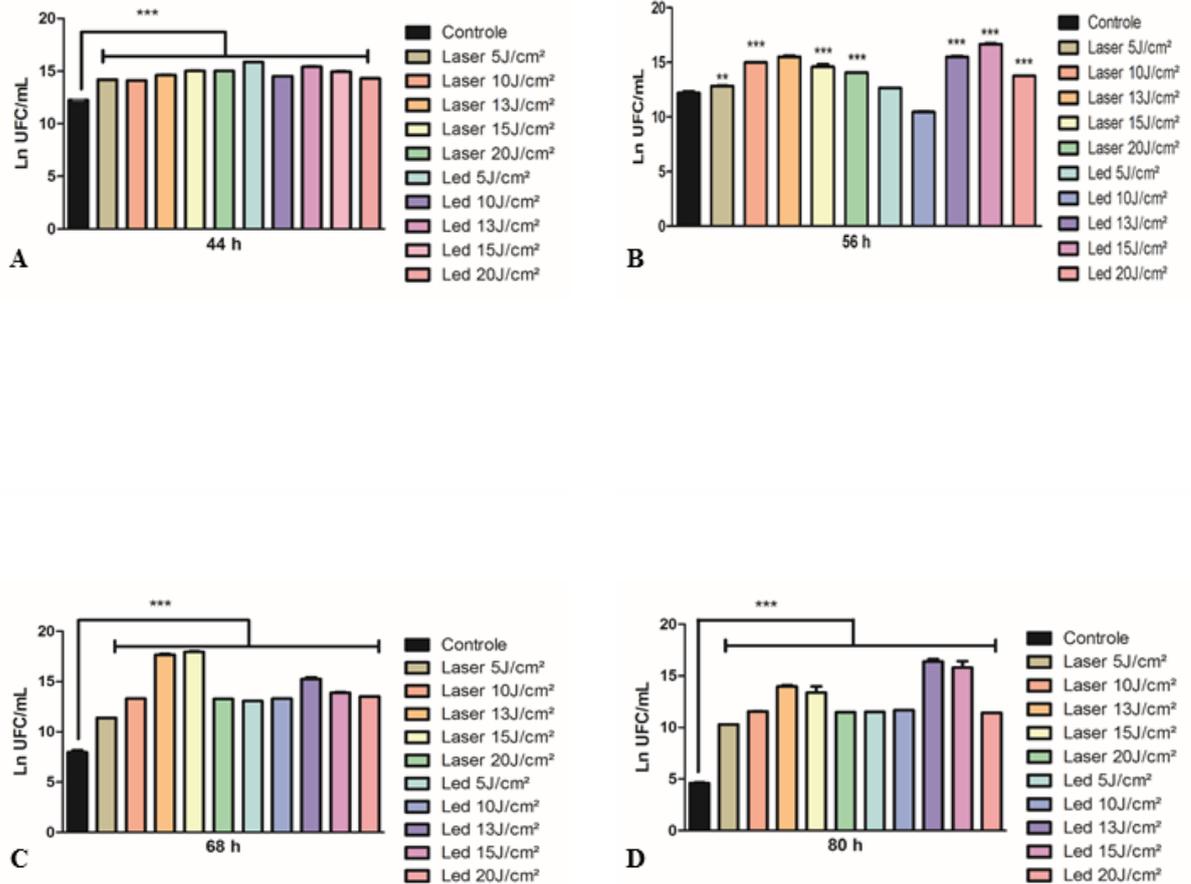


Gráficos de análise estatística ANOVA, comparando o número de células por mL em alguns dos tempos monitorados em diferentes porcentagens de fontes de carbono: (A) 52 horas; (B) 56 horas; (C) 60 horas; (D) 64 horas.



APÊNDICE B – Comparação dos resultados estatísticos (ANOVA) das diferentes doses energéticas estudadas, após a terceira exposição de emissão de luz visível no consórcio termo-celulolítico em estresse nutricional, utilizando as fontes de luz: LBP ou LED. (A) 44 h de privação nutricional; (B) 56 h de privação nutricional; (C) 68 h de privação nutricional; (D) 80 h de privação nutricional;

*Significância



APÊNDICE C - Resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos no monitoramento das leiras de compostagem, ao longo do tempo.

Leira 01 - controle, inoculada com o consórcio sem qualquer exposição à luz.

