



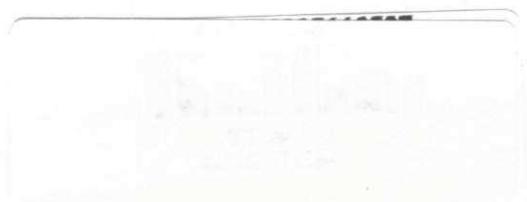
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA- CCT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA



TESE DE DOUTORADO

ESTUDO DO POTENCIAL DE CASCAS DO UMBU (*Spondia tuberosa*),
JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*), GOIABA (*Psidium guajava*) NA PRODUÇÃO E
RECUPERAÇÃO DA EXO-POLIGALACTURONASE

ÂNGELA MARIA SANTIAGO



Campina Grande-PB
2012

ÂNGELA MARIA SANTIAGO

**ESTUDO DO POTENCIAL DE CASCAS DO UMBU (*Spondia tuberosa*),
JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*), GOIABA (*Psidium guajava*) NA PRODUÇÃO E
RECUPERAÇÃO DA EXO-POLIGALACTURONASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Campina Grande
2012



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

S235e Santiago, Ângela Maria.
Estudo do potencial de cascas de umbu (*Spondia tuberosa*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), goiaba (*Psidium guajava*) na produção e recuperação da exo-poligalacturonase / Ângela Maria Santiago. - Campina Grande, 2012.
154 f.: il., color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Líbia de Sousa Conrado Oliveira.

Referências.

1. Poligalacturonase. 2. Cascas de Frutas. 3. Fermentação em Estado Sólido. 4. Sistema Aquoso Bifásico. I.Título.

CDU 634.65/.66 (043)

**ESTUDO DO POTENCIAL DE CASCAS DO UMBU (*Spondia tuberosa*),
JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*), GOIABA (*Psidium guajava*) NA PRODUÇÃO E
RECUPERAÇÃO DA EXO-POLIGALACTURONASE**

Tese aprovada em 14/12/2012

BANCA EXAMINADORA



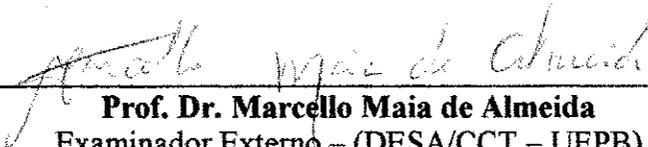
Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Orientadora – (UAEQ/UFCG)



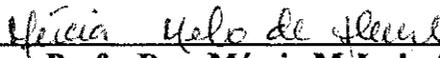
Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador Externo – (CT/UFPB)



Prof. Dra. Glauciane Danusa Coelho
Examinador Externo – (UATEC/CDSA/UFCG)



Prof. Dr. Marcello Maia de Almeida
Examinador Externo – (DESA/CCT – UEPB)



Prof. Dra. Mércia Melo de Almeida
Examinador Externo – (UATA/CCTA/UFCG)



Prof. Dr. Vimário Simões Silva
Examinador Interno – (UAEQ/UFCG)

Aos meus pais Maria Catarina de
Oliveira Santiago e Fiácio Ratis
Santiago (*in memoriam*) por terem
sempre acreditado e confiado em
mim. Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conduzir, orientar em minhas decisões e estar sempre presente na minha vida.

A minha família, especialmente meus pais (*in memoriam*), minhas irmãs Marli e Maria José e Rita minha cunhada, pela compreensão, apoio e incentivo que sempre me deram.

A minha orientadora, Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela orientação, conduta, profissionalismo, apoio, confiança e amizade a qual o tempo não apagará.

Ao professor Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva, pelo carinho e por ajudar e encantar a todos que passam pelo seu caminho.

Ao Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) na pessoa do seu coordenador Dr. Antônio Gilson Barbosa de Lima.

A Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e ao Departamento de Química pela oportunidade concedida.

Aos meus grandes amigos, Marcello Maia, José Tavares e Valderi Duarte que sempre me ajudaram e apoiaram incondicionalmente na realização deste trabalho.

A todos os amigos do laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG, Siumara Alcântara, Carlos Bispo, Layana, Kátia, Ezenildo, Flávia Lima pelo companheirismo, ajuda e contribuição para realização deste trabalho.

Aos alunos de graduação Déborah, Segundo e em especial a Paloma Lima que esteve comigo durante todo o período experimental.

Ao aluno de Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental Emanuel Campos pela grande contribuição na formatação desse trabalho.

Ao funcionário Sr. Jardes pela solicitude e presença sempre que precisava.

As amigas, Marta Barreto, Maridete Saraiva, Sayonara Lia Fook e Carmita Eulálio, por serem fontes de estímulo e porto seguro, me amparando nas dificuldades e dando suporte para que eu continuasse em frente, onde várias vezes recarreguei minhas forças. Obrigada pela amizade sincera.

A banca examinadora, pela revisão e sugestões finais para melhoramento do trabalho.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

Aqueles que passam por nós, não vão só, não nos deixam só. Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós (Antoine de Saint-Exupéry). Portanto levarei comigo um pouco de todos vocês que estiveram comigo durante a realização deste trabalho.

RESUMO

SANTIAGO, A. M. Estudo do potencial de cascas do umbu (*Spondia tuberosa*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), goiaba (*Psidium guajava*) na produção e recuperação da exopoligalacturonase. Tese de Doutorado, UFCG, Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Processos. Área de concentração: Biotecnologia, Campina Grande/PB, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

A indústria de processamento de frutas produz uma grande quantidade de resíduos agroindustriais dentre eles, cascas, as quais são ricas em carboidratos, proteínas e pectina. A pectina é uma fonte indutora de pectinases, que são enzimas que hidrolisam as substâncias pectínicas e são usadas na extração de suco de fruta e clarificação, extração de óleo, tratamento de fibra têxtil e ração animal. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das farinhas das cascas do umbu (*Spondia tuberosa*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e goiaba (*Psidium guajava*) na produção da exopoligalacturonase (cinética fermentativa) por meio da fermentação em estado sólido, usando o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916 como agente da fermentação. Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central para avaliar a influência da umidade inicial do meio e concentração da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) sobre a atividade poligalacturonásica. Durante o cultivo foram analisados, em período de zero a 72 horas, umidade do meio, pH, açúcares redutores e atividade da exopoligalacturonase (PG). A maior atividade alcançada foi com a farinha da casca do umbu, 18 U/g do meio fermentado, nas condições de 60% de umidade em base úmida, concentração de nitrogênio de 1,5%, concentração de esporos 10^7 esporos/g de meio fermentado e temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Portanto, esta farinha foi a escolhida e a partir daí estudou-se a melhor condição de extração desta enzima utilizando a metodologia do planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta no qual verificou-se a influência das variáveis agitação (AG), tempo de contato (TC) e relação solvente/massa de meio fermentado (RE) sobre a atividade PG. O sistema que apresentou o melhor resultado de atividade enzimática, 32,59 U/g foi o operado com agitação de 150 rpm, tempo de contato de 45 minutos e relação de solvente com o meio fermentado de 10 mL/g. Estudou-se também a aplicação da extração líquido-líquido para a separação da exopoligalacturonase da farinha da casca do umbu, por meio de sistema aquoso bifásico (SAB), formado por polietileno glicol (PEG)/fosfato de potássio e o extrato bruto proveniente da fermentação realizada com as melhores condições no processo de extração. Avaliou-se o efeito da massa molar do PEG, concentração do PEG e concentração do sal sobre o fator de purificação (FP) e concentração (R_1) na fase inferior de cada sistema utilizando a metodologia do planejamento experimental fatorial 2^3 e análise de superfície de resposta. A partição da exopoligalacturonase foi conduzida em sistemas com composição de PEG e fosfato de potássio de, 12, 14 e 16% e massa molar do PEG de 4000, 6000 e 8000. O sistema que apresentou maior fator de purificação (FP), 5,64 vezes e recuperação (R_1) de 97,14, cuja concentração de PEG 8000 foi de 16% e concentração de fosfato de potássio 12%. Isto mostra que o sistema aquoso bifásico (SAB) pode ser considerado como uma alternativa no planejamento de processos de recuperação e purificação da enzima estudada obtida da farinha da casca do umbu.

Palavras-chave: Poligalacturonase. Cascas de Frutas. Fermentação em estado sólido. Sistema aquoso bifásico.

ABSTRACT

SANTIAGO, A. M. Study of the potential of peels of umbu (*Spondia tuberosa*), jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and guava (*Psidium guajava*) in the production and recovery of exo-polygalacturonase.

The fruit processing industry produces a lot of agroindustrial wastes, among them husks, which are rich in carbohydrates, proteins and pectin. Pectin is a source inducing pectinases, which are enzymes that hydrolyze the pectic substances and are used in fruit juice extraction and clarification, oil extraction, treatment of textile fiber and animal feed. The aim of this study was to evaluate the potential of flours made of peels of umbu, jaboticaba and guava in the production of exo-polygalacturonase (fermentative kinetics) through solid state fermentation, using the microorganism *Aspergillus niger* CCT 0916 as the agent of fermentation. A factorial design with three replicates in the central point was conducted for evaluating the influence of both the initial moisture of the medium and the concentration of the nitrogen source (ammonium sulphate) on the activity of polygalacturonase. During cultivation, medium moisture, pH, reducing sugars and activity of exo-polygalacturonase (PG) were analyzed within the time range of up to 72 hours. The highest activity was achieved for the flour of umbu peels, 18 U/g of fermented medium under moisture of 60%, nitrogen concentration of 1.5%, spore concentration of 10^7 spores/g of fermented medium and temperature of $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. So this flour was chosen and from there the best condition of enzyme extraction was studied using the methodology of factorial experimental design and response surface analysis being investigated the influence of the variables agitation (AG), contact time (TC) and solvent/medium fermented mass ratio (RE) on the PG activity. The system that showed the best result of enzymatic activity, 32.59 U/g, was operated with agitation of 150 rpm, contact time of 45 minutes and solvent/medium fermented mass ratio (RE) of 10 mL/g. The application of liquid-liquid extraction for separating exo-polygalacturonase from the flour of umbu peels was also investigated by using the two-phase aqueous system (SAB) made up of polyethylene glycol (PEG), potassium phosphate and the raw extract from the fermentation carried out under the best conditions of extraction. The effect of PEG molar mass, PEG concentration and potassium phosphate concentration on the purification factor (FP) was evaluated as well as the concentration (R_1) in the lower phase in each system by using a 2^3 factorial experimental design and response surface analysis. The partition of exo-polygalacturonase was conducted in systems with composition of PEG and potassium phosphate concentration of 12, 14 and 16% and PEG molar mass of 4000, 6000 and 8000. The system with the highest purification factor (FP), 5.64 times and recovery (R_1) of 97.14, had concentration of PEG 8000 of 16% and potassium phosphate concentration of 12%. This shows that the aqueous two-phase system (SAB) can be considered as an alternative in planning processes of recovery and purification of the enzyme studied obtained from the flour of umbu peels.

Keywords: Polygalacturonase. Peel of fruit. Solid-state fermentation. Aqueous two-phase system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Umbu (<i>Spondia tuberosa</i>).....	21
Figura 2	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>).....	22
Figura 3	Jaboticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	24
Figura 4	Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.....	44
Figura 5	Etapas de preparo do resíduo seco do umbu.....	56
Figura 6	Etapas de preparo do resíduo seco da jaboticaba.....	56
Figura 7	Etapas de preparo do resíduo seco da goiaba.....	56
Figura 8	Etapas do processo de produção e recuperação da exo-poligalacturonase.....	64
Figura 9	Distribuição granulométrica dos resíduos secos.....	82
Figura 10	Ajuste das isotermas de adsorção do resíduo seco da goiaba (Modelo de GAB).....	82
Figura 11	Ajuste das isotermas de adsorção do resíduo seco da jaboticaba (Modelo de GAB).....	82
Figura 12	Ajuste das isotermas de adsorção do resíduo seco do umbu (Modelo de GAB).....	82
Figura 13	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 1 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 0,5%).....	85
Figura 14	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 2 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 0,5%).....	86
Figura 15	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 3 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 1,5%).....	87
Figura 16	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 4 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 1,5%).....	88
Figura 17	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 5-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).....	90
Figura 18	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 6-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).....	90
Figura 19	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 7-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).....	91
Figura 20	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jaboticaba correspondente ao ensaio 1 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 0,5%).....	92
Figura 21	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jaboticaba correspondente ao ensaio 2 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 0,5%).....	93
Figura 22	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jaboticaba correspondente ao ensaio 3 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 1,5%).....	94
Figura 23	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jaboticaba correspondente ao ensaio 4 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 1,5%).....	95

Figura 24	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 5-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).....	96
Figura 25	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 6-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).....	97
Figura 26	Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 7-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).....	97
Figura 27	Diagrama de Pareto para atividade PG com 44 horas de fermentação.....	102
Figura 28	Superfície de resposta para atividade PG às 44 horas de fermentação.....	103
Figura 29	Atividade poligalacturonase (APG) em função dos parâmetros avaliados na extração.....	106
Figura 30	Diagrama de Pareto para as condições de extração da exo-PG.....	107
Figura 31	Valores preditos e observados para extração da enzima exo-poligalacturonase.....	108
Figura 32	Influência da agitação e relação solvente/massa na atividade da PG.....	109
Figura 33	Influência do tempo e relação solvente/massa na atividade da PG.....	110
Figura 34	Influência do tempo e agitação na atividade da PG.....	110
Figura 35	Diagramas de equilíbrio de fase dos sistemas formado por PEG/fosfato de potássio.....	112
Figura 36	Sistema aquoso bifásico.....	114
Figura 37	Diagrama de Pareto para a variável dependente fator de purificação (FP) da exo-PG.....	119
Figura 38	Diagrama de Pareto para variável dependente recuperação (R_1) da exo-PG...	120
Figura 39	Valores preditos e observados para o fator de purificação (FP) da exo-PG....	123
Figura 40	Valores preditos e observados para a recuperação (R_1) da exo-PG.....	123
Figura 41	Influência da concentração do PEG e do sal no fator de purificação (FP) da exo-PG.....	124
Figura 42	Influência da massa molar do PEG e concentração do PEG no fator de purificação (FP) da exo-PG.....	125
Figura 43	Influência da massa molar do PEG e concentração do sal no fator de purificação (FP) da exo-PG.....	125
Figura 44	Influência da concentração do PEG e concentração do sal na recuperação (R_1) da exo-PG.....	126
Figura 45	Influência da massa molar do PEG e concentração do PEG na recuperação (R_1) da exo-PG.....	127
Figura 46	Influência da massa molar do PEG e concentração do sal na recuperação (R_1) da exo-PG.....	128

PCF – Polímero de cadeia flexível

PEG 8000 – Polietileno glicol de massa molecular 8000

PEG 6000 – Polietileno glicol de massa molecular 6000

PEG 4000 – Polietileno glicol de massa molecular 4000

PG – Poligalacturonase

PVC – Poli-cloreto de vinila

R^2 – Coeficiente de determinação

R_I – recuperação na fase inferior dos SAB_s

R_S – recuperação na fase superior dos SAB_s

RE – Relação entre o volume de solvente empregado na recuperação das enzimas e a massa de meio fermentado.

RP – Recuperação da proteína

RPM – Rotação por minuto

SAB_s – Sistemas aquosos bifásicos

SQ – Soma quadrática

SST – Sólidos solúveis totais

t – tempo de reação

TC – Tempo de contato entre o solvente e o meio fermentado

U/g – Unidade de atividade por grama de meio

U/mL – Unidade de atividade por mililitro

U – Umidade

UV – Ultravioleta

u_1 – Umidade presente no resíduo seco em base úmida

u_2 – Umidade requerida pelo processo fermentativo

°Brix – Sólidos solúveis totais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 UMBU (<i>Spondia tuberosa</i>).....	20
2.2 GOIABA (<i>Psidium guajava</i>).....	22
2.3 JABUTICABA (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	24
2.4 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS.....	25
2.5 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS OU PECTINASES.....	26
2.5.1 Classificação das pectinases	27
2.5.1.1 Poligalacturonases (PG).....	28
2.6 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO OU CULTIVO SEMISSÓLIDO..	28
2.6.1 Fatores que influenciam na fermentação em estado sólido	29
2.6.1.1 Substrato.....	29
2.6.1.2 Micro-organismos.....	31
2.6.1.3 Inóculo.....	34
2.6.1.4 Umidade e atividade de água.....	34
2.6.1.5 Temperatura.....	36
2.6.1.6 pH.....	36
2.6.1.7 Tamanho das partículas.....	37
2.7 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	37
2.7.1 Recuperação de enzima obtida por fermentação	39
2.7.2 Fator de recuperação e purificação de enzimas	40
2.8 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SABs).....	41
2.8.1 Componentes dos sistemas aquosos bifásicos	42
2.8.2 Diagrama de fases	43
2.8.3 Partição de enzimas em sistemas aquosos bifásicos	44
2.8.4 Tempo de separação das fases	46
2.8.5 Aplicações dos sistemas aquosos bifásicos	47
2.9 ESTADO DA ARTE.....	49
2.9.1 Produção de pectinases por fermentação em estado sólido	49
2.9.2 Recuperação e purificação de enzimas	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	55
3.2 MATÉRIA-PRIMA.....	55
3.2.1 Preparação das farinhas das cascas das frutas (resíduos secos)	55
3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS.....	56
3.3.1 Granulometria.....	56
3.3.2 Massa específica aparente (ρ_a).....	57
3.3.3 Massa específica real (ρ_r).....	57
3.3.4 Porosidade.....	58
3.3.5 pH.....	58

3.3.6 Umidade.....	58
3.3.7 Cinzas.....	59
3.3.8 Sólidos solúveis totais (°Brix).....	59
3.3.9 Açúcares redutores.....	59
3.3.10 Açúcares totais.....	60
3.3.11 Pectina.....	60
3.3.12 Proteínas.....	61
3.4 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE DOS RESÍDUOS SECOS...	62
3.5 PROCESSO FERMENTATIVO.....	62
3.5.1 Micro-organismo e inóculo.....	65
3.5.2 Preparação do meio de cultivo para a fermentação.....	66
3.5.3 Inoculação e incubação do meio.....	66
3.5.4 Extração das enzimas.....	67
3.5.4.1 Determinação da atividade exo-poligalacturonase.....	67
3.5.4.2 Estudo das condições de extração da exo-poligalacturonase.....	68
3.6 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA EXO-PG UTILIZANDO SABs.....	69
3.6.1 Diagramas de equilíbrio de fases.....	70
3.6.2 Planejamento experimental para os PEGs 4000-6000-8000/fosfato de potássio.....	70
3.6.3 Preparação dos sistemas (PEG 4000/6000/8000/fosfato de potássio).....	71
3.6.3.1 Determinação do volume das fases dos sistemas.....	72
3.6.3.2 Coleta das fases.....	72
3.6.3.3 Massa específica das fases.....	73
3.6.3.4 Massa das fases.....	73
3.6.3.5 Determinação da atividade exo-poligalacturonase em cada fase.....	73
3.6.3.6 Determinação de proteínas em cada fase.....	73
3.6.3.7 Determinação dos coeficientes de partição.....	74
3.6.3.8 Avaliação do processo de purificação da exo-poligalacturonase.....	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DAS CASCAS DAS FRUTAS.....	77
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS.....	78
4.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	81
4.3.1 Modelagem das isotermas de adsorção de umidade.....	82
4.4 PROCESSO FERMENTATIVO.....	84
4.4.1 Acompanhamento cinético do processo fermentativo do resíduo seco do umbu.....	85
4.4.2 Acompanhamento cinético do processo fermentativo do resíduo seco da jabuticaba.....	91
4.4.3 Acompanhamento cinético da atividade exo-poligalacturonase obtida do processo fermentativo para o resíduo seco da goiaba.....	98
4.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA O RESÍDUO SECO DO UMBU.....	100
4.5.1 Atividade enzimática máxima e produtividade obtida em cada	

ensaio para o resíduo seco do umbu	104
4.6 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA EXO-PG	104
4.6.1 Análise estatística do processo extrativo	106
4.7 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA EXO-PG	111
4.7.1 Diagramas de equilíbrio	111
4.7.2 Composição dos sistemas aquosos bifásicos (SABs)	112
4.7.3 Avaliação do coeficiente de partição (K_e) da exo-PG em SABs	114
4.7.4 Análise estatística do processo de recuperação e purificação da exo-PG	116
4.7.4.1 Diagrama de Pareto.....	118
4.7.4.2 Modelo de regressão e análise de variância.....	120
4.7.4.3 Superfície de resposta.....	124
5 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS	132
APÊNDICE A	

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, além de ser um dos maiores produtores agrícolas do mundo, tornou-se nos últimos anos uma grande potência no setor da agroindústria o qual é responsável por parcela significativa das exportações, contribuindo positivamente para a balança comercial. Entretanto, em resposta a esse avanço gera-se uma grande quantidade de resíduos os quais além de criar problemas ambientais representa perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em sistemas de tratamento.

Salienta-se que, este é um problema de grande dimensão frente ao volume gerado e a forma, na maioria das vezes inadequada, em que os resíduos têm sido gerenciados e dispostos. Nos últimos anos, houve um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais tendo em vista que os mesmos são constituídos de substâncias de alto valor nutricional, que quando empregada uma tecnologia adequada, podem ser convertidos em produtos comerciais de maior valor agregado.

Dentre as tecnologias empregadas, os processos biotecnológicos, em especial a técnica de fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa de tecnologia economicamente viável e eficiente que vem utilizando estes resíduos os quais são matérias-primas abundantes, de baixo custo e de alto valor nutricional em especial, farelos, cascas, bagaços de frutas da agroindústria (maçã, maracujá, pendúculo de caju, laranja, bagaço de mandioca, bagaço de beterraba e outros), como fonte de carbono para a obtenção de enzimas, alcoóis, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma, desde que o micro-organismo escolhido seja apropriado para a finalidade especial desejada (UENOJO e PASTORE, 2007).

Muitos micro-organismos podem crescer em substratos sólidos, resíduos agroindustriais, entretanto os fungos filamentosos são os mais adaptáveis ao processo de fermentação em estado sólido devido às condições do meio se aproximar mais do seu habitat natural. Estes micro-organismos são capazes de produzir e excretar grandes quantidades de enzimas ao degradar os polissacarídeos presentes na biomassa vegetal (CASTILHO et al., 2000), dentre elas as pectinases que se destacam por representarem cerca de 25% do mercado mundial de enzimas (JAYANI et al., 2005) e são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir a viscosidade, além de aumentar o rendimento da extração e clarificação, na maceração das uvas em vinícolas, na extração dos óleos vegetais aumentando o seu rendimento e diminuindo o seu tempo de processo e no tratamento e demogagem de fibras naturais na indústria têxtil e de papel (UENOJO e PASTORE, 2007).

De acordo com dados do Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior do Governo Federal citado por Rocha (2010), o mercado de enzimas no Brasil movimentou em 2009 US\$ 103,2 milhões de dólares sendo que US\$ 32,2 milhões corresponderam às exportações enquanto que as importações ultrapassaram 71 milhões. Isto mostra que o mercado brasileiro é essencialmente importador em termos de produção e uso das enzimas no país, apesar de apresentar grande potencial em função da enorme geração de resíduos agrícolas e agroindustriais.

O alto custo dessas biomoléculas associado com a necessidade de se obter um produto com alta pureza dificulta as aplicações das mesmas na medicina, nas indústrias farmacêuticas, química e alimentícias. Portanto há necessidade do aprimoramento de processos de produção e purificação seguros e simples e que atinjam elevada pureza do produto a custos baixos, tornando-se um grande desafio da biotecnologia.

O emprego de sistemas aquosos bifásicos (SABs) tem sido empregado na separação e purificação de enzimas, tendo em vista que permite a obtenção de rendimentos elevados em tempos curtos e com custos baixos (IGARASHI, 2003). Estas etapas permitem remoção de substâncias tóxicas e/ou metabólitos indesejáveis além de conferir características adequadas ao produto a ser comercializado.

O fato da importância do uso das enzimas pectinases nas indústrias e que não há produção significativa destas no Brasil, sendo a demanda atendida por produtos importados, tornando o custo suscetível às oscilações cambiais e agregando despesas com transporte intercontinental e a disponibilidade dos resíduos do umbu, jaboticaba e goiaba gerados durante as suas safras, em especial as cascas, as quais em grande parte são lançadas ao meio ambiente constituindo de substâncias indutoras na produção dessas enzimas é que se fazem necessários a realização de pesquisas utilizando-as como substratos em processos biotecnológicos, seguros, de baixo custo e que atinjam altos graus de purificação e seletividade como a fermentação em estado sólido e os sistemas aquosos bifásicos (SABs).

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o potencial das cascas do umbu, jabuticaba e goiaba como substrato na produção de exo-poligalacturonase por meio da fermentação em estado sólido (FES) utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916 como agente da fermentação, bem como, a recuperação desta enzima através do emprego de sistemas aquosos bifásicos (SABs).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o percentual em peso das cascas dos frutos umbu, goiaba e jabuticaba para avaliar o rendimento em processos biotecnológicos.
- Caracterizar as farinhas das cascas (resíduos secos) do umbu, jabuticaba e goiaba quanto a granulometria, massa específica, porosidade, umidade, cinzas, pH, sólidos solúveis (°Brix), açúcares redutores (AR), açúcares totais (AT), proteína bruta e pectina.
- Construir as isotermas de adsorção de umidade dos resíduos do umbu, jabuticaba e goiaba nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C.
- Avaliar a potencialidade destes resíduos secos como substrato na produção da exo-poligalacturonase (exo-PG) por meio da fermentação em estado sólido (cinética fermentativa) e micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916, utilizando a metodologia do planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central. As variáveis independentes foram umidade inicial do meio e concentração de nitrogênio e a dependente foi a atividade poligalacturonásica.
- Utilizar a metodologia de planejamento fatorial 2^3 , para avaliar a influência das variáveis: relação solvente/massa do meio fermentado (RE), tempo de contato entre o solvente e o meio fermentado (TC) e o grau de agitação do meio de extração (AG) no processo de extração da enzima utilizando o resíduo seco que alcançar na cinética de fermentação o maior valor de atividade poligalacturonásica.

- Utilizar planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central na fase inferior dos sistemas aquosos bifásicos (SABs) constituídos de PEG/fosfato de potássio para avaliar a influência das variáveis independentes, concentração de fosfato de potássio, concentração e massa molar dos PEGs 4000, 6000, 8000 sobre os parâmetros de partição, fator de purificação e recuperação da enzima *exo-poligalacturonase* obtida a partir da melhor condição do processo de extração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 UMBU (*Spondias tuberosa*)

A primeira referência ao umbuzeiro foi feita por Gabriel Soares de Souza, em sua obra "Tratado Descrito do Brasil em 1587," quando fez uma fiel descrição desta planta enaltecendo a importância das raízes e das frutas para os índios e habitantes da região. No século XVIII, o botânico Manuel de Arruda Câmara fez a descrição científica do umbuzeiro, classificando-o como espécie *Spondias tuberosa* (MENDES, 1990).

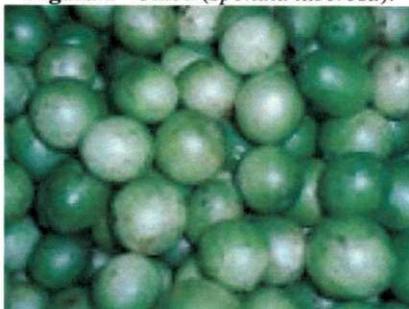
O gênero *Spondias* pertencente à família Anacardiaceae, possui 18 espécies, das quais se destaca a *Spondias tuberosa* (umbuzeiro), espécie originária do semi-árido do Nordeste brasileiro que cresce espontaneamente desde o Ceará até o norte de Minas Gerais, com preferência por regiões de precipitações entre 400 mm e 800 mm anuais, temperatura entre 12 e 38°C, umidade relativa entre 30 a 80% e 3.000 horas de insolação/ano (MILLER e SCHAAL, 2005). Até o momento não existem relatos de sua ocorrência em outras regiões do mundo.

Do umbuzeiro tudo é aproveitado, da raiz se tira a água da batata que sacia a fome e sede do sertanejo na época seca podendo ser utilizada na medicina caseira como vermífugo e anti-diarréica, da raiz seca é extraída uma farinha comestível, do caroço extrai o óleo BISPO (1998) e da casca produzir pectinases devido à mesma possuir alto teor de pectina, substância indutora, na produção destas enzimas, o qual foi um dos objetivos deste trabalho.

O fruto do umbuzeiro, popularmente conhecido por umbu ou imbu tem sua origem na palavra tupi-guarani "y-mb-u", que significa "árvore que dá de beber", em alusão à quantidade de água contida nas túberas, que era consumida pelos índios que habitavam as Caatingas. No idioma inglês, é conhecido por brazilian-plum (CORRÊA, 1988). Pela importância de suas raízes foi chamada por Euclides da Cunha "árvore sagrada do Sertão". Um único umbuzeiro pode acumular até dois mil litros de água em suas raízes. Portanto, não há seca que tire o verde de suas folhas ou que não permita a produção de frutos (CONAB 2010).

O umbu, Figura 1, é uma drupa glabra ou levemente pilosa, de forma variada entre arredondada, ovóide e oblonga, normalmente composta de casca de cor amarelo-esverdeada e polpa branco-esverdeada, mole, succulenta e de sabor agridoce, tendo no centro um caroço (FOLEGATTI et al., 2005). Apresenta diversidade também no tamanho, os quais oscilam entre 1,2 e 2,7 cm de comprimento e têm em média 2,0 a 4,0 cm de diâmetro. É constituído, em média, de 22% de casca, 68% de polpa e 10% de caroço (SILVA et al., 1987).

Figura 1– Umbu (*Spondia tuberosa*).



Fonte: IBRAF (2010).

A produção nacional do umbu foi de 9.268 toneladas em 2009, gerando uma renda de R\$ 6.411.000,00, sendo que 99,7% são advindas do Nordeste Brasileiro e o Estado da Bahia é responsável por 89%, Pernambuco com 5%, Rio Grande do Norte 2% e a Paraíba 1% (IBGE, 2010). É uma fruta de rápida sazonalidade e perecibilidade, abundante no período da safra. Parte da produção é perdida devido à falta de: infra-estrutura, práticas de manuseio adequadas e tecnologias de processamento tanto para o fruto como para os seus resíduos sendo de extrema importância a aplicabilidade destas técnicas por se tratar de fruta típica da região Nordeste do Brasil, onde o setor agroindustrial tem crescido muito nos últimos anos.

O período da colheita do umbu compreendido entre novembro a maio independente da irregularidade da chuva, pois não precisa ser irrigado, tem se tornado uma importante atividade econômica, chegando a produzir entre 28 e 32 mil frutos por planta, algo em torno de 350 quilos safra/ano (SANTOS e OLIVEIRA, 2001). Os umbus são colhidos e vendidos em feiras livres para serem consumidos *in natura* e para as agroindústrias para elaboração de uma variedade de produtos, dentre eles, bebidas, polpas congeladas, sorvetes, geléias, doces, sucos, vinagre, umbuzada e frutas cristalizadas gerando grandes quantidades de resíduos como cascas, caroços que são lançados ao meio ambiente. A maior importância econômica do umbu está na sua industrialização sob a forma de polpa.

A Tabela 1 apresenta a composição físico-química da farinha da cascado umbu.

Tabela 1 – Caracterização físico-química da farinha da casca do umbu.

Parâmetros	Farinha da casca do umbu
Umidade (b.u) (%)	8,77
Proteínas (%)	4,01
Açúcares Totais (%)	3,47
Açúcares Redutores (%)	2,64
Cinzas (%)	4,26
Atividade de água	0,42
pH	2,20
Pectina (% pectato de cálcio)	16,26
SST (° Brix)	4,5

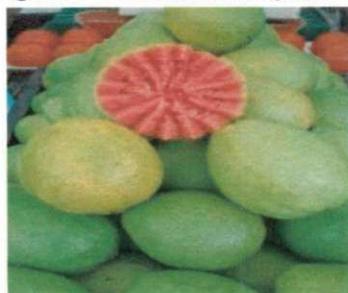
Fonte: ALMEIDA et al.(2010).

2.2 GOIABA (*Psidium guajava*)

A goiabeira (*Psidium guajava*) pertencente à família Myrtaceae, originária da América Tropical, possui cerca de 100 gêneros e 3.024 espécies conhecidas. No Brasil, a goiabeira encontra-se amplamente difundida da região Sul ao Nordeste e dentre as cultivares disponíveis aos produtores brasileiros destacam-se: Pedro Sato, Rica e Paluma (FERNANDES et al., 2007).

A goiaba, fruto da goiabeira, Figura 2, é uma baga globosa, pode ter formato ovóide, arredondado ou piriforme dependendo da cultivar. Internamente, apresenta um mesocarpo de textura firme e 4 a 5 lóculos, cheios por uma massa de consistência pastosa, onde estão numerosas sementes de 2 a 3 mm (CHITARRA, 2006). A casca é uma película fina e delicada, com a cor variando do verde ao amarelo, dependendo do estágio de maturação.

Figura 2 –Goiaba (*Psidium guajava*).



Fonte: IBRAF (2010).

O cultivar mais utilizado nos pomares brasileiros com finalidade industrial é o Paluma possui características de qualidade que a faz ser bem aceita tanto para o mercado de fruto *in*

natura como para o processamento (CARDOSO, E., 2005). São grandes e piriformes, podendo pesar até 500 g.

O Brasil é um dos maiores produtores de goiaba do mundo com uma produção relativamente estável, variando de 316.301 toneladas em 2007 para 328.255 toneladas em 2008, em uma área de 15.012 ha, concentradas principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste do país (AGRIANUAL, 2010). Sendo os estados de Pernambuco e São Paulo os maiores produtores brasileiros, responsáveis por 65% da produção nacional. O estado de São Paulo é o segundo maior produtor, com uma produção de 120 mil toneladas, correspondendo a 29,55% da produção (IBGE, 2009). A maior parte desta produção é destinada à indústria para a produção de doces, suco, geléia, polpa congelada, néctares, sorvetes, sendo as principais formas de consumo da fruta no Brasil. No processo de beneficiamento dos frutos há o descarte das sementes juntamente com as cascas, as quais não são separadas no processo físico de despulpamento constituindo o resíduo que usualmente é descartado pela agroindústria. No caso da goiaba destinada à produção de sucos e doces, aproximadamente 30% do peso do fruto é resíduo, constituído, principalmente, por sementes e cascas, tendo potencial quantitativo para serem utilizados em bioprocessos (NASCIMENTO et al., 2010).

A produção da goiaba está concentrada nos meses de fevereiro a abril embora a comercialização da fruta ocorra durante o ano todo.

A Tabela 2 apresenta a composição físico-química da farinha da casca da goiaba.

Tabela 2 – Caracterização físico-química da farinha da casca da goiaba.

Parâmetros	Farinha da casca da goiaba
Umidade (b.u) (%)	10,52±0,75
Açúcares Totais (%)	30,64±0,91
Açúcares Redutores (%)	9,57±0,35
Cinzas (%)	3,38±0,26
pH	4,20±0,02
Proteínas (%)	3,82
SST (°Brix)	31,50
Pectina (% pectato de cálcio)	10,54
Atividade de água	0,36

Fonte: MUNHOZ et al. (2008), ALMEIDA et al. (2010).

2.3 JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*)

A jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg), pertencente à família *Myrtaceae* é uma planta nativa brasileira, originária da região de Minas Gerais, a qual foi domesticada e incorporada à cultura popular pelos indígenas tupis. É amplamente encontrada e distribuída em quase todas as regiões brasileiras sendo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo os maiores produtores (DONADIO, 2000).

No Brasil, as espécies mais cultivadas são a *M. cauliflora*, destacando-se a variedade Paulista, e a *M. jabuticaba*, destacando-se a variedade Sabará, que é a mais apreciada. É um fruto miúdo, de epicarpo fino, adocicado com maturação precoce (MELETTI, 2000). O período de amadurecimento do fruto pode variar de 45 a 65 dias, dependendo da região de cultivo.

O fruto da jabuticaba, Figura 3, é uma baga globosa, com 1,0 a 3,5 cm de diâmetro, com polpa esbranquiçada, suculenta e casca avermelhada quase preta, contendo entre uma a quatro sementes. É aproveitada pela indústria farmacêutica e alimentícia, devido a seu alto teor de substâncias antioxidantes e também é bastante consumida na forma natural e sob a forma de geléia, vinho, vinagre, licor, suco (LIMA, J. et al., 2008).

Sua casca é adstringente, possui altos teores de antocianinas, ácidos fenólicos e flavonóide, é bastante utilizada no tratamento de diarreias e irritações na pele, na inflamação dos intestinos e hemoptise, apresentando também, segundo a medicina popular, propriedades antiasmáticas (HERBÁRIO, 2010; REYNERTSON et al., 2006).

Dentre as espécies existentes, a jabuticaba Sabará é a que ocupa a maior área cultivada no Brasil e é a mais apreciada e doce das jabuticabas.

Figura 3 – Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)



Fonte: IBRAF (2010).

No Brasil, a comercialização destes frutos tem aumentado anualmente. Em 2008, foram comercializadas aproximadamente 2.000 toneladas das jabuticabas na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) e Central Única de Abastecimento (CEASA) de Curitiba e Belo Horizonte (CITADINI et al., 2010).

O ciclo de desenvolvimento da jabuticaba é muito curto, portanto durante a sua safra, fevereiro a março, há uma grande produção e também desperdício em detrimento da sua perecibilidade gerando grandes quantidades de resíduos ricos em determinadas substâncias, conforme a Tabela 3, que podem ser aproveitados na área da biotecnologia agregando valores a estes e também evitando que sejam lançados no meio ambiente.

Tabela 3 – Caracterização físico-química da farinha da casca da jabuticaba.

Parâmetros	Casca da jabuticaba
Umidade (b.u) (%)	10,23
Proteína (%)	4,82
Atividade de água	0,35
Açúcares Totais (%)	31,39
Açúcares Redutores (%)	29,86
Pectina (% pectato de cálcio)	10,60
SST (°Brix)	36,0
Cinzas (%)	3,6
pH	3,24

Fonte: ALMEIDA et al. (2010).

Diversos estudos sobre a composição de frutas e resíduos agroindustriais brasileiros têm sido realizados com o intuito de que estes sejam adequadamente aproveitados. Para agregar-lhes valor é necessário o conhecimento dos seus constituintes, através de investigações científicas e tecnológicas.

2.4 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

As substâncias pécticas são colóides constituídos, na sua maioria, por cadeias de ácidos D-galacturônicos unidos por ligações α -1,4, e cujos grupos carboxílicos podem estar parcialmente metoxilados e parcial ou totalmente neutralizados por bases (BOBBIO, 2003). Formam o maior componente da lamela média das paredes primárias das células vegetais.

Segundo Bobbio (2003); Coulate (2004); Fennema (2010) e Koblitz (2008) pertencem ao grupo de substâncias pécticas:

- Protopectina (composto insolúvel em água e, por aquecimento em presença de ácidos diluídos, formam ácidos pectínicos ou ácidos pécticos, encontrada em frutas e vegetais não maduros);

- Ácidos pécticos (são os ácidos D-galacturônicos cujos grupos carboxílicos não apresentam esterificados com grupos metil e são solúveis em água);
- Ácidos pectínicos (são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos, formam soluções colodais ou são solúveis em água. São obtidos a partir da protopectina por ação da enzima protopectinase;
- Pectina (são polímeros lineares de ácido α -D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, encontrados na lamela média das células vegetais. A maior parte das pectinas no fruto é solúvel em água (80%). Em meios ácidos fortes, as ligações glicosídicas da pectina (1,4) são hidrolisadas originando monossacarídeos e em meio alcalino a pectina é desmetoxilada.

Embora o ácido D-galacturônico seja o principal açúcar constituinte das substâncias pécticas, proporções variáveis de outros açúcares, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose, também podem ser encontrados. O que diferencia as substâncias pécticas é o seu grau de metoxilação, grupos metilas esterificados ao grupo carboxílico da molécula.

