



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE



CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**USO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE MANGABA  
(*Hancornia speciosa* Gomes) PARA OBTENÇÃO DE  
PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS**

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome

**Orientador:** Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos  
**Coorientador:** Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha

Natal/RN  
Agosto/2019

**Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome**

**USO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE MANGABA  
(*HANCORNIA SPECIOSA* GOMES) PARA OBTENÇÃO DE  
PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor (a) em Engenharia Química, sob a orientação do Professor Doutor Everaldo Silvino dos Santos e coorientação do Doutor Carlos Eduardo de Araújo Padilha.

Natal/RN  
Agosto/2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Jácome, Millena Cristiane de Medeiros Bezerra.  
Uso do resíduo industrial de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)  
para obtenção de produtos biotecnológicos / Millena Cristiane de  
Medeiros Bezerra Jácome. - 2019.  
124 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte,  
Centro de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia  
Química. Natal, RN, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos.

Coorientador: Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha.

1. Mangaba -resíduos agroindustriais- Tese. 2. Hancornia

**JÁCOME, Millena Cristiane de Medeiros Bezerra** - Uso do resíduo industrial de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) para obtenção de produtos biotecnológicos. Tese de Doutorado, UFRN, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Linha de Pesquisa: Processos químicos, catalíticos e biotecnológicos, Natal/RN, Brasil.

**Orientador:** Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

**Coorientador:** Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha

**Resumo:** Atualmente, a busca pelo uso integral dos resíduos da biomassa vegetal, tem sido considerada necessária na atenção ao meio ambiente, bem como a redução de custos e a valorização dessas matérias-primas. Entre esses materiais estão os resíduos agroindustriais amplamente empregados para a obtenção de diversos produtos como o óleo, extratos, enzimas, entre outros. Este estudo investigou o uso do resíduo despulpado de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) que foi caracterizado, destacando-se o seu teor de óleo, e utilizando-o como substrato para a produção de enzimas (lipase e pectinases) por fermentação em estado sólido (FES) utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* IOC 4003. O resíduo de mangaba e seus extratos etanólicos foram avaliados quanto aos aspectos físico-químicos e bioativos, destacando-se principalmente, o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante. Dentre as enzimas avaliadas, a poligalacturonase (PG) foi submetida à ensaios de estabilidade sob diferentes condições de temperatura e pH e aplicada na concentração de 1,0% no processo de clarificação do suco de mangaba. Destaca-se que o resíduo pós-fermentação foi usado para extração de lignina que foi aplicada na obtenção de biofilme de quitosana, avaliando-se a capacidade antioxidante destes bem como sua capacidade para aumentar a vida de prateleira do mamão papaia (*Carica papaya*) após o recobrimento. Os resultados mostraram que resíduo de mangaba possui atividade antioxidante com concentrações de compostos fenólicos totais de  $564,1 \pm 0,047$  mg de equivalente de ácido gálico/g de óleo extraído e Atividade Antioxidante Total - TCA de  $95,46 \pm 1,58$  mg de equivalente de ácido ascórbico/g de resíduo. Além disso, por FES foi possível produzir de lipases ( $50,11 \pm 0,02$  U/g), pectinases totais ( $0,45 \pm 0,01$  U/g) e poligalacturonases ( $76,32 \pm 0,11$  U/g). O extrato apresentou estabilidade à atividade de PG acima de 80% para temperaturas de 20 e 25 ° C, mantendo este nível de atividade por até 1 hora. No entanto, com redução significativa em temperaturas superiores a 40 °C. Em relação ao pH, a atividade da PG foi consideravelmente reduzida em pH alcalino e, em pH 4 e 5, a PG manteve sua atividade relativa acima de 50% por até 120 minutos. Quando aplicado com carga enzimática de 1,0 U/mL o extrato enzimático apresentou resultados satisfatórios no processo de clarificação do suco de mangaba permitindo uma redução de 34% na turbidez e 11% de viscosidade. Os biofilmes de quitosana a 2% adicionados com 0,1 % e 0,05% (m/m) de lignina alcalina apresentaram atividade antioxidante, com base na captura do radical DPPH. As frutas recobertas com as soluções filmogênicas tiveram suas vidas de prateleira aumentadas. Dessa forma, o resíduo de mangaba apresenta-se como matéria-prima de baixo custo e com potencial para a produção de produtos biotecnológicos de interesse para a sociedade.


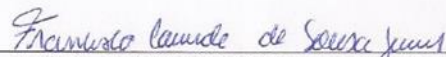

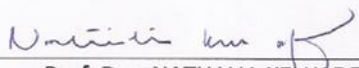
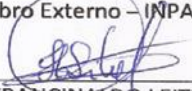

**Palavras-chave:** Mangaba, *Hancornia speciosa*, enzimas, lignina, biofilme

**Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome**

**USO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes) PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Aprovada em: 09 de agosto de 2019

 Dr. CARLOS EDUARDO DE ARAÚJO PADILHA Membro Externo – UFRN, Brasil	 Prof. Dr. FRANCISCO CANINDE DE SOUSA JUNIOR Membro Externo – UFRN, Brasil
 Dr. SÉRGIO DANTAS DE OLIVEIRA JÚNIOR Membro Externo – INPA, Brasil	 Prof. Dra. NATHALIA KELLY DE ARAUJO Membro Externo – IFRN, Brasil
 Prof. Dr. FRANCINALDO LEITE DA SILVA Membro Externo – IFPB, Brasil	 Prof. Dr. EVERALDO SILVINO DOS SANTOS Orientador – UFRN, Brasil

**JÁCOME, Millena Cristiane de Medeiros Bezerra** - Use of industrial mango seed (*Hancornia speciosa* Gomes) to obtain biotechnological products. PhD Thesis, UFRN, Post-graduation Program in Chemical Engineering, Research Line: Chemical, catalytic and biotechnological processes, Natal / RN, Brazil.

**Advisor:** Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

**Coorientador:** Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha

**Abstract:** Currently, the search for the full use of plant biomass residues has been considered necessary in the attention to the environment, as well as the reduction of costs and the valorization of these raw materials. Among these materials are agro-industrial waste widely used to obtain various products such as oil, extracts, and enzymes, among others. This study investigates the use of the characterized mangaba waste (*Hancornia speciosa* Gomes), highlighting its oil content, and using it as a substrate for the production of enzymes (lipase and pectinases). Solid-state fermentation (FES) using the filamentous fungus *Aspergillus niger* IOC 4003. Mangaba residue and its ethanolic extracts were evaluated for physicochemical and bioactive aspects, especially the total phenolic content and antioxidant capacity. Among the evaluated enzymes, polygalacturonase was submitted to stability tests under different temperature and pH conditions and applied at a concentration of 1.0% in the clarification process of mangaba juice. It is noteworthy that the post-fermentation residue was used for lignin extraction that was applied to obtain chitosan biofilm, evaluating their antioxidant capacity as well as their capacity to increase the shelf life of papaya (*Carica papaya*) after coating. The results showed that mangaba residue has antioxidant activity with total phenolic compound concentrations of  $564.1 \pm 0.047$  mg gallic acid equivalent / g extracted oil and Total Antioxidant Activity - TCA of  $95.46 \pm 1.58$  mg equivalent of ascorbic acid / g residue. Furthermore, by FES it was possible to produce lipases ( $50.11 \pm 0.02$  U / g), pectinases ( $0.45 \pm 0.01$  U / g) and polygalacturonases ( $76.32 \pm 0.11$  U / g). The extract showed stability to PG activity above 80% for temperatures of 20 and 25 ° C, maintaining this activity level for up to 1 hour. However, with significant reduction at temperatures above 40 ° C. In relation to pH, PG activity was considerably reduced at alkaline pH and, at pH 4 and 5, PG kept its relative activity above 50% for up to 120 minutes. When applied with enzymatic load of 1.0 U / mL, the enzymatic extract presented satisfactory results in the clarification process of mangaba juice allowing a 34% reduction in turbidity and 11% viscosity. The 2% chitosan biofilms added with 0.1% and 0.05% (w / w) alkaline lignin showed antioxidant activity, based on the capture of the DPPH radical. The fruits coated with filmogenic solutions had their shelf lives increased. Thus, mangaba waste is presented as a low cost raw material with potential for the production of biotechnological products of interest to society.

**Keywords:** *Hancornia speciosa*, enzymes, lignin, biofilms.

*Dedico essa tese à Lisianne Medeiros da Silva, minha irmã, que antes de qualquer um se alegrou comigo por termos uma doutora na família. Agora minha Lili é eternidade e meu coração é esperança de reencontra-la no céu. Te Amo!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus toda a minha gratidão e louvor pelo Seu amor generoso que sempre me socorreu e me manteve com os olhos fixos na Sua vontade.

À minha família, meu pai Edson e minha mãe Maria das Graças, meu irmão Anderson e minha irmã Lisianne – Já no Céu, por todo amor e apoio durante essa jornada. Vocês são a minha base e sou imensamente grata a Deus por cada um de vocês na minha vida.

Ao meu esposo João Maria pela paciência imensa que teve comigo diante de todos os desafios, por ser meu companheiro de todas as horas que nunca me deixou desanimar, essa Tese também é sua.

Aos meus irmãos da Comunidade Católica Shalom por toda a intercessão e torcida para dar tudo certo.

Ao meu orientador, Prof. Everaldo, que desde o princípio me acolheu no grupo e acreditou no meu trabalho me proporcionando um grande crescimento profissional.

A Carlos meu colega de trabalho e posterior Coorientador, pelo exemplo de pesquisador e de ser humano que com simplicidade vai conquistando seus sonhos, o meu muito obrigada.

Aos demais colegas do LEB: Ana Laura, Cleitiane, Patricia, Jaciara, Vitor, Whildson, Catherine, Sinara e Petrócia; aos já Doutores Emilianny, Priscila, Francinaldo e Sérgio meu muito obrigada por todo o apoio na execução dos trabalhos e companhia nos fins de semana de experimentos.

Aos meus ICs Cecília, por todo apoio nos experimentos e a Murilo, que desde o comecinho esteve comigo nessa jornada o meu carinhoso agradecimento.

À, Prof<sup>a</sup>. Gorete, Francisco (Hoje Professor) e a Waleska por fazerem parte da família LEB que com muita seriedade e parceria contribuíram para a construção desse trabalho.

Por fim, agradeço ao PPGEQ por todo apoio e estrutura para a concretização desse trabalho e ao CNPQ pela bolsa concedida durante todo o meu doutorado e a todas e todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização e finalização do meu trabalho.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação dos constituintes da parede celular vegetal e seus componentes estruturais. Fonte: Adaptado de Oliveira Júnior, 2018.....	22
Figura 2.2 – Frutos de mangaba ( <i>Hancornia speciosa</i> ). Fonte: A autora. ....	25
Figura 2.3 – FES de <i>Aspergillus niger</i> IOC 4003 em resíduo de mangaba. Fonte: próprio autor.....	27
Figura 2.4 - Processos que ocorrem durante a FES.....	28
Fonte: Adaptado de Hölker & Lenz (2005).....	28
Figura 2.5 – Reação de hidrólise catalisada pela lipase. Adaptado de Lasoń e Ogonowski (2010). ....	30
Figura 2.6 - Modo de ação das enzimas poligalacturonases. Reações de hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha$ -(1→4) dos resíduos de ácidos poligalacturônicos.....	31
Figura 2.7 - Fluxograma proposto para a caracterização e uso do resíduo de mangaba. ....	33
Figura 2.8 - Perfil de ácidos graxos referente ao óleo de resíduo de mangaba. ....	42
Figura 2.9 – Atividade Antioxidante do óleo de resíduo de mangaba nas diferentes concentrações.....	45
Figura 2.10 - Atividade antioxidante do óleo do resíduo de mangaba, onde a) Presença de óleo do resíduo de mangaba, b) Solução de DPPH. ....	46
Figura 3.1 – Resíduo despulpado de mangaba previamente lavado e seco Inteiro (A) e Moído (B). Fonte: Própria autora.....	51
Figura 3.2 – Fluxograma das etapas avaliadas para a valorização e uso integral do resíduo de mangaba.....	54
Figura 3.3 – A figura é composta por: (A) - Solução filmogênica principal (Q); (B) – Aplicação da solução filmogênica no mamão com auxílio de pincel; (C) – Finalização da aplicação. ....	63
Figura 3.4 – Aparato experimental para a realização do ensaio de barreira nos filmes de quitosana com adição de extrato etanólico e soluções de lignina formulados na seção 3.6.3. ....	65
Figura 3.5 – Atividade enzimática (A), da PG de <i>A. niger</i> IOC 4003 em resíduos de mangaba in natura e extraído e quantificação de proteínas (B), por tempo de fermentação. ....	69
Figura 3.6 - Estabilidade da PG de <i>A. niger</i> utilizando resíduo de mangaba extraído como substrato quando submetida a diferentes temperaturas (A) e pHs (B). ....	69
Figura 3.7 – Gel de eletroforese dos extratos brutos obtidos por FES do resíduo de mangaba por <i>A. niger</i> IOC 4003.....	70

Figura 3.8 – Valores médios de perda de massa relativa em relação ao tempo em mamões papaia in natura e revestidos com soluções filmogênicas Q, QE, QL 0,05 e QL 0,1 as mesmas descritas na seção 3.6.3. ....	76
Figuras 3.9 – Qualidade e tempo de prateleira de mamões papaia com e sem recobrimento de soluções filmogênicas de quitosana (Q) com adição de extrato etanólico (EX) e soluções de lignina (LIG 0,05 e LIG 0,1); formulados conforme a seção 3.6.3. ....	77
Figura 3.10 – Biofilmes obtido pelo método de fundição por solvente: (A) biofilme de quitosana (Q); (B) biofilme de quitosana + extrato etanólico (QE); (C) biofilme de quitosana + sol. Lignina 0,05% (QL0,05); (D) biofilme de quitosana + sol. Lignina 0,1% (QL0,1). ....	78
Figura 3.11 - Atividade antioxidante para sequestro de DDPH no início e fim do experimento com redução aparente de intensidade da cor nas soluções contendo 100 mg dos biofilmes sendo: (A - Q), (B - QE), (C - QL0,05) e (D - QL0,1), nas formulações descritas na seção 3.6.3. ....	79
Figura 3.12 – Capacidade de sequestro do radical DPPH pela ação antioxidante dos biofilmes de quitosana nas formulações: (Q), (QE), (QL0,05) e (QL0,1) descritas na seção 3.6.3. ....	80
Figura 3.13 - Superfície de contato dos filmes a base de quitosana estudados nas formulações descritas na Seção 3.6.3. ....	80
Figura 3.14 - FTIR de biofilmes a base de quitosana adicionados de extrato etanólico e soluções de lignina nas formulações apresentadas na Seção 3.6.3. ....	83
Figura 3.15 - Micrografias de MEV mostrando a morfologia da superfície de (A) filme de quitosana – (Q), (B) quitosana e extrato etanólico – (QE), (C) quitosana e solução de lignina a 0,05% - (QL0,05) e (D) quitosana e solução de lignina a 0, 1% - (QL0,1) com aproximação de 300, 1500 e 5000x. ....	84
Figura 3.16 - Perfil de TGA para os biofilmes a base de quitosana. ....	86
Figura 3.17 - Perfil de DTG para os biofilmes a base de quitosana. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição (porcentagem de massa seca) dos diferentes resíduos.....	39
Tabela 2.2 - Composição centesimal do resíduo de mangaba. ....	39
Tabela 2.3 - Valores médios das características físico-químicas do óleo .....	40
Tabela 2.4 - Composição em termos de ácidos graxos do óleo do resíduo de mangaba.....	42
Tabela 2.5 - Produção de enzimas e quantificação de proteínas .....	47
Tabela 3.1 - Análises físico-químicas no suco de mangaba clarificado pela ação de PG de <i>A. niger</i> IOC 4003 e suco in natura de mangaba. ....	71
Tabela 3.2 – Valores de Taxa de transmissão e permeabilidade aos vapores de água nos biofilmes a base de quitosana. ....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ART	Açúcares redutores totais
A.E	Atividade enzimática
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de Soro Bovino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNS	Ácido 3,5 – dinitro-salicílico
DPPH	2,2 difenil-1-picrilhidrazil
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
PG	Poligalacturonase
Endo-PGase	Endo-poligalacturonase
Exo-PGase	Exo-poligalacturonase
U/g	Unidade de atividade por grama
TVw	Taxa de transmissão dos vapores de água
PVw	Permeabilidade aos vapores de água

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	15
1.1 - Introdução Geral .....	15
2. Resíduo de mangaba ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) potencialmente utilizado na extração de antioxidantes e produção de enzimas .....	20
2.1 Revisão bibliográfica .....	20
2.1.1 – Biomassas lignocelulósicas .....	20
2.1.2 – Estrutura dos materiais lignocelulósicos .....	21
2.1.3 - Resíduos agroindustriais .....	23
2.1.4 – Mangaba .....	24
2.1.5 - Fermentação em estado sólido (FES) .....	26
2.1.6 – Enzimas, lipolíticas e pectinolíticas .....	29
2.2 Objetivos .....	32
2.2.1 Objetivo Geral .....	32
2.2.1 Específicos .....	32
2.3 - Material e método .....	32
2.3.1 Caracterização físico-química do resíduo de mangaba .....	33
2.3.2 Extração do óleo do resíduo de mangaba .....	33
2.3.3 Análise físico-química no óleo .....	34
2.3.4 Compostos fenólicos do óleo .....	34
2.3.5 Atividade antioxidante .....	34
2.3.6 Perfil dos ácidos graxos totais .....	35
2.3.7 Fermentação em estado sólido (FES) .....	35
2.3.8 Quantificação da atividade enzimática e proteínas totais .....	36
2.3.4 Análise estatística .....	37
2.4. Resultados e discussão .....	38
2.4.1 Caracterização físico-química de resíduo de mangaba .....	38
2.4.2 Extração de óleo e sua caracterização .....	40
2.4.2.1 Análise da composição do óleo do resíduo de mangaba. ....	42
2.4.2.2 Compostos Fenólicos Totais (CFT) .....	44
2.4.2.3 Atividade antioxidante do óleo do resíduo de mangaba .....	44
2.4.3 Fermentação em estado sólido .....	46

2.5 - Conclusão .....	47
3 - Uso do resíduo de mangaba ( <i>Hancornia speciosa gomes</i> ) para produção de poligalacturonase visando clarificação de suco e explorando conteúdo de lignina para modificar filmes de quitosana.....	50
3.1. Revisão bibliográfica .....	50
3.1.1. Valorização de resíduos agroindustriais .....	50
3.1.2 – Resíduo despulpado de Mangaba .....	51
3.1.2 – Aplicação de poligalacturonase para clarificação de suco de frutas.....	52
3.1.3 – Biofilmes de quitosana e lignina.....	52
3.2 – Objetivos.....	53
3.2.1 - Objetivo geral .....	53
3.2.2 – Objetivos específicos .....	53
3.3 - Material e métodos .....	54
3.3.1 - Reagentes.....	54
3.3.2 - Resíduo de Mangaba ( <i>Hancornia speciosa Gomes</i> ) .....	55
3.3.3 – Pectina.....	55
3.3.4 – Extrato etanólico .....	55
3.4 – Avaliação das propriedades antioxidantes no extrato.....	56
3.4.1 - Ensaio da capacidade antioxidante total.....	56
3.4.2 – Sequestro do radical DPPH.....	56
3.5 – Fermentação em Estado Sólido (FES).....	56
3.5.1 – Microorganismo e produção de inóculo .....	56
3.5.2 – Produção de Poligalacturonase. ....	57
3.5.3 – Atividade da Poligalacturonase e teor de proteínas totais .....	57
3.5.4 – Efeito da temperatura e pH na estabilidade da enzima.....	58
3.5.5 – Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	59
3.5.6 - Extração de lignina da biomassa fermentada .....	59
3.6 - Aplicações dos produtos obtidos a partir do resíduo de mangaba.....	60
3.6.1 Uso do extrato enzimático de <i>A. niger</i> IOC 4003 (PGase) no processo de clarificação do suco de mangaba.....	60
3.6.2 – Formulação dos filmes de quitosana para aplicação de lignina e extrato etanólico.....	61
3.6.3 - Análise dos biofilmes produzidos .....	62
3.7 Análise estatística .....	66
3.8 Resultados e discussão.....	66

3.8.1 Conteúdo de pectina.....	66
3.8.2 Propriedades antioxidantes do extrato do resíduo não fermentado .....	67
3.8.3 Produção e quantificação de poligalacturonase e proteínas.....	68
3.8.4 Estabilidade da Poligalacturonase. ....	69
3.8.5 Aplicação enzimática e propriedades do suco clarificado. ....	71
3.8.6 Lignina recuperada do resíduo fermentado .....	74
3.8.7 Análises dos filmes de quitosana adicionado de lignina e extrato etanólico. ....	75
3.8.7.1 Análises de recobrimento em mamões papaia utilizando as soluções filmogênicas a base de quitosana. ....	75
3.8.5.2 Elaboração e análises nos biofilmes a base de quitosana adicionados de extrato etanólico e soluções de lignina. ....	78
3.8.5.2.1 Propriedade antioxidante - Atividade de eliminação do radical (AER) dos filmes .....	78
3.8.5.2.2 Hidrofobicidade de superfície de biofilmes.....	80
3.8.5.2.3 Análise estrutural por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	81
3.8.5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	83
3.8.5.2.5 Estabilidade térmica dos biofilmes a base de quitosana. ....	85
3.8.5.2.6 Análises de taxa de transmissão (TVw) e permeabilidade aos vapores de água (PVw), nos biofilmes a base de quitosana. ....	87
3.9 - Conclusão .....	89
4 - Considerações finais .....	91
Referências bibliográficas.....	94

---

# **CAPÍTULO 1**

Introdução

---



# 1. Introdução

## 1.1 - Introdução Geral

Milhares de toneladas de resíduos agroindustriais são gerados no processamento de diversas culturas. Grande parte destes resíduos não tem aplicação, impactando o meio ambiente devido, principalmente, ao tratamento inadequado como queima a céu aberto, descarte ou enterro desses resíduos. A geração de biomassa no Brasil proveniente de resíduos agrícola e agroindustrial teve uma oferta mássica em 2015 de 768 e 130 milhões de toneladas respectivamente, com uma projeção de crescimento até 2030 de 1196 e 207 milhões de toneladas desses resíduos, um aumento de aproximadamente 55 e 59% respectivamente (MORAES et al. 2017).

No agronegócio global, a importância da fruticultura brasileira é inquestionável, o país é responsável por cerca de 5 % da produção mundial de frutas sendo que anualmente são mais de 43 milhões de toneladas, caracterizando-o como o terceiro maior produtor mundial. (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2017). Como consequência, há um aumento no número de agroindústrias instaladas no país, gerando um crescimento na produção de resíduos agroindustriais de origem vegetal (LOUSADA JUNIOR et al., 2005). Desta forma, agregar valor a estes subprodutos se torna fundamental para minimizar possíveis impactos ambientais, gerando maior interesse econômico (SOUSA et al., 2011).

Destaca-se que é crescente o estudo do aproveitamento de resíduos, especialmente os agroindustriais de origem vegetal, tais como resíduos de frutas, polpa e folhas de café, bagaço de mandioca, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais na produção de enzimas, etanol e ácidos orgânicos, gerando produtos de grande valor econômico e atendendo a conceitos de sustentabilidade. Assim, nos últimos anos diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas visando à transformação da matéria-prima em bens úteis sem danificar o meio ambiente, colocando os resíduos como insumos para outros produtos (ISRAEL, 2005).

Nos resíduos agrícolas de origem vegetal estão presentes principalmente a pectina, a celulose, a hemicelulose e a lignina e, em sua maioria, esses materiais lignocelulósicos podem ser utilizados naturalmente como fonte de carbono por diversos microrganismos, em diferentes processos, como na produção de enzimas (BADHAN et al., 2007).

Estima-se que no Brasil a produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais renováveis disponíveis, poderia chegar a mais de  $10^7$  toneladas de amilases,  $10^7$  toneladas de celulases e  $10^8$  toneladas de lipases, evidenciando o potencial brasileiro para produção de enzimas a partir destes tipos de substratos (CASTRO; CASTRO, 2012).

Dentre as enzimas mais utilizadas comercialmente estão as lipases, triacilglicerol acil hidrolases, que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. As lipases ocorrem amplamente na natureza, mas apenas as lipases microbianas são comercialmente significativas. As muitas aplicações de lipases incluem as sínteses orgânicas especiais, hidrólise de gorduras e óleos, modificação de gorduras, realce de sabor no processamento de alimentos, resolução de misturas racêmicas e análises químicas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; TREICHEL et al., 2010).

Também bastante utilizadas, as enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas presentes nas plantas. Neste grupo estão as poligalacturonases, pectina liase e pectina metilesterase que hidrolisam as ligações glicosídicas de substâncias pécticas. As pectinases são importantes enzimas do setor biotecnológico com 25% de participação no mercado mundial de enzimas para alimentos e bebidas (XIA; LI, 2018).

A utilização de resíduos provenientes das indústrias de processamento de sucos de frutas é uma excelente alternativa para reaproveitamento de biomassa e geração de enzimas que poderão ser aplicadas na própria indústria. Barman et al. (2015) utilizaram casca de banana para cultivar o fungo *Aspergillus niger*, visando a indução da produção de poligalacturonases (PG), para clarificação do suco de banana. A mesma espécie também foi capaz de produzir PG em resíduo de tomate (AJAYI et al., 2015), maracujá (MACIEL et al., 2014), casca de limão (RUIZ et al., 2012) e casca de laranja (MRUDULA; ANITHARAJ, 2011).

Uma alternativa para a obtenção de enzimas como as lipases e pectinases visando um menor custo de produção é o cultivo microbiano em resíduos agroindustriais de origem vegetal por fermentação em estado sólido (FES). Nesse processo os microrganismos crescem sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo de líquido ligado a ela está em um nível de atividade de água que assegure o crescimento e o metabolismo das células sem exceder à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001). Devido aos baixos níveis de água nesse tipo de sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maior atenção nas atuais pesquisas, pois apresentam maior capacidade de

crescimento em baixas quantidades de água livre, uma vez que se adequam ao meio e excretam grandes quantidades de enzimas nestas condições.