Leira 02 - inoculada com o consórcio exposto à emissão de luz visível LED.

Leira 03- inoculada com o consórcio termo-celulolítico exposto à radiação por LBP.

Tempo (J/cm ²)	Concentração de Oxigênio (%)		
	Leira 01	Leira 02	Leira 03
0	20,8	20,8	20,8
24	20,8	20	19
48	19,4	18,2	19,7
72	18,76	20,2	19,7
96	19,8	19,8	19,8
120	19,3	20,1	18,7
144	20,8	20,8	20,8
168	20,7	20	20
192	20,7	20	20
216	20,6	19,5	20,3
240	20,5	19,5	20
264	20,5	20,5	20,5

Tempo (J/cm ²)	Média de Temperaturas (°C)		
	Leira 01	Leira 02	Leira 03
0	43	41	44
24	52	55	55
48	53	59	65
72	50	65	62,66
96	47	49	50
120	36	36	36
144	47	55	52
168	39	41	39
192	31,666	44	44
216	36	37	36
240	35	33	32
264	34	38	39

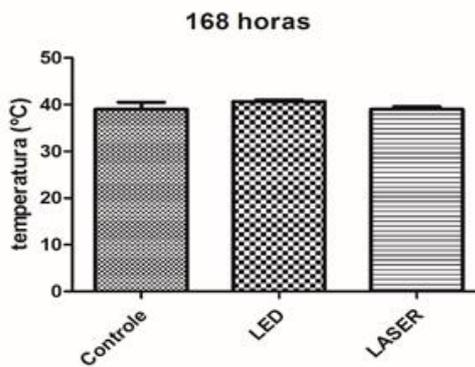
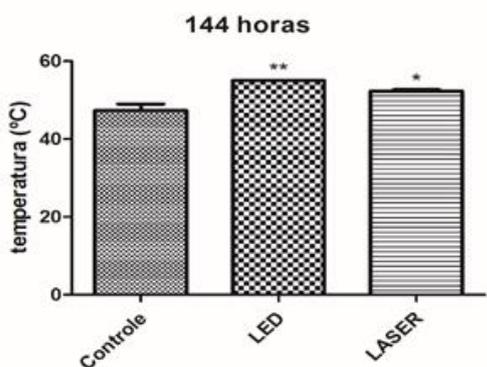
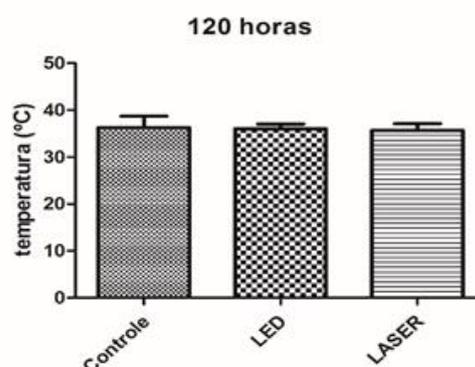
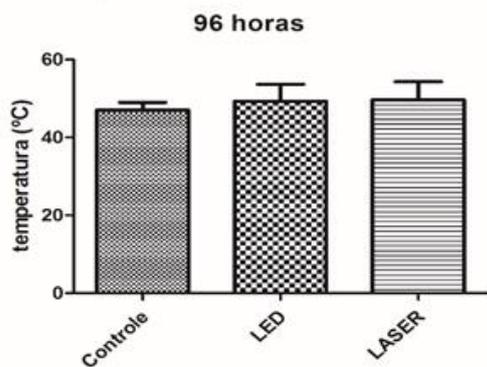
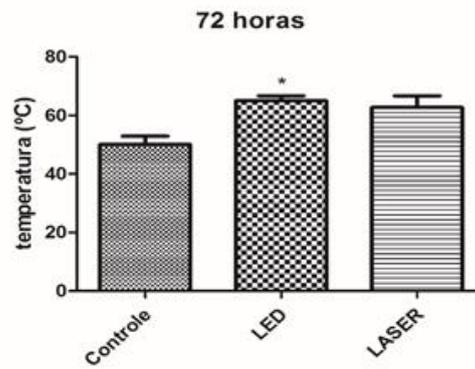
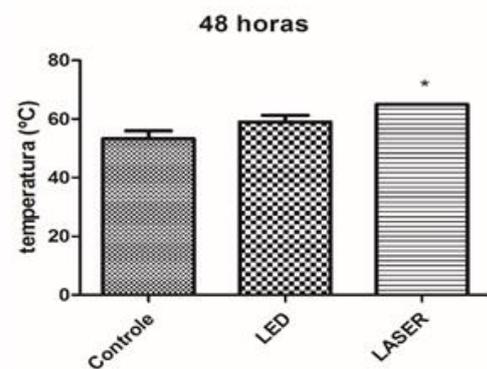
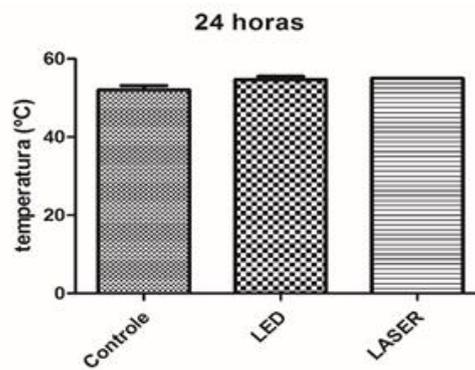
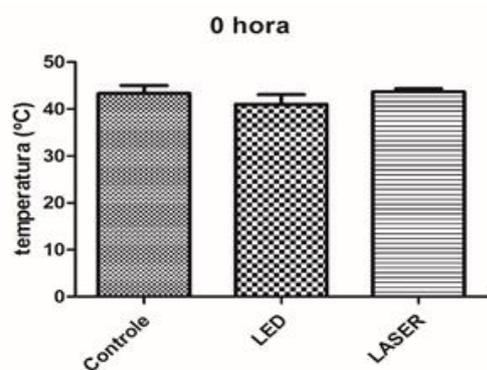
APÊNDICE C - Continuação