2.5 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS OU PECTINASES

São enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre unidades de ácido galacturônico ou seu derivado metoxilado. São produzidas por vegetais e micro-organismos e seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais (KOBBLITZ, 2008).

As enzimas de fontes microbianas oferecem um amplo intervalo de pH ótimo (5,5 a 6,5 para bactérias, 6,2 a 7,5 para leveduras e 2,5 a 5,0 para fungos) para aplicações comerciais (FENNEMA, 2010).

As pectinases foram as primeiras enzimas a serem usadas na indústria. Sua aplicação comercial foi observada em 1930 nas preparações de vinhos e sucos de frutas, o rendimento era baixo e muitas dificuldades foram encontradas para filtrar o suco e se atingir uma clarificação aceitável. A partir de então com os estudos sobre a composição química dos tecidos de plantas é que os pesquisadores começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência e hoje são as que mais crescem no setor comercial, em especial nas indústrias de sucos (CARVALHO,S., 2007).

A produção das pectinases para fins industriais é feita geralmente a partir de fungos, entretanto os filamentosos do gênero *Aspergillus* são os que mais se destacam como bons

produtores, em especial o *Aspergillus niger* em função de suas características de reprodução e crescimento, apesar de existirem vários outros fungos produtores destas enzimas (CASTILHO et al., 2000).

A primeira etapa do processo para a produção de qualquer enzima microbiana comercial é a seleção do micro-organismo capaz de produzi-la em níveis adequados. A linhagem selecionada poderá sofrer melhoramento genético objetivando alcançar níveis de produção da enzima mais elevados (SANTOS, S., 2007).

Muitas pesquisas foram realizadas para a produção de pectinases, dentre elas, Trindade et al. (1996) os quais utilizaram resíduos de frutas (maçã, laranja, acerola, maracujá e morango) na produção da enzima poligalacturonase e obtiveram os melhores resultados com a casca da maçã 14 U/mL em 22 horas de fermentação. Couri et al. (2000) estudaram a produção da enzima poligalacturonase pelo *Aspergillus niger* utilizando como substratos casca de banana, casca de manga, farelo de mandioca e farelo de trigo e concluíram que o farelo de trigo com 42 horas de fermentação apresentou os melhores resultados 76,9 U/g de poligalacturonase. Panarotto et al.(2003) obtiveram 70,5 U/g usando casca de limão como indutor. Pinto et al. (2005) utilizaram a casca de maracujá e obtiveram 1,9 U/g com 24 horas de processo. Padma et al.(2011) na produção de poligalacturonase utilizaram vários resíduos, cascas de frutas, e obtiveram o maior valor de atividade, de 21 U/mL, com a casca da laranja.

2.5.1 Classificação das pectinases

As pectinases são constituídas por um complexo multienzimáticos e sua classificação é feita de acordo com o modo de atuação sobre as substâncias pécticas, na cadeia poligalacturônica e o grupo metoxila da pectina, dividindo-se em três grupos de enzimas; as protopectinases degradam a protopectina insolúvel formando pectina solúvel altamente polimerizada; as pectinesterases, que remove os grupos metil éster das substâncias pécticas formando ácido péctico, e as despolimerases, catalisam a ruptura das ligações glicosídicas α (1,4) das cadeias glicosídicas do ácido D-galacturônico (JAYANY et al., 2005).

No grupo das esterases estão classificadas as pectinesterases e no grupo das despolimerases as poligalacturonases (endo-poligalacturonases e exo-poligalacturonases) e as pectina-liases. A diferença entre as enzimas despolimerases está no modo dessas atuarem no substrato. As pectina-liases agem preferencialmente em pectinas altamente metiladas e hidrolisa cadeias poligalacturônicas, para dar oligossacarídeos com graus variados de metilação e as poligalacturonases hidrolisam o ácido péctico e a pectina em ácido

galacturônico e oligossacarídeos respectivamente (BON et al., 2008). Dentre as enzimas pectinases ou pectinolíticas as mais estudadas são as poligalacturonases (JAYANI et al., 2005).

2.5.1.1 Poligalacturonases (PG)

As poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 da cadeia de ácido poligalacturônico (MARTIN, 2006). Estas enzimas são classificadas em endo-PG (EC 3.2.1.15) a qual catalisa a hidrólise randômica da ligação glicosídica α -1,4 do ácido pécico e a exo-PG (EC 3.2.1.67) que catalisa a hidrólise sequencial da ligação glicosídica α -1,4 do ácido pécico na extremidade não redutora da cadeia (MALLER, 2011).

O resultado da ação da poligalacturonase é a despolimerização da pectina e a solubilização progressiva dos fragmentos de poliuronídeo. O resultado prático de tal atividade é que barreiras intercelulares (lamela média) são rompidas e a viscosidade de soluções de pectina é diminuída à medida que a ação da enzima é mantida (FENNEMA, 2010).

2.6 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO OU CULTIVO SEMISSÓLIDO

É uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre ou dentro de substratos umedecidos, insolúvel em água, no qual a atividade de água presente garante o seu crescimento e produção de produtos. A água existente no meio encontra-se na forma complexada ou absorvida no substrato (CORREIA, 2004).

A escolha do substrato nesse processo é de fundamental importância, pois este pode ser ao mesmo tempo suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos) ou apenas um suporte o qual deve ser acrescido de nutrientes (PALMA, 2003).

A fermentação em estado sólido também chamada de cultivo semissólido é um processo bastante promissor na produção de vários produtos, inclusive enzimas. Este processo apresenta algumas características vantajosas tais como: simplicidade dos meios de cultivo (necessita normalmente do ingrediente principal e de água para umedecê-lo); requer menor espaço e energia; minimiza os riscos de contaminação microbiana, devido ao baixo teor de umidade do meio; gera menor volume de efluentes; o crescimento celular ocorre em condições mais parecidas com as dos habitats naturais; possibilidade de utilizar como substratos resíduos agrícolas ou agroindustriais como fonte de carbono e energia, os quais são

materiais de baixo custo, além de permitir ao fungo produzir um complexo natural de enzimas, ao invés de produzir apenas uma enzima (BON et al., 2008).

Vale ressaltar também que este processo geralmente é preferido por permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas e com custos menores de extração e purificação (UENOJO e PASTORE, 2007).

Apesar da fermentação em estado sólido ser um processo econômico e viável do ponto de vista ecológico, apresenta algumas limitações, tais como: dificuldade de controlar os parâmetros operacionais de processo (pH, temperatura, umidade, crescimento celular), dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano, favorece mais o uso de fungos filamentosos no processo, do que outros micro-organismos que necessitam de teores de umidade elevados (PANDEY et al., 1999).

A aplicação comercial deste processo no Brasil é bastante viável devido à disponibilidade de resíduos agroindustriais de baixo custo, resultando em processo mais favorável ao meio ambiente, além de gerar produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e agricultura em geral. Geralmente pode ser dividida em dois tipos: a) aplicações sócio-econômicas como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustriais; b) aplicações lucrativas economicamente, como produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados (PALMA, 2003).

2.6.1 Fatores que influenciam na fermentação em estado sólido

Vários são os fatores que contribuem para o sucesso do processo, para que se possa obter uma maior concentração de produto formado, a começar pela escolha do substrato e micro-organismo específico, além do controle dos parâmetros operacionais. Esta escolha deve estar associada às condições de custo e disponibilidade do substrato.

2.6.1.1 Substrato

O conhecimento das características físico-químicas dos substratos sólidos, a ser utilizado como meio de cultivo para o crescimento celular e rendimento de produto, é de fundamental importância para a sua escolha, além das condições de custo e disponibilidade.

Os substratos utilizados devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, minerais, e água. Entretanto para a produção de enzimas indutíveis, a presença de uma substância indutora é essencial, como a pectina para as pectinases (BON et al., 2008).

A escolha do substrato é tão importante no cultivo semissólido quanto à escolha do micro-organismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do micro-organismo favorece a maior quantidade de enzimas (BRAVO et al., 2000).

A utilização de resíduos agrícolas ou subprodutos de indústrias alimentícias como substrato no cultivo semissólido está cada vez mais disseminado, buscando obter produtos de alto valor comercial e com custo de produção baixo, além de minimizar o seu acúmulo no meio ambiente. Estes resíduos são os substratos mais pesquisados neste processo, devido a sua abundância, custo, além de serem ricos em nutrientes que favorecem o crescimento de micro-organismos e formação do produto desejado (CORREIA, 2004).

A casca das frutas cítricas é o principal subproduto gerado do processamento destas na indústria constituindo cerca de aproximadamente 50% do peso da fruta fresca (PATIL e DAYANAND, 2006). O destino deste subproduto representa um desafio de muitas fábricas, entretanto os micro-organismos facilmente utilizam este substrato em fermentações devido a sua rica composição (80% de material orgânico, 19-30% de açúcares livres, pectina 20% e 57% de fibra alimentar (CHAU e HUANG, 2003). Segundo Adeleke et al. (2012) a pectina é um substrato adequado para o crescimento de fungos e produção de enzimas pectinolíticas por sistemas microbianos.

São vários os resíduos agroindustriais utilizados como substrato em cultivo semissólido, dentre estes se encontram: bagaço de laranja (CAMARGO, 2005), casca de limão (PATIL e DAYANAND, 2006), bagaço de abacaxi (IMANDI et al., 2008), farelo de trigo e casca de arroz (NIZAMUDDIN et al., 2008), polpa de café (OROZCO et al., 2008), casca e albedo do maracujá (SOUZA, 2008), farelo de trigo (OKAFOR et al., 2010), casca de maracujá (ROCHA, 2011), bagaço de uva (DÍAZ et al., 2012), casca de limão (RUIZ, 2012). Os grupos de pesquisas que estudam a produção das enzimas pectinases geralmente aproveitam substratos regionais.

Para um melhor aproveitamento dos substratos pelos micro-organismos é necessário algum tipo de pré-tratamento, haja vista que, eles não são capazes de transportar estruturas macromoleculares através da membrana celular. De acordo com Mitchel et al. (2000) este pode ser: assepsia do material para redução da carga microbiana; trituração ou moagem para reduzir o tamanho das partículas; suplementação de nutrientes (nitrogênio, fósforo, etc.) ao substrato sólido visando adequá-lo melhor às condições nutricionais do micro-organismo; ajuste de pH e teor de umidade, além de um tratamento a vapor para pré-degradação da estrutura macromolecular e a eliminação dos principais contaminantes.

A adição de água ou solução de nutrientes ao meio de cultivo deve ser feita de forma a alcançar os níveis ideais de atividade de água para o desenvolvimento do micro-organismo em estudo.

2.6.1.2 Micro-organismos

A seleção adequada do micro-organismo é um dos mais importantes critérios a se considerar em um cultivo semissólido. Dentre os micro-organismos, os fungos filamentosos principais produtores de enzimas comerciais, são os mais importantes e os que melhor se adaptam a este processo. Sua forma de crescimento em hifas, e boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica conferem aos fungos vantagens com relação aos outros micro-organismos, bactérias e leveduras, além das condições do meio de cultivo se aproximar mais do seu habitat natural (ROCHA, 2010).

Os fungos filamentosos são fáceis de serem manuseados e crescem em pH baixo, os riscos de contaminação bacteriana no meio em que estes se encontram são muito pequenos, esporulam facilmente e tem a capacidade de produzir e excretar grandes quantidades e variedades de produtos específicos, inclusive as enzimas pectinases. Em geral estes fungos desempenham importante função nas indústrias de alimentos por possuírem diferentes tipos de enzimas capazes de metabolizar misturas complexas de compostos orgânicos presentes na maioria dos resíduos (PELCZAR, 1996).

Na fermentação em estado sólido ou cultivo semissólido, o crescimento dos fungos dar-se-á sob a superfície do substrato através de sua estrutura micelial, a qual possui hifas que são capazes de penetrar nos poros do substrato, beneficiando em seu interior as reações metabólicas específicas e conseqüentemente favorecendo a colonização e a utilização dos nutrientes disponíveis do meio, gerando assim seus bioprodutos.

Aspergillus niger, é um fungo filamentoso negro geralmente denominado “mofo negro”, apresenta hifas finas, septadas e conidióforas com vesículas recobertas por conídios negros, podendo ser visualizado através de micrografia eletrônica. Este fungo é bastante usado em processos fermentativos devido a sua facilidade de manipulação, habilidade em fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (JAY, 2005). Vários autores utilizaram este micro-organismo para produção de enzimas pectinolíticas ou pectinases, dentre eles, Castilho (1997), Panarotto (2003), Fontana et al. (2005), Santos (2007), Castro (2009), Sousa (2010).

Segundo Pandey et al. (1999) a cultura de *Aspergillus niger* tem a capacidade de produzir 19 tipos de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato utilizado.

O micro-organismo utilizado nesta pesquisa foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger* CCT 0916 geneticamente modificado objetivando produzir enzimas pectinolíticas ou pectinases.

A Tabela 4 apresenta algumas substâncias utilizadas como substrato em fermentação em estado sólido na produção de pectinases por fungos do gênero *Aspergillus*.

Tabela 4 – Resumo de alguns trabalhos desenvolvidos para produção de pectinases por *Aspergillus*.

Enzima	Substrato	Atividade Enzimática	Referência
Pectinases	Casca de maçã	14,0 U/mL	TRINDADE et al. (1996)
Poligalacturonase Pectina liase	Bagaço de laranja	3,6 U/mL 11,3 U/mL	CAMARGO et al. (2005)
Poligalacturonase	Casca de maracujá	21,85 U/g	PINTO et al. (2006)
Poligalacturonase	Farelo de arroz	11,1 U/g	COSTA et al. (2007)
Poligalacturonase	Casca e albedo de maracujá	20,9 U/g	SOUZA et al. (2010)
Poligalacturonase	Casca de cenoura Casca de jaca Casca de laranja Casca de beterraba	36 U/mL 38 U/mL 36 U/mL 38 U/mL	ANURADHA et al. (2010)
Endopectinase	Bagaço de maçã, laranja	10,88 U/mL	BARI et al. (2010)
Pectinase	Resíduo de arroz e de maracujá	11,1 U/g	ROCHA et al. (2011)
Exo-poligalacturonase	Casca do umbu	15,65 U/g	SANTIAGO et al. (2011)
Endo-poligalacturonase Exo-poligalacturonase	Palma forrageira Palma forrageira	66,19 U/g 40,61 U/g	CAVALCANTI et al. (2011)
Poligalacturonase	Casca de limão	300 U/mL	MALLER et al. (2011)
Pectinase	Casca de limão	130 U/g	RUIZ et al. (2012)
Exo-poligalacturonase	Casca de laranja Casca de laranja+bagaço de uva	16,9 U/g 3,8 U/g	DÍAZ et al. (2012)
Pectinase	Casca de laranja azeda	15,74 U/mL	VASANTHI e MEENAKAHISSUNDARAM (2012)
Poligalacturonase	Casca de manga Casca de banana Casca de abacaxi	217 U/g 30 U/g 80 U/g	PADMA et al. (2012)
Protopectinase	Casca de caqui	17,27 U/mL	FAN et al. (2012)
Poligalacturonase	Casca de coco verde	52,48 U/g	ARAÚJO, M. et al. (2012)

2.6.1.3 Inóculo

A concentração de inóculo é de extrema importância nas fermentações semissólida, pois uma concentração baixa de inóculo poderá favorecer o desenvolvimento de contaminantes indesejáveis e formar pouca biomassa, entretanto um inóculo com elevada concentração de esporos poderá exaurir o meio para a formação de biomassa, diminuindo a quantidade de produto desejado (ARAÚJO, L., 2004).

Alcântara e Silva (2011) usaram o bagaço seco do pendúculo de caju como substrato na fermentação em estado sólido para estudar a influência da concentração de inóculo do *Aspergillus niger* CCT 0916 (10^6 , 10^7 , 10^8 esporos/g de meio úmido), para produção de poligalacturonase e obteve a maior atividade poligalacturonásica (33 U/g) com concentração de esporos de 10^6 esporos/g de meio úmido.

2.6.1.4 Umidade e atividade de água

A umidade do meio revela a concentração de água contida no material e é expressa em termos percentuais. É um dos fatores que mais influencia no processo, pois quando esta for muito alta resultará numa diminuição da porosidade do substrato, limitando a transferência de oxigênio, além de aumentar o risco de contaminação. Por outro lado, se for menor que a necessitada pelo micro-organismo, poderá o mesmo não se desenvolver no meio e conseqüentemente não haverá formação do produto desejado (PINTO et al., 2006).

Segundo Borzani et al. (2011) o teor de umidade na fermentação em estado sólido pode variar entre 18 e 85%. Esta variação depende do poder de absorção do substrato, pois a umidade inicial ótima para o crescimento do *Aspergillus niger* para a produção de pectinases para a polpa de café foi de 80% (OROZCO et al., 2008) e para o resíduo de maracujá foi de 40% (SOUZA, 2008).

A exigência de água pelos micro-organismos não está associada à umidade do substrato sólido, mas à atividade de água (A_w) do meio, que segundo Fellows (2006) é a razão da pressão de vapor da água contida na amostra (P) e a pressão de vapor da água pura (P_o), ambas a mesma temperatura, conforme Equação 1.

$$A_w = \frac{P}{P_o} \quad (1)$$

Onde:

A_w = atividade de água;

P = pressão de vapor de água do substrato;

P_0 = pressão de vapor da água pura.

Cada micro-organismo requer um valor mínimo, um valor máximo e um valor ótimo de atividade de água para seu crescimento e suas atividades metabólicas. No caso dos fungos filamentosos a atividade de água mínima é em torno de 0,7 (LEITÃO, 1997).

Com relação às enzimas estas necessitam de valores mínimos de A_w diferentes para a função catalítica. A mínima ou o limite requerido para a atividade enzimática varia de 0,25 a 0,70 para várias oxiredutases e 0,025 a 0,96 para diversas hidrolases (FENEMA, 2010).

Castro et al. (2009) estudaram a influência do teor de umidade inicial do meio (8,6 a 57,6%) e atividade de água (0,641 a 0,990) na produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido com diferentes linhagens de *Aspergillus*. Os autores utilizaram torta de girassol como sustrato e obtiveram o maior valor de atividade PG 38,36 U/g, nas condições de 51,8% de umidade inicial e atividade de água de 0,986.

Alcântara, S. (2007) estudou a influência da quantidade de água e a concentração de uma fonte de nitrogênio na produção de pectinases, usando o pedúnculo do caju seco como substrato e o *Aspergillus niger* CCT 0916 como micro-organismo, em um cultivo semissólido. A atividade poligalacturonásica máxima (11 U/g) foi obtida nas seguintes condições: umidade inicial do meio de 50% (b.u), atividade de água entre 0,99 e 1,00, sulfato de amônio de 0,5% (m/m), concentração de inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato sólido e temperatura de incubação igual a 30°C.

Na preparação do meio nos processos fermentativos deve-se considerar à atividade de água e a umidade do mesmo para alcançar os níveis ideais de desenvolvimento dos micro-organismos e conseqüentemente o máximo do produto desejado. Portanto, para isso é necessário o conhecimento de isotermas de sorção a qual pode ser definida como, a expressão gráfica da relação funcional existente entre o conteúdo da umidade de uma substância e a atividade de água (A_w) da mesma substância, medidas a uma temperatura constante (CORREIA, 2004).

Na fermentação em estado sólido as isotermas de sorção podem ser construídas para avaliar a quantidade de água a ser adicionado ao substrato e também definir o comportamento do resíduo com relação à adição de água.

Muitos modelos matemáticos têm sido propostos para a obtenção das isotermas de adsorção ou dessorção de alimentos, pois não existe uma equação geral, haja vista que, a atividade de água depende da composição e da interação dos diferentes constituintes do alimento com a água em condições de equilíbrio termodinâmico (WELTI-CHANES e VERGURA, 1997).

2.6.1.5 Temperatura

A temperatura tem uma grande influência no crescimento dos micro-organismos uma vez que todos os processos fermentativos são dependentes de reações químicas as quais são afetadas pela temperatura.

Durante o processo, a temperatura é um fator crítico devido a grandes quantidades de calor produzido em consequência das atividades metabólicas dos micro-organismos. O calor produzido deverá ser dissipado para que o aumento da temperatura não prejudique o processo (PINTO, 2003).

Para cada micro-organismo existe uma temperatura mínima, abaixo da qual não há crescimento, uma temperatura ótima a qual o crescimento é máximo e uma temperatura máxima acima da qual não há desenvolvimento microbiano. De acordo com Pinto et al. (2006) para os fungos filamentosos a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação dos produtos. Muitos autores usando o *Aspergillus niger* como agente de fermentação utilizaram temperaturas entre 30 a 40°C (SANTOS, 2008; KUMAR, 2010; GOMES, 2011; FERNÁNDEZ, 2011; CAVALCANTI, 2011).

Fawole e Odunfa (2003) estudaram o efeito de diferentes temperaturas entre 20 e 45°C na produção de pectinases por *Aspergillus niger* e concluíram que a maior atividade enzimática e formação da biomassa foram a 40°C enquanto que a 45°C houve um acentuado decréscimo.

2.6.1.6 pH

O valor do pH do meio é um dos parâmetros muito importante em qualquer processo biológico para que se possa obter um bom crescimento celular e elevados rendimentos em produtos. Um pH adverso afeta pelo menos dois aspectos de uma célula microbiana viva: o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes para o interior da célula (JAY, 2005).

Os micro-organismos têm valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o seu desenvolvimento e crescimento. Geralmente os fungos preferem pH entre 4,5 – 5,0 e as bactérias pH próximos da neutralidade (6,5 – 7,0). Para o *Aspergillus niger* o valor mínimo é de 1,2 e ótimo está entre 3,0 a 6,0 (FRANCO, 1999).

Martins (2006) estudou a estabilidade térmica e a estabilidade frente às variações de pH da poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus* e observou que em pH entre 3,0 e 3,5 esta enzima manteve-se com 91% da atividade original e em valores de pH elevados houve uma queda na sua estabilidade. Com relação à temperatura, para valores até 50°C, esta enzima conservou 80% da sua atividade original e manteve apenas 6% dessa atividade quando exposta a uma temperatura de 70°C.

Souza et al. (2010) também estudaram a estabilidade térmica e a estabilidade frente às variações de pH da poligalacturonase produzida por fermentação em estado sólido, utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger* e como substrato o resíduo do maracujá e concluíram que esta enzima mostrou boa estabilidade até 50°C, apresentando 75% da atividade máxima na temperatura de 30°C. Em temperatura acima de 70°C foi completamente inativada, durante 20 minutos e com relação ao pH os autores observaram que esta enzima apresentou boa estabilidade em valores de pH entre 3,5 – 5,5 e acima de 6,5 não detectaram atividade.

2.6.1.7 Tamanho das Partículas

São de extrema importância o tamanho e a forma das partículas do substrato. Geralmente partículas muito pequenas poderão resultar em aglomeração do substrato interferindo na respiração microbiana e conseqüentemente pouco crescimento celular, entretanto partículas maiores promovem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, mas limitam a superfície para ataque microbiano (PANDEY et al., 1999).

Vale ressaltar também que partículas muito pequenas, a área superficial é maior enquanto que a porosidade é menor dificultando a penetração do fungo filamentosos nos poros e conseqüentemente dentro das partículas do substrato (RUIZ, 2012).

2.7 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

O processo de recuperação e purificação de biomoléculas produzidas por micro-organismos em uma fermentação é denominado de *downstream processing*, é uma etapa muito importante na indústria biotecnológica para obtenção de produtos de alta pureza,

representando cerca de 80 a 90% do custo de produção. No caso da produção comercial de enzimas os custos com as operações de recuperação podem alcançar até 80% do custo final do produto (CASTILHO et al., 1999). Portanto, é de extrema importância que se desenvolvam técnicas eficazes, econômicas e que alcancem altos graus de recuperação e purificação, mantendo a atividade biológica da enzima (ANTOV et al., 2004). Para isso é importante o estudo de sua otimização, de modo a se obter produtos biológicos comercialmente viáveis, haja vista que durante o processo fermentativo para a obtenção do composto desejado, podem ser gerados outros compostos que impedem muitas vezes a sua utilização em procedimentos industriais. Portanto, muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de biomoléculas dentre elas se encontram as mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração as quais tem alto poder de concentração e baixa purificação. E as mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa que recuperam e purificam, de forma mais eficaz (FERREIRA, J., 2007). A escolha do método depende das características de cada enzima e do grau de pureza desejado.

A tecnologia de purificação desses biocompostos foi desenvolvida lentamente em comparação com a tecnologia de produção em detrimento da complexidade do sistema e a necessidade de manter a biomolécula com atividade biológica (MUTHIAH, 2011).

A separação de proteínas por precipitação é uma das técnicas mais tradicionais e amplamente utilizadas na recuperação e parcial purificação dessas biomoléculas. É uma técnica de fácil ampliação para escala industrial e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes. Consiste na decantação ou centrifugação dos precipitados de proteínas. Dentre as técnicas de precipitação a utilização de sulfato de amônio e o uso de solventes orgânicos miscíveis tais como etanol, metanol ou acetona em um meio aquoso contendo proteínas tem sido bastante utilizado. A vantagem da utilização do etanol como agente de precipitação é devido a sua abundância e seu baixo custo o qual torna a recuperação da enzima economicamente viável, além do mesmo poder ser reciclado através do processo de destilação. E as desvantagens do seu uso podem ser: a necessidade de operação em baixa temperatura para minimizar a desnaturação da enzima, e o perigo de inflamabilidade deste solvente (SCOPES, 2008).

Saxena, Davidson e Sheoran (2003) fizeram um estudo sobre os métodos de purificação e observaram que aproximadamente 80% dos sistemas de purificação utilizavam a etapa de precipitação sendo que, 60% usavam sulfato de amônio e 35% usavam etanol, acetona ou um ácido, seguido de algum método cromatográfico.

Ferreira, G. et al. (2007) purificaram a amilase e malte de *Zea mays* utilizando 80% de álcool, obtendo um rendimento de 96%.

Pedrolli et al. (2010) purificaram a poligalacturonase produzida por *Aspergillus giganteus* utilizando 70% (m/v) de sulfato de amônio, obtendo um rendimento total de 86,4%.

Santana et al. (2012) fizeram um estudo comparativo de técnicas de precipitação com a enzima amilase obtida de malte de milho utilizando como agentes precipitantes os solventes álcool e acetona e o sal, sulfato de amônio. O maior valor encontrado por estes autores para o fator de purificação (FP) foi de 194, quando usaram o sulfato de amônio a 30% de saturação.

Considerando que o processo de separação e purificação deve ser simples, econômico e evitar sucessivas etapas é que a partição de biomoléculas em sistema aquoso bifásico tem sido uma alternativa bastante eficiente para estes bioprodutos além das fases serem compatíveis com quase todas as proteínas conhecidas. Vale ressaltar que quanto mais etapas forem necessárias para a purificação menor será a recuperação protéica.

Segundo Selvakumaret al. (2010) as vantagens deste sistema são: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das proteínas ligantes.

2.7.1 Recuperação de enzimas obtidas por fermentação

A extração de substâncias contidas nos sólidos fermentados é uma operação de extração sólido-líquido. É a primeira etapa da recuperação das enzimas obtida na fermentação em estado sólido ou cultivo semissólido, também chamada de lixiviação. Esta etapa tem como princípio básico a dissolução de um ou vários solutos sólidos em um solvente líquido (FERNÁNDEZ et al., 2011). Este solvente pode ser: água, tampões, soluções salinas diluídas ou soluções aquosas de glicerol resultando após a operação em um extrato enzimático bastante límpido (CASTILHO, 1997). O uso de tampões evita a desnaturação e inativação enzimática. Normalmente o pH escolhido para a solução tampão é aquele onde a atividade e estabilidade da proteína é máxima, portanto cada enzima possui uma forma de extração considerada ótima conforme suas características funcionais.

A relação entre a quantidade de sólido e o volume de solvente a adicionar é de extrema importância, pois um grande volume de solvente na extração dos solutos aumenta consideravelmente os custos de purificação e recuperação do produto desejado.

Santos, S. et al. (2008) estudaram o processo de extração da poligacturonase produzida por *Aspergillus niger* usando o pendúculo de caju seco como substrato em fermentação em estado sólido e verificaram que a maior atividade enzimática 16,1 (U/g) deu-se com a relação sólido/solvente de 1:5 e tempo de contato entre solvente e meio fermentado de 100 minutos. Entretanto Hendges et al. (2011) estudaram o processo de extração desta mesma enzima e utilizaram como substrato na fermentação em estado sólido, farelo de trigo e pectina obtendo 80 U/g de atividade poligalacturonásica nas condições de: relação sólido/solvente (RE) de 1:7,5; tempo de contato (TC) de 15 minutos e agitação do meio (AG) de 200 rpm.

Para se obter um processo de lixiviação com êxito vários fatores devem ser levados em consideração: relação soluto/solvente, o preparo dos sólidos, pH do solvente, temperatura do processo e o grau de agitação do sistema o qual favorece a difusão dos solutos no solvente (FERNÁNDEZ et al., 2011).

2.7.2 Fator de recuperação e purificação de enzimas

Segundo Cavalcanti (2010) as soluções contendo as biomoléculas a serem purificadas encontram-se misturadas às células, sais e a produtos gerados (muitas vezes indesejáveis) durante o processo fermentativo, portanto é importante que se utilize um tratamento que possibilite à separação destes materiais.

A avaliação do desempenho de qualquer método de purificação de proteínas geralmente baseia-se na recuperação e no fator de purificação de proteínas. Estes valores segundo Cavalcanti (2010) são obtidos em relação à solução inicial podendo também ser feita a avaliação pela relação entre a concentração do material purificado (C) com a concentração do material inicial (C_0), ou qualquer que seja a etapa dentro do bioprocessos, tendo sempre uma etapa anterior como referência. Logo, conforme a Equação 2, define-se a recuperação da proteína (RP) como:

$$RP (\%) = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C: concentração do material purificado;

C_0 : concentração do material não purificado.

O fator de purificação (FP) é definido para enzimas como a relação entre a atividade específica no material purificado (AS) com a atividade específica no material não purificado (ANS), conforme a Equação 3:

$$FP = \frac{AS}{ANS} \quad (3)$$

2.8 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SABs)

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são conhecidos desde o final do século XIX, quando Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel quando misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração separavam-se espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. Entretanto foi apenas com os trabalhos de Albertson em meados da década de 50 que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade da aplicação desta técnica para partição/purificação de biocompostos (SILVA e LOH, 2006).

Os SABs são formados pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros quimicamente distintos, ou pela combinação de uma solução aquosa de um polímero e uma solução aquosa de solutos de baixa massa molar (um sal), formando duas fases com composições diferentes. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas são incompatíveis entre si e se separam em duas fases (CUNHA, 2008). Uma das fases neste sistema é rica em polímero e a outra no outro polímero ou sal. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao equilíbrio entre fases (CARVALHO, M., 2007). O maior constituinte destes sistemas é a água (70 a 90%), proporcionando um ambiente ameno para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perdas de atividades biológicas (Da SILVA 2006).

Dentre os vários tipos de sistemas bifásicos aplicados na recuperação de enzimas, destacam-se os formados por dois polímeros de cadeia flexível (PCF), como PEG (polietileno glicol) e dextrana e os que contêm polímero como PEG e um sal inorgânico como: sulfato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, carbonato de sódio entre outros. Atualmente, os sais orgânicos como os citratos, tartaratos, succinatos também estão sendo usados na formação destes sistemas com sucesso (CUNHA, 2008).

Madhusudhan et al.(2008) estudaram a influência de diferentes sais tais como: fosfato de potássio, sulfato de sódio, fosfato de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de amônio na purificação da enzima álcool desidrogenase e obtiveram a melhor recuperação da atividade (89%) quando utilizaram o sal fosfato de potássio. Segundo Yan-min et al. (2010) o principal sal utilizado na indústria é o fosfato devido ao seu baixo custo e ao alto coeficiente de partição de biomoléculas, entretanto altas concentrações deste podem causar problemas no equilíbrio do SAB como, por exemplo, a desnaturação de biomoléculas.

Os SABs formados por PEG e dextrana ou PEG e sais são amplamente utilizados na separação e purificação de misturas de moléculas de origem biológica, dentre elas, as enzimas pela disponibilidade em grandes quantidades no mercado, por não serem tóxicos, possuírem alta seletividade, possibilidade de reciclagem dos reagentes e por manterem a integridade das enzimas (RATANAPONGLEKA, 2010). Como o custo da dextrana é elevado torna-se inviável a sua aplicação em escala industrial, portanto o sistema aquoso bifásico PEG e sais têm sido empregados para a extração de enzimas em larga escala devido, ao seu baixo custo, baixa viscosidade e curto tempo para separação das fases. Além de poderem ser formados a temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal.

Na literatura encontram-se diversos trabalhos que evidenciam os sistemas aquosos bifásicos e o seu potencial de aplicação a nível industrial na separação de biomoléculas.

2.8.1 Componentes dos sistemas aquosos bifásicos

a) Polietileno glicol (PEG)

O polietileno glicol (PEG), $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ é um polímero sintético neutro, poliéster, linear ou de cadeia ramificada, com uma grande variedade de pesos moleculares, variando de algumas centenas até milhares de unidades de massa atômica. Solúvel em água e em diferentes solventes orgânicos, benzeno, dicloro metano e outros (FERREIRA, J., 2007). É um polímero produzido mundialmente em grandes quantidades devido à sua ampla aplicabilidade nas indústrias de plásticos, alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. E seu uso também é de grande interesse na biotecnologia por ser um composto biodegradável e atóxico, sendo aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*). É um dos polímeros mais utilizados em sistemas aquosos bifásicos.

O termo PEG é usado para compostos de baixa massa molar (abaixo de 20.000g/mol) e o termo PEO (polióxido de etileno) é restrito para compostos de altas massas molares

(maiores que 20.000g/mol). Os PEGs com massas molares menores que 10.000g/mol são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas e os de massas molares, acima de 10.000g/mol, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. São moléculas relativamente estáveis, biodegradáveis, não tóxicas e que podem ser estocadas à temperatura ambiente, entretanto a 4°C a ocorrência de oxidação em soluções é retardada (IGARASHI, 2003). A oxidação do PEG é detectada pela diminuição do pH, devido à liberação de grupos ácidos que altera a coloração da solução para marrom (IGARASHI, 2003). A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles (Da SILVA, 2006).

b) Fosfato de potássio monoácido e diácido de potássio

Os fosfatos são sais inorgânicos, amplamente conhecidos. São utilizados em sistemas bifásicos aquosos do tipo polímero/sal e formam duas fases na presença do polímero (PEG). O fosfato monoácido de potássio ou hidrogenofosfato de potássio tem massa molar 174,09 g/mol e fórmula molecular K_2HPO_4 (anidro). Em solução a 5% e temperatura de 25°C seu pH fica entre 8,5 e 9,6. A sua cinética de dissolução em água é lenta, sendo necessário aquecer o sistema para dissolução total do sal a altas concentrações.

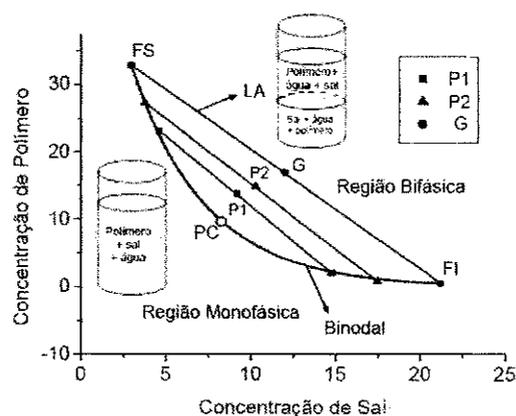
O fosfato diácido de potássio ou di-hidrogenofosfato de potássio tem massa molar 136,09 g/mol e fórmula molecular KH_2PO_4 (anidro). Em solução a 5% e temperatura de 25°C seu pH fica entre 4,1 a 4,5 e sua cinética de dissolução em água é mais rápida que a do monoácido. Os sais de fosfato apresentam um baixo custo, por isso o seu grande uso em sistemas de duas fases aquosas (FERREIRA, J., 2007).

2.8.2 Diagrama de fases

A representação gráfica utilizada para expressar as concentrações de um sistema de fases é geralmente feita através de diagramas retangulares (Figura 4) devido ao seu alto teor de água e é de grande importância para os estudos de separação de biomoléculas, pois são usados como ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração.

A concentração de um dos constituintes do sistema é representada no eixo horizontal e a outra no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença.

Figura 4 – Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.



Fonte: (CARDOSO, M., 2007).

A curva que divide a região em duas fases (FS-PC-FI) é denominada de curva binodal ou curva de equilíbrio. Os sistemas cuja composição fica abaixo da binodal formam uma única fase (região monofásica), entretanto os que ficam acima desta formam duas fases (região bifásica). As linhas são chamadas “tie-lines” ou linha de amarração as quais são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases superiores e inferiores com a mesma composição final, embora com diferentes relações de volumes entre as fases (SILVA e LOH, 2006). No diagrama de fases são mostrados três sistemas com composições globais diferentes P1, P2 e G, localizados em linhas de amarração diferentes (CARDOSO, M., 2007). Outra particularidade mostrada neste diagrama é o ponto crítico (P_c) onde as propriedades físicas e químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986).

2.8.3 Partição de enzimas em sistemas aquosos bifásicos

Nos sistemas aquosos bifásicos formados por duas fases, as biomoléculas presentes estão distribuídas entre as mesmas através de um coeficiente de partição (K). É uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Como os sistemas aquosos bifásicos são bastante aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas as quais normalmente o K está associado.

O coeficiente de partição (K) é definido como a razão entre a concentração da substância de interesse, enzima, na fase superior (A_S) e inferior (A_I) após o sistema atingir o equilíbrio (Equação 4).

$$K = \frac{A_S}{A_I} \quad (4)$$

Quando o coeficiente de partição, também chamado de distribuição, for igual a um a concentração da biomolécula é igual em ambas às fases, ou seja, indica que o soluto particionou igualmente entre as duas fases (superior e inferior). Entretanto se o coeficiente for maior do que um, significa que a biomolécula particionou preferencialmente para a fase superior e caso seja menor do que um significa que ela se concentrou preferencialmente na outra fase (IGARASHI, 2003).

Segundo Chaiwut et al.(2010) são vários os fatores que podem contribuir para a distribuição das biomoléculas: natureza química dos componentes formadores do SAB, a massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH, temperatura, adição de sais inorgânicos além do tamanho e estrutura da biomolécula. Portanto as condições adequadas para a partição destas podem ser encontradas a partir de experimentos.

Em geral, quanto maior for a massa molar do polímero, menor será a concentração requerida, desse mesmo polímero, para que ocorra a formação das duas fases (PEREIRA M., 2005). Este comportamento é devido ao aumento do caráter hidrofóbico do PEG ao aumentar a massa molar do polímero (BERTOLUZO et al., 2005). A massa molar do polímero afeta também o tempo de separação das fases o qual pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases.

Antov et al. (2004) utilizaram dois tipos de sistemas aquosos bifásicos com diferentes concentrações de PEG na purificação de pectinases e observaram a influência da concentração do PEG no coeficiente de partição. Quando a concentração de PEG variou de 13 a 19% e de 5 à 17,5% o K diminuiu de 0,30 para 0,0 e 0,59 para 0,14. O mesmo foi observado por Mehrnough et al. (2011) estudando a partição de pectinases em SABs com diferentes massas molares variando entre 2000 e 10.000. Para o PEG de massa molar 2000 estes autores obtiveram um valor de k de 4,3 e para o PEG 10.000 de 0,9. Segundo Johansson et al. (2008) a diminuição do K com o aumento do polímero pode ser devido ao aumento da repulsão entrópica da fase.