Nesse contexto, um resíduo agroindustrial de origem vegetal com grande potencial biotecnológico é o resíduo de mangaba. A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma fruteira pertencente à família *Apocynaceae*, nativa do Brasil e que está presente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste nas áreas do cerrado e caatinga (VENTURINI FILHO, 2010). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) no Brasil, em 2017, foi de aproximadamente 1022 toneladas, sendo que deste total aproximadamente 77,0% é destinado ao processamento, gerando um grande volume de resíduo que não é utilizado na alimentação humana (PERFEITO et al., 2015). Ainda segundo esses autores, 67,63 kg/h de resíduo são produzidos durante o processamento da fruta. Destaca-se que o resíduo derivado do processamento da mangaba é rico em nutrientes como proteínas, fibras e ácidos graxos (BEZERRA JÁCOME, 2014). Segundo Ferro (2012) há uma relação entre a quantidade de sementes e a massa da fruta. Sendo assim, quanto maior a fruta, maior a quantidade de sementes com o rendimento da polpa permanecendo constante, tanto para frutos grandes quanto para frutos pequenos. Dessa forma, o resíduo de mangaba, apresenta-se com potencial a ser utilizado como fonte de carbono por microrganismos para a obtenção de moléculas com maior valor agregado, tais como enzimas bem como pode ser mais explorado no intuito do seu reaproveitamento integral.

A literatura reporta alguns estudos no reaproveitamento desse resíduo como supracitado. Porém, a utilização integral do resíduo de mangaba ainda pode ser mais explorada. Dentro desse contexto, vislumbra-se a possibilidade de obter concentrados enzimáticos lipolíticos e pectinolíticos por meio do processo de fermentação em estado sólido com o resíduo da mangaba utilizando um fungo filamentosos, assim como suas aplicações entre outros subprodutos provenientes desse resíduo, tais como a aplicação da lignina extraída do resíduo da mangaba em biofilmes de quitosana.

Por tanto a presente tese foi desenvolvida e está escrita em formato de capítulos, no qual o capítulo 2, após uma breve introdução e uma revisão bibliográfica, apresenta-se e discute-se os resultados da caracterização do resíduo de mangaba bem como seu reaproveitamento na extração de compostos antioxidantes e produção de enzimas.

No capítulo 3, após breve introdução e uma revisão bibliográfica, apresenta-se os resultados da utilização integral desse resíduo na produção de poligalacturonase e aplicação

---

na clarificação de suco de mangaba, assim como a extração de lignina e aplicação em biofilmes de quitosana.

O capítulo 4 e 5, por sua vez, apresentam as considerações e conclusões gerais do trabalho, respectivamente. As referências bibliográficas utilizadas no estudo se encontram listadas no fim do documento.

---

## **CAPÍTULO 2**

Resíduo de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)  
potencialmente utilizado na extração de antioxidantes  
e produção de enzimas.

---

## **2. Resíduo de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) potencialmente utilizado na extração de antioxidantes e produção de enzimas.**

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização do resíduo de mangaba e extração de antioxidantes e produção de enzimas obtidas através de fermentação em estado sólido. Primeiramente, foi realizada a caracterização do resíduo de mangaba de maneira a utiliza-lo como substrato na FES para a produção de lipase e pectinase. Esses resultados foram organizados na forma do artigo intitulado “**Mangaba residue (*Hancornia speciosa* GOMES) potentially used for producing antioxidants and lignocellulosic enzymes**”, e publicado com adaptações no periódico **Biosciences Biotechnology Research Asia**, e que pode ser acessado a partir do endereço eletrônico DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2719>.

### **2.1 Revisão bibliográfica**

#### **2.1.1 – Biomassas lignocelulósicas**

Ainda na antiguidade os materiais lignocelulósicos eram utilizados pelo homem para a obtenção de energia na queima de galhos e folhas, na utilização da energia térmica com o aquecimento, preparo de alimentos e a iluminação, também utilizada no combate aos predadores. No período da revolução industrial o carvão mineral passou a ser a principal fonte de energia. Só então, com o advento do motor a explosão o petróleo passa a ser utilizado como fonte de energia (MOREIRA et al., 2016).

À utilização de combustíveis fósseis de origem não renovável contribuiu com o crescimento da qualidade de vida de toda a sociedade mais também provocou diversos problemas ambientais. Então, a atenção de pesquisadores e investidores tem se voltado novamente aos materiais lignocelulósicos que são fonte de energia renovável assim como pelo fator ambiental e socioeconômico que tem contribuído de forma positiva para a geração de produtos que buscam reaproveitar esses materiais. (MOREIRA et al., 2016; BALAT, 2010).

As biomassas lignocelulósicas podem ser entendidas também como os vários resíduos agrícolas dentre eles as cascas, caules, pedúnculos, folhas, palhas, resíduos de indústrias de polpa e papel, e ainda os resíduos de colheitas de verduras e hortaliças. Todo esse material

vem sendo acumulados na natureza representando um problema ambiental, porém é importante destacar que esses resíduos são ricos em fonte de carbono e de outros componentes que são essenciais para a síntese de vários produtos e biomoléculas (MORETTI *et al.*, 2012).

Em países como o Brasil, onde o agronegócio impulsiona a economia nacional, a gestão de resíduos vem se tornando cada vez mais importante nas empresas (SHARMA *et al.*, 2016). Segundo Rocha *et al.*, (2012), com a atividade de agricultura é muito significativa no Brasil, os resíduos de colheita são os que possuem maiores possibilidades de uso por serem mais disponíveis em quantidade e diversidade. É nesta conjuntura que a biotecnologia apresenta perspectivas de novos usos a estes resíduos.

### **2.1.2 – Estrutura dos materiais lignocelulósicos**

Há uma grande oferta de materiais lignocelulósicos no Brasil que são formados principalmente por três componentes, a celulose (35 a 50%), a hemicelulose, (20 a 35%) e a lignina, (15 a 20%) que podem ser utilizados naturalmente como fonte de carbono por diversos microrganismos, em diferentes processos como para a produção de enzimas (MOOD *et al.*, 2013; BADHAN *et al.*, 2007). O maior constituinte desses materiais é a celulose que é um polímero de cadeia linear constituído de glicose com repetições de duas unidades básicas, denominadas de celobiose (ZHANG *et al.*, 2006). Segundo Balat (2008), o heteropolímero de hemicelulose é formado pela repetição de diversos açúcares como glicose, galactose, manose, arabinose e xilose. Com uma estrutura composta por grupos com alta massa molar, presença de anéis aromáticos e amorfa, a lignina é responsável por conferir a biomassa rigidez e resistência (PEREIRA *et al.*, 2008). A estrutura da parede vegetal representada na Figura 2.1, apresenta a sua composição bastante heterogênea sendo necessário a ação de várias enzimas lignocelulolíticas (celulases e hemicelulases) para catalisar a hidrólise desses polímeros (UDAY *et al.*, 2016).

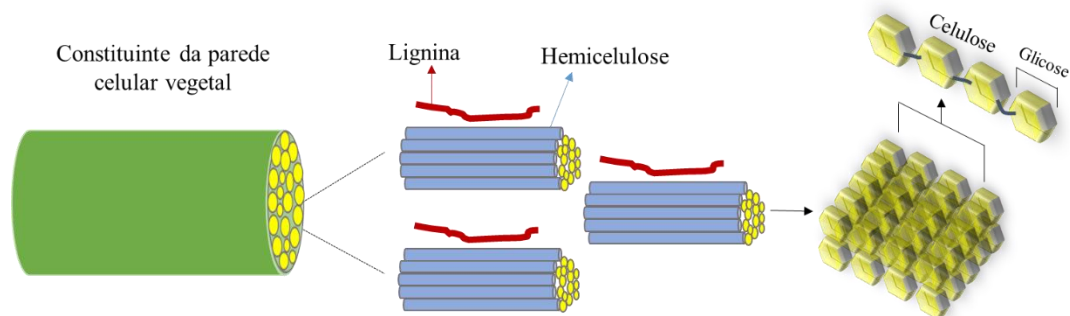


Figura 2.1 - Representação dos constituintes da parede celular vegetal e seus componentes estruturais. Fonte: Adaptado de Oliveira Júnior, 2018.

De acordo com Dias et al., (2013), o material lignocelulósico é composto por uma estrutura cristalina vegetal altamente estável que deve ser rompida mediante pré-tratamentos para disponibilizar a fração sacarídica (celulose e hemicelulose) na forma de açúcares fermentescíveis. As cadeias de celulose são ligadas entre si por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, formando as fibrilas elementares, que contêm 36 cadeias unidas apresentando cerca de 3 nm a 4 nm de largura (DELMER; AMOR, 1995)

Dentro de cada uma das fibrilas elementares, onde as cadeias de celulose são dispostas, existem regiões altamente ordenadas (cristalinas) e outras regiões que estão desordenadas (amorfa) (DOBLIN et al., 2010; HARRIS; SMITH, 2006; KEEGSTRA, 2010).

A junção das fibrilas umas às outras se dá através da hemicelulose, que é um polissacarídeo amorfo. A lignina é o composto que recobre essas estruturas, sua composição é formada por um polímero aromático constituído por três estruturas básicas fenólicas, o álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico e seus derivados (DELMER; AMOR, 1995).

A principal fração dos componentes de hemicelulose dos resíduos agroindustriais é a xilana que é um polissacarídeo amorfo, formado por unidades de xilose e que pode ser hidrolisado pela ação de ácidos em temperaturas brandas (BIER et al., 2007). O resíduo sólido resultante da hidrólise ácida contém frações de lignina e de celulose que podem ser separadas e utilizadas de maneiras diversas. O meio líquido obtido da hidrólise ácida apresenta açúcares solúveis e podem ser utilizados como fonte de carbono em processos fermentativos como o da produção de xilitol (PARAJÓ et al., 1998).

Muitos estudos, visando a aplicação e o aproveitamento da biomassa lignocelulósicas, tem sido desenvolvidos nas últimas décadas principalmente para o uso das frações de celulose,



lignina e hemicelulose (CHEN; WAN, 2017; VENKATESWAR et al., 2016; ZHAO et al., 2009). Por exemplo as enzimas ligninolíticas têm apresentado diversas aplicações biotecnológicas, dentre as quais podemos citar: na indústria de alimentos com a remoção de compostos fenólicos de alimentos e da cerveja; na indústria têxtil com a degradação de corantes e branqueamento; na biorremediação com a biodegradação de xenobióticos; na síntese orgânica; nas aplicações médicas, farmacológicas, em cosméticos e em nanotecnologia com a produção de polímeros, biossensores, síntese de compostos funcionais, entre outros (MACIEL et al., 2010).

### **2.1.3 - Resíduos agroindustriais**

Os resíduos agroindustriais são geralmente os melhores substratos para processos de fermentação em estado sólido (FES), tendo grande potencial na produção de enzimas. A seleção de um substrato para esta finalidade depende de vários fatores, principalmente relativo ao custo e disponibilidade destes resíduos (PANDEY et al., 2000). A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo que se baseia na agricultura, produzindo e exportando café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros, o que significa uma ótima contribuição para o desenvolvimento da economia. Entretanto, a elevada produção desses materiais agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Essas milhares de toneladas de resíduos geradas pelo processamento agroindustrial tem causado uma grande preocupação, sendo importante a busca de alternativas para agregar valor e interesse econômico a estes resíduos, que necessitam de uma investigação científica e tecnológica para possibilitar sua utilização uma vez que são ricos em compostos bioativos (MARTINS & FARIAS, 2002; BALASUNDRAM et al., 2006). Segundo Matias et al. (2005), o resíduo gerado pela agroindústria apresentam uma composição com relevantes variações visto que este subproduto pode ser formado por diferentes constituintes como caroços, cascas, sementes, e até mesmo pela polpa.

A utilização de resíduos agroindustriais não consiste apenas no reaproveitamento destes como ração animal, ou adubo orgânico. É necessário mais investimento em pesquisas para descobrir novos potenciais para a utilização destes resíduos, contribuindo assim, para o desenvolvimento da indústria biotecnológica além de preservar o meio ambiente e diminuir a

fome da população, considerando que estes subprodutos, são uma ótima fonte de nutrientes (NASCIMENTO FILHO & FRANCO, 2015)

Sendo assim, os resíduos agrícolas bem como aqueles advindos de biorrefinarias oferecem uma vasta gama de possibilidades para novos meios de cultura na produção de enzimas de baixo custo (BORIN et al., 2015; SORENSEN et al., 2011). Geralmente para a utilização dos substratos sólidos naturais se faz necessário algum tipo de pré-tratamento para deixar seus componentes químicos mais acessíveis e sua estrutura física mais suscetível para o crescimento dos micélios. Nesses pré-tratamentos são usados os processos físicos, químicos, mecânicos e biológicos ou a combinação desses (MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008). O uso de estratégias viáveis economicamente é de grande importância para a modificação da estrutura das biomassas e a produção de biomoléculas de interesse para a sociedade (SUN et al., 2004). Os pré-tratamentos físicos envolvem a trituração ou moagem para reduzir o tamanho das partículas, tornando-as mais acessíveis. O pré-tratamento químico com ácido ou base em temperaturas altas pode facilitar a difusão intra-partícula e também pode ser importante na hidrólise de macromoléculas, produzindo nutrientes solúveis (MITCHELL et al., 2000).

#### **2.1.4 – Mangaba**

Nativa de regiões de cerrado do Brasil, a mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Figura 2.2) da família *Aponynaceae* cujo fruto é produzido mais abundantemente, de outubro a dezembro, é encontrada em várias regiões do país, desde tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste, onde é mais presente, até áreas de cerrados das regiões Norte e Sudeste (VIEIRA NETO, 2002). De acordo com dados do IBGE, referentes à produção da extração vegetal e da silvicultura nacional, em 2017 foram produzidas 1022 toneladas da fruta. Neste mesmo ano, o estado do Rio Grande do Norte produziu 167 toneladas de mangaba, o que corresponde à aproximadamente 16,34 % da produção nacional (IBGE, 2017). Segundo Clerici; Silva (2011), a mangaba possui potencial para ampliar sua produção devido às condições climáticas do país e perspectivas para a indústria.



Figura 2.2 – Frutos de mangaba (*Hancornia speciosa*). Fonte: A autora.

Nos últimos anos a busca por produtos mais saudáveis e com novos sabores tem se difundido e o consumo de produtos derivados de frutos nativos vem estimulando o extrativismo e até mesmo o plantio comercial da mangabeira (PERFEITO, 2014). Com isso em apenas cinco anos a produção nacional de mangaba (fruto) aumentou aproximadamente 34%, saltando de 677 toneladas para 1022 toneladas em 2017. No estado do Rio Grande do Norte esse crescimento mais que dobrou a produção, passando de 79 toneladas em 2012 para 167 toneladas.

Perfeito (2014) relata que os grandes centros urbanos tem apresentado uma forte demanda por produtos com maior conveniência, mantendo a cor e sabor das frutas *in natura*, bem como seus componentes nutricionais e funcionais. O processamento de frutas traz praticidade para o consumidor e conserva as características químicas e organolépticas da fruta, além de permitir a oferta de frutas sazonais por um período maior de tempo.

Aproximadamente 77% dos frutos de mangaba são aproveitados no processamento, gerando um grande volume de resíduo que não é utilizado na alimentação humana, sendo que aproximadamente 67,63 kg/h de resíduo são produzidos durante o processamento da fruta. (PERFEITO et al., 2015). Os resíduos derivados do processamento da mangaba, em grande parte sementes, são ricos em nutrientes tais como: proteínas, fibras, sais minerais, ácidos graxos (SOUZA & AQUINO, 2012).

Vieira (2007) realizou estudos com a farinha de sementes de mangaba e verificou que a composição média da farinha de sementes de mangaba apresentou um teor de proteínas de 11,4 %, teor de lipídeos de 24,7 %, teor de carboidratos de 25,7 % e porcentagem de fibras de 35 %. Apesar desse resíduo ser rico nestes nutrientes é subaproveitado pelas indústrias, que repassam para produção de ração animal ou para produção de adubo.

Por outro lado, Souza & Aquino (2012) buscaram aproveitar as sementes de mangaba, efetuando o enriquecimento proteico da farinha de sementes de mangaba através de

fermentação em estado sólido utilizando o microrganismo *Aspergillus niger*. O aumento proteico na farinha de sementes de mangaba em proteínas totais solúveis, proteína bruta e teor de metionina foram de 5,0, 3,2 e 2,0 vezes em relação ao valor inicial. Nesse contexto, Santos (2014) avaliou o aproveitamento das sementes de mangaba para a produção de bio-óleo, a fim de minimizar problemas de poluição devido à disposição inadequada dos resíduos e agregar valor a este passivo ambiental.

Dessa forma, a grande oferta de nutrientes presentes no resíduo de mangaba possibilita que a mesma seja empregada como substrato para o processo de fermentação visando à produção de enzimas dentre as quais as poligalacturonases (PG).

### **2.1.5 - Fermentação em estado sólido (FES)**

Como um dos meios eficazes para o reaproveitamento dos materiais lignocelulósicos para a produção de biomoléculas tem-se a fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólida (FSS), que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), em que o conteúdo de líquido (substrato ou solução umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células, e por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001).

O uso da FES como técnica de cultivo de microrganismos para produção de diversas biomoléculas é antigo. Por volta de 1940 os estudos com FES sofreram desinteresse em virtude da produção da penicilina por fermentação submersa (FS), em decorrência da Segunda Guerra Mundial. Contudo, na década de 70 foram realizados novos estudos mais aprofundados sobre a FES, relacionados à ração animal enriquecida com proteínas utilizando resíduos agroindustriais, mostrando assim viabilidade e agregando valor aos resíduos utilizados (OLIVEIRA JÚNIOR, 2018).

A FES é definida ainda como o processo de desenvolvimento microbiano em superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, isto é, isento de água livre (RAHARDJO et al., 2006), sendo estes materiais sólidos biodegradáveis ou não, com ou sem nutrientes solúveis. A FES é uma alternativa adequada e de baixo custo para produzir enzimas e biomoléculas (EL-BAKRY et al., 2015).

A FES é empregada na produção de diversos tipos de enzimas com aplicação industrial. Este processo, além de geralmente ser mais eficiente que a fermentação submersa

na produção enzimática, permite a utilização de diferentes resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para o crescimento microbiano, os quais muitas vezes são descartados e/ou usados para finalidades que pouco agrega valor aos mesmos (SAXENA & SINGH, 2011). Algumas características da FES são: alta produtividade, alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia. Por outro lado, apresentam dificuldades no controle das possíveis variáveis do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Nesse tipo de processo, o principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba favorecendo o uso de fungos filamentosos no processo, devido os mesmos se adaptarem bem a essa condição (PANDEY, 2003).

Dentre as vantagens da FES, estão: menor contaminação devido à baixa quantidade de água no meio; maior solubilização de oxigênio e outros gases; menor consumo de micronutrientes e sais; menor custo de equipamentos e demanda de energia (FARINAS, 2015; YOON et al., 2014). Esta aplicação apresenta um forte potencial de utilização industrial, devido à redução de custos na produção em diversos segmentos, principalmente devido à disponibilidade destes resíduos, além representar um problema ambiental quando descartados de forma inadequada (MÉLO, 2016).

Nos cultivos de larga escala, o calor produzido pela FES deve ser retirado, o que é mais difícil do que no processo de FS, além do cálculo de rendimento de produtos serem mais complexos (HANSEN et al., 2015). A Figura 2.3 ilustra um cultivo em FES utilizando resíduo de mangaba como substrato e o fungo *Aspergillus niger* como agente fermentador.

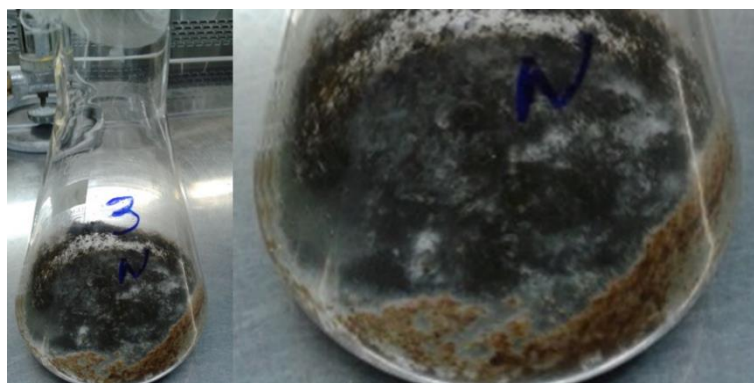


Figura 2.3 – FES de *Aspergillus niger* IOC 4003 em resíduo de mangaba.  
Fonte: próprio autor.

Na FES, durante o crescimento, o fungo se desenvolve na forma de micélio, em que são produzidas hifas aéreas e penetrantes no substrato. A Figura 2.4 ilustra os principais eventos que ocorrem durante a FES. Depois da esporulação, as hifas fúngicas se desenvolvem em uma matriz micelial que se espalha pela superfície das partículas que compõem o substrato sólido. A partir da matriz micelial, hifas aéreas e penetrativas se desenvolvem atuando de diferentes formas. Na superfície do substrato e dentro dos poros ocorre atividade metabólica, entretanto nas regiões expostas ao micélio também apresentam metabolismo e pode haver transporte de substâncias da hifa penetrativa para a aérea. As enzimas hidrolíticas, que são produzidas pelo micélio, difundem-se para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores, que servem como nutrientes para o fungo. O oxigênio é consumido e são produzidos durante a fermentação o gás carbônico, água, aquecimento e produtos bioquímicos. Outro fator importante é o pH, que pode ser modificado devido à liberação de ácidos de carbono. Com tudo, os produtos do metabolismo de interesse que são liberados na matriz sólida podem ser absorvidos sendo necessária uma extração no final do processo (HÖLKER & LANZ, 2005).

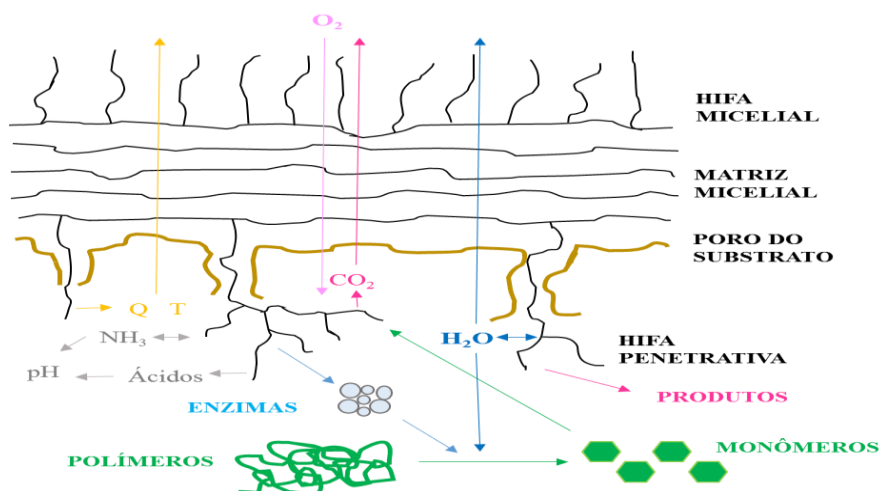


Figura 2.4 - Processos que ocorrem durante a FES.

Fonte: Adaptado de Hölker & Lenz (2005).

Levando em consideração que cada substrato apresenta características próprias, como retenção de umidade e disponibilidade de nutrientes, a sua escolha está relacionada à capacidade de adequação do microrganismo ao seu ambiente (ALBANO, 2012). A FES tem se mostrado muito promissora na obtenção de vários produtos como enzimas (SANTOS, 2007), ácidos orgânicos (RODRIGUES et al., 2007), aromas (UENOJO, 2003), vitaminas, etanol e bioherbicidas (MORAES et al., 2007).

### 2.1.6 – Enzimas, lipolíticas e pectinolíticas

Enzimas são catalisadores que, em condições amenas de temperatura, pH e pressão efetuam reações químicas a um ritmo surpreendente. Elas são caracterizadas por uma notável eficiência e especificidade (BLANCO & BLANCO, 2017).

Particularmente as enzimas lipolíticas ou lipases são hidrolases que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas, além das reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (Figura 2.5). Porém, ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, facilitando a catálise de muitas reações de interesse industrial (HASAN et al., 2006; BON et al., 2008). Encontradas na natureza e produzidas por diversas plantas, animais e micro-organismos, as lipases microbianas se destacam e são industrialmente utilizadas, pois apresentam grande diversidade de propriedades e especificidade ao substrato (RAMAKRISHNAN et al., 2013). As lipases, obtidas a partir de animais, apresentam desvantagens quanto à sua utilização devido à presença de tripsina, resultando em aminoácidos com sabor amargo, além da presença de hormônios residuais dos animais (LOTTI et al., 1994; VAKHLU & KOUR, 2006; TREICHEL et al., 2010). Lipases de plantas também estão disponíveis, mas não são exploradas comercialmente em função dos baixos rendimentos de catálise e dos processos envolvidos para extração (SOUISSI et al., 2009; FABISZEWSKA et al., 2014). Por isso, as lipases microbianas recebem atualmente mais atenção devido as suas vantagens técnico-econômicas, apresentando quase sempre baixo custo de produção, elevado rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade em adaptar-se às condições ambientais e facilidade de manipulação genética (SHU et al., 2010).

Essas enzimas são amplamente aplicadas nas indústrias de panificação, têxtil, farmacêutica, laticínios dentre outras, e vêm conquistando o mercado global, sendo as indústrias que fabricam detergentes para lavagem de roupas o principal setor consumidor (MUSSATTO et al., 2007; HASAN et al., 2006).

As lipases microbianas em geral são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura (TAN et al., 2003). As lipases extracelulares são produzidas por muitos microrganismos quando em condições favoráveis. Os fungos filamentosos são os melhores produtores de lipases, principalmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Thermomyces* (CARDENAS et al., 2001).

Elas podem ser constitutivas ou induzíveis. As constitutivas são aquelas produzidas pelos microrganismos independentemente da presença de algum tipo de indutor, e as lipases induzíveis são as estimuladas por indutores presentes no meio de cultivo (ROVEDA et al., 2010). O uso de óleos vegetais tem sido apontado como a principal fonte de carbono indutora para a produção de lipase em FES (COUTO; SANROMÁN, 2006). Além dos óleos vegetais, as borras e tortas, resíduos da indústria de óleos, também são consideradas uma importante fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismo, podendo ser utilizadas também como fonte indutora (DAMASO et al., 2008; HARTONO et al., 2018).

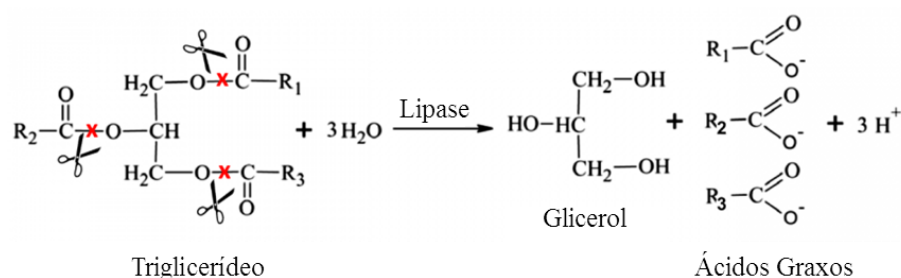


Figura 2.5 – Reação de hidrólise catalisada pela lipase. Adaptado de Lasoń e Ogonowski (2010).