Tempo (J/cm ²)	Umidade Interna (%)		
	Leira 01	Leira 02	Leira 03
0	73,3	77,87	77,2
24	82,1	71,5	74,1
48	76	69,6	74,2
72	72	78	70
96	64	76	60
120	66	60	62
144	76	78	72
168	64	62	64
192	70	46	74
216	42	60	50
240	42	50	48
264	40	42	46

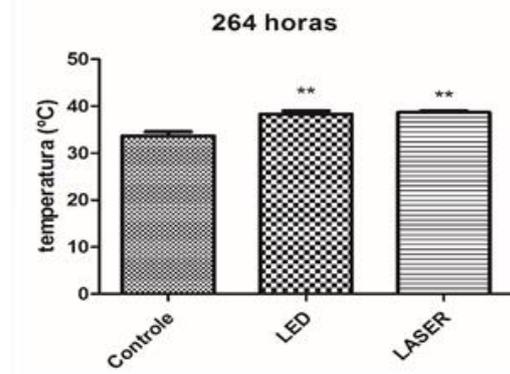
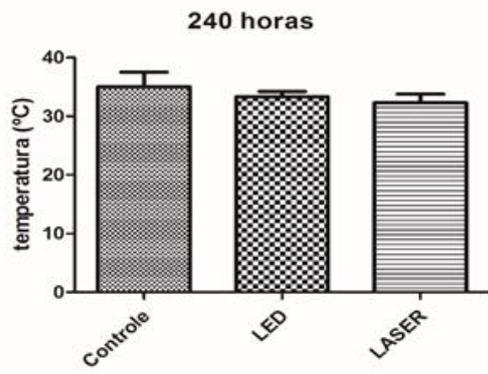
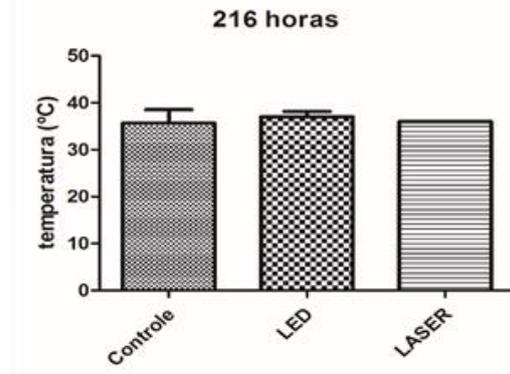
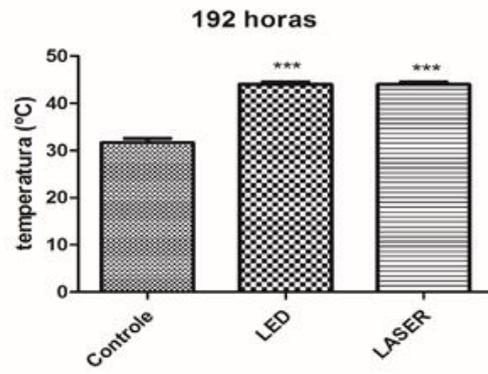
Tempo (J/cm ²)	Potencial Hidrogeniônico		
	Leira 01	Leira 02	Leira 03
0	6,8	6,82	7,63
24	7,52	7,48	7,92
48	7,73	8,18	7,86
72	7,37	7,64	7,34
96	6,61	7,23	7,02
120	6,26	6,35	6,6
144	7,36	7,25	7,32
168	7,04	7,24	7,14
192	7,08	7,16	6,73
216	7,5	7,72	7,72
240	5,34	5,9	6,32
264	6,02	6,62	6,55