Lima, A. et al. (2002) utilizaram várias massas molares de PEG entre 400 e 10.000 na partição de pectinases e observaram que a maioria destas enzimas se concentrava mais na fase polimérica para o sistema de menor massa molar e a medida que aumentava o peso molecular do PEG a concentração dava-se na fase salina (inferior).

O pH pode afetar o coeficiente de partição quer seja alterando a carga do soluto quer seja alterando outras espécies presentes no sistema. Segundo Zhang et al. (2010) ao purificar lipase produzida por *Trichosporon laibacchii* em sistema aquoso bifásico PEG/fosfato observaram que o aumento do pH de 3,0 para 7,0 ocasionou um aumento do coeficiente de partição de 7,61 e o fator de purificação de aproximadamente 3 vezes.

O efeito da temperatura é um fator muito importante a considerar na partição de enzimas, pois temperaturas elevadas nos sistemas aquosos bifásicos podem acarretar em mudanças conformacionais como também desnaturá-las.

Nos sistemas constituídos por um polímero e um sal, o aumento da temperatura pode acarretar em diminuição das concentrações de polímeros e sal necessárias ao aparecimento de duas fases (PEREIRA M., 2005). Silva e Loh (2006) verificaram ao estudar sistemas contendo PEG/sal que em temperaturas próximas à ambiente a separação das fases ocorria com mais facilidade, entretanto Albertsson (1986) ao estudar o sistema PEG e dextrana observou que com o aumento da temperatura era necessária uma concentração maior dos polímeros para que ocorresse a separação das fases.

O efeito da temperatura varia de acordo com os constituintes do sistema, portanto é importante que a temperatura seja fixa e adequada à biomolécula.

2.8.4 Tempo de separação das fases

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. Sistemas contendo PEG/sal possuem um tempo de separação das fases muito menor que os sistemas PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos, enquanto que em sistemas PEG/dextrana dependendo da concentração e da massa molar dos polímeros esse valor será entre 5 a 30 minutos (COIMBRA, 1995).

A velocidade de coalescência das pequenas bolhas que se formam durante a agitação também influencia no tempo de separação. Quando se agita um sistema de fases de maneira a uniformizá-lo, inicialmente ocorre a formação de pequenas regiões ricas em cada

componente. Com o tempo, essas regiões aumentam e separam-se em duas regiões distintas (FERREIRA J., 2009).

2.8.5 Aplicações dos sistemas aquosos bifásicos

A indústria exige processos de *downstream* rápido e econômico para o particionamento e purificação de biomoléculas. Os sistemas aquosos bifásicos têm sido uma alternativa atraente e empregados com muito sucesso na separação de uma diversidade de biomoléculas. É uma tecnologia ideal onde a clarificação, concentração e purificação podem ser integradas em uma única etapa. Na literatura encontram-se uma variedade de trabalhos que evidenciam o seu potencial de aplicação a nível industrial. A Tabela 5 apresenta diferentes SABs e algumas de suas aplicações.

Tabela 5 – Aplicações dos sistemas aquosos bifásicos (SABs).

BIOMOLÉCULA	SAB	AUTORES	RECUPERAÇÃO
Exopoligalacturonase	PEG 400/fosfato	LIMA, ALEGRE, MEIRELLES (2002)	89,5
Endopoligalacturonase	PEG 400/fosfato		64,6
Xilanase	PEG/fosfato de potássio	IGARASHI (2003)	94%
Pectinases	PEG 4000/dextrana	ANTOV et al. (2004)	72,41%
	PEG 4000/(NH ₄) ₂ SO ₄		69,46%
Endopoligalacturonase	PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄	PEREIRA, M. (2005)	91%
			95%
Pectinase	PEG/dextrana	MADAREV et al. (2006)	65,01%
Xilanase	PEG/sulfato de amônia	ANTOV et al. (2006)	97,57%
Glucose (G ₆ PDH)	PEG/fosfato de potássio	RIBEIRO (2007)	97,70%
Glicomacropéptido	PEG/ Sal (Sulfato, Fosfato e Citrato)	SILVA (2007)	94,66%
α-galactosidase	PEG 4000/fosfato de potássio	NAGANAGOUDA E MULIMANI (2008)	87,71%
Endo-pectinase	PEG 1500/dextrana	PRODANOVIC E ANTOV (2008)	85,68%
			84,28%
Exo-pectinase	PEG 6000/(NH ₄) ₂ SO ₄		
Pectinase	PEG 1000/ Na ₂ SO ₄	ANTOVE OMARIAN (2009)	90%
α-amilase	PEG 6000/fosfato de potássio	NGUYEN et al. (2010)	93,45%
Poligalacturonases	PEG 10000/fosfato de potássio	SOUSA, C. (2010)	100%
Glicose oxidase	PEG 7500	SINGH (2010)	69,2%
Lecitina	PEG 400/citrato	PORTO et al. (2011)	104%
β-lactoglobulina	PEG 2000/fosfato de potássio	ALCÂNTARA, P.et al. (2011)	97,3%
			81,1%
α-lactoalbumina			
Invertase	PEG 3000/Na ₂ SO ₄	YUCEKAM e ONOL (2011)	90%
Lipase	PEG 4000/Citrato	MARINE et al. (2011)	50%
β-galactosidase	PEG 1500/(NH ₄)SO ₄	HEMAVATHI et al. (2011)	98,26%
			92,58%
β-glucosidase			
Bromelina	PEG/Fosfato	COELHO et al. (2011)	80%
α-amilase	PEG 8000/fosfato	PORFIRI et al. (2011)	99%
Lipase	PEG 8000/fosfato de potássio	BARBOSA et al. (2011)	201,53
			206%
Bromelina	PEG 6000/MgSO ₄	KETNAWA et al. (2012)	
Invertase	PEG 3000/MgSO ₄	KARKAS e ONOL (2012)	217,7%

2.9 ESTADO DA ARTE

Esta seção trata de alguns trabalhos desenvolvidos sobre produção de pectinases, em especial, apoligalacturonase (PG) produzidas por fungos em fermentação em estado sólido além de apresentar alguns trabalhos na recuperação e purificação de enzimas utilizando sistemas aquosos bifásicos constituídos de polímero e sal.

2.9.1 Produção de pectinases por fermentação em estado sólido

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos que devido à crescente preocupação com o meio ambiente vem buscando alternativas para reduzir possíveis impactos ambientais como também agregar valor a estas matérias-primas que antes eram descartadas. Estes resíduos podem ser transformados em compostos de alto valor comercial, enzimas, através de processos biotecnológicos, tais como, fermentação em estado sólido, o qual geralmente favorece a obtenção de proteínas com maior termoestabilidade e tolerância a valores de pH, assim como, permite a produção de enzimas brutas mais concentradas e com menores custos de extração e purificação. Este processo tem sido utilizado globalmente e tem provado ser a tecnologia ideal na bioconversão prática, econômica e ecológica dos resíduos agroindustriais.

Zheing e Sheny (2000) estudaram a estabilidade de pectinases, a partir de resíduos de beneficiamento de frutas e concluíram que estas se mostraram estáveis a temperaturas até 50°C e a pH na faixa entre 3,0 a 6,5 sendo completamente inativada a 85°C por 20 minutos.

Panarotto et al. (2003), fizeram um estudo comparativo entre a casca do limão com pectinas cítricas comerciais como fonte indutora da exo-poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger*. O farelo de trigo foi o suporte e a principal fonte de carbono. Os autores concluíram que a casca de limão apresentou melhores resultados de atividade (70,5 U/g) do que as pectinas comerciais (34,7 e 35,3 U/g de matéria seca).

Menezes et al. (2006) utilizaram resíduos de maracujá como suplemento e farelo de trigo como suporte e fonte de carbono, na síntese da poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger*. Os autores estudaram proporções de maracujá e farelo de trigo e concluíram que o resíduo de maracujá apresentou potencial de aplicação na produção desta enzima por aumentar a atividade de 4,08 U/mL para 5,77 U/mL quando presente no meio em proporção de 25% para 75% de farelo de trigo.

Segundo Linde et al. (2007) a síntese das pectinases é bastante influenciada pelo substrato utilizado como meio de cultivo, principalmente pelas fontes de carbono e nitrogênio, presença de pectina, temperatura e pH.

Santos, S. et al. (2008) estudaram o efeito da umidade inicial do meio assim como à adição de sulfato de amônio e fosfato de potássio na produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido, usando pedúnculo de caju seco como substrato e *Aspergillus Niger* CCT 0916 como agente transformador. A maior atividade 10,4 U/g de meio fermentado foi obtida nas condições de: concentração de inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato sólido, umidade inicial do meio 60% (b.u), concentração de fósforo 0,6% (m/m) e sem adição de nitrogênio. A temperatura de incubação foi de 30°C durante 22 horas de processo.

Giese, Dekker e Barbosa (2008) utilizaram o bagaço de laranja na produção de pectinase por fermentação em estado sólido e obtiveram 32 U/mL de atividade pectinolítica, entretanto quando adicionaram extrato de óleo proveniente das sementes da própria laranja o mesmo inibiu tanto o crescimento dos fungos como a atividade pectinolítica. Portanto este resultado mostra a necessidade de remover a fração de óleos essenciais nos resíduos cítricos que irão ser utilizados como substrato na produção de pectinases.

Castro et al. (2009) testaram parâmetros de cultivo na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* CCT 0916 em fermentação em estado sólido utilizando torta de canola como substrato e obtiveram o maior valor de atividade PG 19,7 U/g, nas condições de 51,8% de umidade inicial correspondendo a atividade de água de 0,986, temperatura de 30°C e inóculo inicial de 10^7 esporos/g em 72 horas de fermentação.

Sheekh et al. (2009) utilizaram cascas de laranja como fonte de carbono e sulfato de amônio como única fonte de azoto na produção de poligalacturonases, celulasas e hemicelulasas obtida de *Aspergillus carneus* NRC1 e observaram que a atividade da poligalacturonase foi estimulada pelo sulfato de amônio entretanto a da celulose e hemicelulose foram fortemente inibidas por este sal.

Mojsov (2010) investigou os efeitos de diferentes fontes de carbono tais como: glicose, frutose, galactose, xilose, lactose, pectina de maçã e pectina da polpa da maçã prensada na produção da endo-poligalacturonase obtida por *Aspergillus niger* com o objetivo de otimizar o meio para alcançar a máxima atividade. O resultado mostrou que dentre estas fontes a que atingiu o máximo de atividade endo-PG (328 U/L) foi quando utilizou a polpa da maçã prensada. Entretanto para as demais foram alcançados valores de: 140 U/L para a pectina de maçã, (28 U/L) galactose, (0,0 U/L) lactose e (15,0 U/L) para a glicose e frutose.

Souza et al. (2010) utilizaram resíduo seco de maracujá (casca e albedo) na produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido e como agente da fermentação o *Aspergillus niger* CCT 0916 e obtiveram a máxima atividade de 20,9 U/g com umidade inicial do meio de 40% e fonte de nitrogênio 1% em 66 horas de processo.

Kumar et al. (2010) utilizaram casca de manga como indutor na produção de poligalacturonase e como agente fermentador o fungo *Fusarium moniliforme*. Os autores obtiveram atividade poligalacturonásica de 43,2 U/g.

Kar e Ray (2011) utilizaram várias fontes de nitrogênio (caseína, peptona, extrato de levedura, nitrato de amônio, extrato de carne, etc.) na produção da exo-poligalacturonase e obteve a maior atividade com o extrato de carne a 1%.

Abassi et al. (2011) compararam o efeito do nitrato de sódio e sulfato de amônio na produção de poligalacturonases (endo e exo) e observaram que quando adicionado o sulfato de amônio ocorreu um aumento na atividade maior do que com o nitrato. Os autores também avaliaram à adição de pectina e glicose no meio contendo farinha de trigo como fonte de carbono e obtiveram a máxima atividade com 4 g/L de pectina cítrica já para a glicose a atividade máxima foi conseguida com 2 g/L de glicose.

Gomes et al. (2011) estudando a estabilidade da enzima poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* ATCC 9642 a altas temperaturas (25, 35, 45 e 55°C) e a baixas temperaturas (4, 10 e 18°C) verificaram que a temperatura ótima de 37°C e pH 5,5 resultou numa atividade de 72,93 U/mL e que quando armazenada em baixas temperaturas manteve o seu valor inicial de atividade por um período de 40 dias.

Diferentes tipos de micro-organismos podem crescer em resíduos originados do beneficiamento de frutas, entretanto são os fungos filamentosos os mais adaptáveis ao cultivo em estado sólido, pois são capazes de crescerem em meio com baixo teor de umidade. Dentre estes fungos o *Aspergillus* é um dos mais amplamente utilizados em processos industriais, com destaque para a produção de enzimas pectinolíticas ou pectinases (CASTILHO et al., 2000).

Padma, Anuradha e Reddy (2011) utilizaram os resíduos: casca de laranja, casca de maçã, casca de manga e casca de goiaba, ricos em pectina, como substrato na produção de poligalacturonase por *Aspergillus awamori* em fermentação em estado sólido e obtiveram respectivamente, 21 U/g, 20 U/g, 19 U/g e 15 U/g de atividade poligalacturonásica.

Fernandez et al. (2011) estudaram o potencial das cascas de citrinos na produção de pectinases e xilanases por meio da fermentação em estado sólido e como agente da

fermentação o micro-organismo *Aspergillus niger* F₃ num bioreator de 2 Kg. A maior atividade alcançada para a pectinase foi de 265 U/g e para a xilanase foi de 65 U/g.

Santiago et al. (2011) estudaram o potencial da casca do umbu como substrato na produção da poligalacturonase por meio da fermentação em estado sólido e o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916. A maior atividade alcançada (15,65 U/g) foi obtida com umidade inicial do meio de 50% (b.u), 10⁷ esporos por grama de meio úmido, concentração de sulfato de amônio de 1,0% m/m, pH inicial de 2,2 e temperatura de 30°C às 66 horas de fermentação.

Fernández et al. (2011) estudaram a viabilidade do uso de cascas de citrus na produção de pectinases e xilanases através do cultivo semissólido e utilizaram o micro-organismo *Aspergillus niger* F3 como agente da fermentação nas seguintes condições: umidade inicial do meio 60%, pH 5,0 e temperatura de 30°C. A atividade de pectinases foi de 265 U/g em 72 horas de processo e de xilanases 65 U/g.

Vasanthi e Meenakshisundaram (2012) utilizaram casca de laranja azeda como substrato na fermentação em estado sólido para produção de pectinase através do micro-organismo *Aspergillus niger* e alcançaram o maior valor da atividade PG de 15,74 U/mL nas seguintes condições: umidade de 50%, temperatura, 30°C, pH 5,0 e fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) 50% às 72 horas de processo.

Silva, J. et al. (2012) utilizaram três espécies de *Aspergillus:phoenicis* URM 4924, *aculeatus* URM 4953 e *japonicus* URM 5620 e quatro resíduos de casca de frutas (limão, laranja, tangerina e maracujá) na fermentação em estado sólido com 40% de umidade, 10⁷ esporos/g a 30°C, durante 96 h para produção de pectinases. Os maiores valores de atividade foram obtidos pelos fungos *A.japonicus* (66,68 U/g), usando a casca de maracujá para a poligalacturonase.

Gonçalves et al. (2012) estudaram a produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) com micro-organismos geneticamente modificados *Penicillium.griseorosem* do tipo selvagem e *Penicillium griseorosem* T 20 quando cultivados em sacarose comercial e extrato de levedura. A maior atividade obtida par a PL foi de 2428 U/mL em 87,7 horas de cultivo e para a PG foi de 9465 U/mL em 83,8 horas. Estes autores compararam estes dois micro-organismos e verificaram que o *Penicillium griseorosem* T 20 proporcionou um aumento de 400 vezes para a produção de PL e de 14 vezes para a PG e concluíram através dos resultados as suas potencialidades para serem usados principalmente nas indústrias de alimentos e têxtil.

2.9.2 Recuperação e purificação de enzimas

Os sistemas aquosos bifásicos constituídos por dois compostos hidrofílicos como polímeros (polietileno glicol, dextrano, etc) e sais (fosfatos, sulfatos, citratos e outros) são utilizados na partição/purificação de biocompostos os quais consistem de duas fases imiscíveis, onde o maior constituinte é a água. Estes sistemas têm sido estudados por muitos pesquisadores, entretanto as substâncias químicas utilizadas nos mesmos, tais como, sais e polímeros é que determina a competitividade com outras técnicas de bioseparação. É uma tecnologia que quando aplicada em processos biotecnológicos permite a integração de etapas simultânea tais como, a separação e concentração do produto estudado em uma única etapa (SINGH E VERNA, 2010). Além da facilidade de ampliação de escala.

A etapa de purificação é essencial para o estudo das propriedades biológicas e moleculares das enzimas. É interessante considerar que por mais que o processo de purificação de uma enzima seja eficaz, este sempre poderá causar alterações na sua estrutura.

Lima, A.et al. (2002) estudaram a partição de pectinase em SABs do tipo PEG 1000/fosfato e obtiveram valores de fator de purificação para a exo-poligalacturonase de 16,28 e para a endo-poligalacturonase de 4,5 respectivamente.

Prodanovic e Antov (2008) testaram a influência de vários pesos moleculares do polietileno glicol na separação e purificação de pectinases produzidas por *Penicillium cyclopium* em sistema aquoso bifásico composto de PEG/ sal e encontraram que os maiores valores do rendimento foram na fase inferior para a endo-PG de 90,43% e fator de purificação de 19,52 enquanto que para a exo-PG também na fase inferior foram de 89,93% e 37,85 ambos com o PEG 6000.

Madhusudhan et al. (2008) estudaram a influência de diferentes sais tais como, fosfato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio e sulfato de amônio na purificação da álcool desidrogenase (ADH) e observaram que a melhor recuperação da atividade (89%) foi alcançada quando utilizaram o sal fosfato de potássio. Em escala industrial segundo YAN-MIN et al. (2010) o principal sal utilizado é o fosfato devido ao seu baixo custo e ao alto coeficiente de partição de biomoléculas, porém altas concentrações deste podem acarretar problemas de desnaturação das biomoléculas.

Ferreira, Padilha e Tambourgi (2009) estudaram um sistema bifásico aquoso variando as concentrações do polietileno glicol (1500, 4000 e 6000) assim como a dos sais (fosfato monobásico de potássio e fosfato de potássio dibásico) objetivando a sua utilização na partição de diversas biomoléculas em pHs 6, 7 e 8. Os autores concluíram com relação a

massa molar do PEG, que menores concentrações de soluções eram necessárias para a formação de fases com PEG de maior massa molar e verificaram também que a influência dos pHs sobre os SBAs não apresentou comportamento definido.

Mehrmoush et al. (2011) empregaram o sistema aquoso bifásico na separação e purificação de pectinases obtida da casca da manga para verificar a influência da massa molar dos polímeros (PEG 2000-10000), concentração de fosfato de potássio (12-20% w/w), pH (6-9) e adição de diferentes concentrações de NaCl (0-8% w/w) sobre o comportamento de partição da pectinase. Os autores concluíram que as melhores condições foram para o sistema composto de 14% de PEG 4000, 14% de fosfato de potássio, 3% de NaCl e pH 7,0 com FP de pectinase aumentado para 13,2 e rendimento de 97,6%.

Coelho et al. (2011) purificaram a enzima bromelina obtida dos resíduos de abacaxi através de sistemas bifásicos aquosos composto de PEG/fosfatode potássio. Os resultados mostraram que o experimento que resultou em maior valor para o fator de purificação foi o constituído de 15% de fosfato e 15% de PEG 2000 cujo FP foi de 8,5 e o rendimento de 89,9%. Estes autores observaram também que o emprego do cloreto de cálcio foi inadequado, pois não leva à formação de um sistema bifásico.

Ferreira, J.et al. (2011) utilizaram o sistema PEG 4000/fosfato de potássio para purificar a enzima bromelina presente nas folhas de curauá com valores de pH 7,0; 8,0 e 9,0 e obtiveram o maior fator de purificação (3,34) nas condições de maior concentração polimérica (16,23%) e também de sal (13,5%) para pH 7,0.

Sousa, C.et al. (2012) estudaram a influência da massa molar do PEG 4000, 6000 e 8000 a um pH 7,0 na partição e purificação da enzima poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* através da fermentação em estado sólido da casca e albedo do maracujá. Foram testados diferentes composições de PEG e fosfato e concluíram que o sistema PEG 8000 a 15% (m/m) e fosfato a 10% (m/m) foi o que apresentou o melhor fator de purificação (7,01) e recuperação acima de 99%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ) da Universidade Federal de Campina Grande-PB (UFCG).

3.2 MATÉRIA-PRIMA

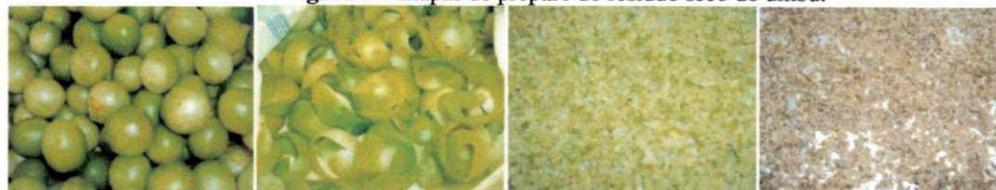
As frutas umbu (*Spondias tuberosa*), goiaba (*Psidium guayava*), variedade Paluma e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) variedade Sabará foram adquiridas na EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas) na cidade de Campina Grande-PB de acordo com o estágio de maturação, o qual para a goiaba e o umbu popularmente conhecido como “de vez”, a fim de se obter amostras mais homogêneas e com quantidades substanciais de pectina.

3.2.1 Preparação das farinhas das cascas das frutas (resíduos secos)

As frutas foram transportadas para o laboratório, lavadas em água clorada a 2,5%, enxaguadas com água corrente e pesadas. Em seguida, foram submetidas ao processo de seleção, classificação e descascamento com exceção da jabuticaba que foi esmagada para a separação da polpa.

As cascas do umbu, goiaba e jabuticaba foram pesadas individualmente em balança semi analítica, trituradas em liquidificador industrial, pesadas novamente e colocadas em bandejas de alumínio em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de $55 \pm 2^\circ\text{C}$ até massa constante. Após a secagem, foram moídas em moinho de facas da marca TECNAL, para obtenção da granulometria adequada ao processo de fermentação em estado sólido para produção da enzima. Em seguida foram homogeneizadas e submetidas à técnica do quarteamento para a retirada de aproximadamente 150 g para a realização da caracterização físico-química. O restante das farinhas foram armazenadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados à temperatura ambiente e passaremos a chamá-las de resíduo seco.

Nas Figuras 5, 6 e 7 encontram-se as frutas inteiras, umbu, jabuticaba e goiaba, as cascas frescas, trituradas e secas que foram utilizadas neste trabalho.

Figura 5 – Etapas de preparo do resíduo seco do umbu.

a) Frutas inteiras b) Cascas frescas c) Cascas trituradas d) Cascas secas

Figura 6 – Etapas de preparo do resíduo seco da jabuticaba.

a) Frutas inteiras b) Cascas frescas c) Cascas secas d) Jabuticaba+polpa+casca

Figura 7 – Etapas de preparo do resíduo seco da goiaba.

a) Frutas inteiras b) Cascas trituradas c) Cascas secas d) Resíduo seco

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS

Foram realizadas em triplicata para cada resíduo seco as seguintes análises físico-químicas: granulometria, massa específica aparente, massa específica real, porosidade, pH, cinzas, umidade, sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix), açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR) e pectina.

3.3.1 Granulometria

Foram pesados em balança analítica 100 gramas de cada resíduo e colocados em uma série de peneiras com malhas de 14 mesh (1,18 mm), 20 mesh (0,840 mm), 24 mesh (0,710 mm), 35 mesh (0,425 mm), 48 mesh (0,300 mm), 60 mesh (0,250 mm) e transferidos para o agitador de peneiras Produteste durante 20 minutos, conforme as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1984). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos em percentuais em relação ao peso do material original.

3.3.2 Massa específica aparente (ρ_a)

Para determinação da massa específica aparente (ρ_a) foram pesados 100 gramas dos resíduos secos e colocados separadamente em provetas, nas quais foram lidos os volumes ocupados por cada amostra. Os resíduos foram adicionados suavemente, para evitar compactação. A massa específica aparente (ρ_a) foi calculada pela Equação 5.

$$\rho_a = \frac{m}{V} \quad (5)$$

Onde:

m: massa dos resíduos (g);

V: volume total do sistema (cm³).

3.3.3 Massa específica real (ρ_r)

A massa específica real (ρ_r) foi determinada a partir da relação entre a massa e o volume da amostra, determinado pelo deslocamento de um fluido (óleo de cozinha) em uma proveta graduada. Utilizou-se óleo porque é um líquido viscoso, capaz de cobrir a superfície das partículas sem penetrar em seus poros. Além disso, o óleo não dissolve o resíduo sendo, portanto, adequado à medição do volume total das partículas. Inicialmente, o óleo foi colocado na proveta e seu volume foi lido (V_1). A seguir, foram colocados em cada proveta contendo o óleo, 100 gramas de cada resíduo seco. Pela ação da gravidade, as partículas do resíduo foram depositadas no fundo da proveta, deslocando o óleo. Após total deposição, foi feita a leitura do novo volume indicado pelo nível do óleo (V_2). A diferença ($V_2 - V_1$) foi denominada de volume deslocado. A massa específica real (ρ_r) foi calculada pela Equação 6.

$$\rho_r = \frac{m}{V_2 - V_1} \quad (6)$$

Onde:

$V_2 - V_1$: volume deslocado (cm³);

m: massa do resíduo seco (g).

3.3.4 Porosidade

A porosidade dos resíduos secos foi calculada a partir da Equação 7 conforme (Keey, 1991).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (7)$$

Onde:

ρ_a : massa específica aparente (g/cm^3);

ρ_r : massa específica real (g/cm^3).

ε = porosidade

3.3.5 pH

O pH das amostras foi determinado seguindo a metodologia descrita por Brasil (2005), na qual foi colocado 10 mL de água destilada em béquer contendo 1 g da amostra. Após completa homogeneização estas suspensões foram deixadas em repouso por 30 minutos. Em seguida foram filtradas em papel de filtro qualitativo e feitas as leituras em pHmetro digital, previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0.

3.3.6 Umidade

Foram pesadas 2 g de cada resíduo seco em cápsulas de porcelana previamente taradas. As cápsulas contendo as amostras foram colocadas na estufa a 105°C até peso constante. Em seguida foram resfriadas em dessecador até alcançar a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica (BRASIL, 2005). A umidade, expressa em base úmida, foi calculada pela Equação 8.

$$U(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

U: umidade em base úmida;

m_i : massa inicial das amostras (g);

m_f : massa final das amostras (g).

3.3.7 Cinzas

Para a determinação das cinzas, foi utilizada a metodologia descrita em Brasil (2005). Foram colocados cadinhos de porcelana vazios na mufla à 550°C por duas horas. Após este período, os cadinhos foram transferidos para um dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados. Em cada um dos cadinhos, foi colocado 2 g da amostra que foi incinerada na mufla à 550°C, por cinco horas ou até apresentarem coloração ligeiramente acinzentadas. Os cadinhos foram novamente deixados em dessecador para esfriar até atingir a temperatura ambiente e, em seguida, pesados. A porcentagem de cinzas das amostras foi calculada pela Equação 9.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

m_f : massa final das amostras (g);

m_i : massa inicial das amostras (g).

3.3.8 Sólidos solúveis totais (°Brix)

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado conforme descrição em Brasil (2005). Para cada 20 mL de água destilada foi colocado 1 g de resíduo seco. Após homogeneização, as suspensões ficaram em repouso por 30 minutos, com agitação intermitente. Em seguida foram filtradas em papel de filtro qualitativo e do filtrado foram transferidos 3 a 4 gotas para o refratômetro modelo Abbé no qual foram feitas as respectivas leituras dos sólidos solúveis totais expressos em °Brix. Os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição.

3.3.9 Açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), com algumas adaptações, a qual se baseia na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS), simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Para a quantificação dos açúcares redutores (AR), foi pesado 0,5 g da amostra e adicionou-se um volume de água o qual variou de 100 a 200 mL dependendo do teor de açúcar de cada resíduo seco. A mistura ficou sob agitação por 30 minutos. Após esse período, a mistura foi filtrada com papel de filtro qualitativo e do filtrado foi transferido 1 mL para tubos de ensaio contendo 1 mL da solução DNS. Em seguida, os tubos foram deixados em banho de água fervente por exatamente 5 minutos e imediatamente resfriados em banho de água à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foram adicionados 8 mL de água destilada em cada tubo, os quais foram agitados em um vórtex, e em seguida feito a leitura da absorbância das amostras em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 540 nm. Os cálculos foram efetuados expressando os resultados em gramas de açúcares redutores por 100 gramas de amostra inicial ($g_{AR}/100g_{amostra}$).

3.3.10 Açúcares totais

A determinação de açúcares totais foi realizada conforme o método de Miller (1959). Após a diluição das amostras foi feita a hidrólise ácida com a adição de ácido clorídrico (HCl) 2 mol/L, seguido de aquecimento por exatamente 5 minutos em banho de água fervente. Após resfriamento, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) a 1mol/L. A partir da neutralização foi adotada a mesma metodologia descrita para a determinação de açúcares redutores. A leitura de absorbância das amostras foi feita em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 540 nm.

Os cálculos foram efetuados expressando os resultados em gramas de açúcares totais por 100 gramas de amostra inicial ($g_{AT}/100 g_{amostra}$).

3.3.11 Pectina

Para a determinação de pectina, foi utilizado o procedimento baseado na metodologia descrita por Rangana (1979). Para 20 gramas dos resíduos secos, foram adicionados 400 mL de HCl 0,05 mol/L em béquer de 1000 mL. As amostras foram submetidas à fervura por duas horas e a água perdida por evaporação foi repostada para que o volume inicial permanecesse constante. Após esse período, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, diluídas para 500 mL e filtradas com filtro de algodão. Os filtrados foram recolhidos e divididos em duas partes (duplicata), as quais foram adicionadas 200 mL de água. O ácido presente em cada amostra foi neutralizado com NaOH 1 mol/L. A neutralização foi realizada em pHmetro

digital. As amostras receberam um excesso de 10 mL de NaOH com agitação constante e foram deixadas em repouso por doze horas. Após esse período, sob agitação constante, foi adicionado ácido acético (CH_3COOH) 1 mol/L. As amostras ficaram em repouso por cinco minutos e em seguida foi adicionado com agitação uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,5 mol/L. As amostras foram levadas à ebulição por dois minutos e deixadas em repouso por duas horas. Após esse período foram filtradas a vácuo com papel de filtro previamente lavado com água destilada e seco em estufa a 105°C por duas horas e pesado. Os papéis de filtro com os precipitados foram deixados em estufa a 40°C por 12 horas, resfriados em dessecador e pesados. O teor de pectina foi calculado por meio da porcentagem de pectato de cálcio, conforme a Equação 10.

$$\% \text{ Pectato de cálcio} = \frac{P_{pc} \times 500 \times 100}{V_f \times P_a} \quad (10)$$

Onde:

P_{pc} : peso do pectato de cálcio;

V_f : volume do filtrado;

P_a : peso da amostra.

3.3.12 Proteínas

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl com adaptação para nitrogênio (N), por espectrofotometria UV-visível a 410 nm, segundo o método descrito em Le Poidevin e Robinson (1964). Foram pesados 0,1 gramas das amostras e transferidas para tubos de ensaios. Em seguida foram acrescentados 50 mg de sulfato de sódio, 7 a 10 gotas de sulfato de cobre a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico PA. Os tubos foram levados à placa digestora para serem aquecidos gradativamente até a temperatura de 350°C. Em seguida foram deixados nesta temperatura até que a solução apresentasse coloração verde claro. Após resfriamento das amostras digeridas, o conteúdo dos tubos foi transferido com o auxílio de água destilada para balões volumétricos de 100 mL os quais foram aferidos. Dos balões de 100 mL, foram retirados 1 mL das amostras e colocados em outros balões volumétricos de 50 mL, nos quais foram adicionados 1 mL de hidróxido de sódio a 10%, 1 mL de silicato de sódio a 20% e 2 mL do reativo de Nessler. Os balões volumétricos de 50 mL foram aferidos com água destilada e deixados em repouso por 30 minutos. Após esse

período foram realizadas as leituras em espectrofotômetro num comprimento de onda de 410 nm. Paralelamente foram feitas amostras em branco sem colocar 0,1 gramas das amostras. O teor de proteína bruta (%) das amostras foi calculado através da Equação 11.

$$\% \text{ Proteína} = (\text{ABS}_{\text{Amostra}} - \text{ABS}_{\text{Branco}}) \times f_c \times 6,25 \quad (11)$$

Onde:

$\text{ABS}_{\text{Amostra}}$: Leitura da absorbância da amostra;

$\text{ABS}_{\text{Branco}}$: Leitura da absorbância do branco;

f_c : valor do fator da curva.

3.4 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE DOS RESÍDUOS SECOS

Para a construção das isotermas foram pesados 20 g dos resíduos secos e adicionado aos mesmos, água destilada na proporção de 1:1. Em seguida foram submetidos à homogeneização por 30 minutos e deixados em repouso no refrigerador em recipiente hermético por 24 horas. Completado o período de repouso destes resíduos secos, foi coletado 1g de cada, e transferido para cápsulas de alumínio, os quais foram para o equipamento Thermoconstanter Novasina RTD 200 TH2 para a realização das leituras de atividade de água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Após a leitura no equipamento foram colocados na estufa a 105°C, resfriados em dessecador e novamente levados ao Novasina para leitura de atividade de água. Em seguida foram pesados novamente em balança analítica para obtenção das massas de equilíbrio e voltados para a estufa para a determinação das massas secas. As isotermas de adsorção de umidade foram construídas com os dados de umidade de equilíbrio e atividade de água.

3.5 PROCESSO FERMENTATIVO

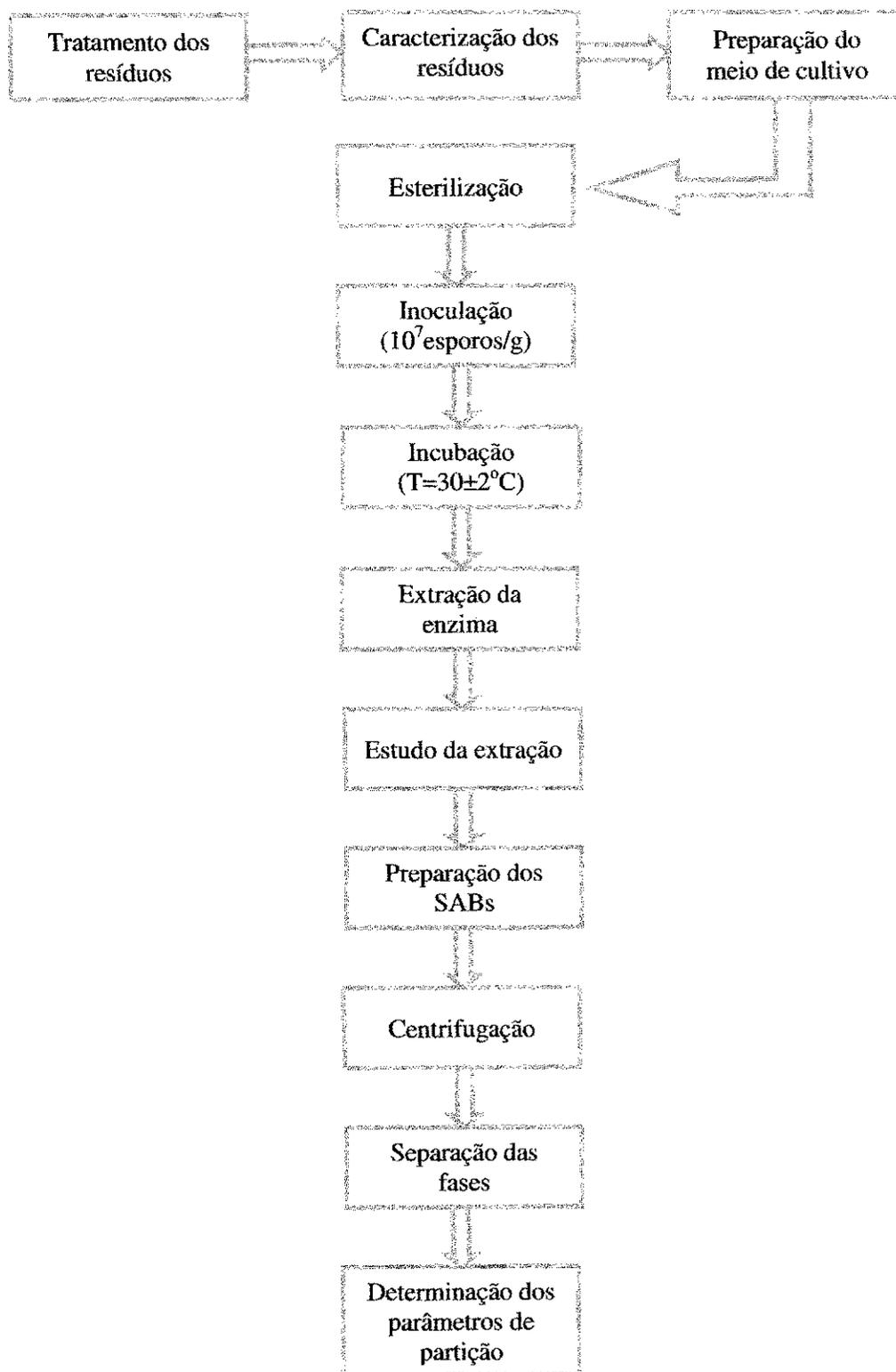
Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, para os três resíduos secos conforme mostra a Tabela 6. Os ensaios foram feitos aleatoriamente. As variáveis chamadas de independentes foram a concentração da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) e a umidade inicial do meio cujos níveis (-1 e +1) corresponderam a 1% e 1,5% para o nitrogênio e 40% e 60% para a umidade. E como variável dependente foi avaliada a

atividade exo-poligacturonase (exo-PG). Os níveis foram definidos baseados em estudos preliminares realizados com os respectivos resíduos secos.

Tabela 6 – Matriz planejamento 2^2 com três repetições no ponto central do processo fermentativo.

Ensaio	Umidade	Concentração de nitrogênio
1	-1 (40)	-1 (0,5)
2	+1 (60)	-1 (0,5)
3	-1 (40)	+ (1,5)
4	+1 (60)	+ (1,5)
5	0 (50)	0 (1,0)
6	0 (50)	0 (1,0)
7	0 (50)	0 (1,0)

A Figura 8 apresenta as etapas do processo de fermentação em estado sólido para a produção da exo-poligacturonase, assim como a sua recuperação por meio de sistemas aquosos bifásicos.

Figura 8 – Etapas do processo de produção e recuperação da exo-poligalacturonase.

3.5.1 Micro-organismo e inóculo

O micro-organismo utilizado nesta pesquisa foi o fungo filamentosso *Aspergillus niger* CCT 0916 modificado, cedido pela Embrapa Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza-CE, e conservado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/UAEQ/UFCG), em tubos de ensaio com tampas rosqueadas contendo solo estéril, mantidos a -18°C .

Os conídios foram retirados do solo estéril com uma alça de platina e transferidos para tubos de ensaios contendo um meio básico, esterilizado em autoclave por 20 minutos a 0,5 atm, constituído de: pectina cítrica (10 g/L), NaNO_3 (3 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), MgSO_4 (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L) e ágar-ágar (20 g/L). Os tubos de ensaio foram inclinados e resfriados a temperatura ambiente (COURI, 1993). Os tubos foram incubados por cinco dias em estufa a 30°C . Em seguida foram mantidos sob refrigeração por um período máximo de quatro meses. Este foi denominado de primeiro repique. Para obtenção do segundo repique foram transferidos do primeiro repique com auxílio da alça de platina esporos para outro meio básico similar ao primeiro, descrito anteriormente, e incubados a temperatura de 30°C durante cinco dias. Após este período foi utilizado um meio de sabugo de milho para produção de grande quantidade de conídios. O sabugo é adequado para este fim, uma vez que, o fungo cresce em uma superfície maior e conseqüentemente aumenta a esporulação.