Outras enzimas bastante utilizadas na indústria são as pectinases, elas foram uma das primeiras enzimas a serem aplicadas industrialmente. Sua aplicação comercial foi empregada em 1930 para a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas na década de 1960, a composição química dos tecidos de plantas ficou esclarecida e com isso os cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, as pectinases são hoje as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras (CARVALHO, 2007).

Os fungos são sabidamente os maiores produtores de enzimas pécnicas e entre eles o que mais se destaca no cultivo industrial é da espécie *Aspergillus niger* (DEBING et al., 2006). Contudo, outras espécies também são reconhecidas como produtoras de poligalacturonases, como a *Neosartorya fischeri* P1 (PAN et al., 2015), *Fusarium graminearum* (ORTEGA et al., 2014) e *Thermoascus aurantiacus* (MARTINS et al., 2011). Esses microrganismos são resistentes a fatores climáticos e sazonais e podem ser submetidos a manipulações genéticas e ambientais, com o objetivo de aumentar o rendimento na produção das enzimas que normalmente são secretadas, possibilitando o processo de purificação. (GÖĞÜŞ et al., 2014).

As pectinases são divididas em protopectinases, pectinesterases e as despolimerizantes. A ação das protopectinases ocorrem na hidrólise da protopectina insolúvel



obtendo a pectina solúvel. As pectinesterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxílicos. E as despolimerizantes atuam catalisando a clivagem hidrolítica das ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) das cadeias glicosídicas no ácido D- galacturônico (JAYANI et al., 2005). A Figura 2.6 traz o mecanismo de ação da enzima Poligalacturonase apresentando as reações de hidrólise e os resíduos de ácidos. As Poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) em ácido pécico (ácido poligalacturônico). De acordo com o modo de ação, são caracterizadas em endo-PGases (E.C. 3.2.1.15) e exo-PGases (E.C. 3.2.1.67).

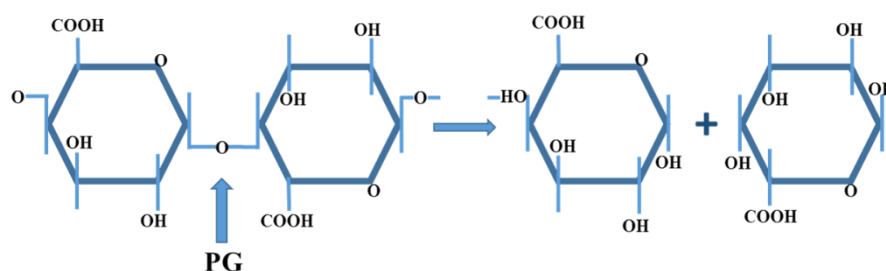


Figura 2.6 - Modo de ação das enzimas poligalacturonases. Reações de hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) dos resíduos de ácidos poligalacturônicos.

Fonte: Adaptado de Gummadi & Panda (2003).

As endo-PGases podem apresentar características como: massas moleculares entre 30 e 80 kDa, temperatura ótima de 30°C a 50°C, pH ótimo de 2,5 a 12 e ponto isoelétrico (PI) de 3,8 a 7,6. Essas enzimas hidrolisam, aleatoriamente, ligações glicosídicas internas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) do ácido poligalacturônico e liberam ácidos oligo-galacturônicos. (SHARMA et. al 2013; RAMÍREZ-TAPIAS et al., 2015).

Para a produção de endo-PGases podem ser utilizados fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores (PEDROLLI et al., 2008; KUSUMA et. al. 2014; MARTOS et al., 2014; GAYATHRI; NAIR, 2014). Dentre os microrganismos o *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Mucor flavus* e *Trichoderma harzianum* foram utilizados para a produção destas enzimas (ZHOU et al., 2015; NAGAI et al., 2000; GADRE et al., 2003; MOHAMED et al., 2006).

Conforme Pan et al., (2015), as exo-poligalacturonases clivam ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) a partir das extremidades não redutoras. O ácido mono-galacturônico é o principal produto da ação dessas hidrolases fúngicas, enquanto que as exo-PGases bacterianas produzem ácido di-galacturônico. (JAYANI et. al. 2005). As exo-PGases são caracterizadas por apresentarem massa molecular variando entre 30 e 50 kDa e o ponto isoelétrico entre 4,0

e 6,0. Segundo Gummadi & Panda (2003), as exo-PGases ocorrem com menor frequência que as endo- PGases. Sua produção é relatada em microrganismos como *Aspergillus sojae*, *Klebsiella sp*, *Streptomyces erumpens* MTCC 7317, *Paecilomyces variotii*, e *Penicillium viridicatum* RFC3 (BUYUKKILECI, et. al. 2014; YUAN et al., 2012; KAR, et. al. 2011; DAMÁSIO et al., 2010; SILVA, et al., 2007).

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do resíduo de processamento de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) para a extração de compostos antioxidantes e produção de enzimas.

### 2.2.1 Específicos

- Caracterizar o resíduo seco quanto à granulometria, densidade aparente, pH, umidade, cinzas, sólidos solúveis, celulose, hemicelulose e lignina, açúcares redutores, proteína e teor de lipídeos;
- Realizar a extração e caracterização do óleo do resíduo de mangaba quanto a acidez, peróxido, refração e saponificação, bem como o teor de umidade e ácidos graxos livres presentes no óleo.
- Utilizar o resíduo de mangaba para produção de lipase e pectinase por meio da fermentação semi-sólida usando o microrganismo *Aspergillus niger* IOC 4003;

## 2.3 - Material e método

O resíduo do processamento de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), constituído majoritariamente por sementes, foi gentilmente doado em dois lotes distintos pela Sterbom Indústria e Comércio Ltda (Macaíba, RN), na região nordeste do Brasil, sendo um deles utilizado apenas para a extração do óleo e sua caracterização. Após recepção, o resíduo foi lavado e seco em estufa a 60 ° C durante 24 horas. Em seguida, foi moído em um moinho de facas (moinho tipo Willye, TE-680, Tecnal, Brasil), peneirado em peneira de 48 *mesh* e

armazenado em um recipiente plástico à temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ). A Figura 2.7 abaixo ilustra o esquema proposto para a caracterização e o uso do resíduo de mangaba no presente estudo.

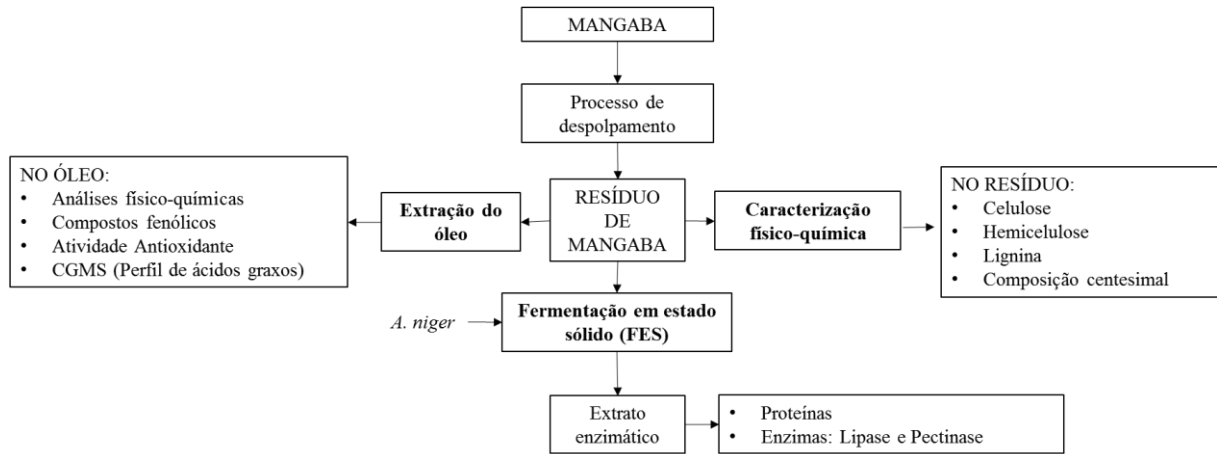


Figura 2.7 - Fluxograma proposto para a caracterização e uso do resíduo de mangaba.

### 2.3.1 Caracterização físico-química do resíduo de mangaba

O resíduo de mangaba foi caracterizado em termos de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas, umidade, carboidratos e extrativos segundo o NREL (*National Renewable Energy Laboratory* - EUA) (SLUITER et al., 2008, SLUITER et al., 2012). Além dessas análises, o resíduo também foi avaliado quanto as proteínas totais pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005) e fibras pelo método gravimétrico-enzimático (usando o extrator ANKOM) no laboratório de nutrição animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

### 2.3.2 Extração do óleo do resíduo de mangaba

A extração e caracterização do óleo foram realizadas conforme Bezerra Jácome (2014). Para extrair o óleo do resíduo mangaba, utilizou-se um extrator Soxhlet e o solvente hexano ( $70^\circ\text{C}$  por 7 horas). O solvente foi evaporado num evaporador rotativo (Solab, modelo SL-126) para obter o óleo final. Posteriormente, foram realizadas análises de acidez, peróxido, refração e saponificação, bem como o teor de umidade e ácidos graxos livres presentes no óleo.

### 2.3.3 Análise físico-química no óleo

No óleo do resíduo de mangaba, a acidez e os ácidos graxos livres foram analisados segundo Moretto & Fett (1998), os índices de peróxidos, refração e saponificação de acordo com os métodos oficiais da *American Oil Chemists 'Society* (AOCS, 2011), bem como o teor de umidade de acordo com os métodos oficiais de análise da Associação dos Químicos Analíticos (AOAC, 2005).

### 2.3.4 Compostos fenólicos do óleo

A concentração total de compostos fenólicos do óleo foi determinada usando a metodologia descrita por Singleton; Rossi (1965). Assim, aproximadamente 1,0 mL do extrato e 1,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu foram misturados. Após 5 minutos adicionou-se 1,0 mL de uma solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (solução a 35% em metanol) sendo a amostra então diluída para um volume final de 25 mL com metanol. A mistura foi protegida da luz por 90 min antes de se efetuar a leitura da absorbância a 725 nm usando um espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Brasil). A partir de uma curva padrão, utilizando o ácido gálico diluído em metanol nas concentrações de 0,02 a 0,2 g/mL com 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, estimou-se o teor de fenólicos. Assim, o teor total de fenólicos foi expresso em mg de ácido gálico/g da amostra.

### 2.3.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo foi determinada utilizando o método de DPPH utilizado por Brand-Williams et al. (1995), modificada por Herrero et al. (2004). Neste método, radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foram neutralizados com antioxidantes nos extratos resultando em uma diminuição na absorbância a 516 nm. Para efetuar a reação, uma solução de  $0,0214 \pm 0,0005$  mg/mL de DPPH em metanol foi preparada e 3,9 mL dessa solução de DPPH foram misturados com 0,1 mL de solução (óleo/metanol) com concentrações de 1,0 a 10,0 mg/mL em intervalos de 1 mg/mL, um controle foi feito utilizando água no lugar do óleo. A reação foi deixada em repouso durante 4 horas à temperatura ambiente ( $\sim 25$  °C). A absorbância foi então determinada a 516 nm utilizando um

espectrofotômetro (Bioespectro SP-220, Brasil). A descoloração da solução após o tempo de reação indica a ação antioxidante do extrato sobre os radicais livres presente na solução, essa diminuição na absorbância foi calculada em termos de porcentagem de inibição usando a Equação (1):

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{controle}) \times 100] / Abs_{DPPH}\} \quad (1)$$

Sendo AA% = Porcentagem de atividade antioxidante; Abs<sub>amostra</sub> = Absorbância da Amostra; Abs<sub>controle</sub> = Absorbância do Controle e Abs<sub>DPPH</sub> = Absorbância da solução de DPPH.

### 2.3.6 Perfil dos ácidos graxos totais

A identificação do perfil de ácidos graxos do óleo extraído do resíduo mangaba foi determinado pelo método analítico de cromatografia gasosa (CG) utilizando o cromatógrafo Shimadzu GC - 2010 Plus AF, que possui detector de ionização de chama e coluna capilar RTX de 100% de dimetilpolissiloxano. A programação da análise foi determinada para uma temperatura de coluna iniciada a 110 °C variando de 8 °C por minuto a 220 °C. As temperaturas usadas no injetor e detector foram 220 e 240 °C, respectivamente. A amostra de óleo antes de ser injetada no cromatógrafo, foi submetida a um processo de transesterificação, a fim de se obter os ésteres correspondentes aos ácidos graxos presentes no óleo, só então a amostra foi injetada no volume de 1,0 µL, adotando a relação de divisão de 1:50. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com velocidade linear de 22,9 cm/s.

### 2.3.7 Fermentação em estado sólido (FES)

Após caracterização, utilizou-se o resíduo de mangaba como substrato para a produção de enzimas lipase e pectinase por FES. O microrganismo utilizado foi um fungo filamentoso *Aspergillus niger* IOC 4003 pertencente à coleção do Instituto Osvaldo Cruz e cedido ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal-Brasil). O fungo foi mantido em tubos de ensaio com tampas roscadas contendo meio estéril e armazenado a -18 °C. Os conídios foram ativados de forma diferente para a produção de cada enzima. A ativação do microrganismo para a produção de pectinase ocorreu por meio de um meio básico proposto por Couri (1993) composto por: pectina cítrica (10,0 g/L), NaNO<sub>3</sub>

(3,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{KCl}$  (0,5 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L) e ágar-ágar (20,0 g/L). Para a produção de lipase, o microrganismo foi ativado pelo meio proposto por Couri & Farias (1995) composto por:  $\text{NaNO}_3$  (3,0 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{KCl}$  (0,5 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/L), ágar-ágar (30,0 g/L) e óleo de oliva (20,0 mL/L). Os microrganismos foram transferidos com auxílio da alça de platina e incubados por cinco dias em estufa a 30 °C. O cultivo foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL, onde foram adicionados 5,0 g de resíduo de mangaba (com diâmetro menor que 48 *mesh*) a umidade foi corrigida para 60%, adicionou-se suplementação do substrato com a fonte de nitrogênio (1% sulfato de amônio), sendo os frascos mantidos a 30 °C de temperatura. Uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* IOC 4003 de  $1,0 \times 10^6$  esporos/g de meio sólido foi usada como inóculo para FES. O cultivo foi realizado a 30 °C por 120 h (5 dias) em estufa BOD. As condições de cultivo para produção de lipase foram as mesmas otimizadas por Souza & Aquino (2012) e para a produção de pectinases as que foram reportadas por Couri (1993).

### 2.3.8 Quantificação da atividade enzimática e proteínas totais

Para a atividade da lipase foi utilizada a dosagem da atividade hidrolítica, conforme Paula (2011) com modificações, onde são misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite : água) e 4 mL de tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). Para garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia (150 rpm) em Shaker, a 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução enzimática (0,2 g/mL, preparada em solução tampão pH 7,0), mantendo-se o sistema reacional sob agitação a 37 °C, por 5 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 20 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) e 20 mL de uma solução de NaOH 0,1N. O excesso de NaOH foi titulado com HCl 0,05N até pH 10, utilizando-se um titulador manual e a fenolftaleína como indicador. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 2. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

$$A(U/g) = \frac{(Vb - Va) \times \text{Fator dil} \times M \times \left(\frac{V_{\text{extração}}}{m_{\text{biomassa}}}\right)}{t \times v} \quad (2)$$

Sendo  $V_b$  o volume do branco (mL);  $V_a$  o volume da amostra (mL);  $M$  a molaridade da solução de HCl (mol/L),  $t$  o tempo de incubação (min),  $v$  o volume de extrato enzimático adicionado (mL),  $V_{\text{extração}}$  o volume de tampão utilizado na extração da enzima e  $m_{\text{biomassa}}$  a massa de resíduo aplicado na fermentação. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1,0  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto nas condições do ensaio.

A atividade da pectinase foi determinada utilizando pectina cítrica a 1,0% como substrato, de acordo com Minjares-Cassanco et al. (1997) com as seguintes modificações. A mistura reacional (1,3 mL) contendo 0,8 mL de substrato (1,0%) e 0,5 mL de extrato enzimático, diluído adequadamente em tampão acetato (0,5 M, pH 4,3), foi incubada a 50 °C em banho termostático durante 30 minutos. Após a incubação, 0,5 mL do meio reacional e 0,5 mL da solução de DNS foram adicionados em tubos de ensaio e, posteriormente, foram mantidos em água fervente por 10 minutos. Após a retirada e resfriamento, a cor desenvolvida foi lida a 540 nm usando um espectrofotômetro (Termo Spectronic, Genesys 10 uv). Uma unidade de atividade pectinolítica corresponde à quantidade de enzima que libera 1,0  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto de reação.

A concentração total de proteína nos extratos enzimáticos foi estimada pelo método de Bradford (1976), sendo quantificada a partir de uma curva padrão de BSA (Albumina de Soro Bovino) com concentrações entre 0,1 e 1 mg/mL em intervalos de 0,1 mg/mL e que foram analisadas na proporção de (1:1). Essa proporção foi respeitada durante as análises onde 0,5 mL das concentrações definidas dos extratos (amostras) e 0,5 mL de reagente de Bradford compunham o meio reacional. O conteúdo de todos os tubos foi agitado, imediatamente após agitação à temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

### 2.3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software Statistica 7.0 (Statsoft, USA), utilizando análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 2.4. Resultados e discussão

O processamento industrial da polpa de mangaba, assim como de outras frutas, inclui várias etapas, como extração mecânica (maceração), filtração e congelamento. As etapas de processamento podem resultar em oxidação, degradação, lixiviação ou outros eventos que reduzem o conteúdo de compostos bioativos em frutas processadas. No entanto, nos resíduos do processamento agroindustrial são encontrados diversos compostos de interesse biotecnológico, por tanto de baixo custo e passíveis de recuperação e reutilização na cadeia produtiva (NORA et al., 2014, TOMAS et al., 2015, BRANCO et al., 2016).

### 2.4.1 Caracterização físico-química de resíduo de mangaba

No presente estudo foi realizada a caracterização do resíduo de mangaba (*Hancornia speciosa*), conforme apresentado nas Tabelas 2.1 e 2.2. Observa-se que o resíduo agroindustrial avaliado após lavagem e secagem é constituído por sementes e apresenta características lignocelulósicas, ou seja, possuem em sua composição química predomínio de celulose (44,31%), hemicelulose (aproximadamente 18%) e lignina (aproximadamente 22,0%). Na literatura, Santos (2014), relata valores de 17,07% de celulose, 22,57% de hemicelulose e 10,16% de lignina para o resíduo de mangaba. Esses valores distintos para o mesmo resíduo poderiam ser justificados pelos nutrientes absorvidos pelo fruto no local de cultivo ou pelo grau de maturação no momento do processamento.

Outro resíduo agroindustrial, o bagaço de caju, apresentou valores inferiores de celulose (21,02%) e hemicelulose (11,50%) segundo (Oliveira et al., 2018), assim também outros materiais lignocelulósicos como a moringa e a carnaúba apresentaram valores inferiores conforme (Magalhaes et al. 2018; Silva et al., 2018). O conteúdo de lignina se mostrou inferior quando comparado a carnaúba e o bagaço de caju.



Tabela 2.1 - Composição (porcentagem de massa seca) dos diferentes resíduos

Resíduo	Celulose	Hemicelulose	Lignina Total	Cinzas	Extraíveis	Autor
Resíduo de Mangaba	44,31 ± 0,93	17,57 ± 0,33	21,82 ± 0,86	2,28 ± 0,17	0,74 ± 0,017	Este estudo
Resíduo de Mangaba	17,07	22,57	10,16	1,87 ± 0,06	-	Santos (2014)
Moringa	12,02 ± 0,81	14,61 ± 0,43	5,37 ± 0,98	3,60 ± 0,02	69,94 ± 1,40	Magalhaes et al. (2018)
Carnauba	23,96 ± 0,75	11,84 ± 0,82	32,79 ± 0,91	7,69 ± 0,05	11,62 ± 0,45	Silva et al. (2018)
Bagaço de Caju	21,02 ± 0,31	11,50 ± 1,13	45,84 ± 1,28	9,50 ± 0,30	10,75 ± 0,86	Oliveira et al. (2018)

Em relação ao teor de proteína total foram encontrados no resíduo de mangaba 10,54 ± 0,03% que é próximo a valores encontrados na literatura como por exemplo em Araújo et al. (2011) foi relatado um valor de 11,43% de proteína total para farelo de semente de mangaba, enquanto Clerici et al. (2011) reportaram valores de 0,62 a 1,2% de proteína total para a polpa de mangaba. Outro valor que podemos destacar são os extraíveis que na metodologia utilizada não correspondem ao conteúdo de lipídeos do resíduo, visto que quando submetido a extração lipolítica seu valor é superior a 20% conforme os resultados da composição química do resíduo que estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição centesimal do resíduo de mangaba.

Conteúdo (%)	Resíduo de Mangaba
Umidade	6,90 ± 0,30
Proteínas	10,54 ± 0,03
Lipídios	22,30 ± 0,44
Cinzas	1,50 ± 0,42
Fibras	47,02 ± 0,91
Carboidratos	12,20 ± 0,52

Observa-se que os principais componentes existentes no resíduo são as fibras (aproximadamente 47,0%), seguidos dos lipídios (aproximadamente 22,0%). Em termos de lipídios, os valores obtidos para as sementes de mangaba foram muito próximos aos encontrados na literatura. Por exemplo, Souza & Aquino (2012) obtiveram 23,0% de lipídios na farinha de mangaba e Vieira (2007) quantificou 24,68% de lipídios nas sementes deste

fruto. Santos (2014) relatou cerca de 27,0% de lipídios, proteína com cerca de 12,0% e, aproximadamente, 12,0% de fibra para o resíduo de mangaba. Como mencionado acima, diferentes valores são devidos aos diferentes processos e ao resíduo obtido além do cultivo e manejo em que os frutos foram submetidos à mangaba.

Com relação ao teor de carboidratos encontrados no descascamento de mangaba ( $12,2 \pm 0,5\%$ ) este foi inferior ao relatado por Souza & Aquino (2012), que relataram um conteúdo de 58,66%. Essa diferença deve-se ao fato que a quantidade de carboidratos foi calculada em termos totais, incluindo as fibras alimentares. Assim, ao considerar as fibras e carboidratos ( $47,02 \pm 0,91\%$  de fibras +  $12,2 \pm 0,5\%$  de carboidratos =  $59,22 \pm 1,41\%$ ), os resultados obtidos no presente estudo concordam com os apresentados.

Em relação ao teor de cinzas nas sementes de mangaba ( $1,5 \pm 0,4\%$ ), os resultados encontrados foram ligeiramente inferiores aos reportados por Vieira (2007), que relatou 2,13% e com o obtido por Souza & Aquino (2012), que foi de 2,09%. Vale ressaltar que esse resultado é interessante para fins alimentares, pois o organismo limita sua absorção.

#### 2.4.2 Extração de óleo e sua caracterização

A extração do óleo do resíduo de mangaba apresentou um rendimento de  $22,3 \pm 0,4\%$ . Esse resultado é mostrado na literatura para sementes de frutas como romã (20,0%), laranja (15,0%) e goiaba (12,3%) 38,42 (KOBORI; JORGE, 2005; TEIXEIRA et al., 2011). Na Tabela 2.3 são apresentados os resultados das análises físico-químicas do óleo de resíduo de mangaba.

Tabela 2.3 - Valores médios das características físico-químicas do óleo

ANÁLISES	Óleo de resíduo de mangaba (sementes)
Índice de acidez	$20.2 \pm 0.4$
Índice de Peróxido (meq / 1000g)	$10.6 \pm 0.2$
Índice de Refração	1.4653
Índice de Saponificação (mg KOH / g)	$498.7 \pm 0.4$
Umidade (%)	$4.6 \pm 0.2$
Ácidos Graxos livres (%)	$11.10 \pm 0.05$

O índice de acidez corresponde à quantidade em mL de hidróxido de sódio (NaOH) necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1g de gordura. Quanto maior for o índice de acidez, maior volume de base será consumida. Já a determinação de ácidos graxos livres é dada pela porcentagem (em peso) de ácidos graxos livres, em relação a um ácido graxo específico, geralmente o ácido oléico (PM = 282 g) ou outro ácido graxo predominante na amostra. A partir dos valores apresentados na Tabela 2.3, pode-se observar que o valor do índice de acidez encontrado para o óleo do resíduo de mangaba foi de  $20,2 \pm 0,4$ . E apenas para comparação de ordem de magnitude Pereira (2009) obteve  $16,2 \pm 0,2$ , estudando as características físico-químicas do óleo cru de pinhão-manso extraído com o mesmo solvente (hexano). Não foram encontrados na literatura estudos de análise físico-química do óleo do resíduo de mangaba para comparação com os resultados obtidos neste trabalho, com isso foram feitas comparações com a legislação brasileira e demais óleos descritos na literatura que se aproximem das características do óleo de resíduo de mangaba.

Em relação ao índice de peróxido, no Brasil não há valor estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, para óleos vegetais brutos; no entanto, para óleos refinados e gorduras, o valor máximo de peróxido é de 10 meq/kg (BRASIL, 2005). O valor encontrado para o óleo do resíduo de mangaba foi de  $10,6 \pm 0,2$  meq/kg. Isso mostra que, mesmo sem o processo de refino, o teor de peróxido do óleo estudado estava próximo da legislação.

O resultado observado para o índice de refração no óleo do resíduo de mangaba foi de 1,4653 a uma temperatura de 40 °C. O índice de refração é amplamente utilizado como critério de qualidade e identidade dos óleos. Este índice pode ser usado para controlar o processo de hidrogenação. A refração dos óleos está relacionada ao grau de insaturação sendo afetado por fatores como conteúdo de ácidos graxos livres, oxidação e tratamento térmico (CECCHI, 2003). A literatura apresenta o índice de refração do óleo de soja refinado na faixa de 1,466-1,470 (BRASIL, 2005), portanto o índice de refração do óleo do resíduo de mangaba é muito próximo do índice de refração do óleo comestível comum. O óleo do resíduo de mangaba apresentou umidade de 4,6%. Este valor é alto quando comparado a óleos vegetais refinados, que tendem a ter um valor de umidade zero. O processo de refino pode ser utilizado para remover a umidade.

O resultado encontrado para o índice de saponificação no óleo estudado foi de  $489,7 \pm 0,4$  mg KOH/g. De acordo com o Regulamento Técnico para determinação de identidade e qualidade de óleos vegetais e gorduras (BRASIL, 2005), soja e óleo de coco possuem índices de saponificação variando de 189-195 e 248-265 mg KOH/g, respectivamente. O índice de

saponificação é indicativo do comprimento da cadeia de ácidos graxos que compõe o óleo, sendo específico para cada óleo. Segundo Moretto & Fett (1998), quanto menor a massa molecular do ácido graxo, maior o índice de saponificação. Em termos de comida, quanto maior a taxa de saponificação, melhor o óleo para comida. Portanto, a ocorrência de altos valores deste índice no óleo estudado, torna-o interessante para fins alimentícios.