APÊNDICE D – Comparação de resultados obtidos, através do método ANOVA, das temperaturas nos vários tempos monitorados nas leiras de compostagem.

*Significância



APÊNDICE D - Continuação

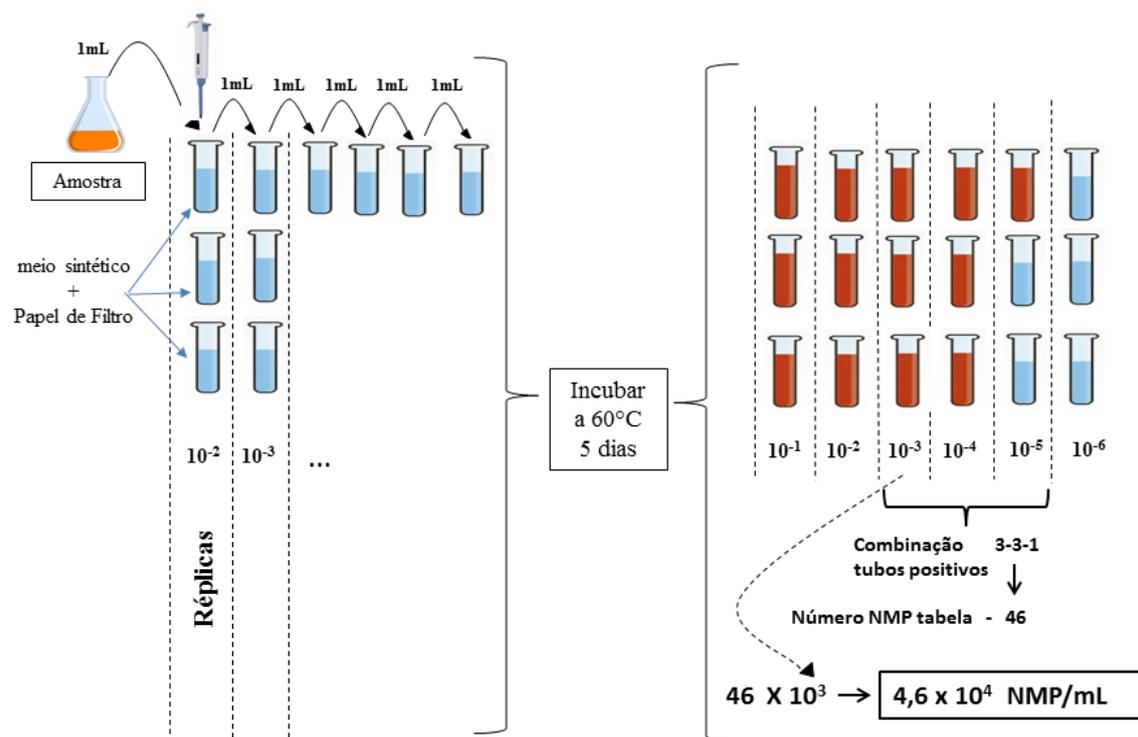


APENDICE E - Procedimento de Leitura e cálculo do NMP

Para o cálculo do NMP:

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

Figura 1.



Fonte: Adaptada (INGRAHAM, 2011)¹.

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

ANEXO A - Tabela utilizada de NMP para determinação de resultados

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

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

Fonte: Retirado (MONTES, 2015)¹.

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