O meio contendo o sabugo de milho foi preparado de acordo com o protocolo da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, com sede no Rio de Janeiro (RJ). Este meio era composto de uma solução A (20 g de fosfato de potássio monobásico dissolvido em água destilada e transferido para um balão volumétrico de 100 mL) e uma solução B (3,96 g de sulfato de zinco, dissolvido em um pouco de água destilada em seguida adicionado 4,60 g de sulfato de ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5 mL de ácido sulfúrico PA. Após completa dissolução, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL o qual foi aferido com água destilada). Em seguida foi feita uma solução umidificante (2,8 g de peptona foram dissolvidas em um pouco de água destilada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL). Foi adicionado a esta solução 0,19 da solução A e 0,025 da solução B e completado o volume do balão com água destilada.

Em cada erlenmeyer de 125 mL, foi pesado 4,6 g de sabugo de milho seco e moído e foi adicionado 6 mL da solução umidificante. Os frascos foram fechados com tampão de algodão envolvido com gaze, homogeneizado e esterilizado em autoclave a 120°C por 30 minutos.

Para inoculação no meio de sabugo de milho, foi transferido 10 mL de solução 0,3% (v/v) de Tween 80 para tubos com os micro-organismos do segundo repique. Com auxílio de uma alça de platina, os micro-organismos foram suspensos e transferidos, 1 mL, para cada frasco que continha o meio com o sabugo de milho. Os frascos foram incubados em estufa a 30°C por um período de 5 dias. Após este período, os frascos foram armazenados sob refrigeração e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

3.5.2 Preparação do meio de cultivo para a fermentação

Foram pesados em um béquer 80 gramas dos resíduos secos. Em seguida foi calculada a quantidade de água a ser adicionada no meio, conforme Equação 12, para que o mesmo ficasse com o teor de umidade de acordo com a matriz do planejamento. Foi pesada a quantidade adequada da fonte de nitrogênio que neste trabalho foi usado o sulfato de amônio, o qual foi diluído na quantidade de água destilada a ser adicionada ao meio. A água com o sulfato de amônio diluído foi adicionada lentamente ao resíduo seguido de homogeneização. Após a homogeneização, foram distribuídos 10 gramas desse meio úmido nos erlenmeyer de 250 mL os quais foram tampados com tampão de algodão envolvido com gaze e levados para a autoclave a 0,5 atm por 5 minutos. Após a esterilização, foram resfriados à temperatura ambiente.

$$m_{H_2O} = m_{RES} \frac{(u_2 - u_1)}{(1 - u_2)} \quad (12)$$

Onde:

m_{H_2O} : massa de água requerida para hidratação do meio;

m_{RES} : massa do resíduo seco utilizado na fermentação;

u_1 : umidade presente no resíduo seco em base úmida;

u_2 : umidade requerida pelo processo fermentativo.

3.5.3 Inoculação e incubação do meio

Após a esterilização e resfriamento do meio de cultivo foram inoculados 10^7 esporos/grama de meio em cada erlenmeyer, os quais foram incubados em estufa

bacteriológica a temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Esta concentração foi utilizada devido a vários trabalhos realizados com o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916 por diferentes autores dentre eles Alcântara (2007); Santos (2008); Sousa (2008); Souza (2010) os quais obtiveram atividade poligalacturonásica máxima nesta concentração. O processo fermentativo teve duração de 72 horas. Foram retiradas amostras periodicamente durante o processo (0, 7, 22, 30, 44, 50, 66, 72 horas de fermentação) para a realização das seguintes análises: umidade, açúcares redutores, pH e atividade poligalacturonásica (PG). A extração do complexo enzimático também foi feita a cada intervalo de tempo citado.

3.5.4 Extração das enzimas

O método para extração do complexo enzimático foi baseado no realizado por Castilho (1997). Após a retirada das amostras para análises nos respectivos tempos de fermentação, foi adicionado em cada erlenmeyer 5,0 mL/g de meio fermentado de solução tampão acetato 200 mM pH 4,5. Após homogeneização, os frascos foram levados ao banho-maria por 1 hora a temperatura de 30°C . Em seguida as amostras foram filtradas em papel de filtro Wattman 1 e determinada a atividade exo-poligalacturonase.

3.5.4.1 Determinação da atividade exo-poligalacturonase

A atividade exo-poligalacturonase foi determinada conforme Couri (1993), seguindo o protocolo desenvolvido na Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza/CE.

Em tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido poligalacturônico 0,25% m/v, preparado com tampão acetato 200 mM pH 4,5 previamente aclimatado em banho termostático a 35°C , foi adicionado 0,25 mL do complexo enzimático, em seguida foi aquecido por 30 minutos a 35°C . Após este período, 0,5 mL da mistura foram transferidos para tubos contendo 1 mL do reagente DNS, os quais receberam 0,5 mL de água. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100°C por 5 minutos e imediatamente resfriados a temperatura ambiente. Após o resfriamento foram adicionados 8 mL de água destilada. Os tubos de ensaio foram homogeneizados em vórtex e em seguida foi feita a leitura de absorbância da amostra em espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, assim como os ensaios em branco, preparados segundo o mesmo procedimento, no entanto, o extrato enzimático foi adicionado à solução de ácido poligalacturônico e imediatamente transferido para os tubos contendo o DNS. Uma unidade de atividade poligalacturonásica foi definida

como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por minuto de reação, nas condições do ensaio, conforme Equação 13.

$$\text{APG} \left(\frac{\text{U}}{\text{g de meio fermentado}} \right) = \frac{(\text{ABS}_a - \text{ABS}_b) \times 17 \times 2 \times f}{212,16 \times t} \times \text{RE} \quad (13)$$

Onde:

APG: Atividade poligalacturonásica;

ABS_a : Absorbância da amostra;

ABS_b : Absorbância do branco;

f: fator de conversão da curva padrão de ácido galacturônico (mg/L);

17: diluição da enzima no meio reacional;

2: diluição dos grupos redutores no reagente DNS;

t: tempo de reação (no caso deste trabalho, $t=30$ minutos);

212,16: massa molar do ácido galacturônico (g/mol);

RE: relação solvente/massa utilizada na lixiviação (mL/g).

3.5.4.2 Estudo das condições de extração da exo-poligalacturonase

Para avaliar o processo de extração da exo-poligalacturonase foram estudados diferentes valores de tempo de contato (TC), relação solvente/massa (RE) e agitação (AG) de acordo com a matriz do planejamento experimental 2^3 com três repetições no ponto central apresentada na Tabela 7. Esta matriz com suas respectivas variáveis codificadas e reais foi baseada em estudos realizados por SOUSA, C. (2010) quando trabalhou com resíduo seco de maracujá. O planejamento fatorial foi analisado utilizando o software Statística 5.0.

Tabela 7 – Matriz planejamento 2^3 com três repetições no ponto central do processo da extração da exo-PG.

Ensaio	Agitação (AG) (rpm)	Tempo (TC) (min)	Relação (RE) (mL/g)
1	-1 (50)	-1 (15)	-1 (5)
2	+1 (150)	-1 (15)	-1 (5)
3	-1 (50)	+1 (45)	-1 (5)
4	+1 (150)	+1 (45)	-1 (5)
5	-1 (50)	-1 (15)	+1 (10)
6	+1 (150)	-1 (15)	+1 (10)
7	-1 (50)	+1 (45)	+1 (10)
8	+1 (150)	+1 (45)	+1 (10)
9	0 (100)	0 (30)	0 (7,5)
10	0 (100)	0 (30)	0 (7,5)
11	0 (100)	0 (30)	0 (7,5)

Fonte: Sousa, C. (2010).

Para execução deste planejamento primeiramente foi realizado um processo fermentativo com o resíduo seco que alcançou a maior atividade poligalacturonásica (PG) no planejamento do item 3.4, que nesta pesquisa foi o do umbu, nas seguintes condições de cultivo: umidade de 60% (b.u), concentração de esporos de 10^7 esporos/g de meio úmido, concentração de sulfato de amônio de 1,5% m/m, temperatura de 30°C e o tempo de 44 horas. Após o tempo de 44 horas de fermentação, os erlenmeyer foram retirados da estufa, receberam 5, 7,5 e 10 mL de tampão acetato de sódio 200 mM de pH 4,5 (solvente), e foram colocados em uma incubadora (shaker) modelo Marconi MA 420 a qual foi programada de acordo com o planejamento da Tabela 7. A temperatura foi estabilizada em $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Em seguida os erlenmeyer foram retirados do shaker nos seus respectivos intervalos de tempos, 15, 30 e 45 minutos. O caldo fermentado (extrato) contido em cada frasco foi filtrado com algodão e gaze. Uma alíquota foi retirada para análise de atividade poligalacturonásica conforme o método descrito no item 3.5.4.1.

3.6 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA EXO-PG UTILIZANDO SABs

Foi feito um estudo da recuperação da enzima exo-poligalacturonase contida no extrato bruto obtido a partir das melhores condições de extração do item 3.5.4.2 utilizando os

sistemas aquosos bifásicos compostos de polietileno glicol de massa molar 4000, 6000 e 8000 g/mol e sais de fosfato diácido de potássio anidro P.A, de fórmula molecular KH_2PO_4 e o fosfato monoácido de potássio anidro P.A, de fórmula molecular K_2HPO_4 . Os polímeros foram adquiridos da Proquímios e os sais de fosfato da Cromoline.

3.6.1 Diagramas de equilíbrio de fases

A construção dos diagramas de equilíbrio de fases é muito importante nos estudos de separação de biomoléculas, pois mostram as condições em que os sistemas aquosos bifásicos (SABs) podem ser empregados. Portanto, para a utilização dos sistemas (SABs) nesta pesquisa, foi necessário inicialmente determinar os diagramas os quais exibiram as condições em que os sistemas poderam ser empregados.

As curvas binodais com os PEGs de massa molar 4000, 6000, 8000 e os respectivos sais de fosfato de potássio foram obtidas por meio do método turbidimétrico (ALBERTSSON, 1986) na temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Inicialmente adicionou-se separadamente em cada tubo de ensaio de 35mL, 1,5 g da solução mãe de PEG 4000, 6000 e 8000. A esta solução, foram adicionadas alíquotas de 10 μL da solução mãe do sal, com o auxílio de uma micropipeta, até o surgimento de uma turvação persistente. Após cada adição de sal, o sistema era agitado em um vórtex e tinha sua massa medida e anotada. As concentrações dos dois componentes imediatamente após a aparição de turbidez foram tomadas como um ponto da curva binodal e foram calculadas a partir das concentrações iniciais das soluções, da massa inicial e final do sistema após cada adição. Para cada sistema com seus diferentes PEGs, foi adicionado cerca de 0,5 mL de água para torná-lo novamente homogêneo. A nova massa do sistema foi medida, e a massa da água adicionada calculada por diferença. Foram adicionados novos incrementos da solução salina até nova turvação, seguida pela adição de água. Este procedimento foi realizado até a obtenção de aproximadamente 25 pontos.

3.6.2 Planejamento experimental para os PEGs4000-6000-8000/fosfato de potássio

Visando a redução da quantidade de experimentos a serem realizados e uma melhor avaliação dos resultados obtidos, foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória para avaliar a influência da massa molar e das concentrações do PEG 4000, 6000, 8000 e do sal fosfato de

potássio sobre os parâmetros de partição nos SABs, fator de purificação (FP) e recuperação na fase inferior (R_1) da exo-poligalacturonase.

Os valores adotados para as variáveis foram baseados em experimentos preliminares realizados por meio de um planejamento fatorial 2^3 com pH variando entre 6,0 e 8,0 e as concentrações de PEG e sal variando entre 12 e 18%. Nestas condições não ocorreu a separação de fases para os sistemas com pH 6,0, concentração de sal de 18% e PEG 8000. Sendo os melhores resultados para os parâmetros de partição FP e R_1 obtidos nos sistemas com pH 7,0 e concentrações de PEG e sal variando entre 12 a 16%.

Foi usado o programa computacional Estatística TM (Versão 5,0, da Statsoft, Inc) para determinar os efeitos principais das variáveis e suas interações assim como dados relativos à Análise de variância (ANOVA) e gerar também as superfícies-resposta do fator de purificação e recuperação da enzima exo-poligalacturonase.

Os níveis utilizados (-1, e +1) correspondendo a 12 e 16 % e o ponto central 14 % e os respectivos ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz planejamento 2^3 com três repetições no ponto central para o sistema aquoso bifásico.

Ensaio	Massa Molar do PEG	Concentração do PEG (%)	Concentração dos sais (%)
1	-1 (4000)	-1 (12)	-1 (12)
2	+1 (8000)	-1 (12)	-1 (12)
3	-1 (4000)	+1 (16)	-1 (12)
4	+1 (8000)	+1 (16)	-1 (12)
5	-1 (4000)	-1 (12)	+1 (16)
6	+1 (8000)	-1 (12)	+1 (16)
7	-1 (4000)	+1 (16)	+1 (16)
8	+1 (8000)	+1 (16)	+1 (16)
9	0 (6000)	0 (14)	0 (14)
10	0 (6000)	0 (14)	0 (14)
11	0 (6000)	0 (14)	0 (14)

3.6.3 Preparação dos sistemas (PEG 4000/6000/8000/fosfato de potássio)

Inicialmente os polímeros foram colocados em estufa a 50°C e os sais foram à 105°C, até peso constante. Os sistemas aquosos bifásicos foram preparados em tubos de centrífuga

graduados de 15 mL, misturando-se quantidades de fosfato de potássio e PEG, conforme Tabela 8, mais o extrato enzimático fermentado do resíduo seco do umbu, perfazendo um total de massa de 15 g. A quantidade de extrato no sistema ficou aproximadamente entre 64 e 76%. A solução tampão fosfato de potássio de pH 7,0 foi constituída de uma mistura de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 na razão de 1,087 (p/p). Após a adição dos componentes, os sistemas foram agitados lentamente, centrifugados e mantidos em repouso por aproximadamente 20 horas à temperatura de 25°C para ocorrer total separação das fases. Em seguida, as fases foram recolhidas e caracterizadas quanto ao volume, densidade, massa, atividade poligalacturonásica e teor de proteínas. Este procedimento se fundamenta na formação de duas fases uma rica em PEG (menor densidade) e a outra rica no segundo componente, que neste caso é o sal (fosfato de potássio). As biomoléculas presentes podem estar distribuídas desigualmente em cada fase.

3.6.3.1 Determinação do volume das fases dos sistemas

Após o período de repouso foi anotado o volume total o qual correspondeu à superfície do sistema e o volume da fase inferior. O volume da fase superior foi calculado por diferença. A razão entre os volumes das fases superior e inferior foi calculada pela Equação 14.

$$RF = \frac{V_{fs}}{V_{fi}} \quad (14)$$

Onde:

V_{fs} : volume da fase superior;

V_{fi} : volume da fase inferior.

3.6.3.2 Coleta das fases

O procedimento de coleta das fases foi realizado conforme o método descrito por Oliveira (2006). A fase superior de cada sistema foi coletada com o auxílio de uma seringa, tendo o cuidado de deixar uma pequena camada desta fase, de pelo menos 5 mm acima da interface, para garantir que a interface não sofresse alteração.

A coleta da fase inferior foi realizada de forma semelhante, após 1 hora, devendo-se ter o cuidado de causar a menor perturbação possível à interface do sistema. Uma pequena bolha de ar foi mantida na agulha e expelida na fase inferior antes da coleta. A sucção foi feita vagorosamente, tomando-se o cuidado de deixar ainda na célula de equilíbrio uma camada desta fase, evitando-se a sucção da fase superior.

3.6.3.3 Massa específica das fases

A massa específica das fases foi determinada pesando-se um volume conhecido de cada fase em balança analítica e calculada segundo a Equação 15.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (15)$$

Onde:

m: massa da alíquota tomada da fase (g);

V: volume da alíquota tomada da fase (cm³).

3.6.3.4 Massa das fases

A massa de cada fase foi calculada a partir da Equação (15), substituindo os valores da massa específica e do volume previamente calculados.

3.6.3.5 Determinação da atividade exo-poligalacturonase em cada fase

A determinação da atividade exo-poligalacturonase em cada fase foi calculada usando a equação (13) do item 3.5.4.1, porém a variável RE assumiu o valor 1 mL para representar a atividade por volume de amostra. Como a fase inferior referente aos sais era rica em tampão fosfato foi necessário diluir as amostras correspondentes a estas fases com ácido acético a 10% até o pH da amostra abaixar de 7,0 para 4,5.

3.6.3.6 Determinação de proteínas em cada fase

A determinação do teor de proteínas em cada fase foi feita utilizando o método de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado com 0,05g de Comassie Brilliant Blue

G-250 dissolvido em 50 mL de álcool etílico a 95%. Foi adicionado 50 mL de ácido fosfórico P.A. Após homogeneização, foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL o qual foi aferido com água destilada e deixado overnight com agitação constante. Após este período foi transferido para um vidro escuro protegido com papel alumínio e armazenado na geladeira.

Foi feita uma curva de calibração utilizando-se albumina bovina (BSA da MERCK), como padrão, na concentração inicial de 0,1 g/mL.

Para a leitura das amostras, 0,5 mL de cada amostra foi adicionada a 5,0 mL do reagente de Bradford. Após 15 minutos de repouso à temperatura ambiente foi medida a absorbância das amostras em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Foi preparado o branco com uma solução de albumina a 0,1 mg/L e feita as respectivas diluições. Após as leituras, foi construída a curva de calibração, plotando-se a absorbância X concentração. A inclinação da reta foi usada no cálculo da concentração de proteínas das amostras das fases. A concentração de proteínas foi determinada pela Equação 16.

$$C = \text{Abs} \times F \times d \quad (16)$$

Onde:

C: concentração de proteínas solúveis na fase, em mg/mL;

Abs: absorbância das amostras em 595 nm;

F: coeficiente angular da curva de calibração;

d: diluição da amostra.

3.6.3.7 Determinação dos coeficientes de partição

Os coeficientes de partição foram determinados segundo Lima, A. et al. (2002). O coeficiente de partição (K) é definido como a concentração de proteína ou atividade enzimática na fase superior dividida pelo valor correspondente na fase inferior, de acordo com as Equações 17 e 18.

$$K_p = \frac{C_s}{C_i} \quad (17)$$

$$K_E = \frac{A_s}{A_i} \quad (18)$$

Onde:

C_S e C_I : concentrações de proteína total em mg/mL nas fases superior e inferior, respectivamente;

A_S e A_I : atividades enzimáticas nas fases superior e inferior, respectivamente.

3.6.3.8 Avaliação do processo de purificação da exo-poligalacturonase

Para avaliar o processo de purificação da exo-poligalacturonase nos SABs foi necessário o cálculo de outros parâmetros além do coeficiente de partição os quais foram: atividade enzimática específica (AS), expressa em U/mg; o fator de purificação (FP) e a recuperação de enzimas na fase superior (R_S) e na fase inferior (R_I) e o fator de concentração (FC) (LIMA, A. et al., 2002).

- A atividade enzimática específica da enzima em cada uma das fases foi calculada por meio da Equação 19.

$$AS_{\text{fase}} = \frac{A_{\text{fase}}}{C_{\text{fase}}} \text{ (U/mg)} \quad (19)$$

Onde:

A_{fase} : atividade enzimática na fase superior ou inferior;

C_{fase} : concentração de proteínas na fase em estudo.

- O fator de purificação da atividade enzimática em cada uma das fases (FP_{fase}) foi calculado através da Equação 20.

$$FP_{\text{fase}} = \frac{AS_{\text{fase}}}{AS_{\text{extrato}}} \quad (20)$$

Onde:

AS_{fase} : atividade enzimática na fase em estudo;

AS_{extrato} : atividade enzimática específica do extrato após a operação de lixiviação (recuperação das enzimas a partir do meio semissólido fermentado);

- O fator de concentração da atividade enzimática em cada fase foi determinado segundo a Equação 21.

$$FC_{\text{fase}} = \frac{A_{\text{fase}}}{A_{\text{extrato}}} \quad (21)$$

Onde:

A_{fase} : atividade enzimática na fase em estudo;

A_{extrato} : atividade enzimática no extrato.

- A recuperação da atividade enzimática na fase superior e inferior foi determinada através das Equações (22) e (23).

$$R_S(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_I}{V_S} \times \frac{1}{K}\right)} \quad (22)$$

$$R_I(\%) = \frac{100}{1 + K \cdot \frac{V_I}{V_S}} \quad (23)$$

Onde:

V_I e V_S : volumes das fases superior e inferior;

K : coeficiente de partição de atividade enzimática.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os dados e a discussão da caracterização físico-química dos resíduos secos das cascas das frutas do umbu, goiaba e jabuticaba utilizados como meio de cultivo no processo de fermentação em estado sólido, seguido do estudo da influência da umidade inicial do meio e concentração de nitrogênio na produção da enzima exopoligalacturonase como também a avaliação das condições do processo de extração desta enzima. E por fim o resultado da influência da massa molar do PEG, concentração do PEG e do sal fosfato de potássio na purificação e recuperação desta enzima.

4.1 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DAS CASCAS DAS FRUTAS

Na Tabela 9 estão apresentados os percentuais em peso das frutas e cascas do umbu, goiaba e jabuticaba, antes e após o processo de secagem.

Tabela 9 – Percentuais em peso de frutas inteiras, polpa/semente/caroço, casca fresca, seca e triturada.

Frutas	Frutas inteiras (g)	Polpa/Semente/Caroço (g)	Casca fresca (g)	Casca seca(g)	Casca triturada (g)
Umbu	2.866,32	2.269,61	562,98	88,35	87,58
Goiaba	3.597,52	2.953,19	511,90	74,65	73,66
Jabuticaba	3.456,84	2.382,09	800,74	151,02	148,17
Peso (%)					
Umbu		79,18	20,82	15,69	15,55
Goiaba		82,08	17,92	14,58	14,38
Jabuticaba		68,90	31,10	18,86	18,50

Observa-se que os frutos do umbu constitui de 20,82% de casca fresca cujo valor é próximo do percentual encontrado por Silva, C. et al. (1987) que foi de 22%. O valor encontrado para a casca da goiaba de 17,92% está dentro do intervalo obtido por Gouveia et al. (2003) que estudaram o rendimento de casca da goiaba para diferentes estádios de maturação obtendo valores entre 9,95% a 21,64%. A jabuticaba apresenta 31,1% de cascas, próximo ao encontrado por Lima, J. (2008) que em média obteve 33%. Estas variações estão associadas ao tamanho e ao estágio de maturação do fruto como também à espessura da casca, que é um importante componente da resistência física do fruto.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS

Em um processo fermentativo é ponto de partida a caracterização do material que vai ser utilizado como meio de cultivo para obtenção do produto desejado. Neste trabalho foi usado as cascas das frutas, umbu, goiaba e jabuticaba devido aos seus constituintes em especial a pectina que é uma substância indutora na síntese das enzimas pectinolíticas produzidas por micro-organismos. Os dados da Tabela 10 correspondem a caracterização físico-química dos resíduos secos em base úmida obtidos a partir das cascas secas a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ e moídas, utilizadas na fermentação em estado sólido como meio de cultivo para a produção da enzima exo-poligalacturonase. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 10 – Caracterização físico-química dos resíduos secos.

Parâmetros Analisados	Goiaba	Umbu	Jabuticaba
Umidade b.u (%)	12,36 \pm 0,51	10,25 \pm 0,46	9,70 \pm 0,17
Cinzas (%)	3,89 \pm 0,02	3,69 \pm 0,07	2,70 \pm 0,06
Proteína (%)	2,09 \pm 0,20	1,66 \pm 0,20	4,39 \pm 0,35
Pectina (%)	9,92 \pm 0,13	21,03 \pm 1,34	8,31 \pm 0,24
Açúcares Totais (%)	26,51 \pm 1,06	8,81 \pm 1,32	27,45 \pm 1,1
Açúcares Redutores (%)	23,35 \pm 0,19	8,67 \pm 0,42	24,67 \pm 0,31
Sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix)	30,00 \pm 0,00	30,00 \pm 0,00	38,00 \pm 0,00
pH	4,24 \pm 0,01	2,20 \pm 0,01	3,60 \pm 0,00
Massa específica aparente (ρ_a) (g/mL)	0,55 \pm 0,04	0,57 \pm 0,02	0,51 \pm 0,03
Massa específica real (ρ_r) (g/mL)	1,20 \pm 0,05	1,00 \pm 0,01	1,36 \pm 0,03
Porosidade do leito de partículas	0,54	0,43	0,62

Os valores obtidos da umidade estão dentro dos limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece o máximo de 15% (b.u) de umidade para farinhas. Como a umidade dos resíduos secos variou entre 9,7 a 12,36%, pode-se considerar que tais produtos possuem boa estabilidade física, química além de poderem ser armazenados em temperatura ambiente sem riscos de desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas, desde que sejam adequadamente acondicionadas em embalagens herméticas.

Na fermentação em estado sólido, a quantidade de água livre presente nos substratos é um parâmetro limitante pois pode afetar diretamente o crescimento dos micro-organismos assim como a síntese de metabólitos.

O teor de cinzas do resíduo seco do umbu 3,69% está próximo do valor encontrado por Almeida et al. (2010) que foi de 4,26% e superior ao valor encontrado por Pereira, L. et al. (2010) de 1,4%. Estes autores utilizaram os resíduos da extração de sucos e processamento de

polpas enquanto que neste trabalho foi utilizado somente as cascas desidratadas. Foi encontrado para o resíduo da goiaba o valor de 3,89% diferente do obtido por Munhoz et al. (2010), que foi de 3,38% quando utilizaram também a farinha da casca da goiaba. Para o resíduo da jabuticaba o teor de cinzas encontrado foi de 2,70% estando abaixo dos valores obtidos por Ascheri (2006) e Almeida et al. (2010) que foram de 3,49 e 3,6% quando utilizaram os mesmos resíduos.

Com relação ao teor protéico, o resíduo seco do umbu apresenta valor de 1,66% sendo este superior ao encontrado por Abud (2009), que foi de 0,43% entretanto o valor obtido para o resíduo seco da goiaba foi de 2,09% acima do valor encontrado por Uchoa (2008) e Abud (2009) que foram de 1,16 e 0,58%. Dos três resíduos secos estudados o da jabuticaba apresentou o maior teor protéico 4,39% próximo ao valor encontrado por Almeida et al. (2010), que foi de 4,82% e superior ao valor encontrado por Lima, J. (2008) que foi de 1,16%.

Os resíduos secos estudados apresentaram alto teor de pectina que segundo a literatura esta substância química atua como eficiente fonte indutora na produção de enzimas pectinolíticas assim como também pode atuar como fonte de carbono para os microorganismos, dependendo da quantidade de açúcares presentes no meio de cultivo. O resíduo seco do umbu apresentou o maior valor, 21,03%. Portanto, no presente estudo este resíduo foi utilizado tanto como fonte de carbono como também indutor para a produção da exopoligalacturonase. O teor de pectina é influenciado por vários fatores dentre eles o estágio de maturação das frutas.

Fontana et al.(2005) estudaram o efeito da quantidade de pectina em um meio a base de farelo de trigo e observaram que até 16% não houve repressão na síntese das pectinases produzidas pelo *Aspergillus niger*.

O menor valor dos açúcares totais foi do resíduo seco do umbu 8,81% próximo ao valor obtido por Santiago et al. (2011) que foi de 9,20% e o maior foi do resíduo seco da jabuticaba 27,45% o qual foi menor do que o encontrado por Almeida et al. (2010) que foi de 31,39%. Quanto ao valor obtido da goiaba de 26,51% foi próximo ao encontrado por Munhoz et al. (2010) que foi de 30,64%. Para os açúcares redutores os valores encontrados foram de 23,35, 8,67, e 24,67% respectivamente para a goiaba, umbu e jabuticaba enquanto que Munhoz et al. (2008) encontraram para a goiaba 9,57% e Almeida et al. (2010) 2,64 para o umbu e 29,86% para a jabuticaba. Os valores dos açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) encontrados diferem dos valores dos autores citados devido a vários fatores, dentre eles, o estágio de maturação das frutas, pois neste trabalho utilizou-se somente frutas “de vez” (goiaba e umbu) devido ao teor de pectina ser maior, bem como também da lavagem realizada

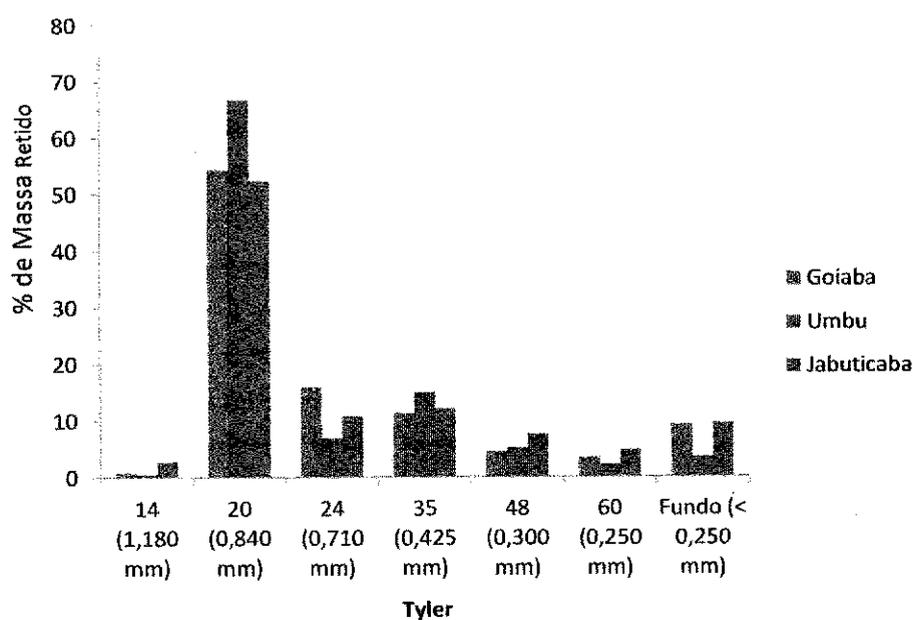
com estas durante a etapa de preparo. Apesar dos açúcares totais do resíduo seco da goiaba ser muito superior aos do umbu os teores de sólidos solúveis foram idênticos. Este fato é atribuído aos sólidos solúveis representarem todas as substâncias solúveis presentes, que no caso das cascas são, além dos açúcares, os ácidos orgânicos, vitaminas, pectina e flavonoides.

Os valores de pH para o resíduo seco do umbu foi similar ao encontrado por Almeida et al. (2010) que foi de 2,20 e inferior ao obtido por Abud (2009) 3,12. Com relação ao pH do resíduo seco da goiaba 4,24, foi próximo ao obtido por Sousa, B. (2010) e Munhoz et al. (2008) que foram de 3,89 e 4,20. Para a jabuticaba o pH de 3,60 foi próximo ao de Lima, J. (2008) e Almeida et al. (2010) 3,39 e 3,24. Este parâmetro tem grande influência na fermentação em estado sólido ou cultivo semissólido, haja vista que, o crescimento dos micro-organismos depende do valor inicial do pH do meio o qual para o *Aspergillus niger* o mínimo é de 1,2 e o ótimo está entre 3,0 e 6,0 (FRANCO, 1999). Malvessi e Silveira (2004) utilizaram um meio contendo farelo de trigo, sais minerais e pectina na produção da enzima poligalacturonase variando o pH entre 2 a 7 e obtiveram máxima atividade com pH inicial do meio de 4,0.

A massa específica aparente dos resíduos secos (0,51 e 0,57 g/mL) revela que estes não tendenciam a compactar-se, gerando espaços vazios entre as partículas dos mesmos e consequentemente favorecendo na respiração e metabolismo dos micro-organismos.

A distribuição granulométrica dos resíduos secos estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Distribuição granulométrica dos resíduos secos.



Observa-se que para os resíduos secos da goiaba, umbu e jabuticaba a maioria das partículas possui tamanho de 20 mesh correspondendo a dimensão de 0,84 mm podendo ser utilizados na fermentação em estado sólido. Partículas de tamanho reduzido em uma fermentação em estado sólido oferecem maior área superficial ao ataque microbiano entretanto tendem a compactar-se facilmente, dificultando a respiração dos micro-organismos e aeração do meio e partículas maiores promovem maior espaço interpartículas, diminuindo o rendimento da absorção dos nutrientes pelos micro-organismos (PANDEY, 2001).

Botella et al. (2007) estudaram a influência do tamanho das partículas de 0,06 a 1,00 mm; 0,74 a 1,00 mm e 1,00 a 1,60 mm) na produção de xilanase e pectinase e não verificaram efeito significativo destes tamanhos na produção destas enzimas.

Ruiz et al. (2012) observaram que o tamanho das partículas da casca de limão influenciou na taxa de crescimento do micro-organismo *Aspergillus* na fermentação em estado sólido pois quando utilizaram tamanho entre 0,3-0,17 mm alcançaram uma taxa de 0,0551/h enquanto que com tamanho entre 0,7-2,0 mm a taxa foi para 0,0991/h. Para estes autores o tamanho ótimo de partículas representa frequentemente um compromisso entre a acessibilidade dos nutrientes e da disponibilidade de oxigênio.

A redução do tamanho das partículas também é importante no processo de extração do complexo enzimático pois facilita o contato entre o soluto, que se encontra na fase sólida e o solvente aumentando a velocidade da transferência dos solutos para o solvente (FERNÁNDEZ, 2011).

Em geral, a composição física e química dos resíduos secos a ser utilizado em um processo depende de vários fatores: estágio de maturação e variedades das frutas, época de desenvolvimento dos frutos, fatores climáticos, tipo de solo e das etapas do preparo para obtenção dos resíduos secos desejados, tais como, seleção, lavagem e descascamento das frutas. Portanto, é de extrema importância a caracterização do substrato que vai ser utilizado em um processo fermentativo. No caso da caracterização destes resíduos secos observa-se que, os nutrientes presentes nestes podem ser metabolizados por variadas classes de micro-organismos, podendo gerar uma diversidade de compostos de interesse comercial, inclusive enzimas.

4.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Foram construídas as isotermas de adsorção de umidade dos resíduos secos da goiaba, jabuticaba e umbu nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Por meio destas foi possível verificar o

teor de água livre contido em cada resíduo seco assim como determinar o intervalo de atividade de água favorável ao desenvolvimento do fungo *Aspergillus niger* CCT 0916.

4.3.1 Modelagem das isothermas de adsorção de umidade

Existe na literatura uma variedade de equações matemáticas que descrevem isothermas de sorção dentre as quais a de Guggenheim-Anderson de Boer (GAB) que são bastante aplicadas em farinhas, portanto, por meio do Software Estatística 5.0, foram realizados os ajustes das isothermas de adsorção utilizando o modelo de GAB.

As isothermas de adsorção de umidade nas temperaturas de 25, 30 e 35°C dos resíduos secos do umbu, jaboticaba e goiaba com os respectivos valores de umidade de equilíbrio (U_{eq}) em função da atividade de água (A_w) estão representadas nas Figuras 10, 11 e 12. Observa-se que a umidade de equilíbrio (U_{eq}) aumenta com o aumento da atividade de água (A_w).

Figura 10 – Ajuste das isothermas de adsorção do resíduo seco da goiaba (Modelo de GAB).

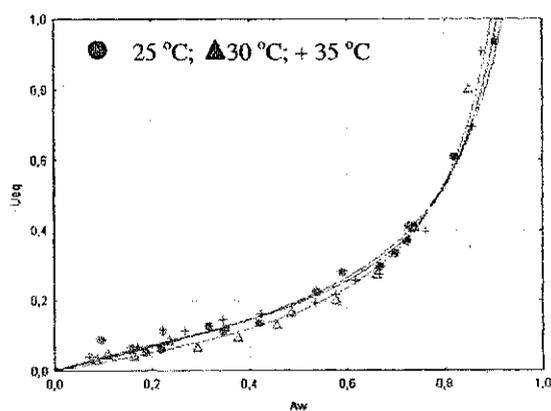


Figura 11 – Ajuste das isothermas de adsorção do resíduo seco da jaboticaba (Modelo de GAB).

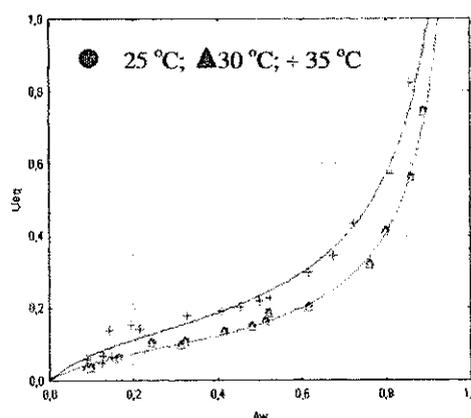
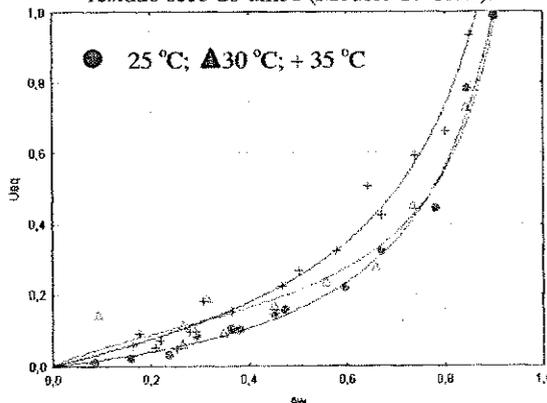


Figura 12 – Ajuste das isothermas de adsorção do resíduo seco do umbu (Modelo de GAB).



As isotermas para as três temperaturas estudadas, são classificadas como do tipo III de acordo com a classificação de Brauner (1938) e apresentam forma J.

As isotermas para o resíduo seco da goiaba estão muito próximas, indicando que praticamente não há influência da temperatura nestes intervalos estudados. Entretanto, para o resíduo seco da jabuticaba as curvas de temperaturas de 25 e 30°C se sobrepõem, mostrando que não há influência desta variável nestas isotermas diferentemente da curva de 35 °C na qual se verifica pequena influência desta variável. Para o resíduo seco do umbu observa-se um efeito maior da temperatura a 35°C, ou seja, um distanciamento das outras duas curvas a medida que a A_w aumenta, mas no intervalo entre 25 e 30 °C o efeito desta variável é percebido entre 0,1 e 0,7 de atividade de água, intervalo no qual segundo dados de literatura não há desenvolvimento do micro-organismo *Aspergillus niger*, portanto, é necessário que na utilização destes substratos em uma fermentação em estado sólido, a atividade de água esteja acima de 0,7. Os resíduos secos da jabuticaba e umbu na temperatura de 35°C mostraram ser mais higroscópicos, adsorvendo uma maior quantidade de água. Estas variações observadas dependem da estrutura física, da composição química, da temperatura e da capacidade de retenção de água do substrato.

Neste trabalho para o processo de fermentação utilizou-se temperatura de 30°C e umidade inicial do meio de 40, 50 e 60% (b.u) para os três resíduos secos, correspondendo as seguintes atividades de água: umbu (0,71; 0,80; 0,85), jabuticaba (0,80; 0,85; 0,88) e goiaba (0,76; 0,79; 0,83).

Na Tabela 11 encontram-se os valores dos parâmetros do modelo de GAB, ajustado às isotermas de adsorção de umidade dos resíduos secos do umbu, jabuticaba e goiaba.

Tabela 11 – Parâmetros de ajuste do modelo de GAB para as temperaturas de 25, 30 e 35°C.