#### 2.4.2.1 Análise da composição do óleo do resíduo de mangaba.

A Figura 2.8 mostra o cromatograma e a Tabela 2.4 ilustra a composição em termos de ácido graxo do óleo do resíduo de mangaba. Observa-se que a quantidade total de ácidos graxos insaturados encontrados para o óleo do resíduo de mangaba foi de 78,5%. Entre os ácidos graxos insaturados, o ácido predominante foi o ácido oleico ( $61,13 \pm 0,12\%$ ), como mostra a Tabela 2.4.

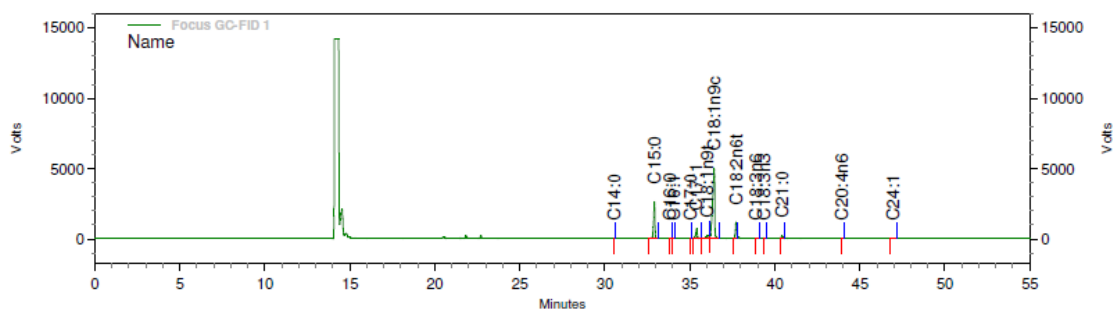


Figura 2.8 - Perfil de ácidos graxos referente ao óleo de resíduo de mangaba.

Tabela 2.4 - Composição em termos de ácidos graxos do óleo do resíduo de mangaba.

ÁCIDO GRAXO		PORCENTAGEM (%)
Ácido mirístico -	C14	$0,07 \pm 0,17$
Ácido pentadecílico -	C15	$19,61 \pm 0,83$
Ácido palmítico -	C16	$0,15 \pm 0,01$
Ácido palmitoléico -	C16:1	$0,13 \pm 0,02$
Ácido margárico -	C17	$0,04 \pm 0,01$
Ácido cis-10-heptadecanóico-	C17:1	$6,36 \pm 0,05$
Ácido elaídico -	C18:1n9t	$3,43 \pm 0,13$
Ácido oléico -	C18:1n9c	$61,13 \pm 0,12$

Ácido linolelaídico -	C18:2n6t	7,42 ± 0,11
Ácido gama-linolênico -	C18:3n6	0,15 ± 0,00
Ácido alfa-linolênico -	C18:3n3	0,33 ± 0,01
Ácido heneicosanóico-	C21	1,6 ± 0,02
Ácido araquidônico -	C20:4n6	0,07 ± 0,00
Ácido nervônico -	C24:1	0,11 ± 0,05
Ácidos graxos Saturados	%	21,48
Ácidos graxos insaturados	%	78,5

A qualidade e a digestibilidade dos óleos comestíveis são determinadas pela quantidade e composição de ácidos graxos insaturados (JORGE & LUIZA, 2012). Quanto maior a quantidade de ácidos graxos insaturados, melhor a qualidade do óleo e a digestibilidade. Nesse sentido, é interessante observar o conteúdo de ácidos graxos insaturados, bem como sua configuração na molécula.

Os ácidos graxos poliinsaturados são representados pelas séries ômega 3 e ômega 6, dependendo de onde a ligação dupla mais próxima da extremidade metílica está posicionada. Como o corpo humano é incapaz de sintetizar esses ácidos graxos, eles são chamados de essenciais e devem ser obtidos através da dieta (MOURA, 2008). O ácido graxo alfa-linonênico ou ômega-3 destaca-se por realizar várias funções biológicas no corpo humano (MARQUES, 2008). O óleo do resíduo de mangaba (sementes) apresentou 0,33% de ômega 3. Assim, levando-se em consideração a porcentagem deste ácido graxo em óleo comum como o girassol 0,3% (CODEX ALIMENTARIUM COMMISSION, 2008) o óleo do resíduo mangaba (sementes) apresentou uma quantidade semelhante à encontrada em óleos comestíveis comuns como o girassol, sendo este um aspecto considerável para o uso destes óleos para fins alimentícios. Santos (2014) relatou a composição de ácidos graxos no óleo de semente de mangaba por meio de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) onde os ácidos graxos com maior abundância na amostra foram ácido octadecenoico (oleico) e hexadecanóico (palmítico). No presente estudo, os principais ácidos graxos são oléico (61,1 ± 0,1%) e pentadecílico (19,6 ± 0,8%). Almeida (2008) caracterizou o óleo de semente de mangaba e constatou que os principais ácidos graxos continham de 10 a 24 carbonos e, portanto, ácido oleico (C18) e ácido palmítico (C16). Este fato é importante porque é um ácido graxo essencial (ômega 9), que participa do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese de hormônios.

O teor de ácido oleico presente em diferentes óleos segundo Ramalho e Suarez, (2013) como óleo de soja (30,0%), sementes de uva (28,0%), óleo de coco (10,0%) e amendoim (72,0%) desses, apenas o óleo de amendoim apresentou teor superior de ácido oleico os demais óleos apresentaram teores de ácido oleico menor que no óleo do resíduo de mangaba (sementes). Esta informação é relevante para justificar o estudo deste novo óleo.

#### **2.4.2.2 Compostos Fenólicos Totais (CFT)**

O resultado obtido para o teor total de compostos fenólicos no óleo do resíduo de mangaba foi de  $564,1 \pm 0,047$  mg de ácido gálico/g de óleo. Vale ressaltar que Soong e Brarlow (2004) encontraram um teor de 117 mg de ácido gálico/g no extrato de semente de manga. Segundo Perfeito (2015), a polpa de mangaba apresentou teor de compostos fenólicos de  $115,84 \pm 0,075$  mg de ácido gálico/100 g de frutas frescas. Este mesmo autor relata que no processamento da polpa de mangaba, as cascas são incorporadas à polpa, trazendo características antioxidantes.

Segundo Rodrigues et al. (2006) o extrato hidrofílico da casca de *Hancornia speciosa* constitui uma mistura extremamente complexa, sendo verificada a presença de polímeros isoprenóides (látex) e uma grande quantidade de taninos condensados. Conforme relatado por Rodrigues (2007), os taninos, o ácido clorogênico e as catequinas encontradas na casca ajudaram a formar o maior índice de compostos fenólicos na polpa.

Como mostrado anteriormente, o resíduo de mangaba utilizado neste estudo é considerado constituído basicamente por sementes. E segundo a literatura os compostos fenólicos presentes na casca e na polpa dessa fruta apresentam valores inferiores podendo assim ser possível afirmar que há uma concentração de compostos fenólicos nas sementes de mangaba e mais especificamente no óleo extraído.

Por isso, o óleo do resíduo de mangaba pode ser uma interessante possibilidade de aplicação para fins alimentícios. Uma vez que a atividade funcional de compostos fenólicos é desejável em alimentos.

#### **2.4.2.3 Atividade antioxidante do óleo do resíduo de mangaba**

Atualmente, não existe um método único para determinar a atividade antioxidante em alimentos de origem vegetal e seus subprodutos, considerando os vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, bem como a diversidade de compostos bioativos. Dentre as metodologias utilizadas, as que utilizam radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) são as mais destacadas.

A capacidade de sequestrar a fração DPPH foi avaliada no óleo do resíduo de mangaba em concentrações que variaram de 1 a 10 mg/mL e foram calculados em porcentagens, conforme mostra a Figura 2.9.

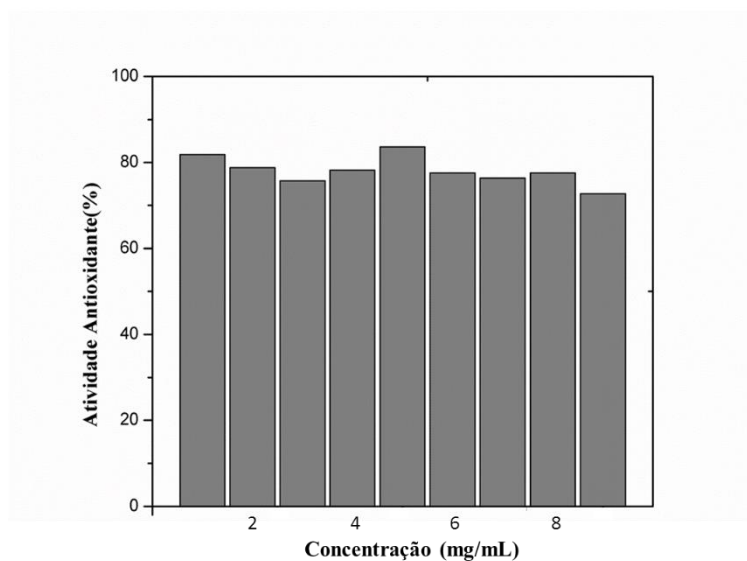


Figura 2.9 – Atividade Antioxidante do óleo de resíduo de mangaba nas diferentes concentrações.

Os resultados indicam uma atividade antioxidante acima de 70% para todas as concentrações variando de 72-86%. Tendo em vista o teor de compostos fenólicos presentes no óleo do resíduo de mangaba, anteriormente apresentados no item 2.4.2.2 (564,1 mg/g óleo), é possível atribuir a esses compostos, o potencial antioxidante presente no óleo.

A mudança de cor na solução é um indicador importante da presença de atividade antioxidante no meio reacional, como mostra a Figura 2.10.

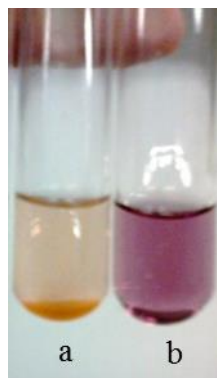


Figura 2.10 - Atividade antioxidante do óleo do resíduo de mangaba, onde a) Presença de óleo do resíduo de mangaba, b) Solução de DPPH.

De acordo com a Figura 2.10, a solução padrão tem coloração roxa intensa (Figura 2.10b). Após a reação, a solução contendo óleo do resíduo de mangaba apresentou coloração alaranjada (Figura 2.10a), indicando a atividade antioxidante. Embora a atividade antioxidante dos óleos tenha sido observada visualmente, é importante quantificar efetivamente essa atividade antioxidante. Os resultados obtidos a partir da quantificação da atividade antioxidante do óleo mostraram que em todas as concentrações estudadas houve atividade antioxidante.

### 2.4.3 Fermentação em estado sólido

A biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas e resíduos florestais, tem sido reconhecida como uma fonte potencial e sustentável de açúcares para biotransformação em produtos biológicos de valor agregado como enzimas (HIMMEL et al., 2007; LI et al., 2008). No resíduo de mangaba encontramos características relevantes como a presença de lipídeos, que possibilitaria seu uso como substrato para produção de lipase. Ainda, na literatura, Almeida et al., 1998; Moura et al., 2002 e Perfeito (2014) relatam a presença de pectina na polpa de mangaba, o que nos faz deduzir que existe a possibilidade da presença de pectina no resíduo e a sua ação como substrato para produção de pectinase. Portanto, no presente estudo buscou-se a reutilização do resíduo de mangaba como substrato para a produção de lipase e pectinase por FES utilizando *Aspergillus niger*. O extrato obtido foi analisado quanto à atividade de cada enzima, bem como proteínas totais, conforme exposto na Tabela 2.5.



Tabela 2.5 - Produção de enzimas e quantificação de proteínas

Enzima	A.E (U/g)	Proteína (mg/mL)
Lipase	50,01 ± 0,02	0,548 ± 0,01
Pectinase	0,45 ± 0,01	0,255 ± 0,15

No presente estudo atividades de  $0,45 \pm 0,01$  U/g e  $50,01 \pm 0,02$  U/g foram obtidos para pectinase e lipase, respectivamente. A concentração de proteínas totais nos extratos enzimáticos foi de  $0,255 \pm 0,15$  mg/mL no extrato pectinolítico e  $0,548 \pm 0,01$  mg/mL no extrato lipolítico em 120 horas de fermentação. Reinehr et al. (2014) produziram lipase por FES utilizando 85% de farelo de soja e 15% de casca de soja como substrato e fungo *Aspergillus niger* e obtiveram atividade lipolítica máxima de 45,49 U/g, semelhante ao encontrado no presente estudo. Um trabalho semelhante realizado por Damaso et al. (2008) usando o bagaço de milho como substrato indutor através de FSS por 48 h produziu uma atividade de lipase de 62,7 U/g. Ainda encontramos na literatura outros trabalhos utilizando resíduos para produção de pectinases, como por Vivek et al. (2010) que produziram pectinase por FES em casca de laranja obtendo uma atividade de cerca de 6,8 U/g. Esses resultados diversos mostram a importância do estudo sobre o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais para produção de biomoléculas de interesse tecnológico.

## 2.5 - Conclusão

O resíduo lignocelulósico de mangaba após extração e caracterização apresentou diversas possibilidades de uso devido a sua composição físico-química rica em lipídeos (22,3%), fibras (47,02%), proteínas (10,54%) e em sua constituição a presença de 44,31% de celulose, 17,57% de hemicelulose e 21,82% de lignina. Todas essas características presentes no resíduo de mangaba, confere uma gama de possibilidades de utilização dessa biomassa de baixo custo. Outros aspectos interessantes foram explorados nesse estudo como a extração do óleo e sua caracterização físico-química e de perfil dos ácidos graxos presentes. Sendo expostos resultados relevantes como índice de peróxido (10,6 meq / 1000g), saponificação (498,7 mg KOH / g) e refração (1,465) sendo esses valores próximos aos encontrados para óleos comestíveis. A alta concentração de compostos fenólicos totais e a importante atividade antioxidante presentes no óleo do resíduo de mangaba indicam o grande potencial e a possível

aplicação dos alimentos de maneira funcional. Além disso, o resíduo apresenta potencial para ser utilizado como substrato para a produção de enzimas como pectinase e lipase por *Aspergillus niger* IOC 4003 em FES.

---

---

## CAPÍTULO 3

Uso do resíduo de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) para produção de poligalacturonase visando clarificação de suco e explorando conteúdo de lignina para modificar filmes de quitosana.

---

---

### **3 - Uso do resíduo de mangaba (*Hancornia speciosa gomes*) para produção de poligalacturonase visando clarificação de suco e explorando conteúdo de lignina para modificar filmes de quitosana.**

No capítulo anterior foram abordadas a caracterização do resíduo de mangaba, bem como a produção e extração de enzimas e compostos antioxidantes. Neste capítulo são apresentados os resultados da produção e aplicação de poligalacturonase (PG) na clarificação de suco de mangaba assim como, a extração de lignina e aplicação em biofilmes de quitosana. Esses resultados foram organizados na forma de artigo o qual se encontra em processo de submissão.

#### **3.1. Revisão bibliográfica**

##### **3.1.1. Valorização de resíduos agroindustriais**

Os resíduos agroindustriais, por sua própria constituição como material lignocelulósico, rico em celulose, hemicelulose e lignina, podem ter seu espectro de aplicação estendido, aumentando o valor agregado desses resíduos em um contexto de biorrefinaria (HASSAN et al. 2019; NOGUEIRA et al., 2019). A lignina possui uma estrutura complexa sendo encontrada amplamente na parede celular das plantas em associação com celulose e hemicelulose (TUOMELA et al., 2000). A gama de uso desse biopolímero desperta interesse da área da biotecnologia. Por exemplo, há evidências da possibilidade de aplicação da lignina na formação de filmes (SPIRIDON et al., 2011; NÚÑEZ-FLORES et al., 2013), mas ainda não é tão explorado como o uso de nanocristais de celulose (REDDY; RHIM 2014; LIU et al., 2010).

Também é importante destacar que o aproveitamento desses resíduos como substratos de baixo custo para a produção de enzimas por FES, requer pouca quantidade de água, além

de ter a vantagem de produzir um meio mais concentrado com a biomolécula de interesse, aumentando a produtividade da enzima por massa de resíduo (CASTILHO et al., 2000; POLETO et al., 2015; SANDRI et al., 2015).

### 3.1.2 – Resíduo despulpado de Mangaba

Nativa das regiões de cerrado do Brasil, a mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), da família Aponynaceae, cujo fruto é mais abundantemente produzido, de outubro a dezembro, é encontrada em diversas regiões do país, oriundas de tabuleiros litorâneos e encostas costeiras do Nordeste, onde mais presente, para as áreas de cerrado das regiões Norte e Sudeste (VIEIRA NETO, 2002). Esta fruta é geralmente arredondada e tem vários tamanhos, tem uma cor amarelada ou esverdeada e uma polpa com um sabor doce. As mangabas são ricas em compostos fenólicos (RUFINO et al., 2010), ácido ascórbico (ALMEIDA et al., 2011) além de ácido clorogênico e rutina (LIMA et al., 2015(a)). Os resíduos derivados do processamento da mangaba são ricos em nutrientes como: proteínas, fibras, minerais e ácidos graxos. Após os processos de lavagem e secagem admite-se que o resíduo de mangaba seja constituição por sementes (BEZERRA JÁCOME, 2014). Tendo em vista a presença de diferentes nutrientes nesse resíduo destaca-se a possibilidade de ser utilizado como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos de maior valor agregado, como enzimas (SANTOS, 2017). É possível observar o aspecto físico do resíduo despulpado de mangaba por meio da Figura 3.1.



Figura 3.1 – Resíduo despulpado de mangaba previamente lavado e seco Inteiro (A) e Moído (B). Fonte: Própria autora.

### 3.1.2 – Aplicação de poligalacturonase para clarificação de suco de frutas

O emprego de fermentação em estado sólido (FES) para a produção de poligalacturonase (PG) utilizando resíduos industriais foi relatado por Barman et al. (2015) que utilizaram casca de banana para cultivar o fungo *Aspergillus niger*, visando induzir PG para clarificação de suco de banana. A literatura relata também a produção de PG por *A. niger* utilizando outros substratos como o resíduo de tomate (AJAYI et al., 2015), resíduo de maracujá (MACIEL et al., 2014), casca de limão (RUIZ et al., 2012) e casca de laranja (MRUDULA; ANITHARAJ, 2011). A principal utilização das poligalacturonases na indústria é na produção de sucos, vinhos e alimentos processados. Para o processo de extração de sucos o início da produção ocorre com a prensagem das frutas, o que acarreta em aumento da viscosidade e de partículas em suspensão, dificultando a extração e a filtração, principalmente em frutos ricos em pectina. Nesse caso, as pectinases são adicionadas para diminuir a viscosidade e turbidez, aumentando a extração, a pigmentação e a clarificação do suco, podendo reduzir em até 50% o tempo de filtração do produto final (KASHYAP et al., 2001; SOUZA et al., 2003; SAXENA et al., 2008; KHAN et al., 2013).

### 3.1.3 – Biofilmes de quitosana e lignina

Nos últimos anos, o uso de embalagens derivadas de recursos renováveis (bioplástico extraídos ou produzidos principalmente a partir de recursos naturais) está se tornando uma necessidade de mercado em termos de inovação. Os valores desse mercado vem crescendo ao longo dos anos, em 2011 cerca de 932 milhões de libras, em 2016 cerca de 2,5 bilhões e o crescimento estimado até 2021 é de 22% chegando até cerca de 12 bilhões de libras. (MOHAN, 2011). A produção de bioplástico provém principalmente de resíduos industriais ou coprodutos como resíduos de polpa de frutas e legumes, algas e marisco em pó (CROUVISIER-URION et al., 2017). Os polímeros extraídos desses materiais começam a ser utilizados na forma de filmes, placas ou bandejas para aplicações em embalagens (ADEODATO VIEIRA et al., 2011; JOHANSSON et al., 2012). Entre os vários biopolímeros que podem ser utilizados para esse fim destaca-se a quitosana, um heteropolissacarídeo derivado da desacetilação parcial da quitina, que vem sendo usada para o desenvolvimento de filmes e embalagens ativas para alimentos ou produtos farmacêuticos (AIDER, 2010; MADELEINE-PERDRILLAT et al., 2015; TASTAN et al., 2016).

Trabalhos anteriores mostraram a adequação de outro biopolímeros, a lignina, para ser utilizado como agregado aplicado em embalagens e filmes ou materiais termoplásticos, devido à sua atividade antioxidante trazida pelos grupos livres de hidroxilas fenólicas (DALLMEYER et al., 2013; HAMBARDZUMYAN et al., 2012). Como a lignina não pode formar filmes por si só, uma estratégia para o uso deste polímero baseia-se em criar um composto com outros biopolímeros, como a quitosana. Essa é uma boa maneira de valorizar esses subprodutos da indústria, e na literatura encontramos estudos visando a otimização de metodologias para a homogeneidade de soluções filmogênicas constituídas por esses biopolímeros. É sabido que os filmes compostos por quitosana e lignina formam um sistema bifásico com uma distribuição de agregados de lignina (BAUMBERGER et al., 1998; NÚÑEZ-FLORES et al., 2013). Tais agregados podem fornecer atividade de remoção de radicais, principalmente impulsionada pela superfície do filme, o que é desejado para a constituição de embalagens ativas (CROUVISIER-URION et al., 2016).

## 3.2 – Objetivos

### 3.2.1 - Objetivo geral

Avaliar o uso do resíduo de mangaba para obtenção de produtos biotecnológicos de alto valor agregado.

### 3.2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar a produção de poligalacturonases por FES em resíduo despulpado de Mangaba usando o fungo *Aspergillus niger* IOC 4003.
- Avaliar a estabilidade enzimática em diferentes pHs e temperaturas.
- Aplicar a poligalacturonase no processo de clarificação de suco de Mangaba.
- Utilizar o resíduo pós fermentação para extração de lignina e avaliar sua aplicação na obtenção de biofilme de quitosana.

### 3.3 - Material e métodos

As possibilidades de processos e aplicações de produtos obtidos são apresentadas na Figura 3.2 que fornece uma visão geral do uso total do resíduo de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes).

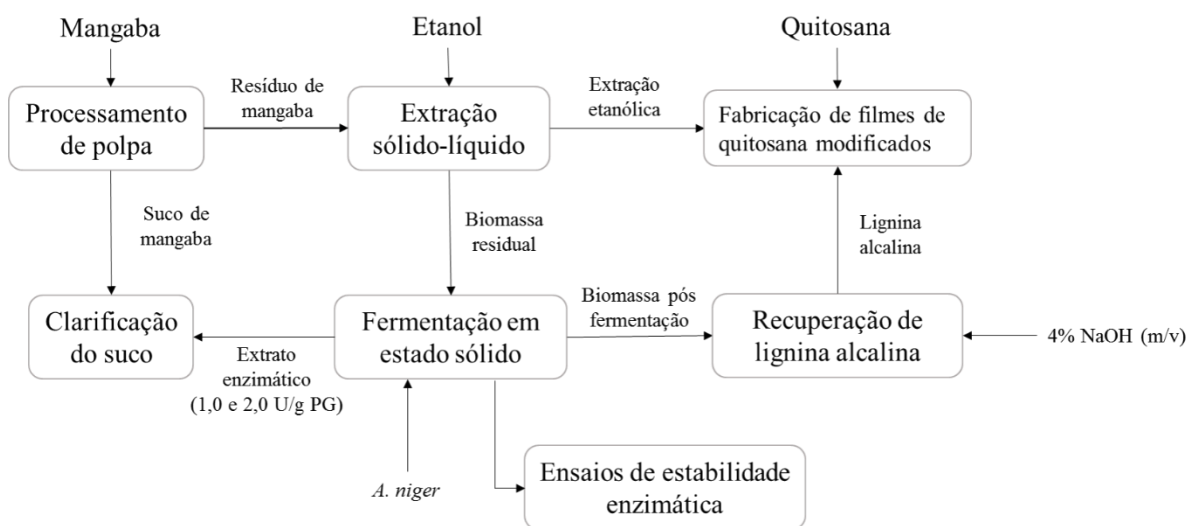


Figura 3.2 – Fluxograma das etapas avaliadas para a valorização e uso integral do resíduo de mangaba.

#### 3.3.1 - Reagentes

Ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, etanol, sulfato de amônio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico foram adquiridos da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Vale ressaltar que esses reagentes foram utilizados nos experimentos de quantificação de pectina, fenólicos totais, extração enzimática, elaboração de biofilme e extração de lignina. Ácido gálico, hidróxido de sódio, cloreto de cálcio, nitrato de prata, acetato de sódio, ácido poligalacturônico, azul de coomassie G250, albumina sérica bovina (BSA), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) e quitosana foram adquiridos Sigma-Aldrich (EUA). O padrão de proteínas utilizado para eletroforese foi adquirido da GE Healthcare (Suécia). Todos os reagentes eram de grau analítico e não requereram purificação prévia. A água deionizada foi obtida de um sistema de ultrapurificação modelo EASYpure da Barnstead (EUA) e prontamente utilizada nos experimentos e para a elaboração das soluções utilizadas.



### 3.3.2 - Resíduo de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)

O resíduo despulpado de mangaba (*Hancornia speciosa*) foi gentilmente doado pela empresa de processamento de frutas Sterbom (Parnamirim/RN, Brasil). A biomassa foi cuidadosamente lavada com água da torneira, seca a 60 °C em estufa com circulação de ar (TECNAL - modelo TE 394/1) e moída num moinho de faca (TECNAL - modelo TE 631/2).

### 3.3.3 – Pectina

O teor de pectina foi determinado pela quantificação do pectato de cálcio, calculada pela diferença de massa utilizando a Equação (3.1), segundo Rangana (1977).

$$\text{Pectato de Cálcio (\%)} = \left( \frac{(M_{\text{final, seco}}(\text{g}) \times V_{\text{medido}}(\text{mL}))}{V_{\text{filtrado}}(\text{mL}) \times M_a(\text{g})} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

Sendo  $M_{\text{final, seco}}$  a massa do resíduo seco filtrado,  $V_{\text{medido}}$  o volume medido do tubo de ensaio,  $V_{\text{filtrado}}$  o volume do extrato filtrado e  $M_a$  a massa do resíduo inicial.

### 3.3.4 – Extrato etanólico

Uma amostra do resíduo foi submetida a extração etanólica conforme Padilha (2018). Nesse caso 50,0 g do resíduo de mangaba foram adicionadas a um béquer e imersos em 500 mL de etanol e água (1:1 v/v) por 60 minutos a 60 °C em banho termostático, agitando-se a cada 15 minutos. Após esse tempo, o extrato foi filtrado e armazenado a -10 °C.

### **3.4 – Avaliação das propriedades antioxidantes no extrato**

#### **3.4.1 - Ensaio da capacidade antioxidante total**

A atividade antioxidante total foi determinada seguindo a metodologia descrita por Kumaran e Karunakaran (2007) com modificações. As amostras foram incubadas a 100 °C durante 90 minutos e depois lidas em espectrofotômetro (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, EUA) a 695 nm. Para expressar o resultado em mg de equivalente de ácido ascórbico por grama de amostra (mg AA / g), foi traçada uma curva padrão com concentrações de ácido ascórbico variando de 25-250 mg/mL.

#### **3.4.2 – Sequestro do radical DPPH.**

A capacidade de sequestro do radical DPPH foi avaliada segundo Nóbrega et al. (2015). Resumidamente, 200,0 µL de uma solução de DPPH (0,1 mM) em etanol foram adicionados a 40 µL de cada amostra. A mistura foi colocada em câmara escura por 25 minutos e a leitura realizada a 517 nm no leitor de microplacas Epoch-Biotek (Winooski, VT, EUA). A curva padrão foi construída com concentrações de Trolox variando de 10 a 200 µM e os resultados expressos em µmol de equivalente Trolox por grama de amostra (µmol TE/g).

### **3.5 – Fermentação em Estado Sólido (FES)**

#### **3.5.1 – Microorganismo e produção de inóculo**

A linhagem de *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizada na FES foi concedida pelo Instituto Oswaldo Cruz, (Rio de Janeiro / Brasil) sendo descrito como um bom produtor de pectinases. O fungo foi mantido em frascos com tampa rosqueada contendo solo estéril e armazenado a -18 °C. Após a ativação do microrganismo em placas de Petri contendo meio PDA (batata dextrose-água). Aproximadamente 10,0 mL de solução de Tween 80 (0,1%) foi utilizada para liberação de esporos. Subsequentemente, transferiu-se 1,0 mL da suspensão para Erlenmeyers de 250 mL

contendo meio de espiga de milho, que tem uma maior área superficial, para proliferação dos esporos, que foram incubados durante 5 dias a 30 °C. O inóculo foi padronizado pela contagem dos esporos na Câmara de Neubauer. O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado para obter uma concentração de  $1,0 \times 10^7$  esporos/g de substrato sólido.

### 3.5.2 – Produção de Poligalacturonase.

A FES foi realizada utilizando o resíduo de mangaba que sofreu extração etanólica e o *in-natura*, em uma incubadora (BOD) a 30 °C por 168 h. O processo de fermentação foi realizado utilizando um teor de umidade de 60% e com adição da solução salina nutriente conforme Urbánszki et al. (2000):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5,0 g/L);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5,0 g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0 g/L); NaCl (1,0 g/L);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5,0 mg/L);  $\text{MnSO}_4$  (1,6 mg/L);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3,45 mg/L) e  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,0 mg/L). Os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida, o extrato enzimático foi extraído dos frascos com adição de 25 mL de tampão acetato (200 mM, pH 5,0) ao substrato sólido fermentado e misturado com uma haste de vidro. A mistura foi então submetida à agitação em 160 rpm, durante 30 minutos e temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi clarificado por filtração e centrifugação a 2500 rpm por 10 min (4 °C). O sobrenadante contendo o extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e a concentração de proteínas totais.

### 3.5.3 – Atividade da Poligalacturonase e teor de proteínas totais

A atividade da poligalacturonase foi estimada como relatado por Couri (1993), de acordo com a Equação (3.2) com as algumas modificações. Em tubos de ensaio, foi preparado o meio reacional contendo 2mL de solução de ácido poligalacturônico 0,25% (m/v) preparada em tampão acetato 0,5M pH 4,3 a 35 °C, adicionou-se 0,250mL de extrato enzimático devidamente diluído, prosseguindo a reação enzimática por 30 minutos a 35 °C. O mesmo meio reacional foi preparado e utilizado no tempo zero. Terminada a reação, transferiu-se 0,25mL da mistura reacional ( $t=0$  e  $t=30\text{min}$ ) para tubos de ensaio contendo 0,25mL do reagente de DNS, após homogeneização os tubos foram colocados em banho a 100 °C por 10 minutos, e logo

após em banho com gelo. Só então são adicionados 2 mL de água com posterior leitura em espectro à 540nm.

$$[PG] \left( \frac{U}{g} \right) = \left( \frac{\text{diluição} \times \text{Abs} \times F (\mu\text{mol/mL}) \times V_{MR}(\text{mL}) \times V_E(\text{mL})}{t_R(\text{min}) \times V_{EE}(\text{mL}) \times M(\text{g})} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

Sendo Abs a absorvância real da amostra, F o fator de conversão da curva de calibração,  $V_{MR}$  o volume total da mistura reacional,  $V_E$  o volume utilizado do solvente de extração,  $t_R$  o tempo de incubação da reação enzimática,  $V_{EE}$  o volume utilizado de extrato enzimático e M a massa do resíduo.

Uma curva padrão foi preparada a partir de diferentes concentrações de ácido D-galacturônico (0,2-2,00 mg/mL) as leituras de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade (U) de atividade da poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto sob condição de ensaio e foi expressa em U/g de substrato seco.

As proteínas totais foram medidas de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976). Neste caso, preparou-se uma curva padrão a partir de diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA), na faixa de 0,05 a 0,40 mg/mL. Finalmente após 5 minutos de reação, as leituras de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, USA) no comprimento de onda de 595 nm.

### 3.5.4 – Efeito da temperatura e pH na estabilidade da enzima

Para avaliação do efeito da temperatura na estabilidade da PG, o extrato enzimático bruto produzido na melhor condição determinada, foi incubado na faixa de temperatura de 20 a 70 °C conforme Ahmed et al. (2016) com as seguintes modificações. O extrato enzimático foi submetido a cada temperatura por uma hora, após a qual foi realizada a análise da atividade enzimática conforme a Seção 3.5.3 anteriormente descrita. A atividade inicial foi assumida como sendo 100%, e foi usada como referência para o cálculo da atividade percentual residual.

Para a estabilidade enzimática em diferentes pHs foi realizada conforme Oliveira Júnior, (2018). Foram utilizados tampões variando de 2,0 a 9,0 (0,2 M), sendo eles: glicina-HCl (pH

2,0-3,0); acetato de sódio (pH 4,0-5,0); fosfato de sódio (pH 6,0-7,0) e glicina-NaOH (pH 8,0-9,0). Um volume de 0,5 mL da solução enzimática foi misturada com 0,5 mL de cada tampão e o volume reacional foi mantido por 1 h a 25 °C. E em seguida determinou-se a atividade enzimática. O melhor resultado de atividade apresentado no determinado pH, foi utilizado como referência para o cálculo da atividade enzimática remanescente em relação aos demais pHs.

### **3.5.5 – Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)**

O perfil protéico obtido por FES foi analisado utilizando eletroforese em condições desnaturantes em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970) usando poliácridamida a 12%. Os extratos enzimáticos brutos foram aquecidas a 100 ° C durante 5 min. Vinte microlitros de cada amostra e do padrão de proteínas (Bio-Rad Co., Richmond, EUA) foram aplicados ao gel que foi corado com nitrato de prata. Um marcador comercial (GE Healthcare, Suécia) foi utilizado para estimar a massa molecular das proteínas.

### **3.5.6 - Extração de lignina da biomassa fermentada**

Para a extração da lignina foi utilizada a seguinte metodologia conforme Gonçalves et al. (2016). Foi realizado um pré-tratamento básico no resíduo de mangaba reaproveitado após FES com uma solução de hidróxido de sódio a 4% (m/v) na proporção de 1:10 (m/v) e 121 °C (autoclave). Após 30 min de incubação, o licor negro foi recuperado por centrifugação a 3000 rpm (Centrífuga Refrigerada SL – 706 SOLAB) e seu pH foi ajustado para 2,0 usando ácido sulfúrico concentrado. A suspensão foi aquecida em banho termostático a 40 °C por 10 min para auxiliar a precipitação e outra etapa de centrifugação foi realizada a 3000 rpm. O hidrolisado foi separado para a realização das análises por CLAE para determinação da presença de polissacarídeos. Em seguida o precipitado foi coletado, lavado por três vezes com água acidificada (pH 2,0) e seco em estufa (TE-394/1 – TECNAL) a 60 °C. A fração sólida contida no papel de filtro foi utilizada na determinação de lignina insolúvel presente no resíduo de mangaba, conforme a Equação 3.3. Assim como na Seção 2.3.1, o teor de lignina Klason foi determinado de acordo com as metodologias descritas em Sluiter et al. (2008, 2012).

A lignina obtida nessa etapa de extração será utilizada na composição de filmes a base de quitosana.

$$Lignin (\%) = \left( \frac{(M_{(m+pf)sc, ah} - M_{pfsc}) - (M_{(c+cz)am} - M_c)(g)}{M_{a, h} (g)} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

Sendo  $M_{(m+pf)sc, ah}$  a massa do filtrado com papel de filtro seco após hidrólise,  $M_{pfsc}$  a massa do papel de filtro seco,  $M_{(c+cz)am}$  a massa do cadinho mais cinza depois da mufla,  $M_c$  a massa do cadinho seco e  $M_{a, h}$  a massa da amostra utilizada na hidrólise.

### 3.6 - Aplicações dos produtos obtidos a partir do resíduo de mangaba

#### 3.6.1 Uso do extrato enzimático de *A. niger* IOC 4003 (PGase) no processo de clarificação do suco de mangaba

Na avaliação do potencial do extrato enzimático de *A. niger* IOC 4003 para clarificação do suco de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) foi avaliado conforme Rocha, (2018), sendo a polpa comercial de mangaba utilizada como matéria-prima no preparo do suco. Neste caso, foram utilizados 30,0 g de polpa em 60,0 g de água (experimento controle). Em experimentos com PG, o extrato enzimático substituiu a quantidade recomendada de água equivalente a 1,0 e 2,0 U/g.

O experimento foi conduzido em incubadora rotativa nas condições a seguir: tempo de 1 hora, agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. A estabilidade da PG pela temperatura, definida na seção 3.5.4 foi o fator principal na escolha da temperatura no processo de clarificação. Em seguida, os frascos foram levados a banho maria à temperatura de 90 °C durante 5 minutos para desnaturação da enzima poligalacturonase e, em seguida, para a etapa de filtração onde os volumes da polpa filtrada foram medidos em proveta. O resíduo sólido retido na filtração foi descartado.

O suco clarificado tratado com PGase foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min e, em seguida, foram realizadas análises físico-químicas de turbidez em um turbidímetro portátil (HI 98703, RI, EUA); a densidade foi estimada utilizando-se um densímetro portátil (DMA 35 Medidor Portátil de Densidade, Anton Paar). O teor de sólidos solúveis (°Brix) nas amostras após a clarificação foi medido em um refratômetro digital (Smart-1/Atago/n° 3150). Para a determinação dos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu conforme Hatami et al. (2014).

A viscosidade foi medida de acordo com ASTM INTERNATIONAL (1990) a partir de um viscosímetro Oswald num banho termostático. A razão entre os coeficientes de viscosidade do líquido e da água foi expressa pela Equação (3.4).

$$[\theta_{amostra}](mPa.s) = \theta_{\acute{a}gua} \times \frac{t_{amostra}}{t_{\acute{a}gua}} \quad 3.4$$

Sendo  $\theta_{amostra}$  a viscosidade da amostra líquida,  $\theta_{\acute{a}gua}$  a viscosidade da água,  $t_{\acute{a}gua}$  o tempo do escoamento da água e  $t_{amostra}$  o tempo de fluxo da amostra líquida.

Na produção do suco clarificado de mangaba o rendimento do suco após aplicação das cargas enzimáticas foi calculado conforme Rocha, (2018), através da equação (3.5):

$$[Rendimento](\%) = \frac{[Vp - Vf]}{Mp} \times 100 \quad 3.5$$

Sendo:  $Vp$  = volume permeado obtido na etapa de filtração (mL);  $Vf$  = volume final adicionado(mL);  $Mp$  = massa da polpa adicionada.

Os ensaios de rendimento foram organizados mantendo a massa de polpa de mangaba fixa em 30 g e a quantidade de água para o ensaio controle foi de 60 g. Para os ensaios com a adição dos extratos enzimáticos foram feitas proporções onde a quantidade de solvente (água + extrato) permanecesse em 60 g. Para a carga enzimática de 1 e 2 U/g de PG foi calculado o equivalente a 1,875 e 3,750 g de extrato respectivamente. Os ensaios foram conduzidos por 5, 10, 15 e 30 minutos de incubação.

### **3.6.2 – Formulação dos filmes de quitosana para aplicação de lignina e extrato etanólico.**

Foram desenvolvidas formulações para filmes à base de quitosana contendo lignina e extrato etanólico, usando o método de fundição por solvente de acordo com Crouvisier-Urien et al. (2017). Uma solução filmogênica principal constituída por 2 % de quitosana em solução

aquosa de ácido acético (pH 6,0) foi preparada agitando-se em (Agitador Mecânico TE-139 da TECNAL) até a completa homogeneização (Figura 3.2). A partir da solução principal outras formulações foram elaboradas agregando conteúdo obtido nas Seções 3.3.4 e 3.5.6 anteriormente descritas. Suspensões contendo 0,1 e 0,05% (m / m) de lignina em etanol 99%, foram obtidas agitando-se vigorosamente a solução em agitador magnético durante 2 horas a 20 ° C. As suspensões de lignina foram então centrifugadas e o sobrenadante foi recuperado para posterior aplicação no filme.

As formulações dos filmes respeitaram as seguintes proporções: 25g de solução filmogênica de quitosana + 5 mL de etanol 99% (Q); 25g de Sol. film. quit. + 5 mL extrato etanólico (QE); 25 g de Sol. film. quit. + 5 mL sol. Lignina 0,05% (QL0,05); 25g de Sol. film. quit. + 5 mL sol. Lignina 0,1% (QL0,1).

Cada mistura foi homogeneizada por 10 min e sonicada para eliminação das bolhas e depois vertida em placa de Petri de poliestireno (9 cm de diâmetro) e seca a 40 °C durante 24 horas em estufa com circulação de ar. Assim, 4 formulações de biofilmes foram produzidas para serem analisadas; (Q), (QE), (QL0,05) e (QL0,1).

### **3.6.3 - Análise dos biofilmes produzidos**

#### **3.6.3.1 – Recobrimento em mamão papaia e análise da vida de prateleira por perda de massa.**

As soluções filmogênicas foram avaliadas também como recobrimento em mamão papaia visando a análise de vida útil das frutas por perda de massa e preservação aparente por meio de imagens conforme Escamila-Garcia et al. (2018) com as algumas modificações. Os mamões foram adquiridos no mercado local e do mesmo lote da maturação. Foram lavados com água corrente e secos à temperatura ambiente. O revestimento foi aplicado generosamente (aproximadamente 2g de solução filmogênica) sob a casca dos mamões utilizando um pincel previamente esterilizado (lavado, seco e aplicado álcool 70%). As massas das papaias revestidas foram avaliadas a cada 24 horas durante por 7 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Mamões não-revestidos foram utilizados como controle e foram analisados nos mesmos tempos de armazenamento. A perda de massa foi determinada pela diferença das massas final e inicial multiplicada por 100, os experimentos tiveram 5 repetições. Na Figura 3.3 é possível observar a aplicação das soluções filmogênicas nas papaias.



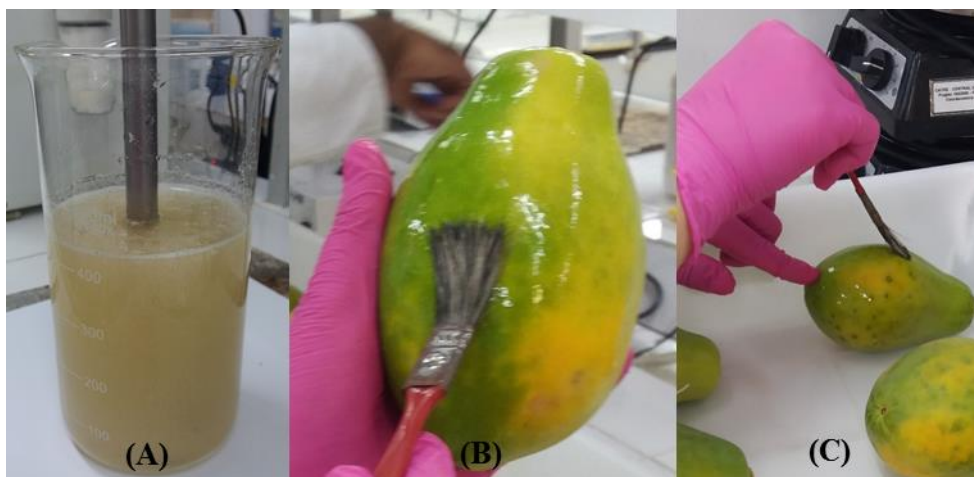


Figura 3.3 – A figura é composta por: (A) - Solução filmogênica principal (Q); (B) – Aplicação da solução filmogênica no mamão com auxílio de pincel; (C) – Finalização da aplicação.

### 3.6.3.2 – análise de propriedades antioxidantes utilizando o método do sequestro do radical DPPH.

Uma vez obtidos os filmes nas formulações estudadas foram realizadas análises visando a caracterização e a possível aplicação para o reaproveitamento do extrato etanólico e a lignina obtidos a partir do resíduo industrial de mangaba.

Os filmes desenvolvidos neste estudo foram submetidos à análise de propriedades antioxidantes utilizando o método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). As análises foram feitas durante o tempo de incubação de até 72 horas a 515 nm. Neste caso, 100,0 mg de película foram colocados em 10 mL de solução de etanol-DPPH (50 mg/L) conforme Crouvisier-Urien et al. (2017), Blois (1958). A redução na atividade de eliminação de radicais em % foi expresso da seguinte forma pela Equação 3.5.

$$\text{Redução \% (t)} = 100 - \frac{\text{Abs}_{\text{branco}}(t) - \text{Abs}_{\text{amostra}}(t)}{\text{Abs}_{\text{branco}}(t)} \times 100 \quad 3.5$$

Sendo  $\text{Abs}_{\text{amostra}}(t)$  a absorvância medida para a solução de etanol/DPPH contendo a amostra de filme no tempo  $t$  e  $\text{Abs}_{\text{branco}}(t)$  é a absorvância da solução de etanol DPPH sem amostra na mesmo tempo. Portanto, a cinética leva em conta a auto degradação dos radicais DPPH.

### **3.6.3.3 – Hidrofobicidade da superfície da superfície dos biofilmes a base de quitosana.**

A hidrofobicidade da superfície foi medida através do ângulo de contato da água com a superfície das películas sendo medida a 25 °C e ~ 50% HR por goniometria pelo método de gota séssil (Krüss GmbH, Alemanha) usando o software ADVANCE.

### **3.6.3.4 – A estrutura dos biofilmes por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e estabilidade térmica por análise termogravimétrica (TGA).**

Os ensaios de FTIR foram realizados usando o FT-IR Spectrum™ 65 (Perking Elmer, EUA) com espectros coletados ao longo da faixa espectral de 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  (OLIVEIRA et al., 2018). A morfologia dos filmes foi verificada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV - Phillips XL-30ESEM, EUA) (OLIVEIRA et al., 2018). As micrografias foram obtidas com ampliação de 20 $\times$ , 300 $\times$ , 1500 $\times$  e 5000 $\times$ . A estabilidade térmica dos filmes foi medida por análise termogravimétrica (TGA) usando um analisador TGA (Hi-Res TGA2950, Instrumento TA, New Castle, DE, EUA). Cerca de 5,0 mg de uma amostra foram adicionados a uma solução padrão de alumínio e aquecidos de 30 a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob um fluxo de nitrogênio de 50  $\text{cm}^3/\text{min}$ .

### **3.6.3.5 – A taxa de transmissão (TVw) e a permeabilidade aos vapores de água (PVw) dos biofilmes a base de quitosana.**

Na literatura encontramos relatos de importantes propriedades de barreira em biofilmes que conforme Fama et al., 2012 dizem respeito a sua capacidade de efetuar ou inibir trocas entre o produto embalado ou encapsulado e o ambiente externo. Uma importante propriedade de barreira é a permeabilidade aos vapores de água, que pode ser definida como a quantidade de água que passa através de uma determinada área do material por unidade de tempo quando esse material está sujeito a uma diferença de pressão de vapor entre as duas faces expostas conforme o sistema ilustrado na Figura 3.4

Os biofilmes de quitosana foram submetidos a 10 horas de experimento sendo a cada hora verificado a massa do sistema. A espessura dos biofilmes foi verificada através de um Micrômetro externo (Mitutoyo IP 65 – Coolant Proof) com precisão de 0,001 mm e aferido a 300gf. Foram realizadas 6 medições e obtida a média para a medida da espessura de cada filme estudado.

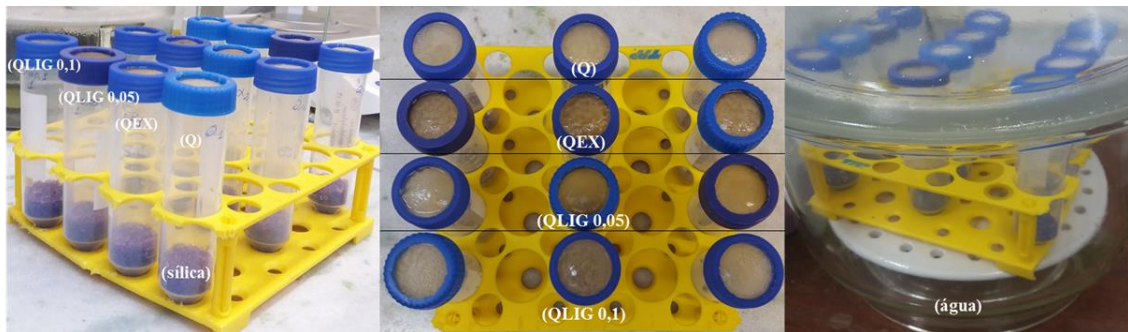


Figura 3.4 – Aparato experimental para a realização do ensaio de barreira nos filmes de quitosana com adição de extrato etanólico e soluções de lignina formulados na seção 3.6.3.

A taxa de transmissão ( $TV_w$ ) e a permeabilidade aos vapores de água ( $PV_w$ ) dos biofilmes estudados foram determinadas gravimetricamente à temperatura ambiente, conforme Angellier-Coussy et. al (2011), com algumas modificações. Os biofilmes, com áreas conhecidas e previamente secos, foram colocados em células de permeação (Tubos plástico com diâmetro de 2,5 cm) adaptados contendo em seu interior sílica também previamente seca (umidade relativa próxima de 0%). Esta célula foi fechada e vedada para garantir que a passagem de vapores de água ocorresse somente através do biofilme. A taxa de transmissão de vapores de água ( $TV_w$ ) foi calculada de acordo com a Equação 3.6.

$$TV_w = \frac{\Delta m}{\Delta t A} \quad 3.6$$

Sendo ( $A$ ) a área de permeação (área do biofilme em metros quadrados),  $\Delta m$  é o ganho de massa de água absorvida pela sílica (em gramas) e  $t$  é o tempo total (em segundos). O termo  $\Delta m/\Delta t$  pode ser determinado segundo o coeficiente angular da equação da reta do gráfico entre os pontos de ganho de massa ( $\Delta m$ ) e tempo ( $\Delta t$ ).

Para a obtenção da permeabilidade aos vapores de água (PV<sub>w</sub>) foi utilizada a Equação 3.7.

$$PV_w = TV_w \times l\Delta P \quad 3.7$$

Onde  $l$  é a espessura do filme (em metros) e  $\Delta P$  é a diferença de pressão de vapor (em Pascal) do ambiente contendo sílica e contendo água destilada.

### 3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software Statistica 7.0 (Statsoft, USA), utilizando o teste de Tukey para três amostras independentes, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3.8 Resultados e discussão

### 3.8.1 Conteúdo de pectina

No presente estudo, o resíduo de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) foi dividido em dois grupos, submetido a extração com etanol e o não extraído. Estes resíduos foram então conduzidos à quantificação de pectina e subsequente FES por *Aspergillus niger* IOC 4003 para a produção de poligalacturonase. A quantidade de pectina em termos de pectato de cálcio (%) foi maior para o resíduo extraído com etanol, atingindo valores de 4,14% e apenas 0,46% para o resíduo não extraído, mostrando que os constituintes que foram extraídos do resíduo interferem diretamente na disponibilidade da pectina no resíduo de mangaba. As principais fontes de pectina comercial com alto teor de metoxilação (ATM) são as casca de laranja e bagaço de maçã, ambos resíduos das indústrias de processamento de suco (SMITH e HONG-SHUM, 2003). Destaca-se que Rocha (2018) reporta porcentagem de pectato de cálcio - indicador de pectina - encontrada nos resíduos lavados da polpa de acerola e cajá de 2,94% e 5,34%, respectivamente, enquanto que na maçã (*Malus sp*) Canteri et al. (2012) relatam um conteúdo de pectina em base úmida de 0,5-1,6% em massa seca de 4-7% já para o Bagaço de

maçã em base úmida 1,5 a 2,5% e em base seca 15 a 20% de pectina e esse mesmo valor em base seca para o Bagaço de beterraba. Os valores encontrados em outros estudos para diferentes resíduos de frutas estão próximos aos apresentados pelo resíduo de mangaba. Assim, o resíduo extraído pode servir como um indutor para a síntese de pectinases.

### 3.8.2 Propriedades antioxidantes do extrato do resíduo não fermentado

No presente estudo, o extrato obtido do resíduo de mangaba não fermentado (seção 3.3.4) mostrou resultados de captura do radical DPPH de 3,55  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g e 7,42% de captura de radicais hidroxila e atividade antioxidante total (TCA) de 95,46 mg de equivalente de ácido ascórbico/g amostra. Estes valores são interessantes mostrando o potencial de extração de componentes antioxidantes desses resíduos, mesmo após o processamento. Segundo a literatura a quantidade de atividade antioxidante (AA) presente no resíduo de manga é promissora quando comparada à polpa do fruto, apesar de ser submetida a diversos processos, desde a polpa até o resíduo. O processamento industrial da polpa de mangaba, assim como de outras frutas, inclui várias etapas, como extração mecânica (maceração), filtração e congelamento. As etapas de processamento podem resultar em oxidação, degradação, lixiviação ou outros eventos que reduzem o conteúdo de compostos bioativos em frutas processadas (BRANCO et al., 2016; NORA et al., 2014; TOMAS et al., 2015). Por exemplo, resíduos agroindustriais, como bagaço de uva, têm sido objeto de estudos que mostram resultados de  $1,12 \pm 0,04$  mmol TE/g de resíduo seco, conforme relatado por Tournour et al., (2015). Outro resultado interessante foi apresentado por Machado et al. (2015) que estudaram o resíduo de amoreira-preta (*Rubus fruticosus* L.) que apresentou AA de 76,03  $\mu\text{mol}$  TE/g de resíduo fresco. Por tanto diante desses resultados encontrados na literatura que reportam valores consistentes, em se tratando de resíduos, é interessante observar a possibilidade de reutilização e aplicação dessa matéria-prima barata. Alguns estudos foram realizados com a mangaba, por exemplo, Dutra et al. (2017) obtiveram para a polpa congelada uma atividade antioxidante de  $1907,56 \pm 102,43$   $\mu\text{mol}$  TEAC/100g no ensaio com DPPH. Lima et al. (2015a) relataram que a mangaba apresentou o valor de 182,58 mg/100g para o valor da atividade antioxidante total (TCA). Esses valores apresentados na literatura para a polpa de mangaba nos leva a concluir que mesmo sendo submetido a diversos processos o resíduo resultante ainda apresenta características que podem interessar a sua aplicação biotecnológica justificando assim maiores estudos.