Temperatura(°C)	Xm	C	K	R ²
Goiaba				
25	0,1535	2,5095	0,9308	0,9967
30	0,1339	1,8715	0,9767	0,9931
35	0,1306	3,4606	0,9631	0,9942
Jabuticaba				
25	0,0978	25,9235	1,008	0,9966
30	0,0892	8,3877	0,9857	0,9991
35	0,1379	8,2054	0,9592	0,9948
Umbu				
25	0,2123	0,7961	0,9226	0,9952
30	0,1373	4,5868	0,9578	0,9873
35	0,2451	1,5094	0,9137	0,9934

Observando os parâmetros do modelo de GAB, pode-se verificar que os valores de X_m o qual representa a fração de umidade na monocamada do material adsorvente, sofre reduções com o aumento da temperatura no intervalo entre 25 e 30°C para os três resíduos secos, entretanto apresenta entre 30 e 35°C uma elevação tanto para o resíduo seco da jabuticaba como para o resíduo seco do umbu, fato igualmente verificado por Alcântara, S. et al. (2009) quando utilizaram pedúnculo seco de caju. Os valores de X_m variaram entre 8,92 e 24,51% em base seca, assegurando que o material pode ser armazenado sem riscos de alterações deterioráveis que segundo Mishra et al. (1996) o valor de umidade em base seca para armazenagem segura e estabilidade máxima é abaixo de 26%.

Os valores do parâmetro C que é função das interações entre os sítios ativo do produto e as moléculas de água não apresentam tendência bem definida sob o aumento de temperatura, provavelmente devido o intervalo estudado ter sido muito próximo (25 a 35°C). Segundo Alexandre (2007) os valores de C estão muito abaixo de 200, estando portanto dentro da faixa comumente encontrada na literatura. Quanto ao parâmetro K, o qual representa o fator de correção das propriedades das moléculas na multicamada com relação ao volume do líquido, observa-se valores próximos a um (1), variando entre 0,9226 e 1,008, estando dentro do valor previsto na literatura.

Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) estão acima de 0,99 o que indica que o modelo pode ser utilizado na predição das isotermas de adsorção dos resíduos secos estudados.

4.4 PROCESSO FERMENTATIVO

De acordo com a matriz do planejamento fatorial 2^2 mais três pontos centrais apresentado na Tabela 6 foram realizados ensaios com a finalidade de avaliar o potencial dos resíduos secos do umbu, goiaba e jabuticaba na produção da exo-poligalacturonase e estudar a influência das variáveis, umidade inicial do meio e concentração de sulfato de amônio nesta produção.

Foi feito acompanhamento cinético da produção da exo-poligalacturonase e de consumo de açúcares redutores assim como o monitoramento dos parâmetros que influenciam na fermentação em estado sólido tais como umidade do meio e pH durante um período de 72 horas de processo. Os resultados para cada resíduo seco estudado, estão apresentados a seguir.

4.4.1 Acompanhamento cinético do processo fermentativo para o resíduo seco do umbu

Nas Figuras de 13 a 19, observa-se o acompanhamento cinético da produção da exopoligalacturonase e do consumo de açúcares redutores assim como o monitoramento do pH e da umidade em base úmida (b.u) durante o período de 72 horas de fermentação em estado sólido em cada condição estudada. As Figuras 13 e 14 correspondem aos ensaios 1 e 2 os quais foram utilizados as mesmas concentrações de nitrogênio (0,5%) e umidades inicial do meio diferentes (40 e 60%) (b.u) correspondendo a atividade de água (A_w) de 0,71 e 0,85, respectivamente.

Figura 13 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 1 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 0,5%).

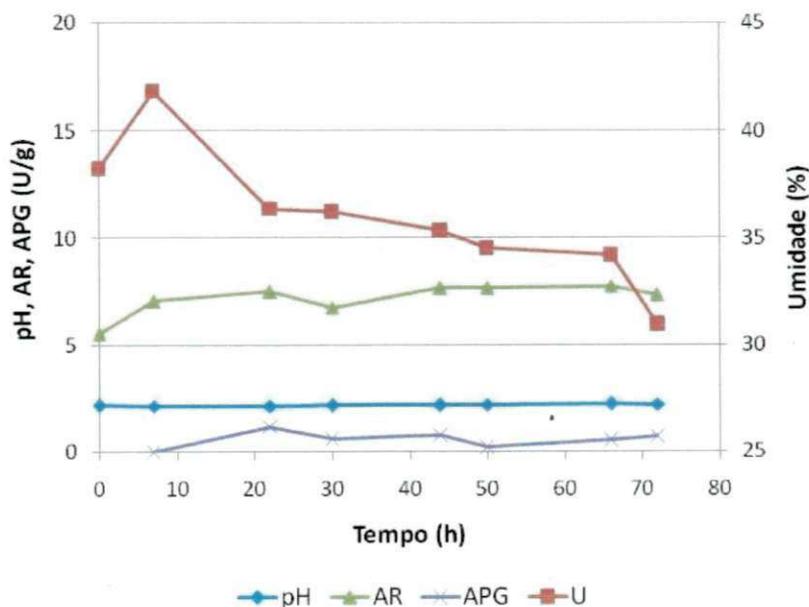
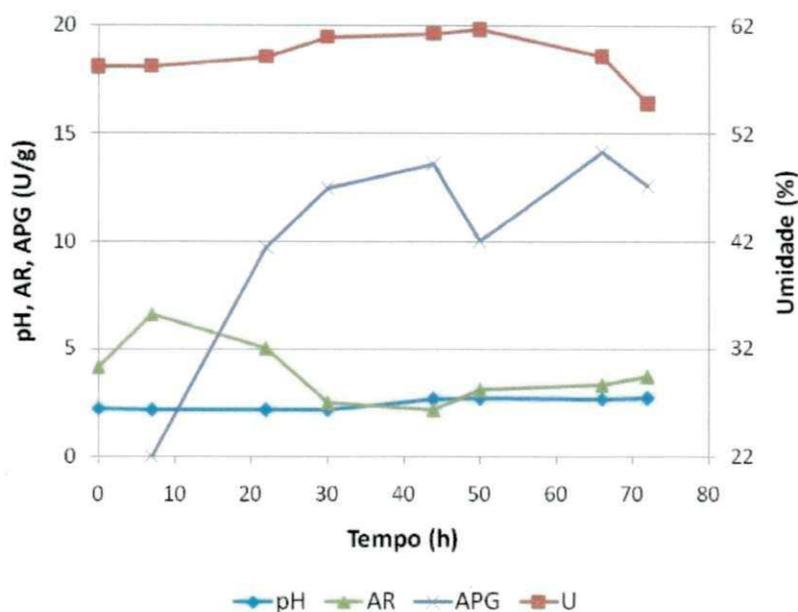


Figura 14 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 2 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 0,5%).



O pH inicial do meio de 2,2 manteve-se praticamente constante durante todo o processo no ensaio 1 enquanto que a umidade variou entre 41,85 a 32% (b.u) e no ensaio 2 variou entre 62% a 59,85 (b.u). Estas perdas de água segundo Borzani et al. (2011) são devidas à evaporação de água e às atividades metabólicas microbianas ocorridas durante o processo fermentativo.

Nestes ensaios o comportamento dos açúcares redutores (AR) são diferentes. Percebe-se que no ensaio 1 ocorreu um acúmulo, possivelmente em detrimento da hidrólise da pectina em oligossacarídeos e monossacarídeos. Segundo Fenema (2010) a pectina em meio muito ácido as ligações glicosídicas da pectina (1,4) são hidrolisadas originando moléculas de D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose e L-fucose. Apesar do meio conter alto teor desta substância, fonte indutora da PG, não foi detectado praticamente atividade desta enzima, associando este fato a baixa umidade inicial do meio de fermentação, correspondendo a uma A_w de água de 0,71, valor abaixo do mínimo para o desenvolvimento do micro-organismo *Aspergillus niger* se desenvolver que segundo Leitão (1997) é de 0,77. Entretanto para o ensaio 2 verifica-se baixo consumo dos AR (4,5- 2,2) induzindo os micro-organismos ao estresse, de forma a ocorrer a quebra da pectina e conseqüentemente excreção da enzima no decorrer do cultivo, alcançando o pico de atividade PG em 66 horas de fermentação de 14,15 U/g. Este fato comprova tanto a importância da umidade inicial do meio no desenvolvimento

dos micro-organismos e consequentemente na elaboração de novos produtos em cultivo semissólido como também a presença de altas concentrações de pectina. Segundo Fawole e Odunfa (2003) quando o meio tem baixas concentrações de glicose surge à necessidade da quebra da pectina em açúcares metabolizáveis pelos micro-organismos e consequentemente a atividade pectinolítica aumenta, sendo este fato observado neste trabalho para o resíduo seco do umbu. Martin e Martins (2009), utilizaram como única fonte de carbono em um meio, pectina cítrica na produção de poligalacturonase e obtiveram 42,5 U/mL.

As cinéticas dos parâmetros analisados no decorrer do processo fermentativo para os ensaios 3 e 4 estão apresentadas nas Figuras 15 e 16, diferenciando das anteriores apenas na concentração de nitrogênio (1,5%) adicionada ao meio. O ensaio 3 contendo 40% (b.u) de umidade inicial do meio e A_w de 0,71 atingiu o pico de APG (1,80 U/g) na 50^a hora enquanto que, o meio correspondente ao ensaio 4 cuja umidade inicial de 60% (b.u) e atividade de água de 0,85 obteve um pico de APG (18 U/g) às 44 horas de cultivo.

O comportamento dos açúcares redutores nas primeiras 7 horas de fermentação foram semelhantes, havendo um acúmulo destes no meio, possivelmente pela hidrólise das ligações glicosídicas da pectina originando açúcares de baixa massa molar mais facilmente assimilável pelos micro-organismos, os quais durante o processo foram sendo utilizados para o seu crescimento e metabolismo.

Figura 15 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 3 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 1,5%).

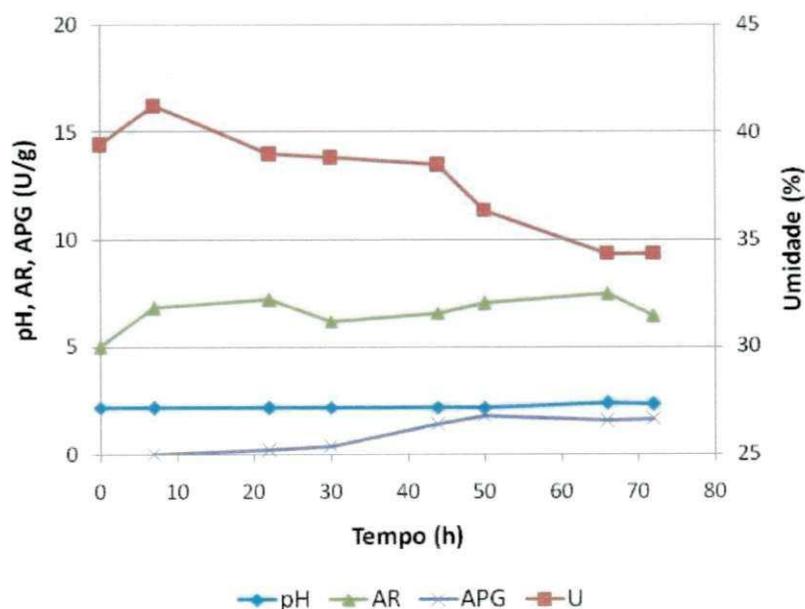
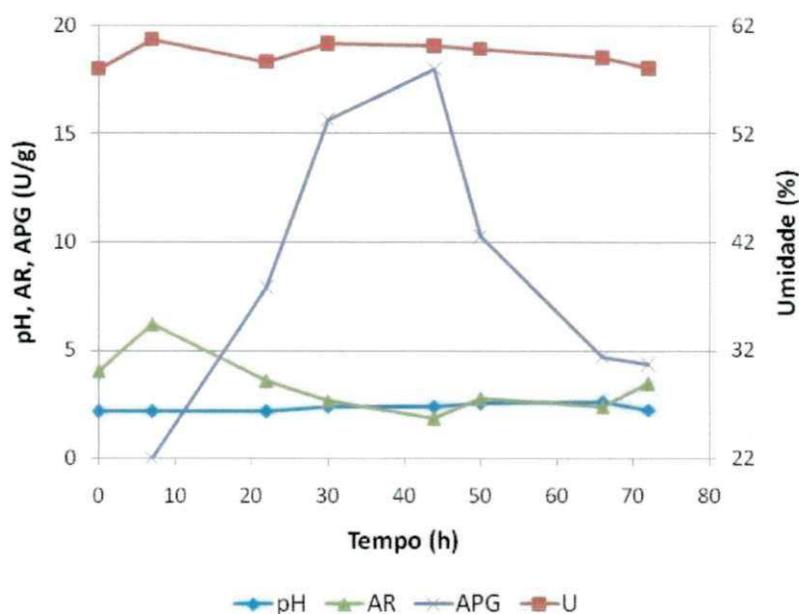


Figura 16 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 4 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 1,5%).



Comparando o ensaio 3 com o 1 observa-se uma semelhança nas cinéticas dos parâmetros analisados inclusive na atividade PG que, praticamente não foi detectada, devido a baixa umidade do meio acarretando provavelmente modificações na membrana celular do fungo conduzindo a limitações de transporte de nutrientes e afetando o metabolismo microbiano. Nestes dois casos a umidade inicial do meio de fermentação foi um fator de inibição da síntese da PG. Portanto o importante é trabalhar com teor de umidade que mantenha o equilíbrio entre a disponibilidade de água, expansão do substrato e efeitos de difusão do oxigênio. É importante ressaltar também que cada micro-organismo tem seu limite mínimo de água livre para seu metabolismo e que este varia de espécie para espécie.

No ensaio 4 a partir das 7 horas de processo observa-se uma diminuição nos açúcares redutores e o início da produção da enzima exo-poligalacturonase atingindo o maior valor, 18U/g às 44 horas de fermentação. O menor valor dos açúcares redutores coincidiu com o máximo valor de atividade. Este fato mostra que o produto formado geralmente está diretamente ligado as reações de decomposição do substrato (açúcares). A partir deste instante observa-se uma diminuição brusca da atividade poligalcturonásica, atingindo o valor de 4,66 U/g, provavelmente devido a quantidade de nutrientes que diminuiu no meio e produtos do metabolismo microbiano que foram se formando, predominando neste caso, substâncias repressoras.

Comparando o ensaio 4 com o 2 percebe-se que no ensaio 2 ocorreu uma diminuição na atividade da enzima entre 44 e 50 horas de processo e que a partir deste intervalo observa-se um aumento na atividade atingindo o pico de 14,15 U/g possivelmente ocorreu neutralização de produtos tóxicos promovendo novamente o crescimento microbiano, mostrando que ainda há uma quantidade suficiente de nutrientes e conseqüentemente excreção da enzima. A diferença entre estes ensaios está na concentração de nitrogênio adicionada ao meio e que quando comparados entre si, observa-se que o ensaio em que foi adicionado maior concentração de nitrogênio obteve-se maior atividade poligalacturonásica, passando de 15 para 18 U/g em um tempo menor. Este fato pode ser atribuído a baixa concentração de proteína do resíduo seco do umbu. O comportamento cinético do pH foi similar durante às 72 horas de cultivo enquanto que a umidade variou entre 61,65 a 54,18% (b.u) no ensaio 2 e entre 60,75 a 58,03% (b.u) no ensaio 4 devido as reações metabólicas e evaporação de água ocorrida durante o processo.

Para verificar a reprodutibilidade dos dados foram realizados ensaios em triplicata nas seguintes condições: umidade inicial do meio de 50% (b.u) e concentração da fonte de nitrogênio de 1,0% conforme as Figuras 17, 18 e 19. Nestes três ensaios o pH permaneceu praticamente constante e em torno de 2,2. O consumo dos açúcares redutores (AR) pelos micro-organismos nestes três casos foram similares, iniciando com o teor de aproximadamente 5,5 e atingindo o menor valor 4,0 às 66 horas de cultivo, não havendo grande variação na curva, provavelmente ocorreu a quebra da molécula da pectina sendo esta ao mesmo tempo a fonte energética e a fonte indutora na síntese da PG. Este fato corrobora com Fontana et al. (2005) que afirmaram que a pectina tanto pode ser usada pelo *Aspergillus niger* como substrato para o crescimento de micro-organismos ou como fonte indutora na produção da poligalacturonase.

A atividade poligalacturonásica máxima foi de aproximadamente 15 U/g entre 66 e 72 horas de cultivo. A umidade do meio variou entre 52,25 a 42,49% (b.u) podendo atribuir esta perda as reações químicas e ao metabolismo celular.

Figura 17 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 5-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).

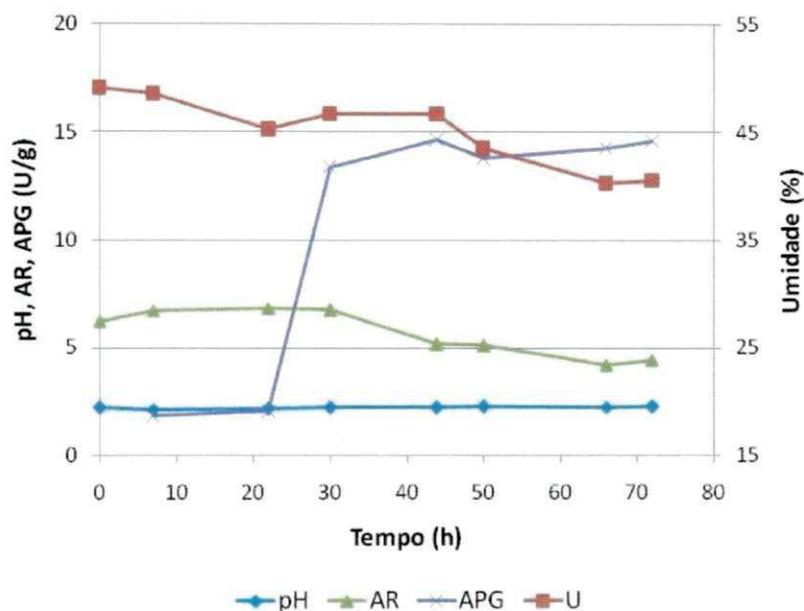


Figura 18 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 6-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).

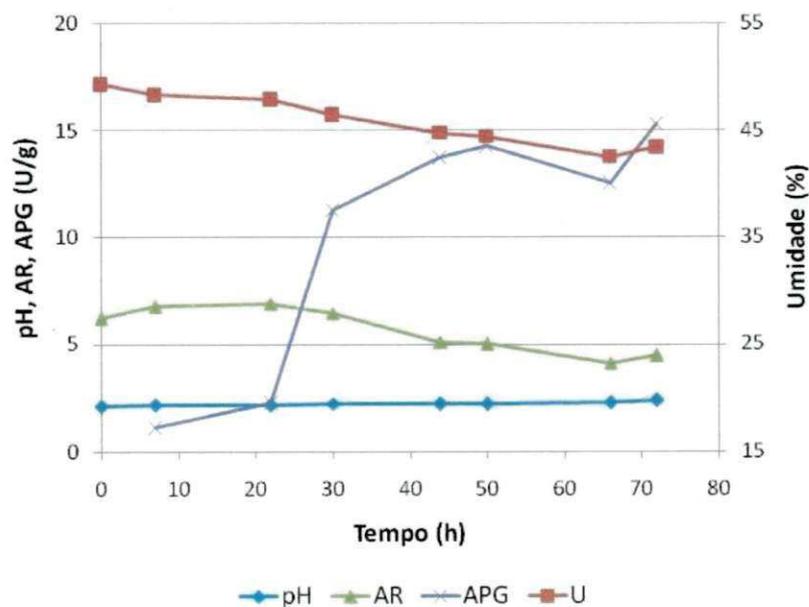
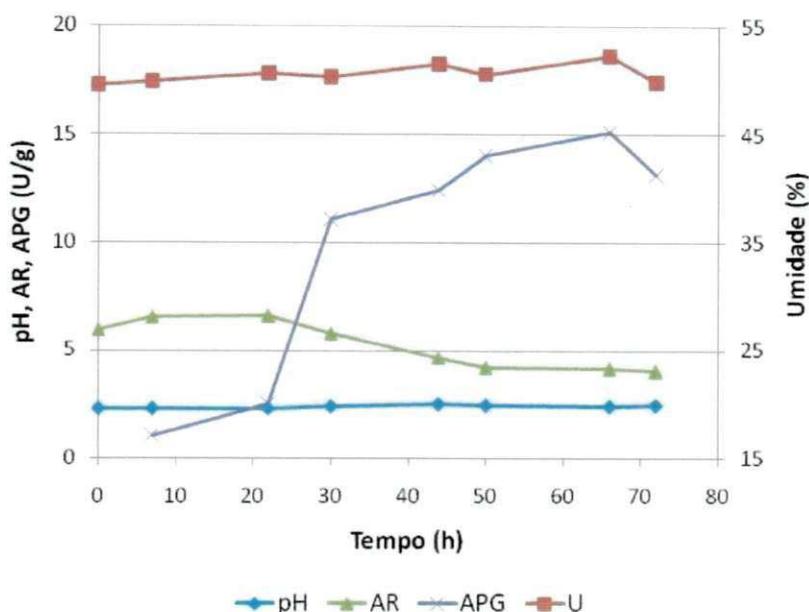


Figura 19– Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco do umbu correspondente ao ensaio 7-Ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1,0%).



De acordo com os resultados discutidos anteriormente a umidade inicial do meio de 60% (b.u) caracteriza como a condição mais adequada para a produção da enzima PG pois os maiores valores de atividade enzimática foram alcançados quando utilizou-se o maior valor de umidade, independentemente das condições do meio, de baixo pH e baixa concentração de açúcares. Este resultado também foi obtido por Menezes et al. (2006) quando utilizaram resíduo de maracujá e farelo de trigo para produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger*.

Botella et al. (2007) variando a umidade inicial entre 45 a 80% na produção de poligalacturonase usando como substrato resíduo da indústria de vinho (bagaço de uva) concluíram que a atividade enzimática decresce para valores de umidade superior a 65%, atribuindo este fato a diminuição da porosidade, alterações na estrutura da partícula e baixa transferência de oxigênio.

4.4.2 Acompanhamento cinético do processo fermentativo do resíduo seco da jabuticaba

A partir da Figura 20 até a 26 observa-se os resultados obtidos do acompanhamento cinético da produção da exo-PG e de consumo dos açúcares redutores, assim como, o monitoramento do pH e da umidade do meio em base úmida no processo fermentativo do

resíduo seco da jabuticaba durante o período de 72 horas em cada condição estudada. O valor do pH variou entre 2,5 a 3,59. Em geral os menores valores de pH coincidem com os maiores valores de atividade poligalacturonásica e maiores consumos de açúcares. Este fato comprova o que já foi discutido para o substrato umbu.

As Figuras 20 e 21 correspondem aos ensaios 1 e 2 os quais foram realizados nas condições de umidade inicial do meio de 40 e 60% (b.u) correspondendo a atividade de água de 0,80 e 0,88 com a mesma concentração da fonte de nitrogênio 0,5%.

Figura 20– Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 1 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 0,5%).

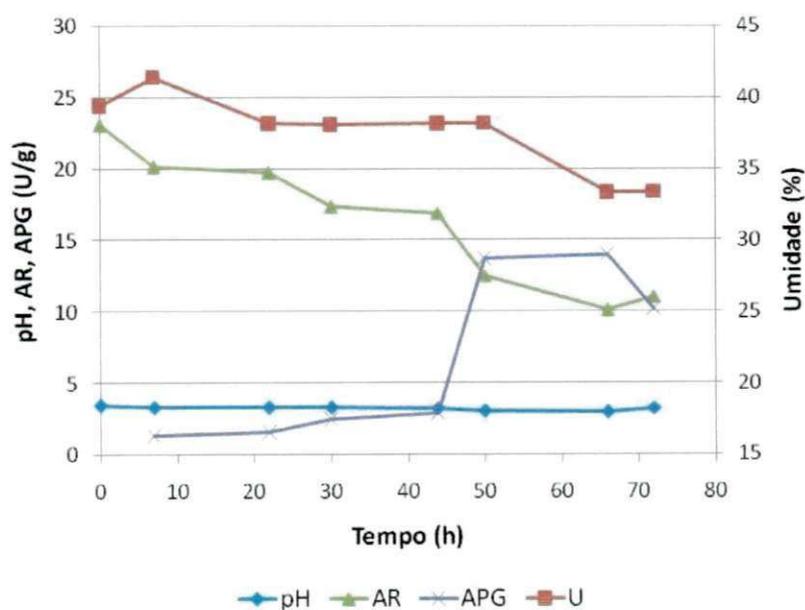
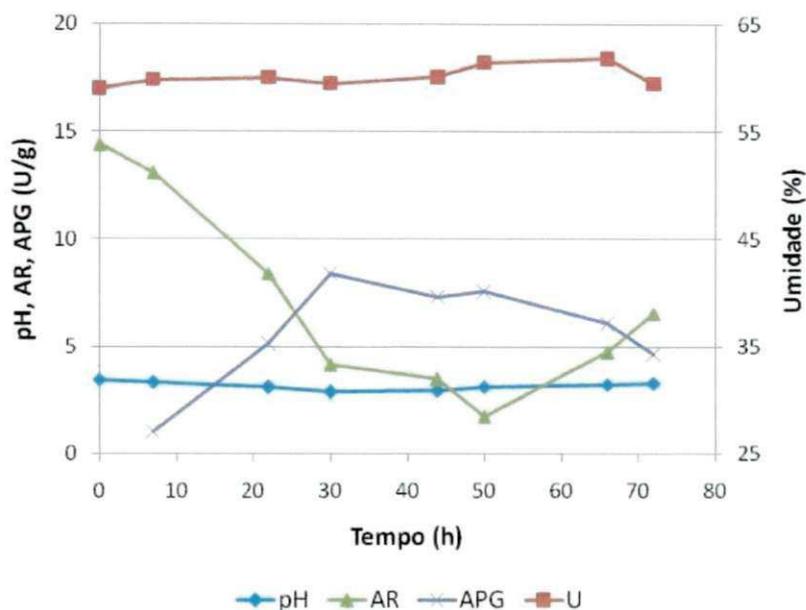


Figura 21 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 2 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 0,5%).



Observa-se que no ensaio 1 ocorreu uma possível extensão da fase de adaptação dos micro-organismos ao meio entre 0 a 44 horas com baixa atividade poligalacturonásica. Segundo Jay (2005), a duração desta fase reflete o tempo necessário para que os micro-organismos tragam o pH do meio externo para a sua faixa ótima de pH de crescimento. Nesta fase a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio.

A concentração inicial dos açúcares é de 24% caindo para 20% nas primeiras 7 horas e mantendo-se praticamente constante até às 22 horas de cultivo. A partir deste instante percebe-se o consumo dos açúcares lentamente e a APG começa a aumentar, atingindo um valor de 13,72 U/g às 50 horas, mantendo-se praticamente constante até às 66 horas de cultivo. Neste instante é alcançado o pico da PG (14,02 U/g) e observa-se a menor concentração de AR atingindo o valor de 10%. E por fim verifica-se uma diminuição na APG, possivelmente pelo acúmulo de substâncias inibidoras produzidas pelos micro-organismos.

Entretanto para o ensaio 2 verifica-se que entre 7 e 30 horas há um rápido consumo dos açúcares redutores e concomitantemente a produção máxima de PG (8,42 U/g). A concentração de açúcares redutores no início da fermentação é de 14,5%, caindo rapidamente para 4,6%, momento de pico da enzima. Entre 44 e 50 horas de cultivo os AR

atingem o menor valor e a APG permanece praticamente constante (7,32-7,55 U/g). A partir da 50^a hora começa o acúmulo dos açúcares e a atividade atinge o menor valor 4,66 U/g podendo atribuir este fato tanto a velocidade de hidrólise da pectina ser maior do que a de consumo dos açúcares redutores por parte dos micro-organismos como também a formação de produtos inibidores da enzima.

O pH do meio vai diminuindo até às 30 horas, depois começa a subir (2,88-3,48) e permanece constante após 66^a hora de fermentação até o final. Observa-se também que no momento em que a concentração de AR é mínima, o pH e a umidade aumentam possivelmente pela assimilação dos ácidos orgânicos pelos micro-organismos. Este mesmo fato também foi verificado por Botella et al. (2007) e Santos S.(2007).

Comparando o ensaio 2 com o ensaio 1 pode-se observar que a umidade do meio influenciou na produção da PG passando de 8,42 U/g e produtividade de 0,28 U/g/h em 30 horas de cultivo para 14,02 U/g e produtividade 0,21 U/g/h em 66 horas, ou seja, para uma umidade inicial do meio menor obteve-se uma maior atividade embora em tempos diferentes.

Nas Figuras 22 e 23 encontram-se as representações gráficas para os ensaios 3 e 4 os quais foram realizados com umidade inicial do meio de 40 e 60% (b.u) e concentração de nitrogênio 1,5%. O pH inicial do meio é de aproximadamente 3,42 e durante o cultivo cai para 2,64. Entre 0 e 7 horas não foi detectada atividade enzimática podendo associar este fato provavelmente a fase de adaptação do micro-organismo, *Aspergillus niger*, ao meio.

Figura 22 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 3 (umidade 40% e fonte de nitrogênio 1,5%).

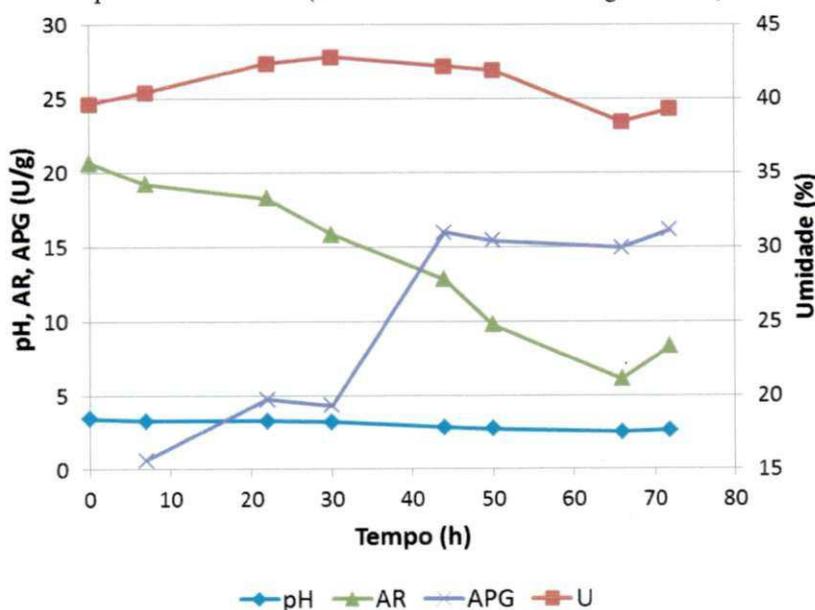
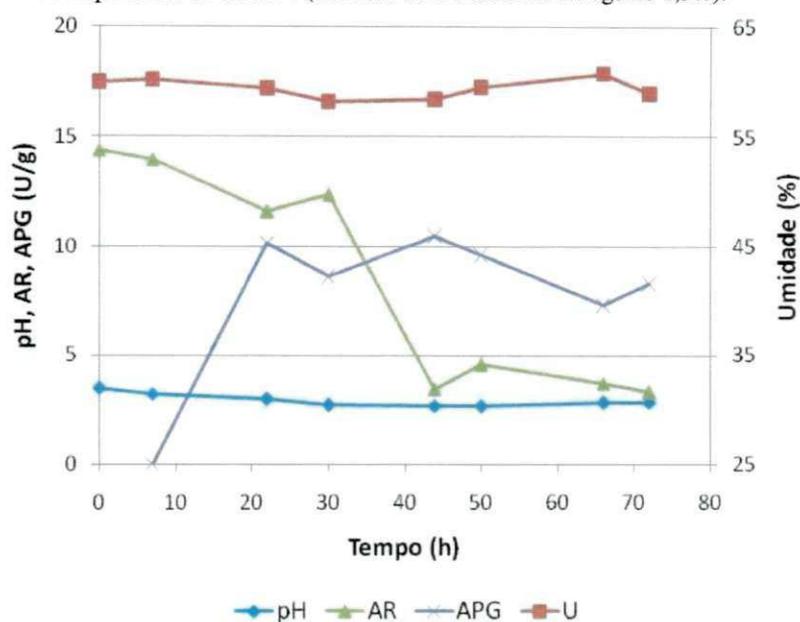


Figura 23– Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jaboticaba correspondente ao ensaio 4 (umidade 60% e fonte de nitrogênio 1,5%).



No caso do ensaio 3 a partir das 7 horas de processo fermentativo, observa-se tanto o início da produção da PG como o consumo dos açúcares. A partir da 30^a hora até a 66^a hora de cultivo verifica-se uma grande variação na curva de AR com alta atividade 15,94 U/g, exatamente às 44 horas de fermentação. Neste instante até às 66 horas de cultivo observa-se o início de uma possível fase estacionária em que praticamente não ocorre variação na APG embora ocorra grande consumo dos açúcares. Logo neste caso o consumo preferencial de açúcares pelos micro-organismos não favoreceu a produção da poligacturonase (PG). Entre 66^a e 72^a horas de fermentação há um acúmulo dos açúcares e a atividade volta a subir (16,12) provavelmente o micro-organismo está utilizando a pectina como fonte de carbono e produzindo a enzima.

Para o ensaio 4 a concentração de açúcares redutores no início do cultivo é de 14%, diminuindo lentamente até a 22^a hora de cultivo chegando a 11,57% e entre 22 e 30 horas há um acúmulo, provavelmente houve a quebra da molécula da pectina em açúcares, voltando a cair rapidamente para 3,44% em 44 horas de processo coincidindo com o pico da APG (10,47 U/g). Entre 44 e 50 horas ocorre novamente acúmulo dos AR, possivelmente houve hidrólise de oligossacarídeos, voltando a cair lentamente até o final da fermentação pelos mesmos motivos já discutidos anteriormente e a APG volta a cair a partir da 44^a hora. Segundo Pelczar (1996) a atividade enzimática pode ser diminuída ou interrompida temporariamente mesmo quando há produto em quantidade suficiente.

O consumo de açúcar foi alto nos ensaios 2 e 4 e no entanto a produção de enzima foi menor corroborando com a literatura em que altos consumos de açúcares não necessariamente correspondem a alta síntese de enzima.

Nas Figuras 24, 25 e 26 observa-se as cinéticas do processo fermentativo para os ensaios 5, 6 e 7 correspondentes ao ponto central nas condições de 50% de umidade e 1,0% de nitrogênio realizados em triplicata com a finalidade de verificar a reprodutibilidade dos dados.

O comportamento dos açúcares foram semelhantes partindo inicialmente em média de 18,91% para 4,31% durante o decorrer da fermentação.

A umidade permanece praticamente constante durante às 72 horas de fermentação.

Foi detectada atividade poligalacturonásica (APG) já no início do cultivo com valores entre 1,83 e 2,1 U/g aumentando a partir das 7 horas e atingindo o seu valor máximo de aproximadamente 14 U/g após 30 horas de cultivo. A partir das 44 horas percebe-se uma diminuição na atividade provavelmente devido ao esgotamento de um ou mais nutrientes do meio necessários ao crescimento dos micro-organismos assim como também ao acúmulo de substâncias inibidoras das enzimas pectinolíticas.

Figura 24– Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 5-ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1%).

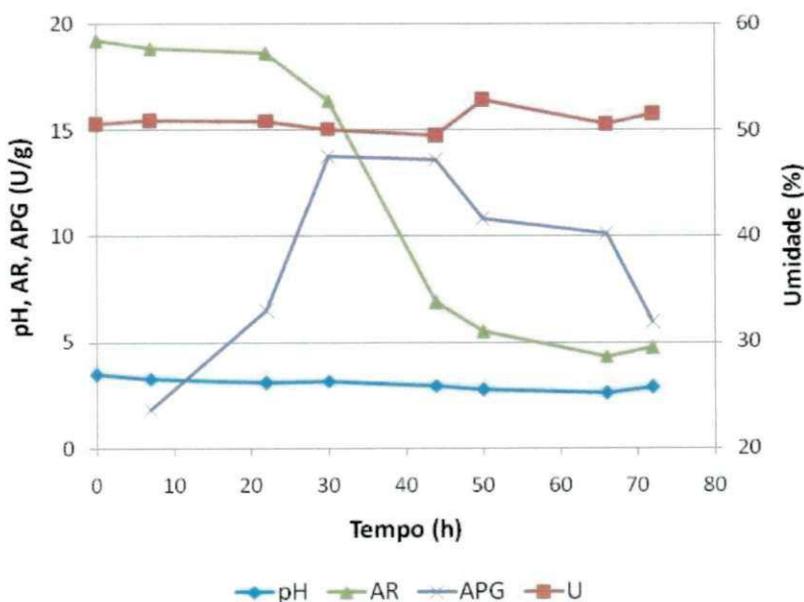


Figura 25– Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 6-ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1%).

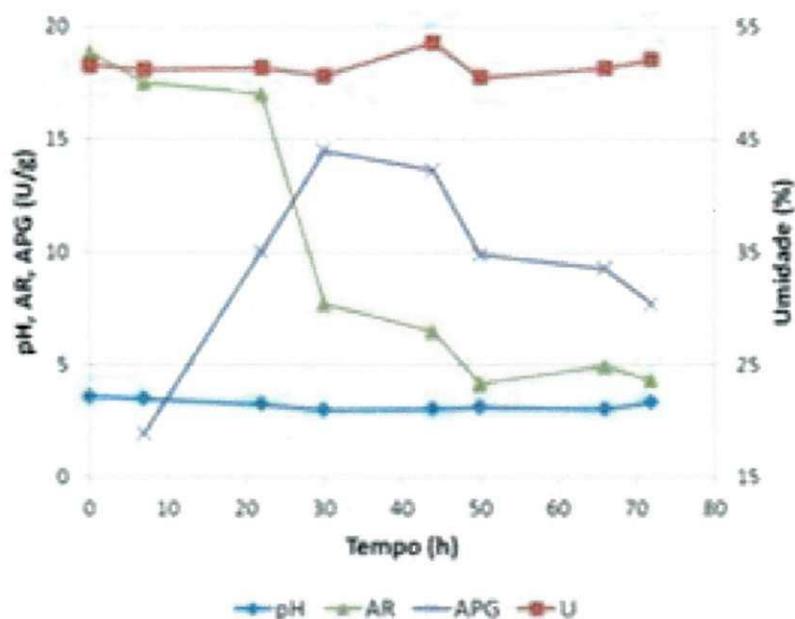
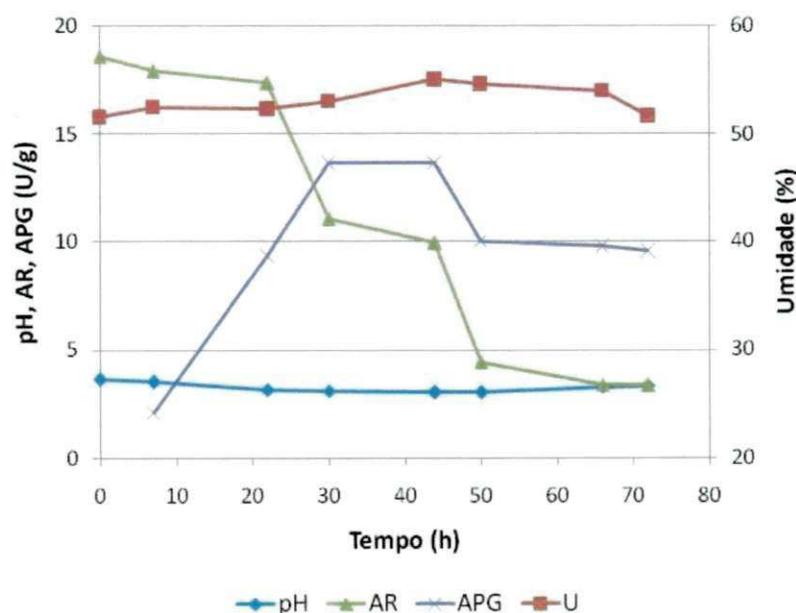


Figura 26 – Acompanhamento cinético do processo de produção da exo-PG obtida do resíduo seco da jabuticaba correspondente ao ensaio 7-ponto central (umidade 50% e fonte de nitrogênio 1%).



Comparando os resíduos secos do umbu e da jabuticaba pode-se verificar que devido a elevada concentração de açúcares no resíduo da jabuticaba provavelmente o micro-organismo supriu a sua necessidade de crescimento e a pectina no meio foi pouco utilizada e consequentemente a atividade PG foi menor que a observada no resíduo do umbu. Como a

concentração de açúcares redutores do resíduo seco do umbu é baixa e a da pectina é alta, esta atua no meio como fonte indutora e também energética quando hidrolisada em açúcares metabolizáveis pelos micro-organismos logo a atividade poligalacturonásica foi maior. Este fato foi observado também por Mojsov (2010) quando utilizou vários substratos diferentes, glicose, frutose, galactose, xilose, lactose, pectina de maçã e pectina da polpa de maçã como fonte de carbono na produção da endo-PG obtido do micro-organismo *Aspergillus niger*. O autor verificou que a máxima atividade da endo-PG não ocorreu no meio com valores mais altos de açúcares e sim quando utilizou como fonte de carbono a pectina da polpa de maçã.

O consumo dos açúcares redutores AR foi muito mais rápido com o resíduo seco da jaboticaba do que com o do umbu provavelmente devido aos seus elevados teores, além do pH do meio ser mais favorável ao crescimento celular do micro-organismo e não a produção de enzimas.

A combinação de maior concentração da fonte de nitrogênio e maior umidade inicial do meio para o resíduo seco do umbu, proporcionou maior atividade PG (18 U/g) em 44 horas de cultivo enquanto que, para o da jaboticaba a maior atividade foi alcançada quando utilizou-se concentração de nitrogênio de 1,5% e umidade de 40% (16,12 U/g) em 72 horas.

Santos, S. et al. (2008) trabalhando com o resíduo de caju seco como substrato em um cultivo semissólido obteve os maiores valores de atividade PG com umidade inicial do meio de 40%.

4.4.3 Acompanhamento cinético da atividade exo-poligalacturonase obtida do processo fermentativo para o resíduo seco da goiaba

Os resultados experimentais da atividade exo-poligalacturonásica durante um período de 72 horas de fermentação em estado sólido para o resíduo seco da goiaba conforme a matriz planejamento da seção 3.4, estão apresentados na Tabela 12. As Figuras correspondentes as cinéticas de fermentação encontram-se no Apêndice A.

Tabela 12 – Atividade poligalacturonásica obtida da fermentação em estado sólido utilizando o resíduo seco da goiaba em 72 horas de cultivo.

Tempo de Fermentação (h)	Ensaio						
	1	2	3	4	5	6	7
7	0,46	0,00	0,00	0,82	1,01	2,33	1,17
22	2,43	4,53	0,84	8,96	4,46	4,71	4,37
30	5,53	4,39	4,15	11,31	11,50	11,85	12,64
44	6,59	10,17	4,94	11,20	11,96	9,72	10,15
50	6,08	6,58	6,70	7,59	10,11	12,24	10,31
66	4,87	6,45	3,89	7,91	8,35	9,23	9,52
72	5,49	6,77	4,03	7,38	8,90	9,03	11,21

Os valores em negrito correspondem ao valor de maior atividade alcançado nos respectivos tempo de fermentação para cada ensaio. Observa-se que a máxima atividade foi de 12,64 U/g, com umidade inicial do meio de 50% e concentração de nitrogênio de 1% às 30 horas de cultivo.

Comparando os resíduos secos e os ensaios entre si nos quais foram adicionados as mesmas concentrações de nitrogênio e os mesmos teores de umidade, percebe-se que a umidade inicial do meio influenciou na síntese da exo-poligalacturonase pelo *Aspergillus niger* CCT 0916. Para o resíduo seco do umbu a maior atividade foi alcançada com umidade inicial do meio de 60%, enquanto que, para o da jabuticaba foi com 40% e para o da goiaba de 50%. Podendo atribuir estas diferenças a capacidade de retenção de água e as características físicas e químicas do substrato.

Araújo, M et al. (2012) avaliaram o uso de resíduo da casca de coco verde como substrato na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido e obtiveram a máxima atividade de 52,48 U/g em 24 horas de cultivo com umidade inicial do meio de 60%. Entretanto Santos et al. (2008) trabalhando com o resíduo de caju seco como substrato em um cultivo semissólido obteve os maiores valores de atividade PG com umidade inicial do meio de 40%.

Como o resíduo seco do umbu tem baixa concentração de açúcares redutores e alto teor de pectina há necessidade da quebra da molécula da pectina levando à uma atividade poligalacturonásica maior em relação aos outros dois resíduos estudados, cujos teores de açúcares são maiores e de pectina menores. Este fato também foi observado por outros autores que afirmam que quando a concentração de açúcar no meio é baixa o micro-organismo para produzir pectinases necessita da hidrólise da pectina em açúcares tais como: D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose de modo que possa ser consumida, resultando em

alta atividade pectinolítica no meio. Entretanto quando a concentração de glicose é alta satisfaz as exigências de crescimento dos micro-organismos, sendo portanto desnecessária ou mínima a quebra da molécula de pectina, resultando em baixa atividade de pectinases.

A adição da fonte de nitrogênio ao meio provavelmente favoreceu a síntese das enzimas pois para estes resíduos secos a maior atividade poligalacturonásica foi alcançada quando utilizou-se concentrações de nitrogênio entre 1,0 e 1,5%. Uma fonte de nitrogênio adicionada em um meio de cultivo poderá acarretar efeitos positivos ou negativos. Este fato vai depender da concentração de proteína do substrato.

Alcantâra et al. (2010) estudaram a influência da concentração de sulfato de amônio na produção da enzima poligalacturonase e constataram que concentrações acima de 1,5% no meio causou efeito inibidor.

Pereira et al. (2010) avaliaram o valor nutricional de vários resíduos gerados pelas agroindústrias processadas de polpas de frutas da região sul da Bahia para alimentação de ruminantes e concluíram que a goiaba e o umbu apresentaram limitações para serem utilizados na alimentação animal. Entretanto, neste trabalho estes resíduos se apresentam como fonte promissora de poligalacturonase.

Diante dos resultados das cinéticas de fermentação realizadas com os três resíduos secos, foi feito um estudo com o resíduo seco do umbu, o qual apresentou a maior atividade poligalacturonásica, nas etapas seguintes: avaliação estatística da cinética de fermentação e do processo de extração, recuperação e concentração da enzima.

4.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA O RESÍDUO SECO DO UMBU

Através do planejamento experimental e análise de superfície de resposta é possível avaliar a influência das variáveis independentes (umidade inicial e fonte de nitrogênio) sobre a variável dependente (atividade poligalacturonásica) no processo fermentativo realizado durante 72 horas e a forma de interação entre estas variáveis.

A partir dos resultados experimentais obtidos em cada tempo determinado de processo e do planejamento fatorial, foi possível construir modelos de primeira ordem que relacionasse a atividade poligalacturonásica com os parâmetros estudados. Os modelos estatísticos para a atividade (PG) estão apresentados na Tabela 13 com os seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e os valores do teste F. Os valores em negrito são os coeficientes do modelo estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

A umidade é o efeito de maior importância para o processo com valores positivos em todos os modelos, mostrando que o maior valor da atividade enzimática é atingido com os maiores valores de umidade no intervalo estudado.

Tabela 13 – Modelo de primeira ordem obtido para atividade PG por hora de fermentação do resíduo seco do umbu.

Tempo (h)	Modelo Atividade da Poligalacturonase	R ² (Linear)	Teste F
22	PG = 3,69 + 4,07U – 0,70N – 0,21U.N	0,8656	0,799
30	PG = 9,27 + 6,79U + 0,73N + 0,84U.N	0,8255	0,509
44	PG = 10,65 + 7,37U + 1,25N + 0,94 U.N	0,8251	0,508
50	PG = 9,21 + 4,58U + 0,44N – 0,34U.N	0,4101	0,074
66	PG = 8,98 + 4,18U – 2,11N – 2,61U.N	0,4613	0,093
72	PG = 8,92 + 3,65U – 1,84N – 2,29U.N	0,3569	0,059

O coeficiente de determinação ou de explicação (R²) quantifica a qualidade do ajuste. Segundo Rodrigues e Lemma (2005) fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

O teste F apresenta a razão entre o F_{calculado} e o F_{tabelado}. Sempre que esta relação for maior que 1 a regressão é estatisticamente significativa havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS et al., 1996).

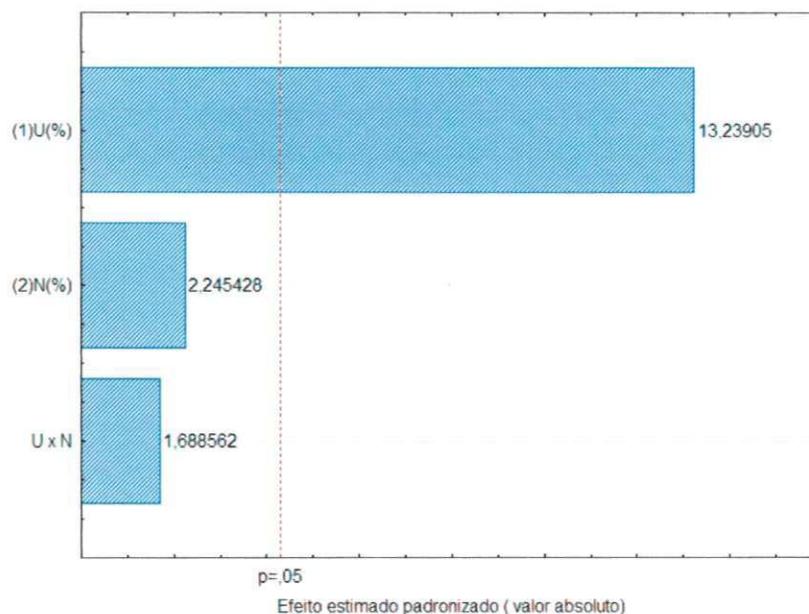
Como o maior valor de atividade poligalacturonásica obtido neste trabalho foi com o tempo de 44 horas de fermentação (18 U/g), logo será apresentado a seguir a análise estatística correspondente a este tempo.

A Equação 24 apresenta o modelo de primeira ordem obtido para a atividade (PG) no tempo de 44 horas de cultivo, considerando somente a variável estatisticamente significativa que neste caso foi a umidade. Observa-se que o coeficiente apresenta sinal positivo indicando que, para se obter atividade poligalacturonásica máxima, dentro da faixa estudada, o meio deve ter alta umidade inicial.

$$PG(44h) = 10,65 + 7,37U \quad (24)$$

O Diagrama de Pareto mostrado na Figura 27 confirma que os efeitos da concentração de nitrogênio e da interação das duas variáveis não são estatisticamente significativos.

Figura 27 – Diagrama de Pareto para atividade PG com 44 horas de fermentação.



Apesar do diagrama de Pareto mostrar que a variável concentração de nitrogênio não é estatisticamente significativa, o coeficiente da equação do modelo de primeira ordem, Tabela 13, para o tempo de 44 horas de cultivo tem sinal positivo, indicando a importância desta no meio provocando um aumento na atividade PG, provavelmente devido ao baixo teor de proteína do substrato utilizado como meio de cultivo. Além de a umidade ser a variável que apresenta grande significância podendo, portanto ocorrer “sombra” sobre a variável nitrogênio.

A Tabela 14 apresenta a análise de variância no tempo de 44 horas de fermentação considerando somente o parâmetro que foi significativo. Este modelo tem 78,95% das variações obtidas explicadas pelo modelo e a razão $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$ igual a 2,83, indicando que o mesmo é estatisticamente significativo com 95% de confiança em relação aos dados experimentais.

Tabela 14 – Análise de variância para atividade PG com 44 horas de fermentação do resíduo seco do umbu.

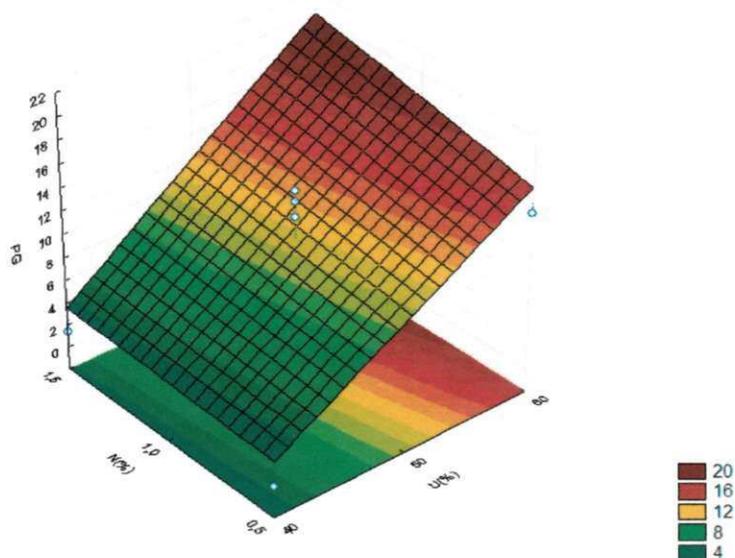
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	217,28	1	217,28	2,83
Resíduo	57,90	5	11,58	
F. ajuste	55,42	3		
Erro puro	2,47	2		
Total	275,17	6		
R ²	78,95			
F tabelado	6,61			

G.L. – Grau de Liberdade; S.Q.– Soma dos Quadrados; Q.M.– Quadrado Médio dos Desvios.

A Figura 28 representa a superfície de resposta para verificar a influência da umidade inicial e da concentração de nitrogênio no meio fermentado sobre a atividade poligalacturonásica às 44 horas de cultivo (PG44).

Observa-se que a máxima produção da poligalacturonase 18 U/g ocorre para o maior valor de umidade (60%) independentemente da concentração de nitrogênio. Este comportamento é similar ao encontrado experimentalmente sob as mesmas condições.

Figura 28 – Superfície de resposta para atividade PG às 44 horas de fermentação.



4.5.1 Atividade enzimática máxima e produtividade obtida em cada ensaio para o resíduo seco do umbu

Os valores da atividade poligalacturonásica máxima obtida em cada ensaio e suas respectivas produtividades estão apresentados na Tabela 15. Observa-se que a maior atividade foi de 18 U/g obtida quando o meio de cultivo continha 60% de umidade e 1,5 % da concentração da fonte de nitrogênio no tempo de 44 horas de fermentação.

Tabela 15 – Atividade poligalacturonásica (PG) máxima e produtividade obtida do resíduo seco do umbu para cada ensaio.

Ensaio	Umidade (b.u.)	Nitrogênio (%)	Atividade (U/g)	Produtividade (U/g.h)	Tempo (h)
1	40	0,5	1,18	0,05	22
2	60	0,5	14,15	0,21	66
3	40	1,5	1,80	0,03	50
4	60	1,5	18,00	0,41	44
5	50	1	15,29	0,21	72
6	50	1	14,69	0,20	72
7	50	1	15,14	0,23	66

4.6 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA EXO-PG

O extrato enzimático utilizado no estudo da extração da exo-PG, foi obtido a partir da fermentação do resíduo seco do umbu realizada nas condições de maior atividade da PG: umidade 60%, fonte de nitrogênio 1,5% e tempo de cultivo de 44 horas.

Na Tabela 16 encontra-se os valores das variáveis independentes, tempo de contato (TC), relação solvente/massa (RE) e agitação (AG) com seus respectivos níveis assim como o valor da variável dependente, atividade poligalacturonásica (APG). As leituras de atividade poligalacturonásica foram realizadas no momento em que o extrato bruto era tirado da incubadora (shaker) e filtrado em cada intervalo de tempo e condições estudadas conforme planejamento.

Tabela 16 – Dados experimentais da atividade PG obtida no processo de extração em cada ensaio do planejamento.

Ensaio	AG (rpm)	Tempo (min)	RE (mL/g)	APG (U/g)
1	-1 (50)	-1 (15)	-1 (5)	12,84
2	+1 (150)	-1 (15)	-1 (5)	20,26
3	-1 (50)	+1 (45)	-1 (5)	19,53
4	+1 (150)	+1 (45)	-1 (5)	20,6
5	-1 (50)	-1 (15)	+1 (10)	17,59
6	+1 (150)	-1 (15)	+1 (10)	23,91
7	-1 (50)	+1 (45)	+1 (10)	26,32
8	+1 (150)	+1 (45)	+1 (10)	32,59
9	0 (100)	0 (30)	0 (7,5)	21,35
10	0 (100)	0 (30)	0 (7,5)	19,21
11	0 (100)	0 (30)	0 (7,5)	19,38

Os experimentos 9, 10 e 11 correspondentes aos pontos centrais com valores de atividade de 21,35; 19,21 e 19,38 U/g mostram a reprodutibilidade dos dados.

A máxima atividade foi obtida no ensaio 8 nas condições: agitação de 150 rpm, relação solvente/massa de 10 mL/g e tempo de contato 45 minutos.

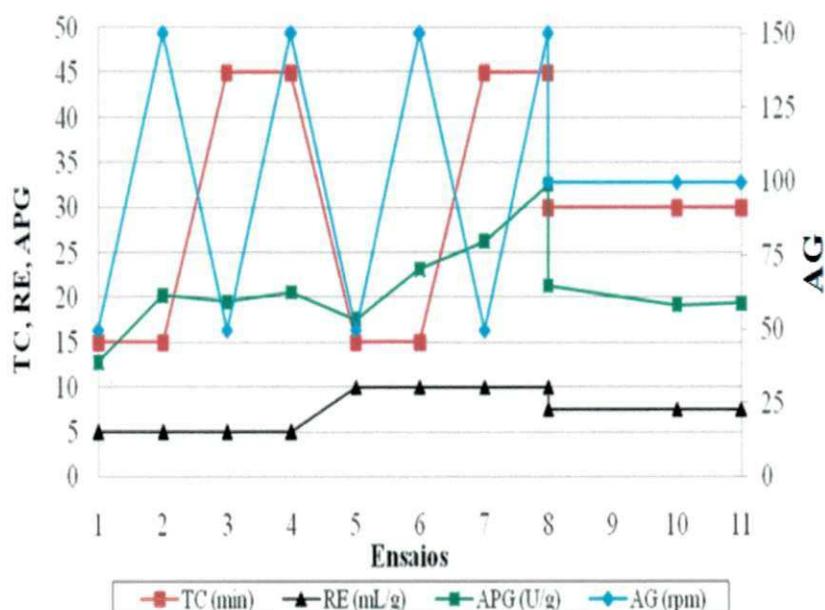
Sousa, C. et al. (2011) avaliaram o processo de extração da poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* com o resíduo de maracujá, o qual foi similar ao utilizado nesta pesquisa, e obtiveram a máxima atividade 53,70 (U/g) com o tempo de contato de 45 minutos, agitação de 50 rpm e relação solvente/massa de 10 mL/g.

Gomes et al. (2011) estudaram a produção da poligalacturonase proveniente do *Aspergillus niger* ATCC 9642 em um cultivo semissólido utilizando pectina, L-asparagina e sulfato de ferro e a maior atividade foi alcançada quando utilizaram uma velocidade de agitação de 180 rpm.

Freitas et al. (2010) estudaram as melhores condições de extração da protease microbiana em fermentação em estado sólido produzida por *Aspergillus oryzae* IV utilizando torta de canola como substrato e observaram que, aumentando o volume da solução extratora no meio não obtinha maior recuperação da enzima, sendo 100 mL o volume que proporcionou maior valor de atividade enzimática (298 U/g). Os autores perceberam que uma agitação de 100 rpm contribuiu para um aumento de 17% na recuperação da enzima.

A Figura 29 mostra a influência da razão solvente (tampão acetato)/massa de meio fermentado, agitação e tempo de contato na extração da poligalacturonase. Percebe-se que os ensaios que resultaram em atividades maiores foram os que tinham em comum a maior RE, exceto o ensaio 5.

Figura 29– Atividade poligalacturonásica (APG) em função dos parâmetros avaliados na extração.



Para avaliar com mais detalhes a influência das variáveis independentes (TC, RE e AG) sobre a atividade poligalacturonásica, foi feito estudo estatístico utilizando o software Statística versão 5.0.

4.6.1 Análise estatística do processo extrativo

Foi analisado a partir do planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central e análise de superfície de resposta a influência dos parâmetros das três variáveis independentes: agitação, tempo de contato e razão solvente/massa sobre a atividade poligalacturonásica (APG) nos extratos obtidos em cada ensaio.

Na Tabela 17 trata-se do modelo de primeira ordem considerando somente os parâmetros estatisticamente significativos a 95% de confiança e o respectivo coeficiente de determinação (R^2) e o teste F para os dados de atividade poligalacturonásica.

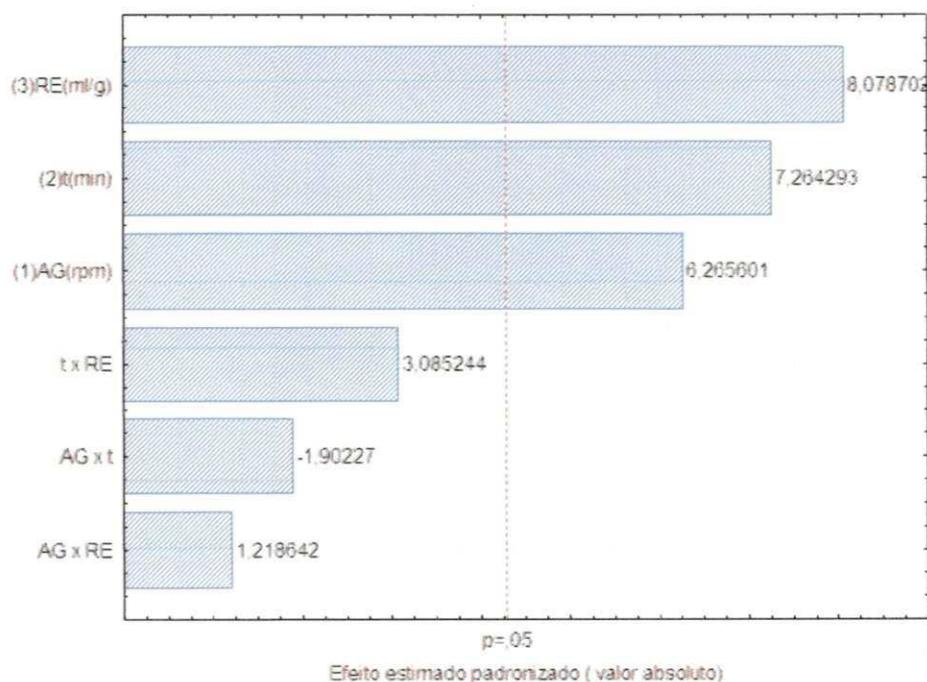
Observa-se que todos os coeficientes apresentam sinal positivo indicando que, para se obter atividade poligalacturonásica máxima, dentro da faixa estudada os valores de TC, AG e RE deverão ser os maiores.

Tabela 17–Modelo de primeira ordem para a extração da enzima poligalacturonase.

Modelo Estatístico Linear da Extração	R ²
PG = 21,23 + 2,63AG + 3,055t + 3,39RE	86,42

A Figura 30 confirma que os parâmetros RE, TC e AG são estatisticamente significativos, ou seja, as variáveis independentes influenciam na atividade dos extratos obtidos em 44 horas de fermentação.

Figura 30 - Diagrama de pareto para as condições de extração da exo-PG.



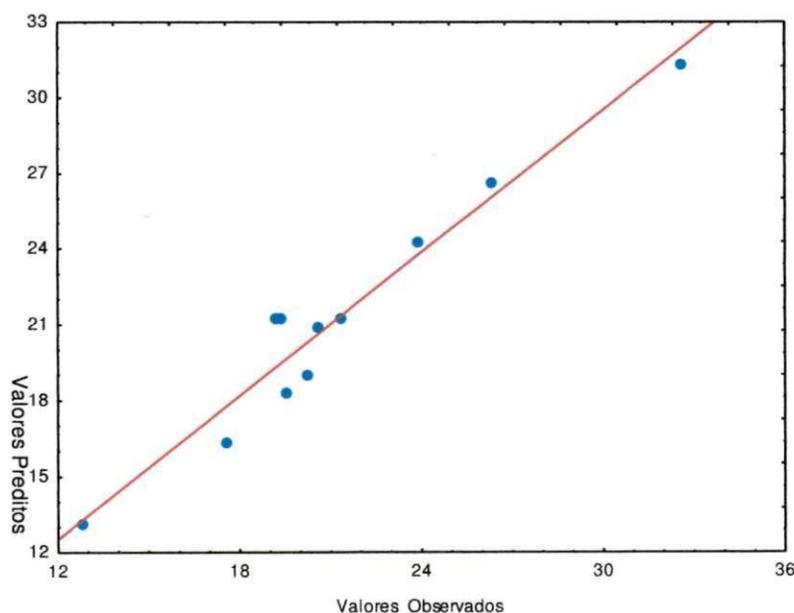
A Tabela 18 corresponde a análise de variância para verificação estatística do modelo da equação da Tabela 17. Este modelo tem 86,42% das variações obtidas explicadas pelo modelo, a razão entre o $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ é igual a 3,41 indicando que o mesmo é estatisticamente significativo com 95% de confiança em relação aos dados experimentais.

Tabela 18 – Análise de variância para a extração da enzima exo-poligalacturonase.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	222,55	3	74,08	3,41
Resíduo	34,97	7	4,99	
F. ajuste	32,14	5		
Erro puro	2,829	2		
Total	257,52	10		
%R ²	86,42			
F tabelado	4,35		F _{calculado} =14,85	

G.L. – Grau de Liberdade; S.Q. – Soma dos Quadrados; Q.M. – Quadrado Médio dos Desvios.

A dispersão entre os valores observados e valores preditos para um limite de confiança de 95% na variável resposta atividade poligalacturonásica está na Figura 31. Verifica-se uma pequena dispersão dos resultados indicando uma boa qualidade de ajuste do modelo linear previsto estatisticamente.

Figura31 – Valores preditos e observados para a extração da enzima exo-poligalacturonase.

As Figuras 32, 33 e 34 representam as superfícies de respostas fixadas no ponto central construídas com a finalidade de verificar a influência das variáveis independentes, relação entre o volume de solvente empregado na recuperação da enzima e a massa do meio

fermentado (RE), tempo de contato entre o solvente e o meio fermentado (TC) e agitação do meio na atividade poligalacturonásica do extrato (APG). As superfícies de resposta encontradas apresentam o mesmo comportamento independente da condição do nível da variável fixada como mostra as figuras abaixo. Percebe-se que para maiores valores de agitação, razão do solvente/massa e tempo de contato foram obtidos os maiores valores de atividade PG corroborando com o comportamento fenomenológico encontrado durante os experimentos realizados na Tabela 16.

Figura 32 - Influência da agitação e relação solvente/massa na atividade da PG

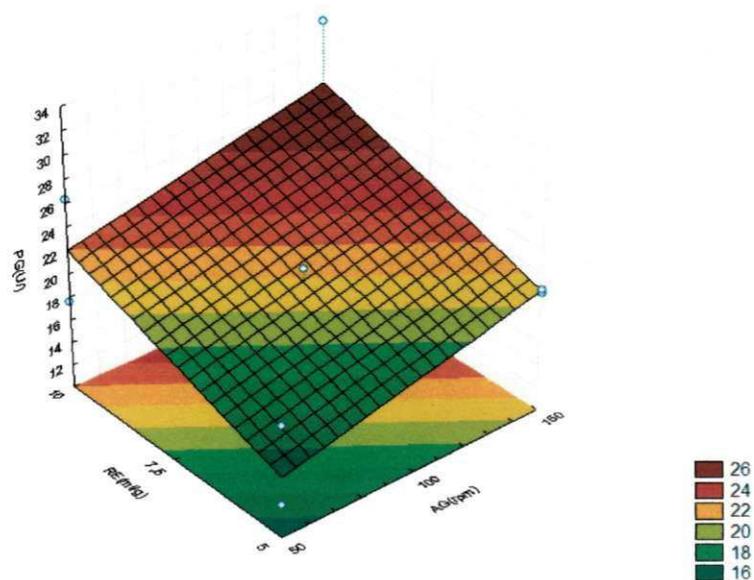


Figura 33 – Influência do tempo e relação solvente/massa na atividade da PG.

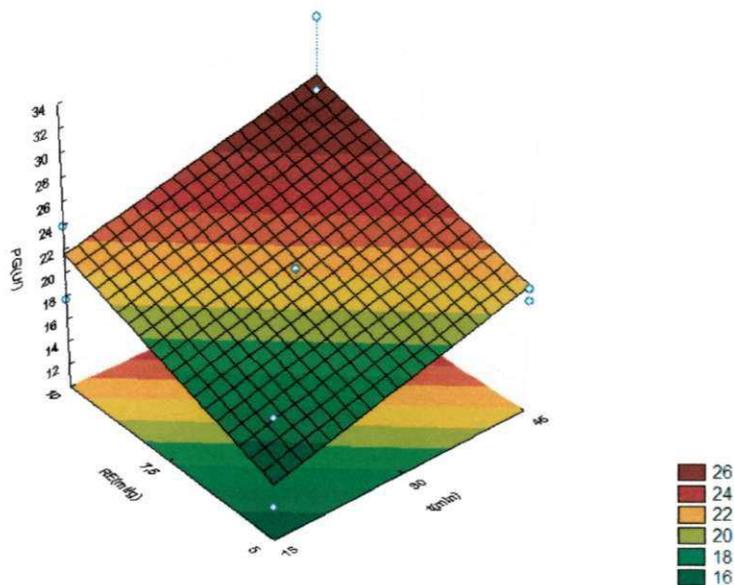
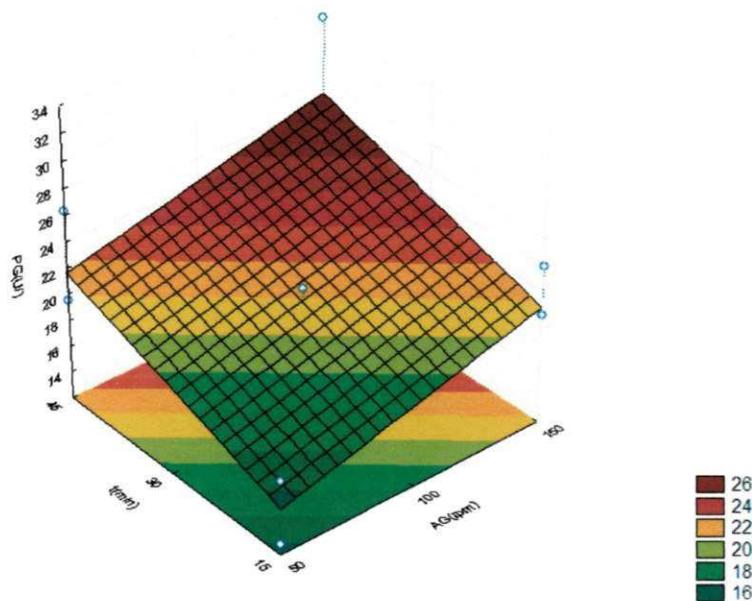


Figura 34 – Influência do tempo e agitação na atividade da PG.



O estudo da agitação durante o período de extração enzimática é um fator importante pois, esta facilita a liberação da enzima das partículas do meio sólido durante o processo da extração, assim como também o da adição do solvente ao meio semissólido devido ao poder de absorção deste pelo substrato, conseqüentemente a determinação do volume necessário para a liberação da enzima presente no meio.

Segundo Freitas et al. (2010) em fermentação em estado sólido, elevadas razões volume de extrato por massa de meio deverão ser evitadas pois a produção de um extrato muito diluído poderá afetar economicamente os custos operacionais do processo.

4.7 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA EXO-PG

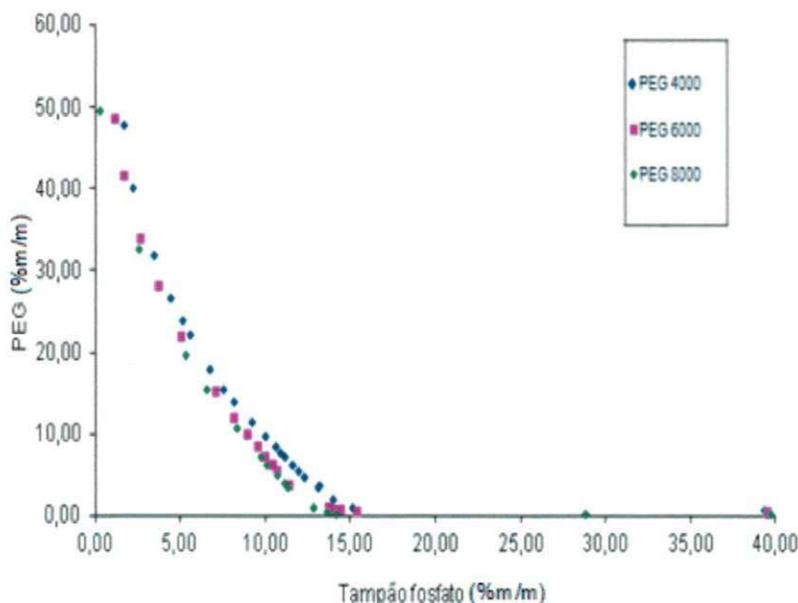
A recuperação de produtos biológicos oriundos de processos fermentativos é uma etapa de extrema importância pois estes processos, além de gerar o composto desejado, geram também subprodutos que impedem, muitas vezes, a utilização do fermentado em processos industriais. Devido a essa problemática várias técnicas foram desenvolvidas e aplicadas, dentre elas a extração em sistemas aquosos bifásicos (SABs) a qual concentra e purifica bioprodutos. Esta técnica tornou-se atrativa dada as condições suaves que oferece as biomoléculas e se apresenta como um processo de baixo custo econômico. Logo, neste trabalho após a recuperação da enzima (extração por lixiviação) utilizou-se desta técnica com o objetivo de concentrar e purificar a exo-poligalacturonase.

4.7.1 Diagramas de equilíbrio

O diagrama de equilíbrio de fases é ponto de partida para a construção dos sistemas aquosos bifásicos (SABs) devido conter informações importantes, tais como, concentrações de PEG e sal necessárias à formação das fases, composição das fases em equilíbrio e previsão qualitativa da partição de moléculas. Neste trabalho, foram construídos diagramas referentes aos PEGs 4000, 6000 e 8000/fosfato de potássio a temperatura de 25°C e pH 7,0 os quais estão apresentados respectivamente na Figura 35. A temperatura e o pH adotados foram baseados em trabalho realizado por Sousa, C. (2010).

A concentração de sal (% sal fosfato), que se distribui preferencialmente na fase inferior, foi plotada na abscissa, e a concentração do PEG (%PEG), que se distribui preferencialmente na fase superior, na ordenada. Neste trabalho, foi feita uma análise comparativa com os polímeros de diferentes massas molares.

Figura 35 – Diagramas de equilíbrio de fase dos sistemas formado por PEG/fosfato de potássio.



O formato das curvas binodais obtidas são similares ao dos sistemas PEG 4000/fosfato, PEG 6000/fosfato e PEG8000/fosfato encontrado por Ferreira, J. et al. (2009), Padilha (2009) e por Sousa, C. (2012) utilizando temperatura aproximadamente de 25°C com pH 7,0. Observa-se nestas curvas binodais um bom alinhamento dos pontos.

Analisando o comportamento das curvas verifica-se que o aumento da massa molar do polímero promoveu um aumento na região bifásica do diagrama de equilíbrio e a medida que a massa molar do PEG aumenta as curvas binodais tornam-se mais próximas da origem, deslocando-se para a esquerda e conseqüentemente menores as quantidades de PEG e sal de fosfato de potássio são necessárias para a formação de fases. Este fato foi observado por vários autores, dentre eles: Albertsson (1986), Bertoluzzo et al. (2005), Graberet al. (2007) e Padilha (2009), os quais atribuíram tal comportamento a diminuição da solubilidade dos polímeros em água que aumenta com o aumento da sua massa molar portanto menores concentrações são requeridas para que ocorra a separação das fases.

4.7.2 Composição dos sistemas aquosos bifásicos (SABs)

As composições (m/m) dos sistemas de duas fases aquosas para cada ensaio, estão na Tabela 19, nas condições de pH 7,0 e temperatura de 25°C. A escolha do valor do pH foi devido a experimentos preliminares realizados conforme discutido na seção 3.6.2 e a temperatura por ter sido utilizada na construção dos diagramas de equilíbrio, de onde foram

tirados a composição dos SABs, além de considerar vários trabalhos realizados por diversos autores na recuperação de pectinases como também de outras enzimas, tais como, invertase obtida do tomate (YUCEKAN, 2011), α lactalbumina e β lactoglobulina (ALCANTÁRA, 2011).

Os SABs foram construídos com PEG 4000, 6000, 8000, sal (fosfato ácido de potássio, fosfato diácido de potássio) e o extrato proveniente da fermentação em estado sólido do resíduo seco do umbu.

Tabela 19 - Composição dos SABs construídos para os ensaios de partição

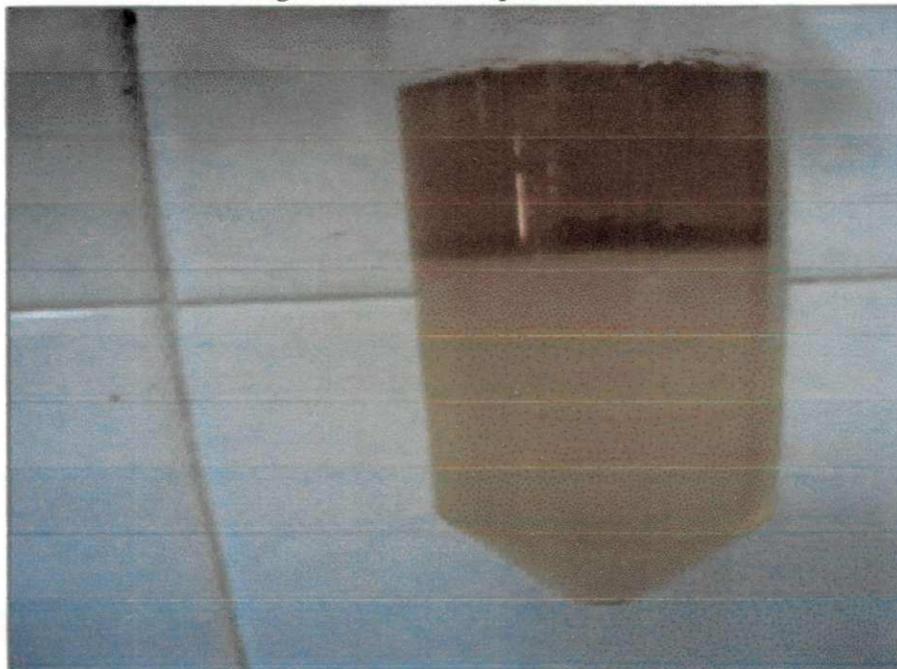
Ensaio	Massa Molar do PEG	Extrato(g)	PEG(g)	SAIS(g)
1	4000	11,4	1,8	1,8
2	8000	11,4	1,8	1,8
3	4000	10,8	2,4	1,8
4	8000	10,8	2,4	1,8
5	4000	10,8	1,8	2,4
6	8000	10,8	1,8	2,4
7	4000	10,2	2,4	2,4
8	8000	10,2	2,4	2,4
9	6000	10,8	2,1	2,1
10	6000	10,8	2,1	2,1
11	6000	10,8	2,1	2,1

As quantidades de PEG e de sal fosfato de potássio correspondem aos valores das composições dos sistemas, os quais foram baseados em testes preliminares já discutidos anteriormente. As concentrações de PEG e sais foram 12%, 14% e 16% correspondendo a 1,8, 2,1 e 2,4 g e o extrato fermentado variou de 10,2 a 11,4 g correspondendo aproximadamente a 70% de água.