### 3.8.3 Produção e quantificação de poligalacturonase e proteínas

No presente estudo, os resíduos de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), tanto o submetido a extração com etanol como o não extraído foram utilizados na FES por *Aspergillus niger* IOC 4003 para a produção de poligalacturonase.

A Figura 3.5 (A) mostra os resultados obtidos para a produção da enzima PG por FES a partir de resíduo de mangaba extraído e não extraído em 168 horas, enquanto a Figura 3.5 (B) ilustra a concentração de proteínas totais produzidas. Conforme apresentado na Seção 3.8.1 a quantificação do conteúdo de pectina é expressivamente superior no resíduo de mangaba que sofreu extração com etanol esse fato é importante e pode estar associado com uma produção mais rápida de poligalacturonase, visto que, pode-se observar que no 4º dia (96 horas) de fermentação a produção da enzima obteve seu resultado ótimo para o resíduo extraído, obtendo-se aproximadamente  $76,32 \pm 0,11$  U/g com  $825,08 \pm 0,00$  µg/mL de proteínas totais. Uma maior disponibilidade de pectina no ambiente pode estar relacionada a uma maior velocidade de produção enzimática teoricamente conforme preconiza o Modelo cinético de Michaelis-Menten. Com relação ao resíduo não extraído, a atividade máxima foi alcançada no 7º dia de fermentação (168 horas) com valor de 78,30 U/g e as proteínas atingiram a máxima produção após 5 dias (120 horas) atingindo  $1228,15 \pm 0,01$  µg/mL. Nesse caso com uma menor oferta de pectina a produção da enzima é retardada, apesar do resultado superior ao final do processo. Por tanto para a definição do tempo ótimo de fermentação, foi levado em consideração o menor tempo de produção, assim, o 4º dia de cultivo ou 96 horas foi determinado como o tempo ótimo de produção de PG de *Aspergillus niger* IOC 4003 por FES a partir do resíduo de mangaba extraído. Vale ressaltar que a biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas e resíduos florestais, tem sido reconhecida como uma fonte potencial sustentável de açúcares para biotransformação em produtos de valor agregado, como enzimas (HIMMEL et al., 2007; LI et al., 2008). De tal modo, é enfatizado o potencial de reutilização do resíduo de mangaba na produção de Poligalacturonase (PG) usando FES.

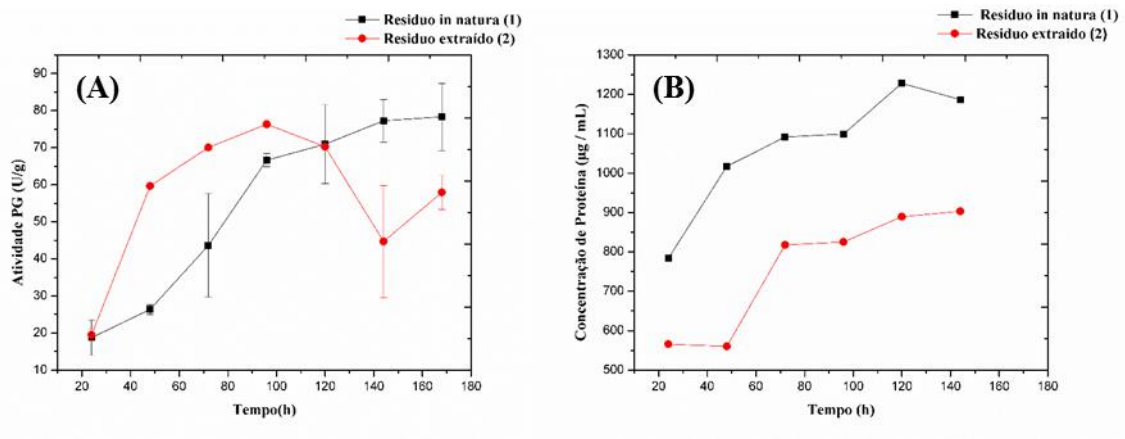


Figura 3.5 – Atividade enzimática (A), da PG de *A. niger* IOC 4003 em resíduos de mangaba in natura e extraído e quantificação de proteínas (B), por tempo de fermentação.

### 3.8.4 Estabilidade da Poligalacturonase.

Após a avaliação do comportamento e do potencial dos resíduos extraído e não extraído (*in natura*) na produção de poligalacturonase, o extrato enzimático produzido após 96 h de fermentação foi avaliado quanto à estabilidade, variando-se a temperatura e o pH, conforme demonstrado nas Figuras 3.6 (A e B) respectivamente. Ressalta-se que a atividade foi expressa como atividade remanescente (%).

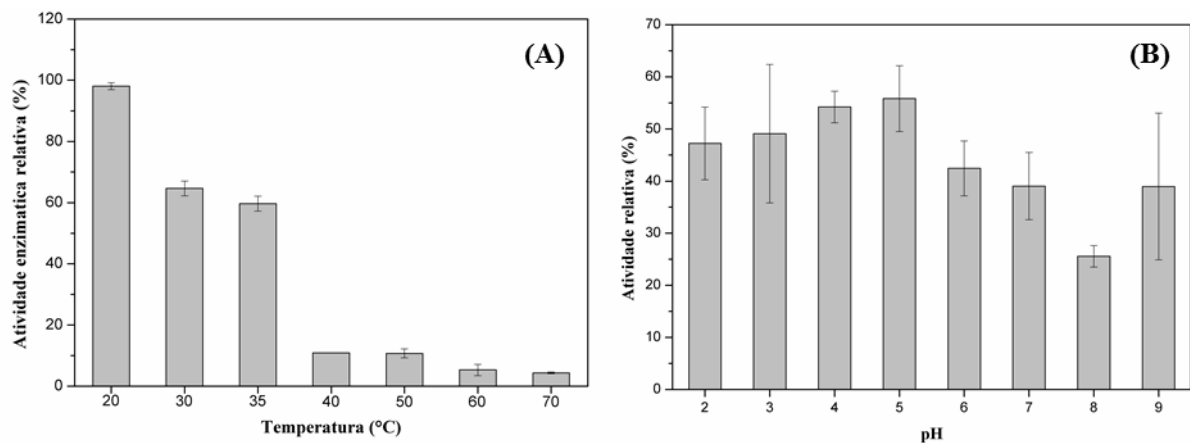


Figura 3.6 - Estabilidade da PG de *A. niger* utilizando resíduo de mangaba extraído como substrato quando submetida a diferentes temperaturas (A) e pHs (B).

Após incubação nas temperaturas superiores a 40 °C a atividade da PG é significativamente reduzida, conforme ilustrado na Figura 3.6 (A). De fato, no presente estudo, em temperaturas de até 35 °C, foi observado uma atividade relativa acima de 60% por 1 hora. Por exemplo, Anand et al. (2017) relatam uma temperatura ótima para a PG purificada em 30 °C. Juwon et al. (2012) relataram uma temperatura ótima para o *Aspergillus niger* CSTRF PG

de 35 °C, enquanto Dey et al. (2014) obtiveram uma temperatura ótima de 50 °C para a PG de *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652. No presente estudo foi observado que a estabilidade da PG acima de 80% foi obtida apenas na temperatura de 20 °C por até para 1 hora. É importante destacar que em temperaturas mais elevadas pode ocorrer desnaturação da proteína. Por tanto as temperaturas ótimas obtidas para a poligalacturonase analisada por este trabalho são adequadas para a manutenção de sua atividade.

Em relação ao pH, o perfil de estabilidade da PG foi determinada pela medida da atividade residual após a incubação do extrato enzimático a 30 °C, com pH variando de 2 a 9 por até 2 horas, como mostra a Figura 3.6 (B). Observa-se que em pHs alcalinos a atividade catalítica da PG é consideravelmente reduzida e que em pH 4 e 5 a PG manteve sua atividade relativa acima de 50% por até 1 hora. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Juwon et al. (2012) e Dey et al. (2014) que obtiveram valores para o pH ótimo de 4,0 e 4,5, respectivamente. Em contraste com Anand et al. (2017) o pH ótimo da enzima purificada foi de 10,0 e foi estável na faixa de pH de 7-10. A Figura 3.7 mostra o perfil eletroforético das proteínas produzidas por *Aspergillus niger* IOC 4003 usando o resíduo mangaba, extraído e in natura.

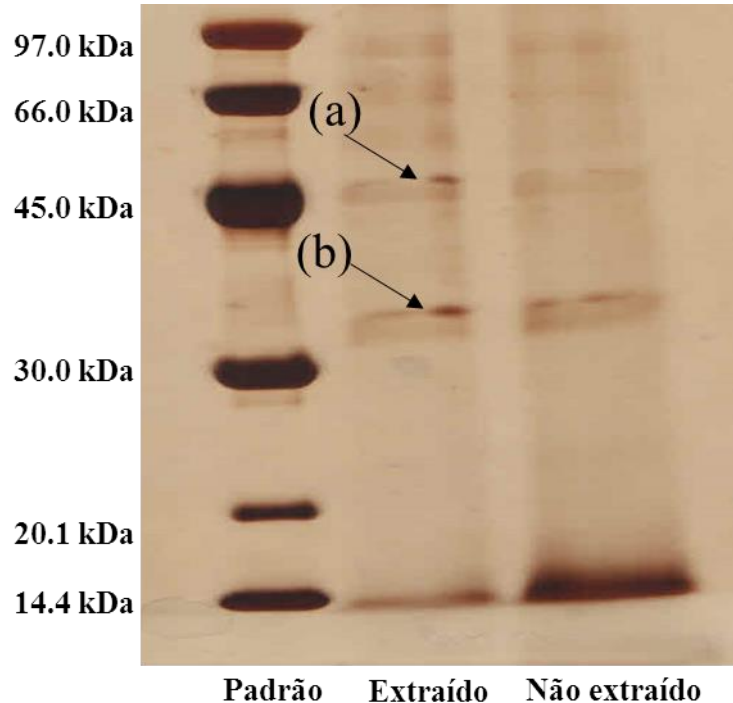


Figura 3.7 – Gel de eletroforese dos extratos brutos obtidos por FES do resíduo de mangaba por *A. niger* IOC 4003.



Alguns estudos mostram uma variação significativa nas massas moleculares das poligalacturonases produzidas pelo microrganismo *Aspergillus niger*. Por exemplo, Kant et al. (2013) utilizaram o microrganismo *Aspergillus niger* MTCC 3323 e obtiveram massas moleculares para poligalacturonases de 39 a 64 kDa. Já Sakamoto et al. (2002) relatam PG de *A. niger* com massas moleculares de 82 e 56 kDa após purificação. Para Juwon et al. (2012) a massa molecular encontrada de PG purificada de *A. niger* CSTRF foi de 79 kDa, enquanto Dey et al. (2014) relatam PG purificada com única banda no gel massa molecular de 30 kDa.

No presente estudo como mostra a Figura 3.6 observou-se a presença de bandas mais fortemente marcadas das proteínas nos extratos enzimáticos brutos obtidos por FES de *A. niger* IOC 4003 em resíduo de mangaba extraído e não extraído que podem estar relacionadas à presença de poligalacturonase previamente quantificada nos extratos (Seção 3.8.3). Foi realizada uma estimativa das massas moleculares referentes a essas bandas utilizando-se a correlação do deslocamento das proteínas obtendo-se os valores aproximados de suas respectivas massas moleculares para (a) 52 kDa e (b) 35 kDa. A massa molecular desta enzima produzida pelo fungo *Aspergillus niger* varia grandemente devido a diferentes fatores, como o uso de diferentes substratos e seus constituintes, os métodos de produção, extração e purificação empregados (DEY et al, 2014).

### 3.8.5 Aplicação enzimática e propriedades do suco clarificado.

O extrato enzimático produzido foi aplicado ao suco de mangaba em duas carga enzimáticas em substituição à água. A caracterização físico-química e a análise dos compostos antioxidantes do suco de mangaba clarificado são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Análises físico-químicas no suco de mangaba clarificado pela ação de PG de *A. niger* IOC 4003 e suco in natura de mangaba.

Propriedades	Suco controle	Suco clarificado (1,0 U/mL)	Suco clarificado (2,0 U/mL)
Proteínas totais (mg/mL)	0,0127±0,002	0,0133±0,007	0,0230±0,009
Turbidez (%)	100,00±5,55 <sup>a</sup>	92,22±7,63 <sup>a</sup>	74,97±3,40 <sup>a</sup>
Viscosidade (%)	100,00	10,68±0,40	9,30±0,20
pH	3,25±0,20 <sup>a</sup>	3,66±0,40 <sup>a</sup>	3,42±0,30 <sup>a</sup>
Fenólicos totais (mg GAE /100g)	582,17±0,021 <sup>a</sup>	589,88±0,023 <sup>a</sup>	575,08±0,016 <sup>a</sup>

---

Rendimento (%; v/m)	23,3	23,3	26,7
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,0117±0,00012 <sup>a</sup>	1,0122±0,00022 <sup>b</sup>	1,0124±0,00017 <sup>c</sup>
Sólidos solúveis (brix)	3,78±0,04 <sup>b</sup>	3,91±0,02 <sup>ab</sup>	3,95±0,0025 <sup>a</sup>

---

Fonte: Própria autora (2019). Análise ANOVA (*Analysis of Variance*). Tipo de análise: *one-way ANOVA, Type I (sequential)*. *Post-hoc: homogeneous group* ( $\alpha = 0,05$ ), teste Tukey HSD (*High statistical difference*). Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias.

A utilização do extrato enzimático bruto (sem purificação) produzido por FES de *A. niger* em resíduo de mangaba extraído, para a clarificação do suco de mangaba, podem também estar atuando outras proteínas ou tendo auxílio de outras enzimas produzidas pelo microrganismo. No entanto, efetivamente obtivemos respostas que podem ser comparadas com a literatura presente.

Com relação à concentração de proteínas totais, percebeu-se que houve um aumento na maior carga enzimática adicionada ao suco. Esse aumento foi de 4,72% para o suco clarificado com carga enzimática de 1,0 U / mL e cerca de 81,10% para o suco clarificado com carga enzimática de 2,0 U / mL. Esse fato pode ser explicado pela concentração de proteínas presentes no extrato enzimático, que consequentemente proporcionaria um aumento quando utilizado em uma maior proporção. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos nos sucos estudados.

O teor de compostos fenólicos no suco não clarificado foi de 582,17 mg GAE/100g, que foi ligeiramente menor do que para o suco clarificado, cerca de 589,88 mg GAE/100g. Esse resultado superior não se repete quando aumenta-se a carga enzimática. Isso pode ser justificado pelo processo de clarificação que remove moléculas orgânicas e inorgânicas e que com uma carga enzimática maior possivelmente reduziu o teor de fenólicos. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho foram superiores ao teor de compostos fenólicos presentes no fruto (mangaba) reportado por Lima et al. (2015a) com cerca de 490,0 mg GAE/100g.

Outros estudos ainda relatam valores inferiores como os relatados por Lima et al. (2015b), por Rufino et al. (2010) e por Almeida et al. (2011) que encontraram 352,98, 169,0 e 159,9 mg GAE / 100g, respectivamente para as frutas (mangaba). Sabe-se que com a produção da polpa há um aumento desses compostos fenólicos como mostra Dutra et al. (2017) que apresentaram valores de fenólicos totais de 6631,39 mg/100g e 8860,06 mg/100g para fruta e polpa processada de mangaba, respectivamente. Esses valores diferentes para quantificação de compostos fenólicos na mesma fruta podem ser justificados pela origem, gral de maturação e processos sofridos.

A conhecida ação das poligalacturonases na hidrólise completa de pectina e de polissacarídeos ramificados para a clarificação de sucos de fruta corrobora diretamente com a

redução da turbidez e viscosidade dos sucos (UENOJO; PASTORE, 2007). A redução da turbidez obtida pela aplicação das cargas enzimáticas estudadas de 1,0 e 2,0 U / mL foram respectivamente de  $92,22 \pm 7,63$  e  $74,97 \pm 3,40$ , que ocorre possivelmente pela ação da poligalacturonase anteriormente quantificada no extrato (Seção 3.8.3). Na literatura encontramos trabalhos que sugerem que a turbidez está correlacionada com a presença de pectina, por isso, a redução da turbidez é uma indicação da ação das pectinases, que atuam sobre as pectinas (ALVAREZ et al., 1998; GRASSIN; FAUQUEMBERGUE, 1996). Porém, em se tratando de um extrato bruto (composto por diversos produtos da FES), quando utilizado numa quantidade maior (carga enzimática de 2 U / mL) é possível que esteja ocorrendo reações concorrentes às hidrólises esperadas e com isso interferindo diretamente no processo de clarificação e esperada queda na turbidez.

As análises da redução da viscosidade no suco clarificado de mangaba mostraram que houve uma diminuição na viscosidade de cerca de 34% para a carga enzimática de 1,0 U/mL. As mesmas considerações sobre a interferência dos constituintes do extrato bruto podem ser pertinentes para a baixa redução na viscosidade para o uso de uma carga enzimática maior. Na literatura encontramos resultados semelhantes de redução de viscosidade em suco de maçã apresentados por Sandri et al. (2013), que obtiveram redução da viscosidade abaixo de 40%, mesmo utilizando enzima comercial ou extrato sintetizado por *Aspergillus niger* LB23. Outro trabalho apresentado por Ongaratto e Viotto (2016), mostrou uma redução de 20% na viscosidade no suco de pitanga. Esses resultados se mostram semelhantes aos obtidos no presente estudo para a aplicação do extrato bruto obtido por FES de *A.niger* IOC 4003 em resíduo extraído de mangaba, com uma carga enzimática de 1 U/mL.

Para a análise de pH não houve diferença significativa entre as amostras, já para a densidade foi observada diferença significativa em todas as amostras com um discreto aumento da densidade com a aplicação das cargas enzimáticas. Para a elaboração do suco de mangaba no presente experimento, foi utilizada polpa comercial e obedecidas as orientações do fabricante quanto as proporções de polpa e água. O suco clarificado apresentou aumento do °Brix com a adição do extrato enzimático, porém, não alcançou 7,00 °Brix, que é o mínimo exigido pela legislação brasileira que determina os padrões gerais de identidade e qualidade estabelecidos para o suco tropical de Mangaba. A análise estatística mostrou diferença significativa entre o °Brix do suco in natura quando comparado com o suco submetido a carga enzimática de 2 U/mL, porém não houve diferença entre o °Brix do suco in natura e o aplicado com a carga enzimática menor. No entanto, essa queda nos sólidos solúveis pode ser justificada pelo fato de se ter manipulado uma pequena amostra. Em escala industrial, as mangabas terão

variação no grau de maturação, conseqüentemente, variando-se também o seu °Brix. Uma mistura de polpas com maior e menor grau °Brix é utilizada industrialmente para atender às especificações do órgão regulador.

Em relação ao rendimento, a melhor condição de ensaio foi com duração de 30 minutos de incubação e foi possível observar que com a carga enzimática de 1 U/mL não houve melhoria no valor obtido porém com a carga enzimática de 2 U/mL houve um aumento no percentual de rendimento do suco o que é esperado.

Deste modo, permite-se concluir que para alguns parâmetros físico-químicos, a adição das proporções do extrato enzimático não ocasionou grandes alterações sendo possível adicioná-las sem maiores mudanças físicas no suco, o que é desejável. Mas é importante destacar que o suco tratado com a adição do extrato enzimático efetivamente teve propriedades significativamente modificadas, o que é interessante e comprovaria a ativa ação enzimática.

### **3.8.6 Lignina recuperada do resíduo fermentado**

Lignina é um resíduo da indústria de papel utilizada comumente para gerar energia, alguns trabalhos relacionam a quantidade de lignina presente na madeira ao poder calorífico e comprovam que quanto maior o teor de lignina encontrado, maior o poder calorífico (THOMAZ et al., 2007; HAYKIRI-ACMA et al., 2010). Porém recentemente aplicações mais nobres vem sendo desenvolvidas como em resinas, biocombustíveis, fonte de compostos fenólicos e agente antioxidante (GONÇALVES et al, 2016; SCHUTYSER et al, 2018).

A extração de lignina com NaOH é um caminho convencional pelo mecanismo de ação da hidrólise básica pois esses processos são menos efetivos na solubilização de celulose e hemicelulose sendo portanto, mais utilizado para a remoção da fração de lignina (CHANG & HOLTZAPPLE, 2000).

No presente estudo na Seção 2.4.2 na tabela 2.1 foi apresentado a porcentagem 21,82 % de lignina presente no resíduo de mangaba e desse valor foi possível recuperar 75% do conteúdo inicial de lignina utilizando 4% NaOH (m/v) em 30 min, 121°C, dessa porcentagem foi determinado que 87,16% é lignina insolúvel ou Klason e 1,5% é lignina solúvel. Ainda foi possível observar que traços de glicose permaneceram após a hidrólise. Diferentemente de Nascimento et al., (2016) que relataram a presença de resíduos de xilose na lignina alcalina recuperada do bagaço de cana de açúcar e quantificaram de 5,9 a 7,8 % de lignina no bagaço de cana de açúcar com o mesmo mecanismo de hidrólise básica com NaOH 4% (m/v) e

recuperou desse valor uma massa de 50 a 55%. Já Gonçalves et al., (2016) obtiveram um rendimento de 91,1% (em relação ao total de lignina no licor), na recuperação de lignina utilizando o mesmo processo.

Estes resultados demonstram a eficiência do método para recuperação de lignina utilizada neste trabalho. A lignina obtida foi utilizada para fabricação de biofilmes a base de quitosana.

### 3.8.7 Análises dos filmes de quitosana adicionado de lignina e extrato etanólico.

#### 3.8.7.1 Análises de recobrimento em mamões papaia utilizando as soluções filmogênicas a base de quitosana.

Os mamões recobertos pelas soluções filmogênicas formuladas na seção 3.6.3 foram avaliados quanto a perda de massa e ao apodrecimento (visual) a cada 24 horas durante 7 dias em armazenamento à temperatura ambiente, assim como mamões não-revestidos foram utilizados como controle e analisados nos mesmos tempos de armazenamento.

Foram utilizados cinco mamões para cada solução filmogênica nos ensaios de recobrimento. A massa inicial foi admitida como 100% resultando ao final da análise a massa residual em % apresentados na Figura 3.8.

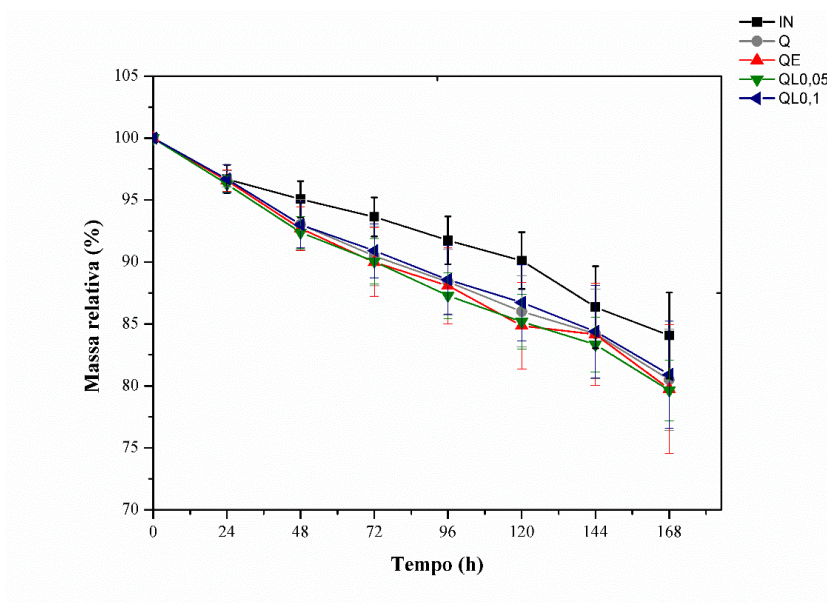


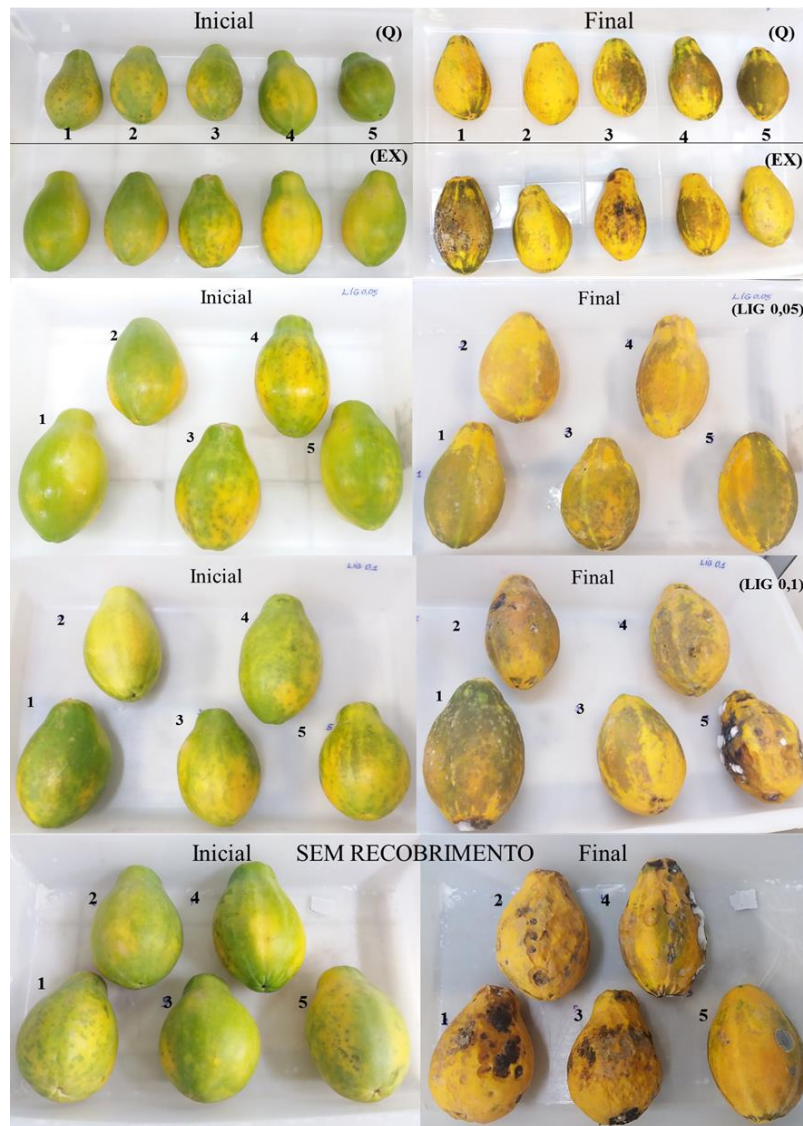
Figura 3.8 – Valores médios de perda de massa relativa em relação ao tempo em mamões papaia in natura e revestidos com soluções filmogênicas Q, QE, QL 0,05 e QL 0,1 as mesmas descritas na seção 3.6.3.