Observa-se na Figura 36 correspondente ao ensaio 5, que a fase superior ficou com uma coloração e turbidez mais forte que a fase inferior (sal), provavelmente outras substâncias, tais como, corantes naturais do próprio extrato foram particionados para a fase superior. O mesmo fenômeno foi observado por Ferreira, G. (2007) ao estudar a partição de bromelina em SABs compostos por PEG 4000 e fosfato de potássio e por Sousa, C. (2010) quando estudou a partição de poligalacturonases com PEG 8000 e fosfato de potássio. A

coloração escura da interface do sistema provavelmente foi devido ao acúmulo de esporos presentes no extrato os quais não tiveram preferência por nenhuma das duas fases.

Figura 36 – Sistema aquoso bifásico.



4.7.3 Avaliação do coeficiente de partição (K_e) da exo-poligacturonase (PG) em SABs

Após a formação dos SABs a partir dos dados da composição dos sistemas da Tabela 19, foi calculado o coeficiente de partição (K_e) da enzima exo-poligalacturonase obtida da fermentação em estado sólido, quando se utilizou como matéria-prima no meio de cultivo o resíduo seco do umbu, com a finalidade de averiguar a sua distribuição nas duas fases dos sistemas. Os valores de K_e encontram-se na Tabela 20 correspondendo aos sistemas constituídos de PEG 4000, 6000, 8000 e fosfato de potássio.

Tabela 20 – Resultados do coeficiente de partição (K_e) da exo-poligalacturonase por SABs PEG/fosfato.

Ensaio	Massa Molar do	K_e
	PEG	Exo-PG
1	4000	0,0374
2	8000	0,0177
3	4000	0,0350
4	8000	0,0294
5	4000	0,0438
6	8000	0,0218
7	4000	0,0572
8	8000	0,0238
9	6000	0,0303
10	6000	0,0327
11	6000	0,0322

O coeficiente de partição (K_e) é menor que a unidade para todos os sistemas testados, significando que uma maior quantidade desta enzima migrou para a fase inferior.

Segundo Ratanapongleka (2010) quando os valores dos coeficientes de partição (K_e) são menores que a unidade indica que a biomolécula particiona preferencialmente para a fase inferior, fato este verificado neste trabalho com a enzima exo-poligalacturonase.

Observa-se que o coeficiente de partição K_e foi diminuindo à medida que a massa molar do PEG foi aumentando. Segundo Naganagouda e Mulimane (2008) o aumento da massa molar do PEG nos sistemas aquosos bifásicos (SAB_s) diminui o espaço disponível para a biomolécula na fase superior, aumentando a partição para a fase inferior dos sistemas por efeito de exclusão devido à hidrofobicidade das proteínas.

Quanto maior a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível, acarretando uma diminuição da solubilização das proteínas hidrofílicas na fase rica em polímero (ALBERTSSON, 1986, RATANAPONGLEKA, 2010). Logo o polímero adquire uma conformação mais compacta, intramolecular, impedindo a partição da biomolécula para a fase superior.

Prodanovic e Antov (2008) avaliaram a partição de pectinases de *Penicillium cyclopium* em SABs compostos por PEGs de diferentes massas molares e sulfato de amônio e concluíram que em sistemas com PEGs de baixa massa molar, no caso 1000, as pectinases se

distribuíram preferencialmente na fase superior do sistema, rica em PEG. Os autores verificaram que à medida que a massa molar do PEG aumentava a preferência das pectinases era pela fase inferior, rica em sal.

São inúmeras as propriedades físico-químicas do sistema e da proteína que podem influenciar no coeficiente de partição assim como fatores associados à enzima tais como: tamanho, composição (estrutura), presença de carga elétrica e hidrofobicidade. Além desses fatores existem propriedades importantes das fases que contribuem na distribuição das biomoléculas, como por exemplo, a natureza química e a concentração dos componentes formadores dos SABs, a massa molar dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína além de pH e temperatura (HEMAVATHI, 2011; SILVA e LOH, 2006).

Segundo Babu et al. (2007 apud Coelho, 2011) o particionamento de biomolécula depende também do efeito do volume de exclusão do polímero na fase polimérica e do salting-out na fase rica em sal.

Mesmo com os vários estudos sobre partição de biomoléculas em SABs, bem como sobre os fatores que afetam o comportamento de partição, ainda não se conhecem as forças motrizes responsáveis pela transferência preferencial para uma das fases. Portanto, a única maneira de saber se uma dada biomolécula concentra-se preferencialmente na fase superior ou na inferior, num determinado SAB, é através da realização de experimentos (CARDOSO, M., 2007).

4.7.4 Análise estatística do processo de recuperação e purificação da exo-PG

Para avaliar a influência das variáveis independentes, massa molar do PEG, concentração do PEG e concentração de sal sobre as variáveis dependentes, fator de purificação (FP) e recuperação da enzima exo-poligalacturonase na fase inferior (R_1) dos SABs, haja vista que, a preferência da enzima exo-poligalacturonase nos SABs estudados nesta pesquisa deu-se nesta fase, o que foi confirmado por meio da determinação do coeficiente de partição (K_e) corroborando com vários autores dentre eles, Antov (2004), Madarev et al. (2006), Mehrnoush (2011), Prodanovic´ e Antov (2008) e Sousa, C. et al. (2011), foi realizada uma análise por meio do planejamento fatorial e metodologia da superfície de resposta descrito na seção 3.6.2 utilizando o programa computacional Estatística TM (versão 5.0 da Statsoft, Inc).

Segundo Da Silva (2006) esta distribuição desigual da enzima, neste caso a exo-PG, entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a enzima e as outras espécies (polímeros, água e/ou sais inorgânicos) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio.

Na Tabela 21 encontram-se os resultados do planejamento fatorial 2^3 mais três pontos centrais com os respectivos valores do fator de purificação (FP) e recuperação (R_1) da enzima exo-PG em cada ensaio. Estes dados são referentes à fase inferior (sal) de cada sistema.

Tabela 21—Dados experimentais do fator de purificação e recuperação da exo-PG por SAB PEG/fosfato.

Ensaio	Massa molar do PEG	Concentração do PEG (%)	Concentração do sal (%)	Fator de purificação	Recuperação (%)
1	-1 (4000)	-1 (12)	-1 (12)	2,34	96,86
2	+1 (8000)	-1 (12)	-1 (12)	3,36	97,41
3	-1 (4000)	+1 (16)	-1 (12)	2,79	96,07
4	+1 (8000)	+1 (16)	-1 (12)	5,64	97,14
5	-1 (4000)	-1 (12)	+1 (16)	0,80	97,65
6	+1 (8000)	-1 (12)	+1 (16)	2,89	98,91
7	-1 (4000)	+1 (16)	+1 (16)	0,89	95,85
8	+1 (8000)	+1 (16)	+1 (16)	2,88	98,23
9	0 (6000)	0 (12)	0 (14)	1,61	97,84
10	0 (6000)	0 (12)	0 (14)	1,43	97,56
11	0 (6000)	0 (12)	0 (14)	1,49	97,66

Os maiores valores do fator de purificação (FP) da exo-poligalacturonase são alcançados com o PEG 8000 e concentração de sais de 12% e os menores para o PEG de massa molar 4000 com concentração de sais de 16%.

Observa-se que o sistema menos adequado dentre os testados foi o correspondente ao ensaio 5, composto de 12% de PEG 4000 e 16% de sal pois apresentou o menor valor de FP, corroborando com Sousa, C. et al. (2012) quando obtiveram o menor valor de FP para o sistema constituído de 10% de PEG 4000 e 15% de fosfato de potássio na purificação de poligalacturonase. Segundo Mehrnoush et al. (2011) provavelmente pode-se atribuir este fato a maior concentração de sal causando o efeito salting out pelo fosfato de potássio, resultando em proteínas contaminantes e enzimas removidas para a fase de topo ou interface do sistema. Estes mesmos autores também observaram uma diminuição do FP da pectinase obtida da casca da manga quando aumentaram a concentração do sal de 12 para 20%.

O ensaio 4 foi o que atingiu maior valor de FP cuja composição foi de 16% para o PEG 8000 e 12% para o fosfato de potássio sendo considerado a melhor partição. Nestas

condições, foi obtido rendimento (R_1) de 97,14% e fator de purificação (FP) de 5,64 vezes. Neste caso, possivelmente o efeito foi o de exclusão do polímero para com a enzima na fase polimérica favorecendo a partição da mesma para a fase de baixo, rica em sal.

Estes resultados, muito embora sejam inferiores aos encontrados por Sousa, C. et al. (2012) quando estudaram a influência da massa molar dos PEG 4000, 6000 e 8000 na purificação da poligalacturonase obtida da fermentação em estado sólido do resíduo seco de maracujá, obtendo o maior valor para FP de 7,01 e R_1 de 98,56% com o PEG também 8000, refletem as condições experimentais realizadas e são válidos para este estudo comparativo com os polímeros citados.

Lima, A. et al. (2002) estudaram a influência da massa molar do PEG variando entre 400 e 10000 na partição de pectinases formados por PEG/fosfato de potássio. Os autores encontraram para o PEG 8000 um valor de FP para a poligalacturonase de 4,79, sendo este PEG considerado o mais adequado para a recuperação de tais enzimas.

Com relação aos resultados da recuperação na fase inferior (R_1) percebe-se que são elevados para todos os sistemas. Fato este observado por Prodanovic e Antov (2008) quando estudaram a influência da massa molar do polietileno glicol no rendimento da exo-pectinase produzida por *Penicillium cyclopium* em sistema aquoso bifásico composto de 10% de PEG, 15% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 75% do extrato enzimático, obtendo altos rendimentos na fase inferior: para PEG 4000 foi de 71,08%, PEG 6000 de 89,93 e para o PEG 10000 de 98,85. E também observado por vários autores dentre eles, Fan et al. (2012) na partição da protopectinase, por Porfiri et al. (2011) na partição da alfa-amilase e por Madarev (2006) na partição da exo-pectinase.

Portanto os sistemas formados por PEG e fosfato de potássio avaliados neste trabalho são adequados para a recuperação da exo-poligalacturonase na fase inferior, uma vez que os coeficientes de partição são menores que a unidade e a recuperação maior que 95%.

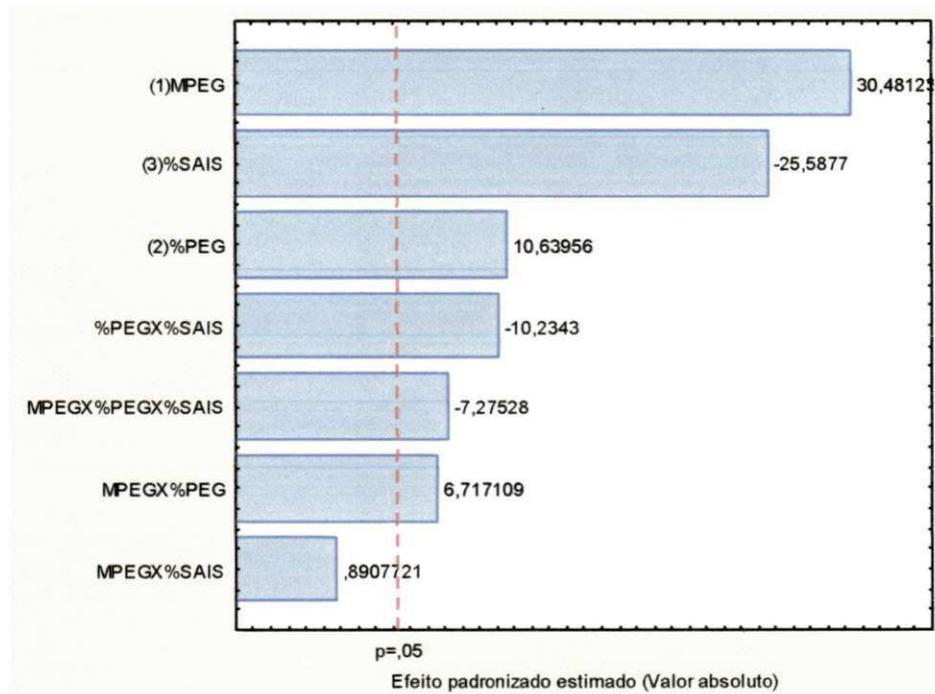
4.7.4.1 Diagrama de Pareto

As Figuras 36 e 37 correspondem aos diagramas de Pareto os quais representam os efeitos estimados, em ordem decrescente de magnitude, das variáveis dependentes e suas interações das respostas linearizadas do fator de purificação e da recuperação da enzima exo-poligalacturonase.

Analisando a Figura 37, observa-se que os fatores massa molar do PEG, concentração de sais, concentração do PEG e as interações concentração de PEG \times concentração de sais,

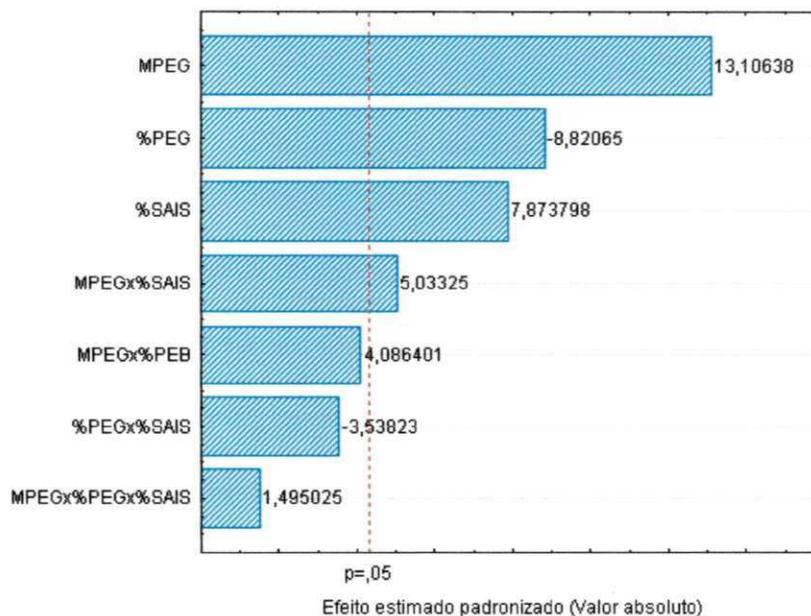
massa molar do PEG \times concentração de PEG \times concentração de sais e massa molar do PEG \times concentração de PEG são estatisticamente significativos em relação ao fator de recuperação. Sendo a massa molar do PEG considerado o efeito de maior importância.

Figura37 – Diagrama de Pareto para a variável dependente fator de purificação (FP) da exo-PG.



Verifica-se na Figura 38, que os fatores massa molar do PEG, concentração de PEG, concentração de sais, assim como as interações massa molar do PEG \times concentração de sais são estatisticamente significativos em relação à recuperação da enzima na fase inferior (R_1) rica em sal. Mais uma vez observa-se que a massa molar do PEG apresenta maior efeito.

Figura 38 – Diagrama de Pareto para a variável dependente recuperação (R_1) da exo-PG.



4.7.4.2 Modelo de regressão e análise de variância

Com os dados da Tabela 21, obteve-se por regressão modelos lineares que apresentam estimativas com 95% de confiança. Estes modelos codificados foram propostos para representar o fator de purificação e a recuperação da exo-poligalacturonase na fase inferior (sal) dos sistemas em função dos fatores massa molar do PEG, concentração do PEG e concentração do sal fosfato de potássio conforme as Equações 25 e 26.

$$FP=2,37 + 0,99MP + 0,34P - 0,83S + 0,21MP \times P + 0,029MP \times S - 0,33P \times S - 0,23MP \times P \times S \quad (25)$$

$$R_1=97,38 + 0,65MP - 0,44P + 0,39S + 0,20MP \times P + 0,25MP \times S - 0,17P \times S + 0,075MP \times P \times S \quad (26)$$

Onde:

MP: massa molar do PEG;

P: concentração do PEG;

S: concentração do sal.

Os modelos mostram uma dependência linear do fator de purificação e recuperação para a massa molar do PEG, concentração do PEG e do sal para os sistemas estudados PEG 4000, 6000 e 8000/fosfato.

Os valores dos coeficientes em negrito são estatisticamente significativos. Observa-se que estes coeficientes do modelo estatístico para o fator de purificação, tais como, massa molar dos polímeros, concentração de PEG e as interações massa molar de PEG com concentração de PEG apresentam sinal positivo, indicando que quanto maior estes efeitos maior o fator de purificação, ou seja, a resposta aumenta, fato este comprovado fenomenologicamente. Entretanto os coeficientes da concentração de sais e as interações concentração de PEG com concentração de sais e dos três fatores apresentam sinal negativo indicando que, quanto menor forem estes efeitos maior será o fator de purificação. Em relação à resposta R_1 verifica-se que os efeitos estatisticamente significativos massa molar do PEG, concentração de sais e a interação massa molar do PEG com concentração de sais são positivos, indicando que quanto maior estes efeitos maior a recuperação da enzima, entretanto, a concentração de PEG apresenta sinal negativo indicando que para menores valores da concentração de PEG obtem-se maiores valores da recuperação da enzima.

Observa-se na Tabela 22 a qual se encontra os dados da Análise de Variância (ANOVA) para o fator de purificação da exo PG que o modelo apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança, com R^2 igual a 0,841, evidenciando que o modelo explicou 84,1% da variação dos dados experimentais.

Tabela 22 – Análise de variância para o fator de purificação (FP) da exo-PG nos SABs PEG/fosfato.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	16,255	3	5,418	2,84
Resíduo	3,0642	7	0,437	
F. de ajuste	3,0472	5		
Erro puro	0,0171	2		
Total	19,319	10		
$\%R^2$	84,14			
F_{tabelado}	4,35		$F_{\text{calculado}}=12,37$	

G.L. – Grau de Liberdade; S.Q. – Soma dos Quadrados; Q.M. – Quadrado Médio dos Desvios.

O valor do F calculado da regressão foi aproximadamente três vezes maior que o F tabelado. Segundo Box et al. (1978) quando essa relação for maior que 1,00 a regressão é

estatisticamente significativa portanto, neste caso pode-se dizer que os dados experimentais ajustam-se ao modelo.

A Tabela 23 exhibe os dados da Análise de variância (ANOVA) para a recuperação da exo-poligalacturonase (R_1). Observa-se que o modelo explica 94,54% da variação dos dados experimentais.

Tabela 23 – Análise de variância para a recuperação (R_1) da exo-PG nos SABs PEG/fosfato.

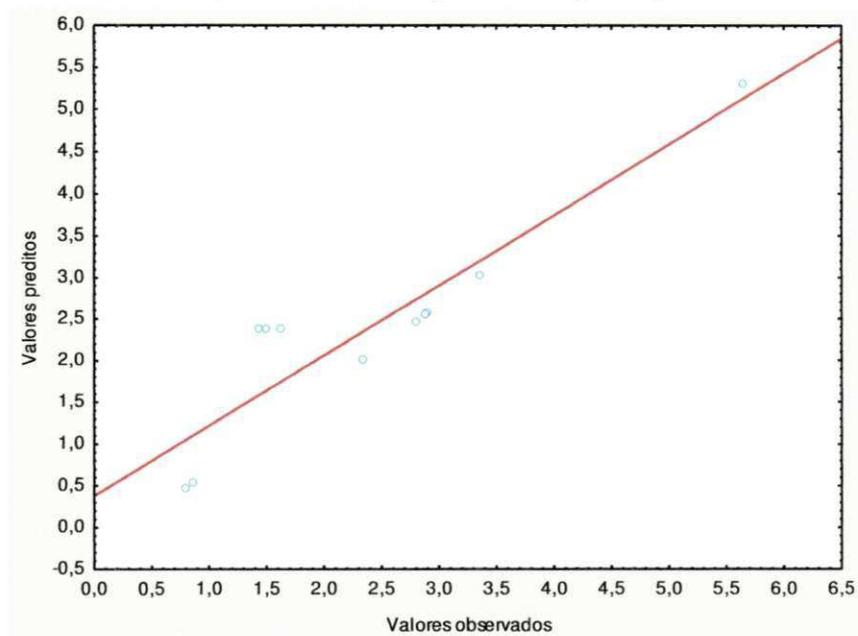
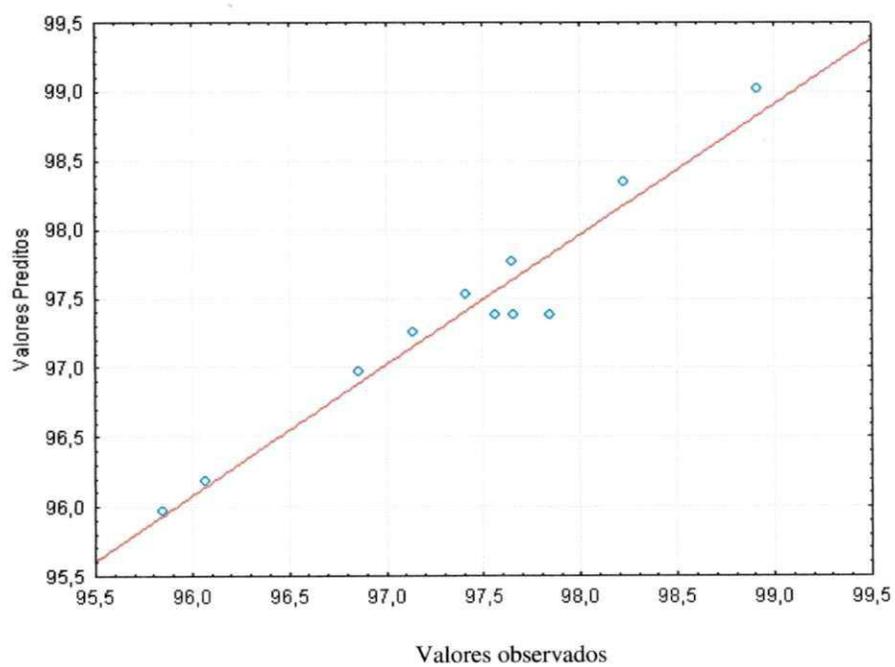
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	7,4178	3	2,4726	9,30
Resíduo	0,4282	7	0,0611	
F. ajuste	0,38793	5		
Erro puro	0,04026	2		
Total	7,8446	10		
$\%R^2$	94,54			
F_{tabelado}	4,35		$F_{\text{calculado}}=40,46$	

G.L. – Grau de Liberdade; S.Q. – Soma dos Quadrados; Q.M. – Quadrado Médio dos Desvios.

O valor do F calculado da regressão foi aproximadamente dez vezes maior que o F tabelado portanto neste caso pode-se dizer que os dados experimentais ajustam-se ao modelo obtido e a análise de regressão foi estatisticamente significativa e altamente preditiva.

Fan et al. (2012) estudando os efeitos do PEG 6000/ K_3PO_4 na partição da protopectinase obtida a partir da casca de caqui em pó por *Aspergillus terreus* SHPP01 em sistemas aquosos bifásicos, utilizaram a metodologia de superfície de resposta e obtiveram um modelo preditivo com a maior partição na fase inferior. Observaram também que o K_3PO_4 teve um efeito significativo na partição desta enzima assim como a concentração do PEG 6000 e que as interações não foram significativas ao nível de 0,05.

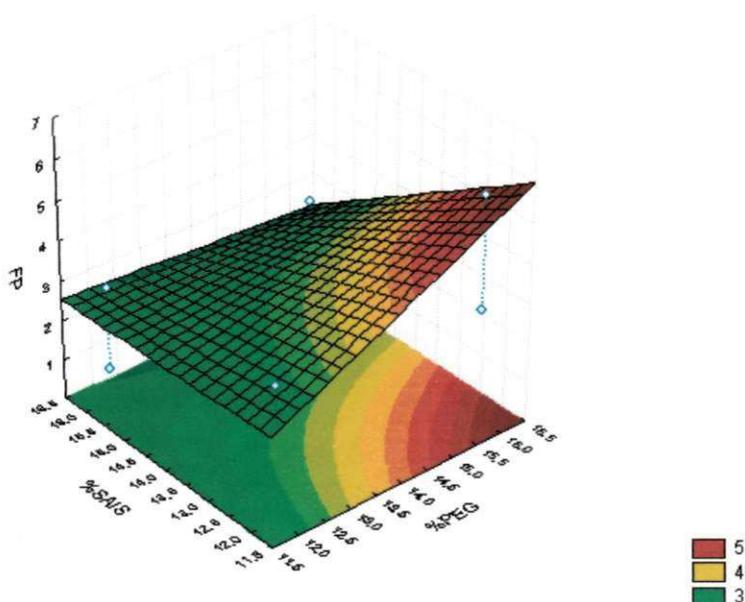
As Figuras 39 e 40 apresentam as dispersões entre os valores observados e valores preditos para um limite de confiança de 95% nas variáveis resposta, fator de purificação (FP) e recuperação (R_1) da enzima. Verifica-se uma pequena dispersão dos resultados indicando uma boa qualidade de ajuste do modelo linear previsto estatisticamente.

Figura 39 – Valores preditos e observados para o fator de purificação (FP) da exo-PG.**Figura 40** – Valores preditos e observados para a recuperação (R_1) da exo-PG.

4.7.4.3 Superfície de resposta

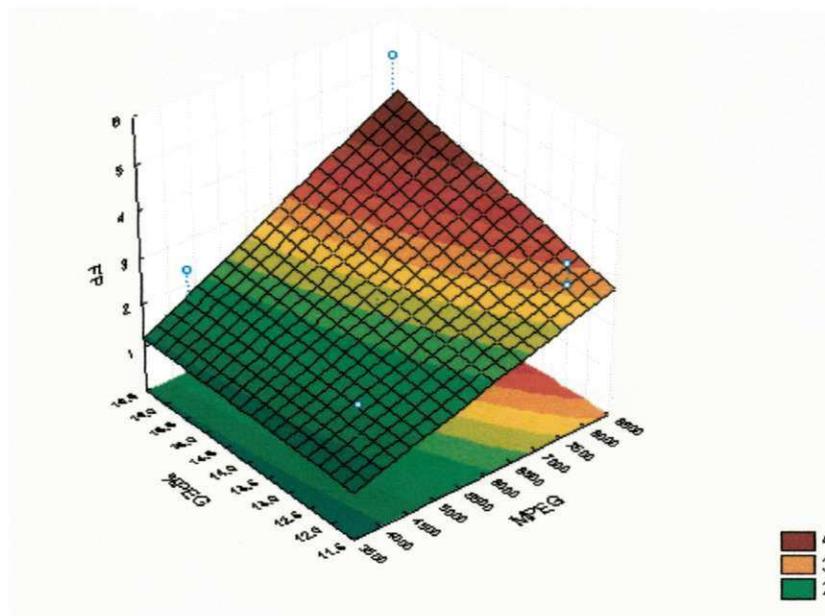
As Figuras 41, 42 e 43 representam as superfícies de resposta para o fator de purificação da enzima exo-poligalacturonase (PG) em função da: concentração de PEG × concentração de sal, da massa molar do PEG × concentração de PEG, massa molar do PEG × concentração de sal, fixadas no ponto central. Verifica-se na Figura 41 que para maiores valores da concentração de PEG e menores valores da concentração de sais obtém-se o maior valor para o fator de purificação (FP) da exo-poligalacturonase.

Figura 41 – Influência da concentração do PEG e do sal no fator de purificação (FP) da exo-PG.



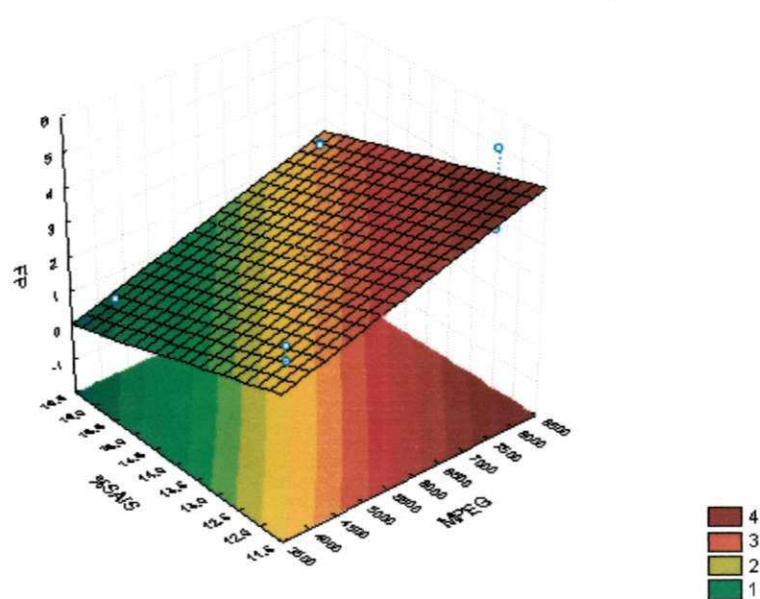
Percebe-se na Figura 42 que para maiores valores da massa molar do PEG e maiores valores da concentração de PEG obtém-se maiores valores para o fator de purificação (FP).

Figura 42 – Influência da massa molar do PEG e concentração do PEG no fator de purificação (FP) da exo-PG.



Observa-se na Figura 43 que para maiores valores da massa molar do PEG e menores valores da concentração de sais obtêm-se maiores valores para o fator de purificação (FP).

Figura 43 – Influência da massa molar do PEG e concentração do sal no fator de purificação (FP) da exo-PG.



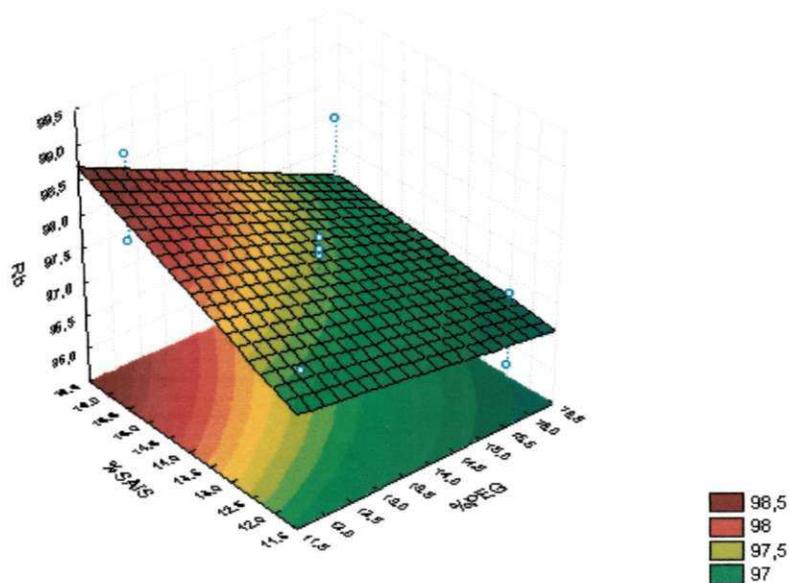
As superfícies obtidas confirmam a análise dos efeitos e permitem visualizar a variação da resposta (FP) em função das variáveis, massa molar do PEG, concentração do PEG e concentração de sais, dentro das faixas estudadas.

Verifica-se que quanto menor à concentração de sais e maior a massa molar maiores valores para o fator de purificação (FP) foram obtidos do planejamento. E quanto menor a massa molar do PEG e maior concentração de sais menores os valores de (FP).

As Figuras 44, 45 e 46 representam as superfícies de resposta para a recuperação (R_I) da enzima exo-poligalacturonase em função da: concentração de PEG \times concentração de sal, da massa molar do PEG \times concentração de PEG, massa molar do PEG \times concentração de sais fixada no ponto central.

A Figura 44 corresponde à superfície de resposta para a recuperação da enzima na fase inferior (R_I) dos sistemas em função da concentração do PEG \times concentração de sais. Percebe-se que quanto menor a concentração de PEG e maior a concentração de sais maior o valor da recuperação (R_I), corroborando com o modelo linear correspondente a Equação 28.

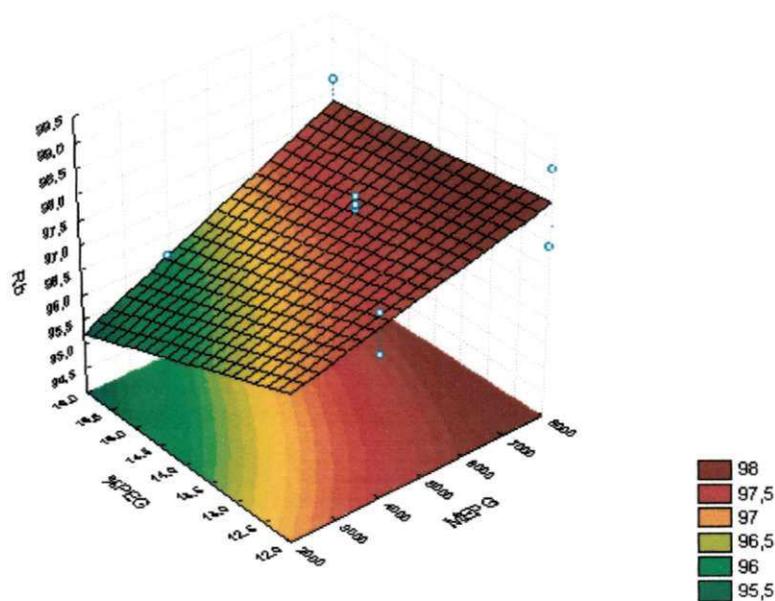
Figura 44 – Influência da concentração do PEG e concentração do sal na recuperação (R_I) da exo-PG.



Observa-se na Figura 45 o efeito da massa molar do PEG e da concentração do PEG sobre a recuperação (R_I) da exo-PG. Observa-se que a concentração de PEG apresenta influência negativa. Fixando a concentração de PEG em 12% e a massa molar em 8000

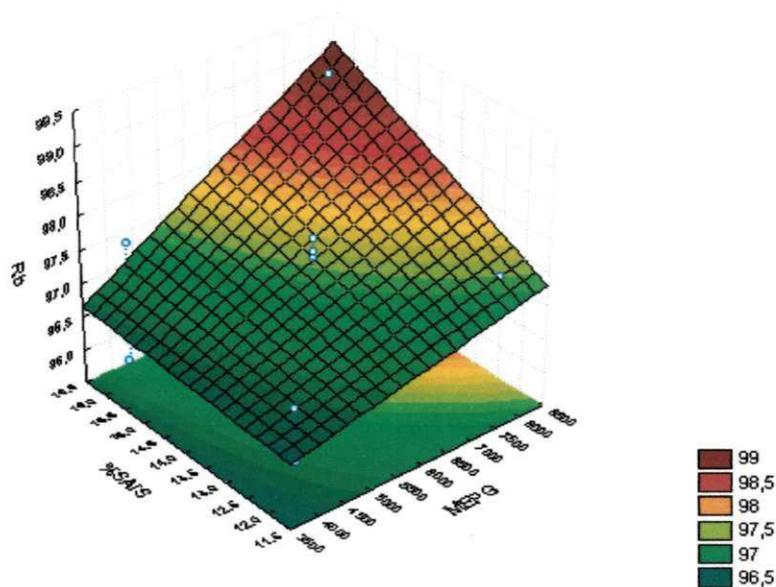
obtem-se uma recuperação da enzima de aproximadamente 98,91% da exo-PG, corroborando com o valor encontrado experimentalmente.

Figura 45 – Influência da massa molar do PEG e concentração do PEG na recuperação (R_1) da exo-PG.



A Figura 46 exibe a superfície de resposta para a recuperação da enzima em função da massa molar do PEG \times concentração de sais. Observa-se que a máxima recuperação da enzima exo-poligalacturonase, 98,91%, ocorreu com o polímero de maior massa molar (PEG 8000) e maior valor da concentração de sais 16%, valor similar ao encontrado experimentalmente.

Figura 46 – Influência da massa molar do PEG e concentração do sal na recuperação (R_1) da exo-PG.



Antov e Omorjan, (2009) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para avaliar a partição de pectinases em sistemas aquosos bifásicos, PEG 1000/ Na_2SO_4 . A análise aplicada revelou um espaço experimental, no qual a maior purificação da pectinase foi de 2,5 vezes e o rendimento de 96,61 para baixas concentrações de sal. Estes autores concluíram também que a metodologia de superfície resposta é uma ferramenta útil e promissora em sistemas aquosos bifásicos na purificação de biomoléculas assim como, Fanet al. (2012), Kammaum et al. (2009), Pericin et al. (2009) e Porfiri et al. (2011).

6 CONCLUSÃO

As principais conclusões obtidas neste trabalho são apresentadas a seguir, separadas por assunto desenvolvido:

Caracterização físico-química dos resíduos secos

Os resultados da caracterização físico-química dos resíduos secos do umbu, jabuticaba e goiaba indicam a potencialidade destes como substratos na síntese da exo-poligalacturonase por fermentação em estado sólido com valores percentuais de açúcares redutores, proteína e pectina de 8,67, 1,66 e 21,03; 24,67, 4,39, 8,31 e 23,35, 2,09 e 9,92 respectivamente.

O modelo de GAB ajustou-se adequadamente às isotermas de adsorção nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, havendo correlação entre os coeficientes de determinação, com valores de 0,99.

Resíduo seco do umbu

Os maiores valores de atividade poligalacturonásica foram obtidos com umidade inicial do meio de 60% (b.u) e concentração de sulfato de amônio de 1,5%. O pico de atividade foi de 18 U/g em 44 horas de fermentação. A condição menos favorável foi quando a umidade inicial do meio foi de 40% correspondendo a uma atividade de água de 0,71.

Resíduo seco da jabuticaba

Os maiores valores de atividade da exo-poligalacturonase obtida do resíduo seco da jabuticaba foram alcançados nas seguintes condições do meio de cultivo: umidade inicial de 40% (b.u), atividade de água de 0,80 e concentração de sulfato de amônio de 1,5%. O pico de atividade foi de 16,12 U/g em 72 horas de fermentação.

Resíduo seco da goiaba

Os maiores valores de atividade da exo-poligalacturonase obtida do resíduo seco da goiaba foram atingidos com umidade inicial do meio de cultivo de 50% (b.u), atividade de

água de 0,79 e concentração de sulfato de amônio de 1,0%. O pico de atividade foi de 12,64 U/g em 30 horas de fermentação.

Dentre os três resíduos secos estudados o do umbu foi o que apresentou menor valor de pH 2,2, considerado não ideal pela literatura para a síntese da poligalacturonase, o menor teor de açúcar e o maior valor de pectina. Entretanto foi o que se obteve a maior atividade e produtividade, sendo, portanto o mais adequado para a produção desta enzima para posteriormente ser utilizada nas indústrias de sucos cítricos.

Condição de extração da PG para o resíduo seco do umbu

A melhor condição de extração da exo-PG foi com o tempo de contato de 45 minutos, relação solvente/meio fermentado de 10 mL/g e velocidade de agitação de 150 rpm atingindo uma atividade poligalacturonásica de 32,59 U/g de meio fermentado, correspondendo a aproximadamente 82% do valor obtido na cinética fermentativa.

Foi obtida boa reprodutibilidade dos dados com os experimentos realizados no processo de extração da enzima exo-PG.

Sistema aquoso bifásico

Para os sistemas formados por PEG 4000, 6000 e 8000 e fosfato de potássio, as curvas binodais apresentaram a mesma forma. Observou-se, de uma forma geral, um deslocamento da região bifásica para menores concentrações de polímero e sal com o aumento da massa molar do PEG. Este comportamento era o esperado, pois quanto maior a massa molar do polímero, menor é a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico.

A partição da exo-poligalacturonase nos sistemas bifásicos analisados neste trabalho se deu, preferencialmente, para a fase inferior, rica em sal. A força motriz dessa transferência foi provavelmente de natureza entrópica.

O PEG mais adequado para a purificação da enzima exo-poligalacturonase é o de massa molar 8000, sendo o sistema formado por 16 % de PEG e 12 % de fosfato de potássio o

que apresentou os melhores resultados, proporcionando uma recuperação (R_f) de 97,14 % e fator de purificação (FP) de 5,64 vezes.

Os sistemas aquosos bifásicos constituídos de PEG/fosfato de potássio mostraram-se bastante eficientes, atingindo rendimento acima de 95%, portanto conclui-se que estes sistemas são alternativas eficientes e promissoras para a recuperação e purificação da enzima *exo-poligalacturonase*.

Os resultados obtidos neste trabalho para a recuperação da *exo-poligalacturonase* em SABs podem ser melhorados mediante estudo de otimização do processo.

REFERÊNCIAS

ABBASI, H. SHAFIGHZADEH, H. Continuous production of polygalacturonases (PGases) by *Aspergillus awamori* using wheat flour in surface culture fermentation. **Iranian Journal of Biotechnology**, v.9, n.1, p. 50-55, 2011.

ABNT: Associação brasileira de Normas Técnicas. **Solo - Análise Granulométrica NBR-7181**, 1984.

ABUD, A. K. S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, p.257-265, 2009.

ADELEKE, A. J.; ODUNFA, S. A.; OLANBIWONNINU, A.; MOJISOLA, C. O. Production of cellulase and pectinase from Orange peels by fungus. **Nature and Science**, v.10, n.5, p.107-112, 2012.

AGRIANUAL: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP - **Consultoria e Agroinformativo**, 2010.

ALBERTSSON, P., A. Partition of cell particles and macromolecules. **New York, John Wiley**, p.346, 1986.

ALCÂNTARA, S. R. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida com bagaço do pedúnculo do caju**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2007.

ALCÂNTARA, S.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H.; GOMES, P. J. Isotermas de adsorção do pedúnculo seco do caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n.1, p.1-11, 2009.

ALCÂNTARA, S. R; ALMEIDA, F.A.C; SILVA, F.L.H. Pectinases production by solid state fermentation with cashew Apple bagasse: Water activity and nitrogen source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p.121-126, 2010.

ALCÂNTARA, S. R ; SILVA, F.L.H. Influence of spores concentration, moisture, ammonium sulphate concentration and temperature on polygalacturonase production using cashew apple in the solid state fermentation process. **Chemical Engineering Transactions**, v.24, p.949-954, 2011.

ALCÂNTARA, P. A. L.; MIRIM, A. L.; RODRIGUES, M. V. P.; FERREIRA, R. C.; SILVA, H. M.; SILVA, M. C. H. Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.879, n.21, p. 1881- 1885, 2011.

ALEXANDRE, H. V.; FGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n.1, p.11-15, 2007.

ALMEIDA, K.V; SANTIAGO, A. M; ALMEIDA, M.M. Caracterização físico-química da farinha das cascas de frutas tropicais. In: II SIMPÓSIO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS. 2010, Aracaju. **Anais...Aracaju**, 2010.CD.

ANTOV, M.; DRAGINJA, P.; PEJIN, S.M. Pectinases partitioning in aqueous two-phase systems: na integration of the systems poly (ethylene glycol)/crude dextran and poly(ethylene glycol)/ammonium sulphate. **J. Serb. Chem. Soc**, v.69, p. 299-307, 2004.

ANTOV, M. DRAGINJ.; P. DASIC, G. M. Aqueous two-phase of xyanase produced by solid-state cultivation of *Polyonous squomous*. **Process Biochemistry**, v.41, p. 232-235, 2006.

ANTOV, M. G.; OMARJAN, R. Pectinase partitioning in polyethylene glycol 1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase systems> statistical modeling of the experimental results. **Bioprocess and Biostems Engineering**, v. 32, n. 2, p. 235-240, 2009.

ANURADHA, K.; NAGA, P. VENKATESHWAR.; GOPAL, R. Fungal isolates from natural pectic substrates for polygalacturonase and multienzyme production. **Indian Journal of Microbiology**, v.50, p. 339-344, 2010.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Processo) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2004.

ARAÚJO, M.; ABUD, A.; ALMEIDA, R. Produção de enzimas por fermentação semi-sólida a partir de resíduos da casca de coco verde. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMIOCA, 09-12 de Setembro 2012, Búzios/RJ. **Anais...Búzios/RJ**, 2012. CD-Rom.

ASCHERI, D.P. R.; ASCHERI, J.L.R; CARVALHO, C.W.P. Caracterização da farinha do bagaço da jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.867-905, 2006.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, L.R. L.; FRICKS, A. T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M.; LIMA, A. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using na aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, Issue 32, p. 3853-3858, 2011.

BARI, M. R.; ALIZADEH, M.; FARRBEH, F., 2010. Optimizing endopectinase production from date pomace by *Aspergillus niger* PC5 using response surface methodology. **Food Bioproducts Prcess**, v. 88, p. 67-72, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996, 480p.

BERTOLUZZO, M.G.; BERTOLUZZO, S. M.; RIGATUSO, R.; PICÓ, G. Caracterización Del equilibrio líquido-líquido en sistemas *bifásicos* acuosos. **Anales AFA**, v. 17, p. 321-324, La Plata, 2005.

BISPO, E.S. **Estudos de produtos industrializados do umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Câmara)**. 1989, 119f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Unidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BOBBIO, F. O. **Introdução à química de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003, 238p.

BON, E. P.S.; FERREIRA, M.A. **Enzimas em biotecnologia produção, aplicação e mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506p.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n.1, p. 98-101, 2007.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: fundamentos**. 1. Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2011, 254.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley e Sons Inc., 1978. 653 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Brasília: Editora MS. 2005, 1017p.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHAWAN, R. F.; GOMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciências Agrotécnicas**, v.24, p.137-152, 2000.

BRUNAUER, S. EMMETT, P. TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemical Society**, v.60, n.2, p.309-319, 1938.

CAMARGO, L. A.; DENTILLO, D. B.; CARDEIRO, L.; GATTÁS, E. A. L. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus sp.* **Alim Nutr., Araraquara**, v. 16, n.2, p. 153-156. 2005.

CARDOSO, E. A. **Produtividade e qualidade da goiaba 'Paluma' em função da adubação mineral.** 2005, 158f. Tese (Doutorado em Fitotécnica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

CARDOSO, M. V. C.; **Efeito do centro metálico nas interações intermoléculares dos complexos $(M(CN)_5MO)^X-$ com o poli (óxido de Etileno) em sistemas aquosos bifásicos.** 2007. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

CARVALHO, M. M. **Estudo do equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol sais e água.** 2007. Dissertação de Mestrado. - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

CARVALHO, S. **Pectinases Produzidas pelo Agente Biológico G088: Extração e purificação.** 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

CASTILHO, L.R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida.** 1997. 94 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M. ; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 34, p.181-186, 1999.

CASTILHO, L.R; MEDRONHO, R.A; ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p.45-50, 2000.

CASTRO, R. J. S.; FREITAS, A. C.; BESERRA, M. A.; VIEIRA, J. M. M.; PINTO, G. A. S. Produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida utilizando como substrato torta de canola. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 02-05 de Agosto 2009, Natal/RN. **Anais...natal/RN**, 2009. CD-Rom.

CASTRO, R. J. S.; TORRES, M. B. O.; FREITAS, A. C.; PINTO, G. A. S. Estudo da Produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando torta de girassol como substrato. In: XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 02-05 de Agosto 2009, Natal/RN. **Anais...natal/RN**, 2009. CD-Rom.

CAVALCANTI, M. H. M.; HERCULANO, P. N.; POR, T. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; MOREIRA, K. A.; MOTA, C. M. S. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM 4645. **Journal of Biotechnology**, v.10, n.13, p.2469-2474, 2011.

CAVALCANTI, J. S. **Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo "tipo coalho" usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma**

expandida. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio do Norte, Natal, 2010.

CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. **Process Biochemistry**, v.45, p. 55-1148, 2010.

CHAVES, C. A. Extraction of amylase from fermentation broth in poly (Ethylene Glycol) salt aqueous two-phase system. **Brazilian Archives of biology and Technology**, v. 42, n.1, p. 98-101, 2007.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. **Cv.Liucheng J. Agric. Food Chem.** V. 51, p.2615-2618, 2003.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2ª. Edição. Lavras: UFLA, 2006, 785p.

CHENYU, D.; LIN, S. K. C.; KOUTINAS, A.; WANG, R.; DORADO, P., WEBB, C. A. Wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid. **Bioresource Technology**. Doi: 10.1016/j.biotech, 2008.

CITADINI, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 0-11, 2010.

COELHO, D. F.; SOARES, P.; CUNHA, C. G. M.; SILVEIRA, E.; JR, P. A.; TAMBOURGI, B. E. Purificação de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por sistemas bifásicos aquosos PEG/Sal, **Exata**, São Paulo, v.9, n.3, p. 333-338, 2011.

COIMBRA, J. S. R. **Desempenho de um extrator tipo grasser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. 1995. Tese de Doutorado-Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br> acessado em 10 de Outubro de 2011.

CORRÊA, M. P. Umbuzeiro. In: PIO CORREIA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, v.6, p. 336, 1988.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semissólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. 2004. 138f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

COSTA, J. A. V.; COLLA, E.; MAGAGNIN, G.; SANTOS, O. L.; VENTDRUSCOLO, M.; BERTOLIN, T. E. Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n. 5, p.759-766, 2007.

COULATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 368p.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 1993. 198f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v.26, n.4, p.314-317, 1995.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255-261, 2000.

CUNHA, E. V.C. **Equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos água + PEG 8000 + sal: determinação experimental e modelagem termodinâmica**. 2008. Dissertação (Mestrado em engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

Da SILVA, L. H. M.; Sistemas aquosos bifásicos; Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v.29, n.6, p. 1345-1351, 2006.

DEMIATE, I. M.; WOSIAKYI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Analysis of total and reducing sugar in foods. A comparative studies between colorimetric and titration techniques. **Exact and Soil Sciences, Agrarian and S. Engineering**, v. 8, n.1, p. 65-67, 2002.

DÍAZ, A. B.; ORY, I.; CARO, ILDEFONSO.; BLANDINI, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace, **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 72-78, 2012.

DONADIO, L. C. Jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) Berg). Jabuticabal: FUNEP, 2000. 55p.

FAN, C.; LIU, Z.;HU, J.; NIU, B.; HUANG, J.; YAO, L. Efects of polyethylene glycol 6000 and tripotassium phosphate on protopectinase partition in the aqueous two - phase systems using response surface methodology. **African Journal of Food Science**, v. 64, p.85-90, 2012.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2003, v.52, n. 4, p.223-227.

FELLOWS, P. J. **Teconologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. Fennema, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 602p.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Química de Alimentos**, 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

FERNADES, A. G. **Alterações das características químicas e físico-químicas do suco da goiaba (*Psidium guajava L.*) durante o processamento**. 2007. 84f. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Ceará- Fortaleza-CE.

FERNÁNDEZ, D. E. R.; RODRÍGUES-LEÓN, J. A.; CARVALHO, J.C.; STURM, W.; SOCCOL, C. R. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, Doi: 10.1016/j. biotech 2011.

FERREIRA, J. F. **Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato**. 2007. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2007.

FERREIRA, G. B.; EVANGELISTA, A.F.; JUNIOR, J.B.R.; SOUZA, R.R.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E. B.; JORDÃO, E. Partitioning optimization of proteins from *ZeamaysMalt* in ATPS PEG 6000/CaCl₂. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p.557-564, 2007.

FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. D.S.; TAMBOURGI, E.G. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfato, **Exata**, São Paulo, v.7, n.1, p. 49-56, 2009.

FERREIRA, J. F.; SBRUZZI, D.; BARROS, K. V. G.; MACHADO, I. S.; TAMBOURGI, E. B. Purificação da enzima bromelina presente no curuá (*Ananas erectifolius L.B SMITH*) variedade roxa, por sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato de potássio. **Revista Brasileirade Produtos Agroindustriais**, v.13, n.2, p.197-202, 2011.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C.A U.; CARDOSO, R. L.; MACHADO, S. S.; ROCHA, A. S.; LIMA, R.R. Aproveitamento industrial do umbu:processamento de geléia e compota. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1008-1014, 2005.

FONTANA, R.C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **J Ind. Microbiology Biotechnology**. v. 32, p. 371-377, 2005.

FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora-Atheneu São Paulo, 1999, 182p.

FREITAS, A. C.; CASTRO, R. J.S.; PINTO, G. A. S. **Estudo das condições de extração de protease em processo fermentativo semissólido**. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 19 a 22 de setembro de 2010, Foz do Iguaçu- Paraná.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and lacase by *Botryosphaeria Rhodina* 05 in submerged and solid state fermentation. **Bio Resources**, v.3, n. 2, 2008.

GOMES, J.; Zeni. J.; Cence. K.; Toniazzo.G.; Treichel. H. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 281-287, 2011.

GONÇALVES, D. B, TEIXEIRA, A.; BOZZOLLI, M. S.; QUEIROZ. M. V.; FERNANDES, A. Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium Griseoroseum* T 20, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2012.

GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; BARTOLOMEU, G. S. M.; RIBEIRO, C. F. A.; SILVA. M. M. Maturação da goiaba (*Psidium guajava* L.) Mediante parâmetros físico-químicos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, n.1, p. 85-94, 2003.

GRABER, T. A.; MEDINA, H.; GALLEGUILLOS, H. R.; TABOADA, M. E. Phase equilibrium and partition of iodide in a aqueous biphasic system formed by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{PEG} + \text{H}_2\text{O}$ at 25°C. **Journal of Chemical e Engineering**, n.52, p. 1262-1267, 2007.

HEMAVATHI, A. B. Differential partitioning of β -galactosidase and β -glucosidase using aqueous two-phase extraction. **Process Biochemistry**, v.46, n.3, 2011.

HENDGES, D. H.; MONTANARI, Q.; MALVESSI, E.; SILVA, M.M. Production and Characterization of Fendo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* State Fermentation in Double-surface Bioreactor. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.2, Curitiba, 2011.

HERBÁRIO. **Jaboticaba**. Disponível na internet: <http://www.herbário.com.br/dataherb16/jaboticaba.htm>, acessado em 10 de Agosto de 2010.

IBRAF; Instituto Brasileiro de Frutas, 2010. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>, acessado em : 08 de Setembro de 2010.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009. Disponível na internet. <http://www.ibge.gov.br/>, acessado em Julho de 2010.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível na internet. <http://www.ibge.gov.br/>, acessado em Outubro de 2010.

IGARASHI, Luciana. **Extração de biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas convencionais e com polímeros termossensíveis**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia química) - Universidade Estadual de Campinas, SP.

IMANDI, Z. S. B.; BANDARU V. V. R.; SOMALANKA, S.R.; BANDARU, S.R.; GARAPATI, H.R. Application of statistical experimental designs for the optimization of médium constituíntes for the production of citric acid from pineapple waste. **Bioresour Technology**, v. 99, p. 4445-4450, 2008.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v.10, n.9, p. 2931-2944, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 709p.

JOHANSSON, H-O.; MAGALDI, F. M.; FEITOSA, E. PESSOA-JR. A Protein partitioning in poly ethylene glycol/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatograph**, v.1178, p.145-153, 2008.

KAR, S.; RAY, R. C. Purification, characterization and application of thermostable exo-polygalacturonase from *Sstreptomyces erumpens* MTCC 7317. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 133-148, 2011.

KAMMAUM, R CHOUAYEKH, H.; ABID, H.; NAILI, B.; BEJAR, S. Purification of CBS 819.72 alpha-amylase by aqueous two-phase systems: modeling using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 306-312, 2009.

KARKAS, T. ONOL, S. Characteristics of invertase partitioned in poly(ethylene glycol) magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p.142-150, 2012.

KENAWA, SUMANTHA,; CHAIWUTAND.; RAWDKUEN,S. Aqueous two-phase extraction of bromelain from pineapple peels (phu lae cultiv.) and its biochemical propertis. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1219-1226, 2012.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos, teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242p.

KUMAR, Y. S.; VARA, K. S.; REDALY, O. V. Production and optimization of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.) peel using *Fusarium moniliforme* in solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, 2010.

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. **Métodos de diagnóstico foliar utilizados nas plantações do grupo booker na Guiana Inglesa: Amostragem e técnica de análise**. 21. ed. Paris: Fertilité, 1964. 3-11 p.

LIMA, J. B.; De JESUS, A.; ANGELITA, D. C.; CARVALHO, A.; PAULA, A.; PATO, A. C. M.; DANTAS, A. M.; Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Archivos. Latino americanos de Nutricion*, Caracas, v. 58, n.4, p. 416-421, 2008.

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate polymers*, v. 50, p. 63-69, 2002.

LEITÃO, M. F. F. Atividade de água e alterações microbiológicas dos alimentos. In: Atividade de água em alimentos. JARDIM, D.C. P; GERMER, S. P. M. Campinas: ITA, p.13.1-13.8, 1997.

LINDE, G. A.; MAGAGNIN, G.; COSTA, A. V.; BERTOLIN, T. E.B.; COLUTO, N. B. Column bioreactor use for optimization of pectinase production in solid substrate cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 557-562, 2007.

LUECAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. A descriptive model and methods for up-scaled process router for interfacial partition of bioparticles in aqueous two-phase systems. *Biocemical Engineering journal*, v. 50, p. 122-130, 2010.

MADAREV, S.; ANTOV, M.; PERICIN, D. Partitioning of pectinases aqueous two-phase system polyethylene glycol/dextran 500. **ANNALS OF THE FACULTY OF ENGINEERING HUNEDOARA**, 2006, Tome IV, Fascicule 3, 2006.

MADHUSUDHAN, M.C.; RAGHAVARO, K. S. M. S.; NENE, S. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction. *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 414-420, 2008.

MALLER, A.; DAMÁSIO, R. L.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A. TERENZI, H. F.; PODIZELI, M. L. T. M.; Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enzyme Research*, v. 28, p.1-6, 2011.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonase by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47.n.5, p.693-702, 2004.

- MARINE, A.; IMELIO, N.; PICÓ, G.; RAMANIMLD.; FARRUGIA, B. Isolation of *Aspergillus niger* lipase from culture medium with aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography**, v. 879, n.22, 2011.
- MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis; produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase.** 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2006.
- MARTINS, E. S. **Purificação de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido e caracterização bioquímica das mesmas.** 2006. 132f. Tese (Doutorado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2006.
- MARTIN, C. A. C.; MARTINS, M. L. L.; Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus sp.* e algumas de suas propriedades, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1, 2009.
- MEHRNOUSH, A. SARKER, Z. I.; MUSTAFA, S. YAZID, A. M. M. Direct purification of pectinase from mango (*Mangifera Indica Cv. Chokanan*) peel using a PEG/salt-based aqueous two phase system. **Molecules**, v. 16, p. 8419-8427, 2011.
- MELETTI, L. M. M. **Propagação de frutíferas tropicais.** Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000, 145-153p.
- MENDES, B. V. Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr.Cam.): importante fruteira do semi-árido. Mossoró: ESAM, 66p. (ESAM> Coleção Mossoroense, Série C – v.554), 1990.
- MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. C. L.; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Ciências Exatas e da Terra. Seropédica, EDUR**, v. 25, n.1, p. 15-27, 2006.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic AID reagent for determination of reducing sugars. **Analítica Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.
- MISHA, V.K.; ORAIKUL, B.; TEMELLI, F. Physical characterization and water sorption of freeze dried dulce *Palmaria palmata* powder. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n.1, p. 25-39, 1996.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

- MILLER, A.; SCHAAL, B.A. Domestication of a mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **PNAS**, Washington, v. p.102, 12801-12806, 2005.
- MOJSOV, K. The effects of different carbon sources on biosynthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Applied Technologies and Innovations**, v.3, p. 23-30, 2010.
- MONTAVANI, J. R.; CORRÊA, M. C. M.; CRUZ, M. C. P.; FERREIRA, M. E.; NATALE, W. Uso fertilizante de resíduo da indústria processadora da goiabas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26. p.339-342, 2004.
- MRUDULA, S.; ANITHARAJ, R. Pectinase production in solid fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. **Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.6, p.64-71, 2011.
- MUTHIAH. P. Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based bifasic system, 2011.
- MUNHOZ, C. L.; ARGANDOÑA, E. J. S.; JÚNIOR, S. S. M. Características físicas e químicas das farinhas obtidas a partir de goiabas CV Pedro Sato. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 54 th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Vitória-Espírito Santo 12 a 17 de Outubro de 2008.
- MUNHOZ, C. L.; ARGANDOÑA, E. J. S.; JÚNIOR, S. S. M. Extração de pectina de goiaba desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, 2010.
- NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. **Process Biochemistry**, v.43, p.1293–1299, 2008.
- NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Antioxidant from agri-industrial wastes of the guava fruits (*Psidium guajava* L). **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 21, n.2, p. 209-216. 2010.
- NGUYEN, H. L.; NGUYEN, T. T.; DO, T. B. T. Purification of extracellular alpha-amylase from *subtilis* by partitioning in a polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase system. **ANNALS OF MICROBIOLOGY**, v.60, n.4, p. 623-628, 2010.
- NIZAMUDDIN, S.; SRIDEVIA, NARASIMHA G. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. 8, p. 1096-1100, 2008.
- OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; SHALOM, N. C.; EBUEHI, O. A. T.; OKERENTA, B. M. Pectinolytic activity of wild-type filamentous fungi fermented on agro-wastes. **African journal of microbiology**, v. 4, n. 24, p.2729-2734, 2010.

- OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por pletilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas.** 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - UNV, Viçosa-MG.
- OROZCO, A.L.; PÉREZ, M. I.; GUEVARA O, RODRÍGUEZ J.; HERNÁNDEZ M.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; POLVILLO, ARIAS M.E. Biotechnological enhancement of coffe pulp residues by solid-state fermentation wuth streptomycetes. Py-GC/MS analysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 81, p.247-252, 2008.
- PADILHA, G. S.; FERREIRA J. F.; ALEGRE, M. R.; TAMBOURGI, E. B. Diagrama de fases para utilização em sistema bifásico aquoso com diferentes massas molares de PEG e pHs. . In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS. *Anais...*Campina Grande/PB, 2007. CD-Rom.
- PADILHA, G. S.; CURVELO-SANTANA, J. C.; ALEGRE, M. R.; TAMBOURGI, E. B. Expanded bed adsorption of an alkaline lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Chromatography B*, v.877, p. 521-526, 2009.
- PADMA, P. N.; ANURADHA, K.; REDDY, G. Pectinolytic yeast isolates for active polygalacturonase production. *Innovative Food science and Emerging Technologies*, v. 12, p, 178-184, 2011.
- PADMA, P. N.; ANURADHA, K.; NAGARAJU, B.; KUMAR, V. S.; REDDY, G. Use of Pectin rich fruit wastes for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* MTCC 9166 solid state fermentation. *Bioprocessing e Biotechniques*, 2012.
- PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** 2003. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte de inductor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: __, 2003.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v.77, p.149-162, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. **Solid–state fermentation in biotechnonogy: fundamentals and applications.** New Delhi: Asiatech, 2001.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2, p.81-84, 2003.

PATIL, S. R.; DAYANAND. A. Production of pectinases from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresonance Technology**, v. 97, p. 2054-2058, 2006.

PEDROLI, D. B.; OMES, E.; MONTI, R.; CARMONA, E. C. Studies on productivity and characterisation of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 14, n.2, p. 191-200, 2010.

PELCZAR, J.; CHAN, E. C. S.; MICHAEL, J.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2 ed. São Paulo: MMAKRON Books, 1996, v. 1, 523p.

PEREIRA, M. S. A. **Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por, *Kluyveromices marxianus* utilizando sistemas de duas fases aquosas**. 2005. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Portugal, 2005.

PEREIRA, L. G. R.; BARREIROS, D. C.; OLIVEIRA, L. S.; FERREIRA, A. L.; MARTINS, R.; AZEVEDO, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. P.; SOUSA, F. Composição química e cinética de fermentação ruminal de subprodutos de frutas no sul da Bahia. **Livestock Research for Rural Development**. Disponível na Internet [http://www. Irrd.org/Irrd20/1/ribe20001. Htm.pdf](http://www.Irrd.org/Irrd20/1/ribe20001.Htm.pdf). Arquivo capturado em 01 de Outubro de 2010.

PERICIN, D. M.; MADDAREV, S. Z.; RADULOVIC, L. M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnol**, v. 31, p. 43-47, 2009.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. EMBRAPA, ago 2005. Disponível em: www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_102.pdf. Acessado em: 28 de Setembro de 2011.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido; Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v.74, p.17-20, 2006.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003-180f. Tese (Doutorado em ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós graduação de Tecnologia de Processos. Rio de Janeiro, RJ, 2003.

PORFIRI, M. C.; PICÓ, G. ROMANINI, D.; FARRGGIA, B. *Aspergillus oryzae* alpha-amylase partition in potassium phosphate - polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p.7-13, 2011.

PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B.S.; LIMA, J. L.; PORTO, A. L.F. Partition de lecitina from *Canavaliagranda flora* Benth in aqueous two-phase, **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n.2, p165-171,2011.

PRODANOVIC, J. M.; ANTOV, M. G. The influence of molecular weight of polyethyleneglycol on separation and purification of pectinases from *Penicillium cyclopium* in aqueous two-phase system. **APTEFF**, v. 39, p.193-199, 2008.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New De lhi: Tata Mc Graw Hill Publishing Company, 1979. 634p.

RATANAPONGLEKA, K. Recovery of biological products in aqueous two phase systems. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, v.1, n. 2, p. 191-198, 2010.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R.R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENELLY, E. J. Biactive depsides and anthocyanins from jabuticaba (*Myrriacaria cauliflora*), **J. Nat. Prod.,Ohio**, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, 2006.

RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; PESSOA-JUNIOR, A. Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly (ethylene glycol)/phosphate systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 78-83, 2007.

ROCHA, C. P.; BAILÃO, E. F. L.; COUTINHO, F. U.; CARDOSO, V. L. Utilização de resíduos agroindustriais como substrato para produção das enzimas amilase e pectinase por *Aspergillus niger*. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 24 a 27 de 2011, Caxias do Sul. **Anais...Caxias do Sul/RS**, 2011. CD-Rom.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de pós graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia-Minas Gerais, MG, 2010.

RODRIGUEZ, J. A.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005, 326p.

RODRIGUEZ, F. D. E.; RODRIGUES, L. J. A.; CARVALHO, J. C.; STURN, W.; SOCCOL, C. R. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. v.102, p. 10657-10662, 2011.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ, J.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J. C.; AGUILAR, C. N. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 90-95, 2012.

- SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. D.; TAMBOURGI, E. B. Estudo comparativo das técnicas na precipitação de amilases de malte de milho. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 09-12 de Setembro 2012, Búzios/RJ. **Anais...**Búzios/RJ, 2012. CD-Rom.
- SANTIAGO, A. M.; ANJOS, D. A.; ALCÂNTARA, S. R.; CONRADO, L. S. O. Aproveitamento da casca do umbu seco na produção de pectinases por *Aspergillus niger* em cultivo semissólido. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 24 a 27 de 2011, Caxias do Sul. **Anais...**Caxias do Sul/RS, 2011. CD-Rom.
- SANTOS, E. O. C.; OLIVEIRA, A. C. N. Importância sócio-econômica do beneficiamento do umbu para os municípios de Canudos, Uauá e Curaçá. Instituto Regional da Pequena Agropecuária Apropriada- **IRPAA**, Juazeiro, BA. 8p, 2001.
- SANTOS, S. F.M.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H DA.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. Aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta no Estudo da Produção e Extração da Poligalacturonase. **Química Nova**, v.31, n.8, p. 1973-1978, 2008.
- SANTOS, S. F.M. Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. 132f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Program de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v.39, p. 239-247, 2003.
- SCOPES, R. K. **Prtein purification: principles and practice**. New York, springer Verlag, 2008.
- SELVAKUMAR, P.; LING, Y.C.; WALKER, S.; LYDIATTI, A. A pratical implemenation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological fedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**, doi: 10.1016/j. Seppur. 2010.08.022, 2010.
- SHAKTIMAY, K. Purification, Characterization and application of thermostable exo-polygalacturonase from strptomycetes erumpens MTCC 7317. **Food Biochemistry**, v. 35, p. 133-147, 2011.
- SHEEKH, EL.; MOSTAFA, M.; ISMAIL, A. M. S.; ABD, EL.; MOSTAFA, A.; HEGAZY, EMAN. M.; DIWANY, EL.; AHMED, I. Effective techonological pectinases by *Asperggilus carneus* NRC1 utilizing the Egyption orange juice industry scraps. **International Biodeterioration & Biodeterioration**, vol. 63, p. 12-18, 2009.

SILVA, C. M. M.; PIRES, I. E.; SILVA, H. D. Caracterização dos frutos do umbuzeiro. Petrolina: EMBRAPA (Boletim de Pesquisa) n. 34, p.17, 1987.

SILVA, J. C. ; DIAS, J. L.; GOMES, S. C. M.; SILVA, M. F.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando cascas de frutas como substrato. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 09 - 12 de Setembro 2012, Búzios/RJ. **Anais...**Búzios/RJ, 2012. CD-Rom.

SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: Fundamentos e Aplicações para Partição/Purificação de Proteínas. **Química Nova**, v. 29, p.1345-1351, 2006.

SILVA, C. A. S. partição do Glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos, 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Alimentos) - Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, MG, 2007.

SINGH.; VERMA. N. Partition of glucose oxidase from *Aspergillus niger* in aqueous two-phases systems based on salt and polyethylene glycol. **Brazilian Archives of Biology and technology**. v.53, n.5, Curitiba, 2010.

SING, M.; SAVRAV, K.; SRIVASTAVA, N.; KANNABI, RAN, K. Lipase production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in solid state fermentation using ground nut oil cakes as sbstrate. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v.2, p. 241-245, 2010.

SOUSA, C. A. B.; Oliveira, P. L.; SOUZA, R. L. A.; CONRADO, L. S. Recuperação de poligalacturases obtidas pela fermentação semi-sólida da casca e albedo do maracujá. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18, 2011, Caxias do Sul. **Anais...**Caxias do Sul/RS, 2011. CD-Rom.

SOUSA, C. A. B. **Recuperação de poligalacturases produzidas pela fermentação semi-sólida do resíduo agrícola do maracujá amarelo empregando Sabs**. 2010.98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).- Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2010.

SOUZA, R.L.A. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato**. 2008.97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2008.

SOUZA, R. L. A.; CONRADO, L. S. O.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.9, p.987-992, 2010.

SOUSA, B. A.A; PINTO, R. T. C. Biotechnological reuse of fruit residues as a rational strategy for agro-industrial resources. **Journal of Technology Management & Innovation** v.5 n.2, 2010.

SOUSA, C.A.B; SANTIAGO, A.M.; OLIVEIRA, P.L.; CONRADO, L.S. Influencia da massa molar do PEG na purificação de poligalacturonase de *Aspergillus niger* por meio de SAB. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 09-12 de Setembro 2012, Búzios/RJ. **Anais...Búzios/RJ, 2012. CD-Rom.**

SILVA, D. J. P. Características físicas de goiabas (*Psidium guajava L*) submetidas a experimento hidrotérmico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n.4, p.408-414, 2008.

TRINDADE, V; DANIEL, M. R; CASTILHO, L.R; COELHO, M. A. Z; MEDRONHO, R. A; LEITE, S. G. F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semi-sólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais...Maringá/Paraná, 1996. CD.**

UENOJO, M; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p 388-394, 2007.

UCHOA, A. M. A; COSTA, J. M. C. MAIA, G. A. M; SILVA, E. M. C; CARVALHO, A. F. F. U; MEIRA, T. R. Parâmetros físico-químicos, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduo de frutos tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.15, p. 58-65, 2008.

VASANTHI e MEENAKSHISUNDARAM. Optimization of pectinase enzyme production by using sour orange peel as substrate in solid state fermentation. **Asian journal of biochemical and pharmaceutical research**, v 2, p. 16-24, 2012.

VIEIRA, S. M. J.; Couto, S. M.; CORRÊA, P. C.; SANTOS, A. E. O.; CECOM, P. R.; TRINDADE, V.; DANIEL, M. R.; CASTILHO, L.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semissólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais...Maringá: __, 1996.**

WELTI-CHANES, J.; VERGURA, B.F. Actividad de água. Concepto y aplicación em alimentos com alto contenido de humedad. In: Aguilera, J.M. **Temas em Tecnologia de Alimentos**, v.1, p.11-43, 1997. México.

YAN-MIN, L.; YAN-ZHAO, Y.; XI-DAN, Z.; CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts Processing** v.88, p. 40-46, 2010.

YUCEKAN, I.; ONOL, S. Partitioning of invertase from in poly (ethylene glycol) sodium sulfate aqueous two-phase. **Process Biochemistry**, v, 46, n.1, p 226-232, 2011.

ZHANG, Y-Y.; LIU, J-H. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporum laibacchi* using aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**. v. 878, p. 909-912, 2010.

ZHENG, Z.; SHENY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 323-329, 2000.

APÊNDICE A

ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA O
RESÍDUO SECO DA GOIABA

Figura 1 – Cinética da produção da PG
Ensaio 1 – Umidade 40% e Nitrogênio 0,5%

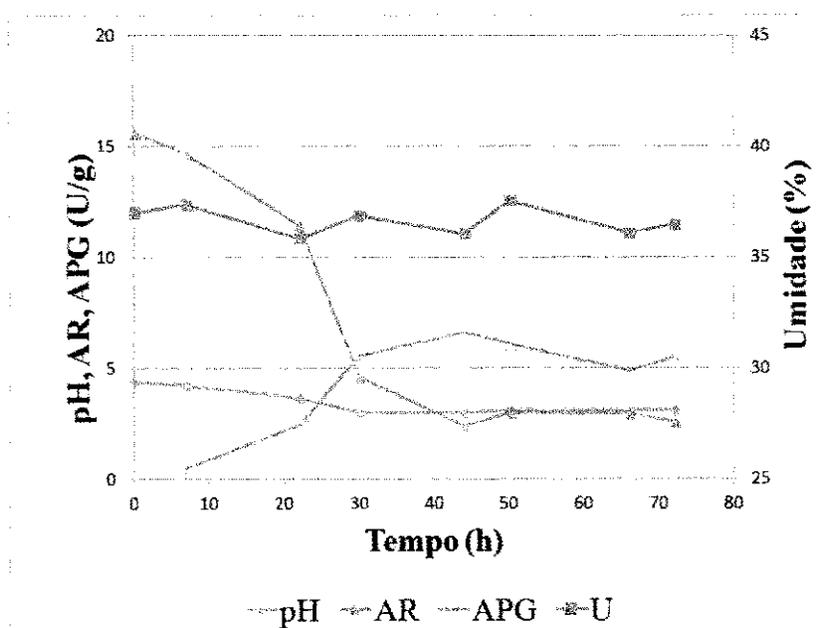


Figura 2 – Cinética da produção da PG
Ensaio 2 – Umidade 60% e Nitrogênio 0,5%

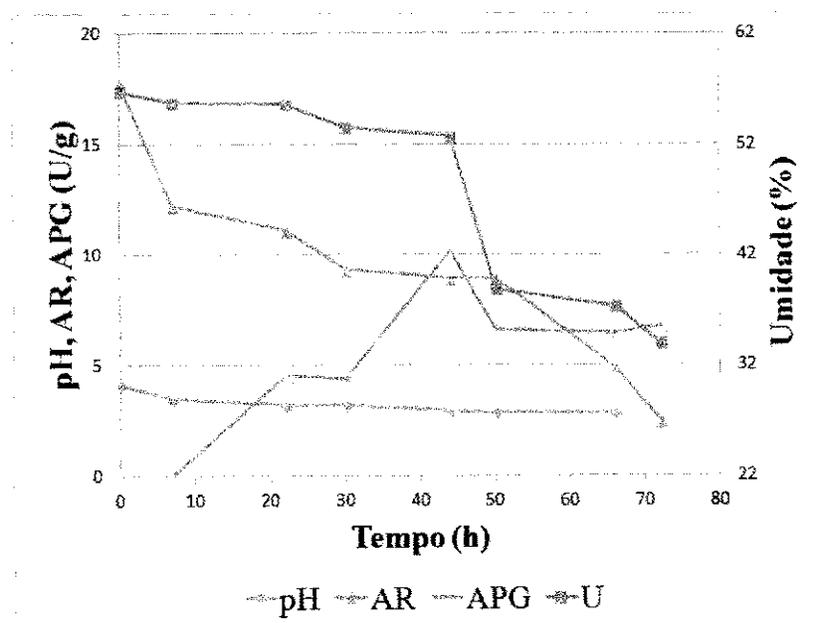


Figura 3 – Cinética da produção da PG
Ensaio 3 – Umidade 40% e Nitrogênio 1,5

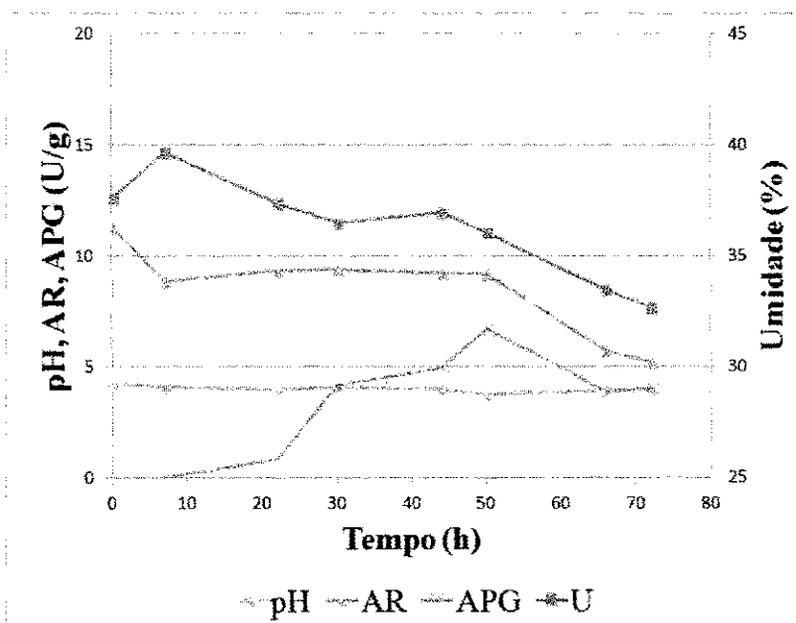


Figura 4 – Cinética da produção da PG
Ensaio 4 – Umidade 60% e Nitrogênio 1,5%

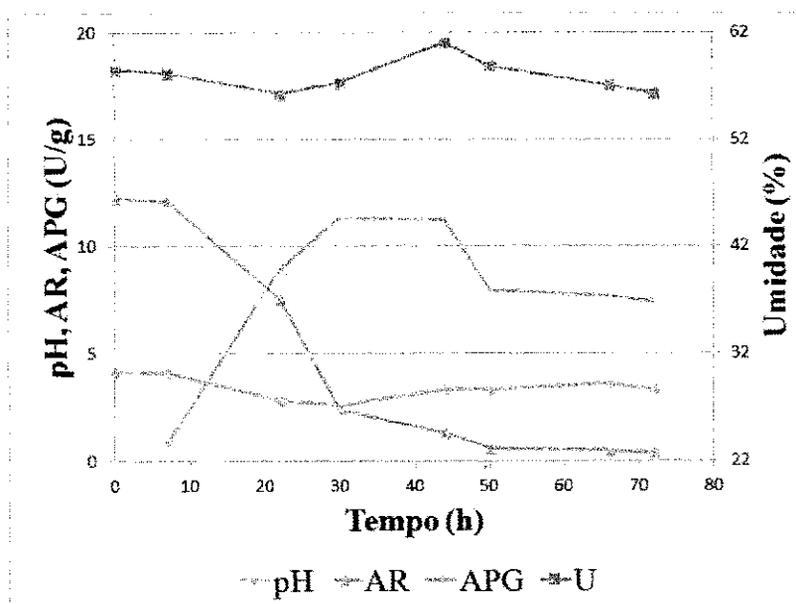


Figura 5 – Reprodutibilidade dos dados experimentais – Ponto central
(Umidade 50% e Nitrogênio 1,0%).