Os mamões recobertos utilizando as soluções filmogênicas nas formulações estudadas e aplicadas com a metodologia descrita na seção 3.6.4, apresentaram uma perda de massa superior aos frutos in natura para todas as formulações nas condições do ensaio realizado, apesar de estatisticamente não haver diferença significativa,  $p > 0,05$ .

Comparando a aplicação ou não da solução filmogênica de quitosana, independentemente de suas formulações, verifica-se a maior perda de massa fresca nos tratamentos com presença de quitosana Figura 3.8. Esta situação pode ser devido ao fato dos frutos tratados com quitosana terem permanecido com a cor verde por mais tempo, pelo retardamento do amadurecimento e, nesta condição, perderem mais massa fresca, decorrente das maiores taxas de respiração e transpiração.

Estes resultados corroboram com os obtidos por Lin et al. (2008) ao avaliarem o efeito do revestimento de quitosana na qualidade de peras 'Yali' e verificaram redução significativa da perda de massa fresca em peras revestidas com 1,5% de quitosana em comparação com as não revestidas, durante o armazenamento a temperatura ambiente e umidade relativa controlada entre 80-90%. Para Chien et al. (2007) foi observado uma menor perda de massa fresca, cerca de (10,27%) em mangas minimamente processadas, tratadas com quitosana (2%), comparadas com o tratamento-controle (19,86%). Podemos concluir neste caso que a adição de extrato etanólico e soluções de lignina 0,05 e 0,1% em solução filmogênica de quitosana a 2% interferiram no desempenho da conservação por meio do retardo do amadurecimento e consequente maior perda de massa dos frutos recobertos estudados.

A qualidade e vida de prateleira dos mamões recobertos foram avaliadas, por meio do amadurecimento e aparecimento de podridão, para tanto, é importante frisar que a ação antifúngica e antibacteriana de revestimentos de quitosana já foi constatada por diversos autores como Camili et al. (2007), que utilizaram a quitosana no recobrimento da uva "Itália", verificando sua ação antifúngica suprimindo o crescimento do mofo cinzento. Já Assis e Alves (2002) verificaram a ação antifúngica de revestimento da quitosana no recobrimento de maçãs. Chien et al. (2007) também avaliaram os efeitos do revestimento comestível da quitosana na qualidade e vida de prateleira de fatias de manga. Nas figuras 3.9 a seguir são mostradas as imagens dos mamões recobertos e sem recobrimento.



Figuras 3.9 – Qualidade e tempo de prateleira de mamões papaia com e sem recobrimento de soluções filmogênicas de quitosana (Q) com adição de extrato etanólico (EX) e soluções de lignina (LIG 0,05 e LIG 0,1); formulados conforme a seção 3.6.3.

É possível observar um maior apodrecimento nos mamões não recobertos e nesse caso a formulação da solução filmogênica contendo 0,05% de lignina apresentou um melhor resultado quanto ao tempo de prateleira. Esse resultado pode estar relacionado com a concentração de lignina utilizada nessa formulação bem como seus efeitos antioxidantes que colaborou para um retardamento no envelhecimento assim como no aparecimento de microrganismos. Além disso foi observado uma menor presença de microrganismos nos mamões recobertos com as soluções filmogênicas a base de quitosana. Esse aspecto pode estar ligado a atividade antimicrobiana da quitosana. Pode-se então concluir que para todas as formulação das soluções filmogênicas houve um atraso no amadurecimento assim como a

inibição do aparecimento de microrganismos quando comparados com os resultados dos mamões sem recobrimento.

### 3.8.5.2 Elaboração e análises nos biofilmes a base de quitosana adicionados de extrato etanólico e soluções de lignina.

Para a realização de outros experimentos, as formulações descritas na seção 3.6.3 para as soluções filmogênicas de quitosana com adição de proporções de lignina e extrato etanólico foram elaboradas e obtidos os filmes após secagem em estufa a 40 °C. Os biofilmes obtidos estão apresentados conforme mostra a Figura 3.10. Vale ressaltar que 0,05 e 0,1% foram valores de lignina que interferem minimamente na coloração dos filmes.

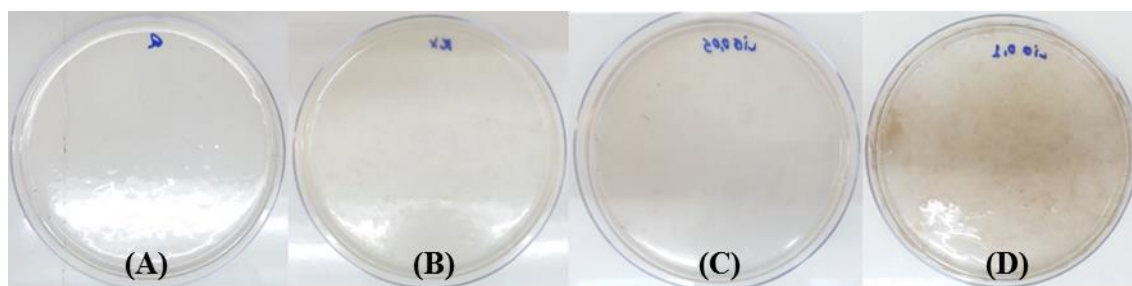


Figura 3.10 – Biofilmes obtido pelo método de fundição por solvente: (A) biofilme de quitosana (Q); (B) biofilme de quitosana + extrato etanólico (QE); (C) biofilme de quitosana + sol. Lignina 0,05% (QL0,05); (D) biofilme de quitosana + sol. Lignina 0,1% (QL0,1).

#### 3.8.5.2.1 Propriedade antioxidante - Atividade de eliminação do radical (AER) dos filmes

Os biofilmes estudados tiveram sua atividade antioxidante determinadas de acordo com a atividade de captura do radical DPPH conforme descrito na seção 3.6.3. Todos os filmes reagiram com este radical livre podendo ser observado inclusive pela perda da coloração da solução de DPPH e exibiram atividade antioxidante até que o equilíbrio fosse alcançado após 72 h de experimentos, como mostrado na Figura 3.11.



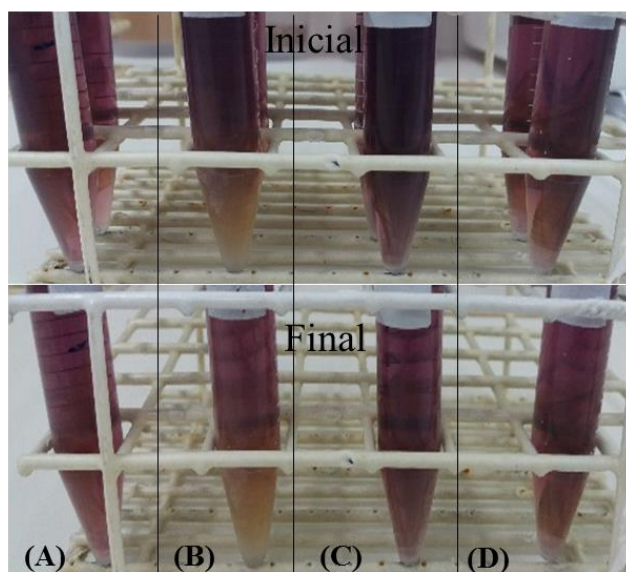


Figura 3.11 - Atividade antioxidante para sequestro de DDPH no início e fim do experimento com redução aparente de intensidade da cor nas soluções contendo 100 mg dos biofilmes sendo: (A - Q), (B - QE), (C - QL0,05) e (D - QL0,1), nas formulações descritas na seção 3.6.3.

Para o filme de quitosana adicionado de extrato (QE), observa-se uma maior redução dos radicais representando uma maior atividade antioxidante quando comparado as demais formulações de filmes avaliadas. Esse comportamento se justificada pela presença de compostos fenólicos no extrato incorporado. Para essa amostra a captura do radical DPPH atingiu valores aproximados de 38%. Alguns estudos presentes na literatura mostram valores diferentes para a atividade antioxidante de biofilmes de quitosana. O valor apresentado por Hromiš et al. (2015) foi de 28,96%, após 24 horas, para a atividade antioxidante do filme de quitosana. Esse resultado foi inferior ao apresentado por Crouvisier-Urien et al. (2017) que ao final de 72 horas obtiveram uma redução de 55% em filmes com formulação semelhante. No mesmo estudo, observou-se que não houve diferença significativa no potencial antioxidante entre filmes de formulações com adição de lignina e tratados com diferentes métodos de homogeneização. No presente estudo, o método de homogeneização foi o mesmo para todos os filmes porém devido as diferentes formulações os potenciais antioxidantes apresentados foram distintos. O filme constituído por quitosana (Q) apresentou 20,37% de eliminação, já as outras formulações com adição de lignina, mostraram 18,08% e 29,63%, respectivamente (QL0,05 e QL0,1). Esse resultado frente as formulações com adição de lignina se mostra coerente visto que segundo Delmer; Amor, (1995), a lignina tem em sua composição um polímero aromático constituído por estruturas básicas fenólicas responsáveis pela ação antioxidante. Por isso na formulação contendo o maior teor desse composto esperava-se um melhor resultado para essa análise.

De maneira geral todas as formulações apresentaram atividade antioxidante sendo a finalidade para a qual o filme seja aplicado o que determinaria a escolha da formulação a ser utilizada. Neste caso, para uma aplicação que necessite de uma maior ação antioxidante, por exemplo, o filme a ser escolhido seria o QE, como mostra a Figura 3.112.

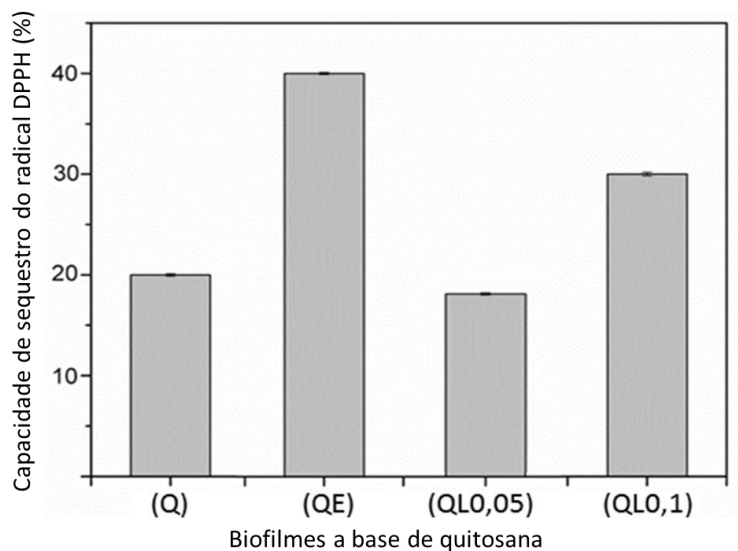


Figura 3.12 – Capacidade de sequestro do radical DPPH pela ação antioxidante dos biofilmes de quitosana nas formulações: (Q), (QE), (QL0,05) e (QL0,1) descritas na seção 3.6.3.

### 3.8.5.2.2 Hidrofobicidade de superfície de biofilmes

No presente estudo, a hidrofobicidade da superfície dos filmes foi avaliada por meio do ângulo de contato com a água, como mostra a Figura 3.13. Os filmes foram investigados na superfície em contato com o veículo durante a secagem.

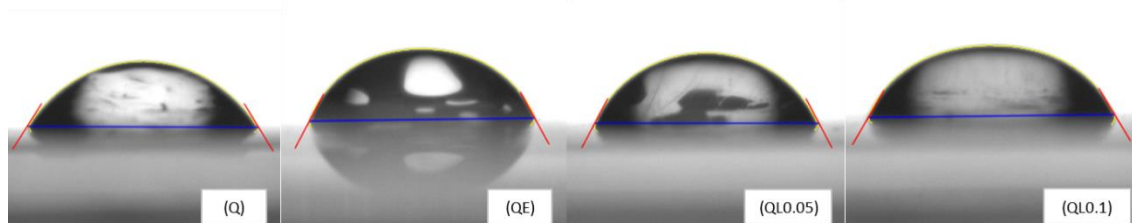


Figura 3.13 - Superfície de contato dos filmes a base de quitosana estudados nas formulações descritas na Seção 3.6.3.

Conforme Araújo et al., (2009), o ângulo de contato formado entre a superfície e a água é o critério primário de avaliação qualitativa da hidrofobicidade e permite avaliar o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de uma superfície. Estes mesmos autores relatam que ângulos superiores a 50° indicam uma superfície hidrofóbica.

No presente estudo todos os filmes a base de quitosana, com diferentes formulações, apresentaram o ângulo de contato superior a 50°, (Q – 55,9°; QE – 51,9°; QLIG 0,05 – 59,3° e QLIG 0,1 – 59,5°), mostrando assim que todas as formulações utilizadas apresentaram caráter hidrofóbico. Segundo Shahbazi et al. (2016), em filmes de quitosana 1% adicionados de k-carragena, obtiveram valores moderadamente baixos de ângulo de contato (39°) para os filmes apenas com quitosana. Porém esses mesmos autores reportam um aumento considerável de 29° no ângulo de contato dos filmes adicionados de k-carragena. Esses valores corroboram com os encontrados no presente estudo.

Um aumento no valor do ângulo de contato de 55° a 59° pode ser notado quando adicionado lignina independente da concentração. Para o filme de quitosana e extrato (QE), o ângulo de contato diminuiu para 51,9°. Considerando que o processamento para a elaboração dos filmes foi o mesmo e que a parte física é muito semelhante, evitando, portanto, grandes diferenças na rugosidade do filme. Tal aumento no valor do ângulo de contato com a água revela uma mudança na superfície do filme com a ausência ou adição de lignina, o que possivelmente pode ser devido a uma modificação na química da superfície. No que diz respeito a modificação física, a rugosidade superficial pode ser avaliada usando medições do ângulo de contato (ERAL et al., 2013; GOOD et al., 1998). Essa modificação física nos filmes estudados não interferiu no caráter hidrofóbico de todas as formulações avaliadas.

Assim sendo, os valores dos ângulos de contato e a característica hidrofóbica para todas as formulações de filmes estudados, nos leva a concluir, que a adição do extrato etanólico e das soluções de lignina utilizadas, não conferiram prejuízo a hidrofobicidade dos filmes a base de quitosana a 2% e que para aplicação em embalagens de conservação de alimentos essa característica seria adequada.

### **3.8.5.2.3 Análise estrutural por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de FTIR foi utilizada para investigar a interação entre a quitosana (base dos filmes) e os compostos adicionados nas formulações descritas na seção 3.6.3 (do extrato

etanólico e das soluções de lignina). A Figura 3.14 mostra o espectro de FTIR dos filmes nas formulações utilizadas, (Q, QE, QL0,05, QL0,1) onde pode ser observado que para o filme com a formulação contendo apenas quitosana (Q) existe uma divergência no comportamento dos picos em comparação com os outros filmes. Nas demais formulações a quitosana se liga a diferentes compostos químicos presentes, tanto no extrato como nas soluções contendo lignina.

Conforme Bajer; Kaczmarek, (2010), quando a lignina é incorporada na composição dos filmes, os picos passam por mudanças espectrais na banda de absorção, indicando as interações entre os grupos hidroxila (OH), carbonila (= CO) e éter (ROR). Segundo Sudheer et al. (2017), que avaliou filmes de quitosana e lignina separadamente e em formulações contendo os dois componentes, picos característicos de lignina aparecem em 1503, 1454 e 1417  $\text{cm}^{-1}$  e correspondem à vibração do anel aromático das unidades monômicas de fenilpropano. Com relação à quitosana, a faixa de absorção característica a 1553,31  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de alongamento do grupo amino, outro pico de absorção a 1666  $\text{cm}^{-1}$  para ligação amida e a 3280  $\text{cm}^{-1}$  para o grupo hidroxila (- OH). Uma ampla faixa de adsorção localizada entre 3550 - 3400  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos OH aromáticos e alifáticos. O intervalo a 1211  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento de C-O-C do éter arílico e 1134  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento de CO-C do éter (Sudheer et al., 2017).

No presente estudo, esses picos característicos também podem ser observados, confirmando a interação da quitosana com os demais aditivos. Apesar de todas as amostras serem a base de quitosana é possível perceber que o filme constituído apenas de quitosana são observados picos distintos dos apresentados nas demais formulações.

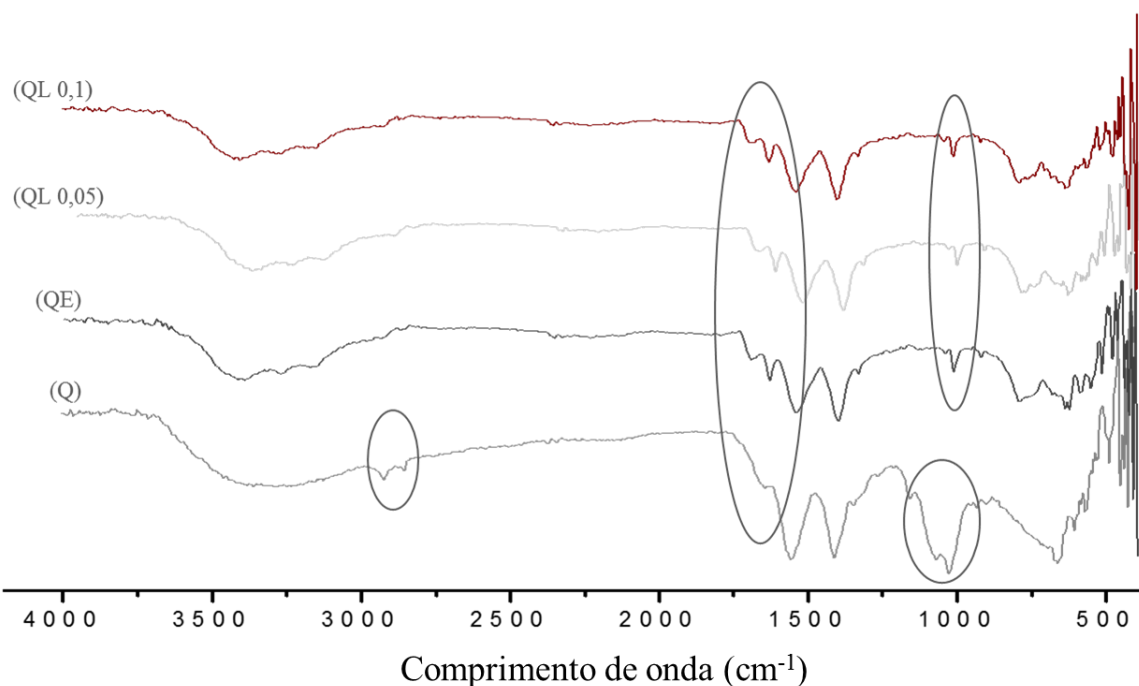


Figura 3.14 - FTIR de biofilmes a base de quitosana adicionados de extrato etanólico e soluções de lignina nas formulações apresentadas na Seção 3.6.3.

Entre as formulações adicionadas de extrato etanólico e soluções de lignina de diferentes concentrações, não houve grandes diferenças nos picos encontrados revelando assim que a adição desses compostos não provocam grandes mudanças estruturais nos biofilmes de quitosana, o que corrobora com os resultados de experimentos anteriores mostrando a efetiva ligação química, porém não culminando em prejuízo estrutural ou de características já conhecidas dos filmes de quitosana.

#### 3.8.5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV dos filmes a base de quitosana com adição de extrato etanólico e soluções de lignina foi realizada para observar a microestrutura e a dispersão da lignina no biopolímero de quitosana (Figura 3.15). Como esperado, o filme somente de quitosana mostrou-se liso e compacto, como pode ser visto na Fig. 3.15-A, apresentando micro-sulcos específicos compatíveis com superfície do molde e o processo de secagem. Na Figura 3.15-B é possível observar estruturas correspondentes à presença do extrato que torna o filme não homogêneo, possivelmente causando pontos de fragilidade na estrutura. Nas Figuras 3.15-C e 3.15-D,

observa-se que as partículas de lignina não foram bem dispersas no biopolímero de quitosana. No entanto, para o filme (QL0,1), observa-se uma estrutura mais compacta e homogênea, provavelmente devido a uma maior concentração e compactação da lignina presente. Esta dispersão não uniforme, aparentando estar mais aglomerada entre si, pode ser devido à dissolução da lignina em etanol e não na água. Como comentado por Shankar et al. (2015) uma dispersão uniforme de lignina em ágar deve-se à dissolução da mesma em água previamente preparada e aplicada para a preparação do biofilme. Uma vez que a estrutura do ágar semelhante a quitosana, que também é um polissacarídeo, acredita-se que a não homogeneidade da lignina nos filmes é devido à dissolução em etanol.

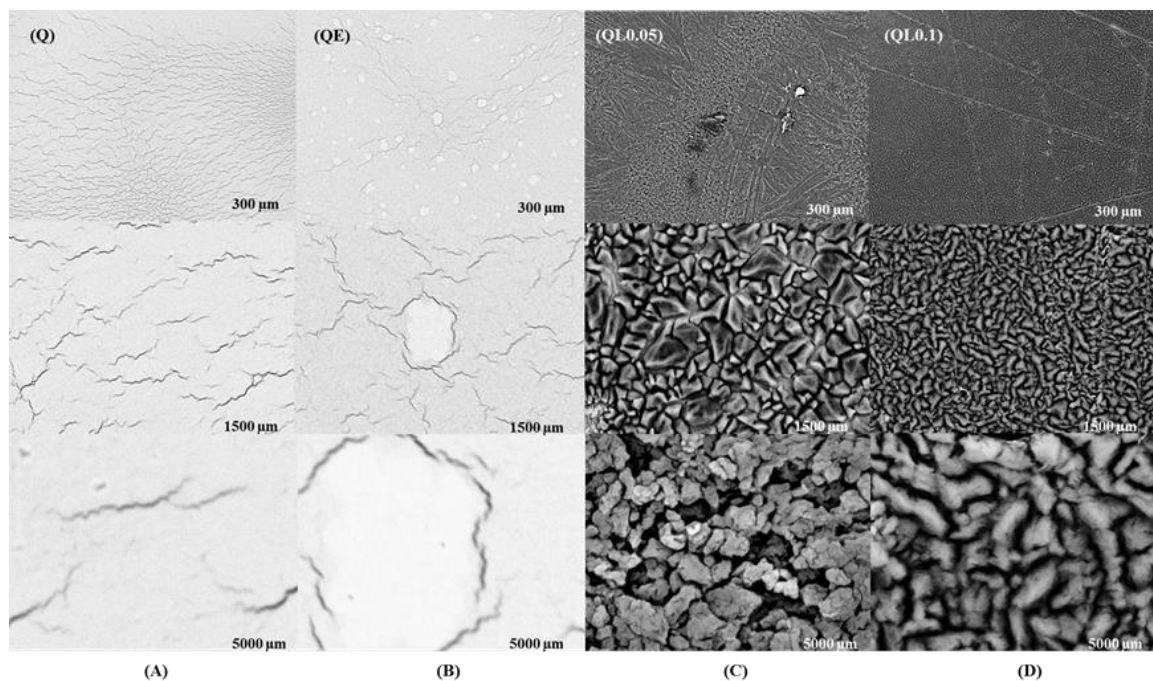


Figura 3.15 - Micrografias de MEV mostrando a morfologia da superfície de (A) filme de quitosana – (Q), (B) quitosana e extrato etanólico – (QE), (C) quitosana e solução de lignina a 0,05% - (QL0,05) e (D) quitosana e solução de lignina a 0, 1% - (QL0,1) com aproximação de 300, 1500 e 5000x.

Os resultados das análises anteriormente realizadas neste estudo, vem mostrando uma possível interação química dos componentes dos biofilmes a base de quitosana, apesar de proporcionar algumas diferenças físicas não representaria mudanças estruturais. Com a realização da análise de observação da Microestrutura dos filmes, foi possível constatar pontos de estrutura heterogenia com possível concentração dos compostos adicionados nas formulações estudadas.

Com isso podemos concluir que apesar de uma microestrutura distinta as formulações utilizadas na produção dos biofilmes de quitosana, não contribuíram para alterar fortemente características importantes dos filmes, como vemos nas análises anteriores deste estudo. Em que todas as formulações analisadas tem comportamentos no geral bem semelhantes, sendo assim possível a adição dos compostos propostos por esse estudo sem grandes perdas ou prejuízos nas conhecidas características dos biofilmes de quitosana.

### **3.8.5.2.5 Estabilidade térmica dos biofilmes a base de quitosana.**

O efeito da adição de diferentes proporções de lignina e extrato etanólico na estabilidade térmica de biofilmes de quitosana foi estudado por análise termogravimétrica. Essa análise determina as alterações na massa das amostras de filmes com o aumento da temperatura (MARTINS et al., 2010). Segundo Matos et al. (2009), outro dado importante obtido através da curva de TG é a curva termogravimétrica derivada (DTG).

Conforme esse mesmo autor a DTG expressa a derivada primeira da variação de massa ( $m$ ) em relação ao tempo ( $dm/dt$ ), sendo registrada em função do tempo ou da temperatura. Na curva DTG são obtidos picos cujas áreas são proporcionais a variação de massa das amostras, apresentando informações mais facilmente visualizadas. Os perfis TGA e DTG dos biofilmes a base que quitosana formulados anteriormente na Seção 3.6.3, são mostrados nas Figuras 3.16 e 3.17.

Como podemos observar na Figura 3.16 (TG) o aumento da temperatura, proporcionou uma perda de massa muito semelhante para os filmes que receberam adição de extrato e proporções de lignina (QE, QL0,05 e QL0,1). O filme constituído apenas por quitosana (Q) apresentou maior estabilidade térmica, no início da análise pois apresenta menor perda de massa com o aumento da temperatura. É possível observar três estágios de degradação em todas as formulações. Esse resultado é diferente dos reportados por outros autores como Tripathi, Mehrotra e Dutta (2010), que observaram apenas dois graus de degradação, porém pode ser justificado pelo grau de desacetilação da quitosana utilizada para elaboração dos filmes (MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010).

Conforme Martins et al. (2012), o primeiro estágio de degradação está associado com a perda de água e material volátil presente no filme. O segundo estágio corresponde à degradação da quitosana com a decomposição de unidades amino, seguindo de despolimerização e a decomposição pirolítica do polissacarídeo. Possivelmente, no presente estudo, esses estágios de degradação ocorreram em três fases, sendo isso explicado pelo grau de desacetilação da

quitosana utilizada na base de todas as formulações estudadas e pelas possíveis ligações químicas ocorridas no processo de obtenção dos filmes retardando assim a decomposição em todas as formulações estudadas.

Porem estudando a faixa de temperatura de 150 a 450 °C vemos algumas diferenças no percentual de perda de massa para as formulações. O filme com maior teor de lignina (QL0.1) apresentou maior perda de massa cerca de 53,85% nessa faixa de temperatura, já os filmes compostos de (Q) e (QE) apresentaram um comportamento de perda de massa muito similar em torno de 51,03 e 51,14%, respectivamente. Esse fato pode ser justificado devido as reações químicas ocorridas ao adicionar-se o extrato etanólico à base de quitosana que possivelmente deu origem a outros compostos com estabilidade térmica semelhantes ao filme constituído apenas de quitosana. A decomposição térmica do filme (QL0,05) começa a cerca de 70 °C e entre 150 e 450 °C ocorre uma perda de massa acentuada que resulta em cerca de 52,89%.

É bem conhecido que a lignina se decompõe em uma ampla faixa de temperatura de 150-600 °C (Shankar et al., 2015). Na literatura encontramos relatos para a decomposição da lignina ocorrendo também entre 150 e 300 °C que se deve a clivagem das ligações  $\alpha$  e  $\beta$ -aril-alquil éter (MONTEIRO et al., 2012).

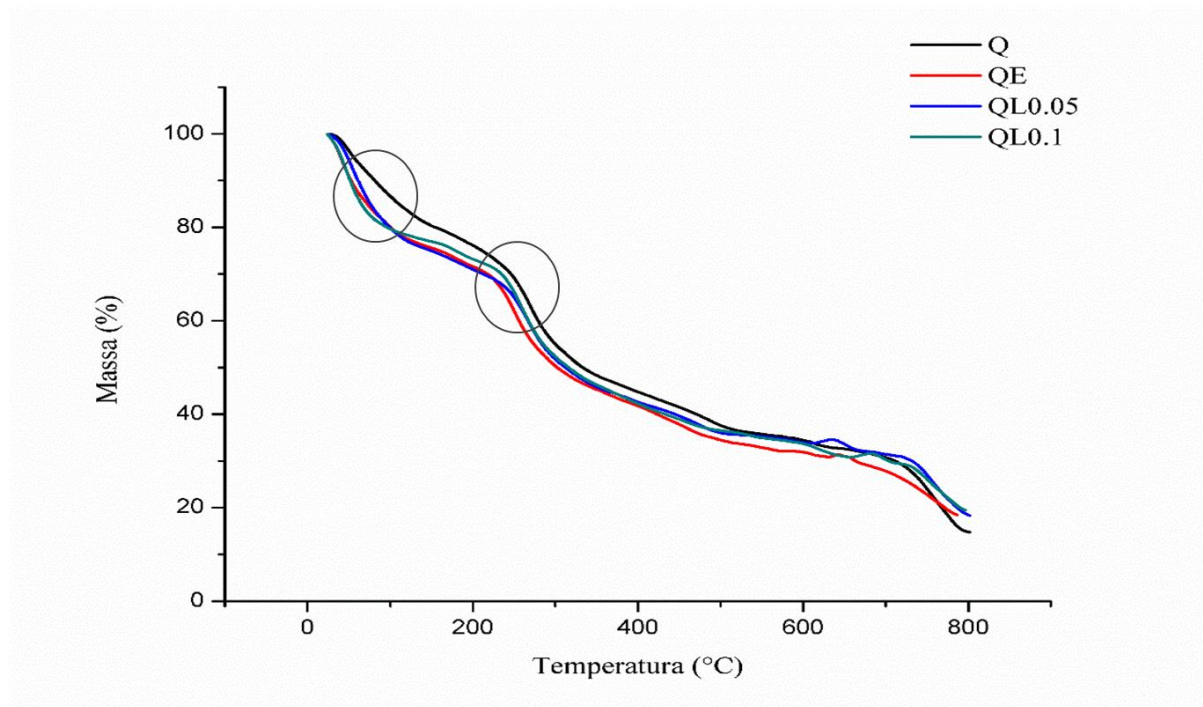


Figura 3.16 - Perfil de TGA para os biofilmes a base de quitosana.

O primeiro pico observado em DTG para todos os filmes relaciona-se à perda de compostos voláteis como etanol e água presentes na formulação dos biofilmes a base de



quitosana. A alteração mais pronunciada na massa da amostra inicial ocorre entre 250 e 340 °C para todos os filmes, onde um pico de DTG bem definido é observado a 270 °C.

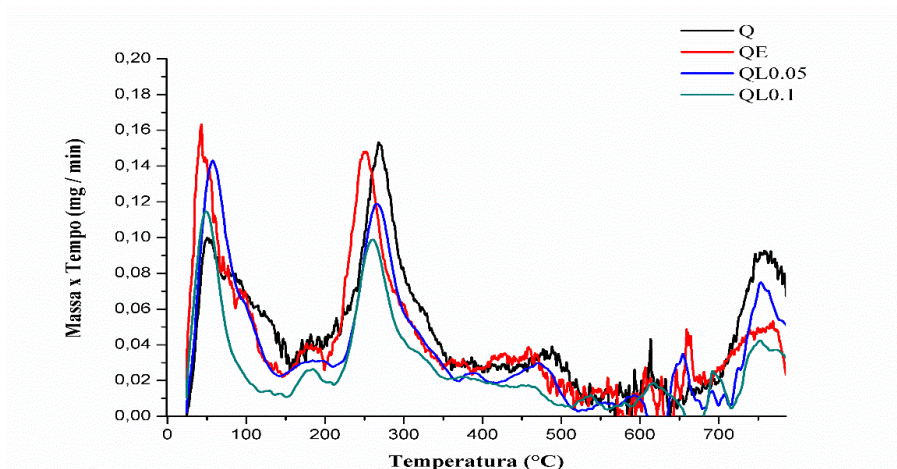


Figura 3.17 - Perfil de DTG para os biofilmes a base de quitosana.

Portanto, a adição de extrato etanólico e proporções de lignina em biofilme a base de quitosana propostas por este estudo, proporcionaram um comportamento de perda de massa muito semelhante para todas as formulações, o que é interessante do ponto de vista da utilização das formulações propostas por este estudo, pois não houveram grandes diferenças, sendo assim possível a utilização dessas para a aplicação na elaboração de filmes de quitosana sem ocasionar prejuízos as características desses filmes.

### 3.8.5.2.6 Análises de taxa de transmissão (TVw) e permeabilidade aos vapores de água (PVw), nos biofilmes a base de quitosana.

Segundo Zhong; Song; Li, (2011), o processo de transferência de vapor de água depende das ações simultâneas de solubilidade da água e difusividade na matriz polimérica. Na Tabela 3.2 estão apresentados os resultados experimentais obtidos para a taxa de transmissão (TVw) e permeabilidade aos vapores de água (PVw), determinadas para cada biofilme produzido.

São encontrados na literatura relatos de valores de permeabilidade a vapor de água para filmes de quitosana de 2,38 e 124 g / m s Pa  $\times 10^{-11}$ , essa variação pode ser pela diferença da fonte de quitosana e também pela diferença de grau de desacetilação e peso molecular por exemplo (LAVORGNA et al, 2010; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010).

Segundo Pereda et al. (2012) valores de permeabilidade ao vapor de água na ordem de  $10^{-11} \text{ gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ , são suficientes para evitar migração de umidade de frutas para o ambiente durante refrigeração. Neste estudo para todas as formulações de biofilmes a base de quitosana foram encontrados valores de permeabilidade ao vapor de água na ordem de  $10^{-13} \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ , sendo possível afirmar que diante de uma permeabilidade ainda menor que a apresentada na literatura, as formulações avaliadas poderiam nesse caso ser utilizadas para evitar a migração de umidade de frutas em refrigeração.

Ainda segundo os resultados encontrados neste estudo, pode-se observar que os filmes de quitosana com a formulação contendo o maior teor de lignina (0,1%) apresentaram discreta diminuição taxa de transmissão e conseqüentemente menor permeabilidade ao vapor de água. Esse fato se deve possivelmente a maior concentração de lignina que se liga aos grupos hidroxila da quitosana diminuindo, assim, os espaços livres, tornando o caminho mais tortuoso do vapor de água ao longo da matriz polimérica. Conforme Fernández et al. (2007), normalmente utiliza-se da adição de materiais hidrofóbicos em filmes hidrofílicos para melhorar propriedades de barreira ao vapor de água. Como foi mostrado na análise da microestrutura, o filme de quitosana com a maior concentração de lignina apresentou uma estrutura mais compacta e aglomerada, o que possivelmente influenciou na permeabilidade da estrutura ao vapor de água. Com isso podemos concluir que para a formulação com um maior teor de lignina, dentre as formulações testadas, se destaca no que diz respeito a menores taxas de transmissão e menor permeabilidade a vapor de água, sendo essa uma característica desejada quando o objetivo da aplicação do filme for diminuir os níveis de umidade em embalagens para alimentos, diminuindo a possibilidade de contaminação microbiana por exemplo.

Tabela 3.2 – Valores de Taxa de transmissão e permeabilidade aos vapores de água nos biofilmes a base de quitosana.

Biofilmes	TV <sub>w</sub> * ( $10^{-6} \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	PV <sub>w</sub> ** ( $10^{-13} \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ )
(Q)	3,724	1,324
(QEX)	3,234	1,15
(QLIG 0,05)	3,626	1,289
(QLIG 0,1)	2,107	0,749

TV<sub>w</sub>\* Taxa de transmissão de vapores de água

PV<sub>w</sub>\*\* Permeabilidade aos vapores de água

### 3.9 - Conclusão

No presente estudo a produção de PG obteve após 96 horas de cultivo uma atividade enzimática de  $76,32 \pm 0,11$  U/g e  $825,08 \pm 0,00$   $\mu$ g/mL de proteínas totais. O extrato enzimático apresentou estabilidade à atividade de PG acima de 60% para temperaturas de 30 e 35 ° C, mantendo este nível de atividade no tempo de 1 hora de incubação. No entanto, com redução significativa da atividade em temperaturas superiores a 40 °C. Em relação ao pH, a atividade da PG foi consideravelmente reduzida em pH alcalino e, em pH 4 e 5, a PG manteve sua atividade relativa acima de 50% por até 120 minutos. O extrato enzimático quando aplicado com carga enzimática de 1,0 U/mL apresentou resultados satisfatórios no processo de clarificação do suco de mangaba.

Na análise de recobrimento de mamão papaia com as soluções filmogênicas a base de quitosana pode-se observar que para todas as formulação estudadas houve um atraso no amadurecimento assim como a inibição do aparecimento de microrganismos quando comparados com os resultados dos mamões sem recobrimento. Sendo neste caso a formulação QL0,05 a que apresentou melhor resultado.

Os biofilmes obtidos no presente estudo tiveram sua atividade antioxidante determinada de acordo com a atividade de captura do radical DPPH e todos os filmes apresentaram capacidade de sequestro do radical e apresentaram atividade antioxidante. Porém o filme constituído por quitosana e extrato etanólico (QE) apresentou atividade de eliminação do radical DPPH de 38% superior as demais formulações (Q-20,57; QL0,005-18,8 e QL0,1-29,63%) nos levando a concluir que para essa análise o biofilme a base de quitosana com adição de extrato etanólico do resíduo de mangaba, obteve o melhor desempenho.

Para as demais análises (FTIR, MEV, TG, PVw) a adição de lignina nas proporções utilizadas apesar de apresentar diferenças na microestrutura dos filmes não provocou grandes alterações e influência nas características estudadas entre as formulações com adição de extrato e a formulação contendo apenas quitosana. O que é interessante do ponto de vista de possibilitar a aplicação desses compostos obtidos do resíduo de mangaba que é uma fonte de baixo custo.

Assim, os resultados mostram que o resíduo de mangaba apresenta-se como uma fonte potencial de produtos de interesse biotecnológico com possibilidade de uso na produção de poligalacturonase, assim como na extração de extrato etanólico com características antioxidantes e lignina alcalina para aplicação em biofilmes de quitosana.

---

## **CAPÍTULO 4**

Considerações finais

---

## 4 - Considerações finais

Os ensaios desenvolvidos nesse trabalho apontam a potencialidade do uso integral do resíduo despulpado de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) para produção de biomoléculas como enzimas, proteínas, extrato antioxidante e lignina alcalina. Estes produtos foram aplicados no tratamento de clarificação do suco de mangaba e em formulações de filmes a base de quitosana.

A alta concentração de compostos fenólicos totais e a importante atividade antioxidante indicam o grande potencial e a possível aplicação em alimentos funcionais. O resíduo ainda foi utilizado como substrato para a produção das enzimas como poligalacturonase e lipase por *Aspergillus niger* em FES.

O resíduo lignocelulósico de mangaba após extração e caracterização apresentou possibilidades de uso com características de interesse industrial, para a obtenção de outros produtos como a produção de celulases e avaliação da atividade anti-inflamatória.

Assim, trabalhos futuros podem ser realizados com outros microrganismos e diferentes processos fermentativos para uma potencialização dos resultados. A aplicação de extrato etanólico e lignina em biofilmes de quitosana, nas formulações utilizadas, apresentaram influência em algumas análises sendo necessária uma maior investigação com diferentes proporções para melhorar efetivamente as características dos filmes a base de quitosana. No desenvolvimento de outros trabalhos sugere-se a avaliação de um maior número de formulações para se verificar de forma mais efetiva a influência nas características, físicas e bioativas dos biofilmes produzidos. A solução de lignina utilizada nos biofilmes foi produzida utilizando etanol, assim em outros trabalhos pode-se utilizar de outros solventes visando uma melhor homogeneização na produção dos biofilmes tornando mais homogênia a microestrutura e melhorando as características físicas.

E possível ainda, a fim de legitimar os promissores resultados obtidos e enriquecer as pesquisas dessa área, aplicar métodos de ACV – Avaliação do Ciclo de Vida, visando à necessidade de preservação do ambiente onde geralmente são descartados esses resíduos, como também explorando o contexto de biorefinaria, para uma utilização integral desse resíduo verdadeiramente passivo de ser aplicado em diversos processos produtivos de interesse biotecnológico.

Dessa forma, os resultados mostrados na presente tese demonstram que o resíduo de mangaba apresenta-se como uma fonte potencial de produtos de interesse biotecnológico, que ainda pode ser bastante explorado.

---

---

## **Referências bibliográficas**

---

---

## Referências bibliográficas

ADEODATO VIEIRA, M. G., ALTENHOFEN DA SILVA, M., OLIVEIRA DOS SANTOS, L., MASUMI BEPPU, M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, 254–263, 2011.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, p. 837–842, 2010.

AJAYI, A. A.; PETER-ALBERT, C. F.; AKEREDOLU, M.; SHOKUNBI, A. A. Clarification of tomato juice with polygalacturonase obtained from tomato fruits infected by *Aspergillus niger*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 74-80, 2015.

ALBANO, M. Comparação da produção de celulase e xilanase por fungos filamentosos em fermentação submersa e em estado sólido. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2012.

ALMEIDA, S.P. de; COSTA, T. da S.A.; SILVA, J.A. Frutas nativas do Cerrado: Caracterização físico-química e potencial fonte de nutrientes, **Embrapa Cerrado**. Brasília, DF, p.247-285, 2008.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, Â.M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. D. C.; Maia, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2155–2159, 2011.

ALVAREZ, S. et al. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 138, p. 377 - 382, 1998.

ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-8, 2017.



ANGELLIER-COUSSY, H. et. al, V.; Influence of processing temperature on the water vapour transport properties of wheat gluten based agromaterials. *Industrial Crops and Products*, v. 33, p.457-461, 2011

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2017. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 140p. 2017.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of the Analytical chemists, (18th ed.), Whashington, 2005.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. Official methods and recommended practices, (6th ed.), Press, 2011.

ARAÚJO, K. B.; SANTOS, R. C. A.; SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L. Enriquecimento proteico da farinha de semente de mangaba com *Rhizopus oryzae*: otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, V.5, n.4, p.45-50, 2011.

ARAÚJO, E. A.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, P. É.; SÁ, J. P. N. Hidrofobicidade de Ribotipos de *Bacillus Cereus* isolados de indústria de laticínios. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 491-497, 2009.

ASSIS, O.B.G.; ALVES, H.C. Metodologia mínima para a produção de filmes comestíveis de quitosana e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs Cortadas. Comunicado técnico 49, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. São Carlos, Embrapa Instrumentação Agropecuária, 5 p. 2002.

ASTM INTERNATIONAL. Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids and Calculation of Dynamic Viscosity. An American National Standard and British Standard. West Conshohocken, p. 1-10. 1990.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, K. M. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504–510, 2007.

BAJER, D.; KACZMAREK, H. Study of the influence of UV radiation on biodegradable blends based on chitosan and starch. **Progress on chemistry and application of chitin and derivatives**, v.15, p. 17-24, 2010.

BALASUNDRAM, N.; SUNDARAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BALAT, M; BALAT, H; OZ, C. "Progress in Bioethanol Processing", **Progress in Energy and Combustion Science** v. 34, p. 551-573, 2008.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**. Vol. 52. p. 858-875, 2010.

BARMAN, S., SIT, N., BADWAIK, L. S. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effects on clarification. **J. Food Sci Technol**, v. 52, p. 3579-3589, 2015.

BAUMBERGER, S., LAPIERRE, C., MONTIES, B., & DELLA VALLE, G. Use of kraft lignin as filler for starch films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n 1–3, p. 273–277, 1998.

BLANCO, A. & BLANCO, G. Chapter 8 - Enzymes, Editor(s): Antonio Blanco, Gustavo Blanco, Medical Biochemistry, Academic Press, 2017, Pages 153-175, ISBN 9780128035504, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2>.

BEZERRA JÁCOME, M. C. de M. Caracterização e avaliação dos óleos extraídos das sementes de melão amarelo (*Cucumis melo* L.) e mangaba (*Hancornia speciosa*): possibilidade de uso alimentício. 2014. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BIER, M. C.J.; MARANHO, L. T.; AZEVEDO, J. A. M.; JUNIOR, L. S. S. Crescimento e consumo de Xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. **Evidência**. v.7, n.2, p.119-130, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, 181(4617), p. 1199–1200, 1958.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F., PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro. **Interciência Brasil**. p. 241-271, 2008.

BORIN, G.P.; SANCHEZ, C. C.; DE SOUZA, A.P.; DE SANTANA, E.S.; DE SOUZA, A.T.; LEME, A.F.P.; SQUINA, F. M.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G. H.; OLIVEIRA1ET, J. V. C. Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. **PLoS ONE** v.10, n.6, p. 1-20, doi:10.1371/journal.pone.0129275, 2015.

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

BRANCO, I. G.; MORAES, I. C.; ARGANDOÑA, MADRON, G. S.; SANTOS, C.; RUZ A. L.; CARVALHO, J. E., HAMINUIK, C. W. I. Influence of pasteurization on antioxidant and in vitro anti-proliferative effects of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit pulp. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 225-230, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2005. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico: "Identidade e Qualidade da Fixação de Óleos e Gorduras Vegetais". Disponível em: (<http://www.anvisa.gov.br>). Acesso em 15 de janeiro de 2019.

BUYUKKILECI, A.O.; LAHORE, M.F.; TARI, C. Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae*. **Bioprocess and biosystems engineering**, p. 749–760, 2014.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L; WOSIACKI, G; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria prima ao produto final, **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; Cia, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, p. 3, p.215-221, 2007.

CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. ***Enzymes and Microbial Technology***, v. 28, p. 145 - 154, 2001.

CARVALHO, S. Pectinases produzidas pelo Agente "G088": Extração e purificação. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Lavras Minas Gerais - Brasil, 2007.

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, S. M. & CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. ***Biomass Conversion and Biorefinery***, v. 2, p. 87-107, 2012.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos na análise de alimentos. Editora da UNICAMP: 2ª Ed. Rev.- Campinas / SP, editora da UNICAMP, 2003. 207p

CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

CHEN, Z. & WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v. 73, p. 610-621, 2017.

CHIEN, P.; SHEU, F.; YANG, F. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, Taipei, v. 78, p. 225-229, 2007.

CLERICI, M. T. P. S.; SILVA, L. B. C. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v.44, p. 1658-1670, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex Stan 210: codex standards for named vegetable Oils. Rome: Codex Alimentarius, 2008.

COURI, S. Efeito dos cátions na morfologia de agregados e produção de poligalacturanase *Aspergillus niger* 3T5B8. 198f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1993.

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

CROUVISIER-URION K.; LAGORCE-TACHON A.; LAUQUIN C.; WINCKLER P.; TONGDEE-SOONTORN W.; DOMENEK S.; DEBEAUFORT F.; KARBOWIAK T. Impact of the homogenization process on the structure and antioxidant properties of chitosan-lignin composite films, **Food Chemistry**, v. 236, p. 120-126, 2017.

CROUVISIER-URION, K.; BODART, P. R.; WINCKLER, P.; RAYA, J.; GOUGEON, R. D.; CAYOT, P.; KARBOWIAK, T. Bio-based composite films from chitosan and lignin: Antioxidant activity related to structure and moisture. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, p. 6371–6381, 2016.

DALLMEYER, I., CHOWDHURY, S., KADLA, J. F. Preparation and characterization of Kraft lignin-based moisture responsive film with reversible shape-change capability. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 7, p. 2354–2363, 2013.

DAMÁSIO, A.R. L. ; SILVA, T. M. ; MALLER, AL.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H.F.; TEIXEIRA, M.L.Purification and partial characterization of an Exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1496–1507, 2010.

DAMASO, M. C. T., PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G., LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 676- 681, 2008.

DEBING, JING; PEIJUN, LI; STAGNITTI, FRANK; XIANZHE, XIONG; LI, LING Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 244–250, 2006.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; Fermentação em estado semi-sólido. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, v. 2, cap. 13, p. 250-254, 2001.

DELMER, D. P.; AMOR, Y. Cellulose biosynthesis. **The Plant cell**. v.7, p. 987-1000, 1995.

DEY, T. B.; ADAK, S.; BHATTACHARYA, P.; BANERJEE, R. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 591-595, 2014.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**. v.109, p. 72-78, 2013. ISSN 0306-2619, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.081>.

DOBLIN, M. S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. Evans Review: Plant cell walls: The skeleton of the plant world. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 357-381, 2010.

DUTRA, R. L. T.; DANTAS, A. M.; MARQUES, D. A.; BATISTA, J. D. F.; MEIRELES, B. R. L. A.; CORDEIRO, Â. M. T. M.; MAGNANI, M.; BORGES G. S. C. Bioaccessibility and antioxidante activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazil exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food research international**. v. 100, n. 1, p. 650-657, 2017.

ESCAMILLA-GARCÍA, M.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, M.J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, H.M.; DELGADO-SÁNCHEZ, L.F.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E.;

AMARO-REYES, A.; REGALADO-GONZÁLEZ, C. Effect of an Edible Coating Based on Chitosan and Oxidized Starch on Shelf Life of *Carica papaya* L., and Its Physicochemical and Antimicrobial Properties. **Coatings** v. 318, n. 8, 2018.

EL-BAKRY, M., ABRAHAM, J., CERDA, A., BARRENA, R., PONSÁ, S., GEA, T., SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, v. 45, n.18, 1999–2042, 2015.

ERAL, H. B.; MANNETJE, D. J. C. M.; OH, J. M. Contact angle hysteresis: A review of fundamentals and applications. **Colloid and Polymer Science**, v. 291, p. 247-260, 2013.

FABISZEWSKA, A. U.; STOLARZEWICZ, I. A.; ZAMOJSKA, W. M.; BIALECKA-FLORJANCZYK, E. Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 404-410, 2014.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FAMÁ, L.; ROJO, P. G.; BERNAL, C.; GOYANES, S. Biodegradable starch based nanocomposites with low water vapor permeability and high storage modulus. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1989-1993, 2012.

FERRO, J. H. de A. Conservação da Polpa de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) por métodos combinados. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2012.

FERNÁNDEZ, L.; DE APODACA, E., CEBRIÁN, M. Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 224, n. 4, p.415-420, 2007.

GAYATHRI, T.; NAIR, A. S. Isolation, purification and characterisation of polygalacturonase from ripened banana (*Musa acuminata* cv. Kadali). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 429–434, 2014.

GÖĞÜŞ, N.; TAZE, B.H. ; DEMİR, H.; TARI, C.; ÜNLÜTÜRK, S.; LAHORE, M.F.. Evaluation of orange peel, an industrial waste, for the production of *Aspergillus sojae* polygalacturonase considering both morphology and rheology effects. **Turkish Journal of Biology**, v. 38, p. 537–548, 2014.

GONÇALVES, F.A.; RUIZ, H.A.; SANTOS, E.S.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, G.R., Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept, *Renew Energy*, v. 94, p. 353–365, 2016.

GOOD, R. J.; CHAUDHURY, M. K.; YEUNG, C. A new approach for determining roughness by means of contact angles on solids. **Mittal Festschrift**, 181–197, 1998.

GRASSIN, C.; FRAUQUEMBERGUE, P. Application of pectinases in beverages. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. **Pectins and pectinases**. [S.I.]: Elsevier Science B. V., 1996. p. 453 - 462.

GRIMM, L.H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D.C. Morphology and production of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

GUMMADI, S. N. & PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987–996, 2003.

HAMBARDZUMYAN, A.; FOULON, L.; CHABBERT, B.; AGUIÉ-BÉGHIN, V. Natural organic UV-absorbent coatings based on cellulose and lignin: Designed effects formulation on functionality of modified chitosan films containing carvacrol nanoemulsions. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 12, p. 4081–4088, 2012.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C., LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

HARTONO, R.; HANNAULI, Y. S.; MARESYA, A.; SAHLAN, M.; WIJANARKO, A.; GOZAN, M.; MEYER, M.; HERMANSYAH, H. Lipase Biocatalyst Immobilization from



Solid State Fermentation of Palm Oil Empty Fruit Bunches, Bagasse, and Palm Oil Sludge with Adsorption-Cross Linking Method in Anion Macroporous Resin, **Materials Science Forum**, Vol. 929, pp. 209-217, 2018.

HARRIS, P. J.; SMITH, B. G. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: Structures, properties and uses in food products. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 129–143, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU: Drivers, challenges, and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 101, p. 590-599, 2019.

HATAMI, T.; EMAMI, S.A.; MIRAGHAEI, S. S.; MOJARRAB, M. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *artemisia biennis* willd. **Iran J Pharm Res**. v. 13, n. 2, p. 551-559, 2014.

HAYKIRI-ACMA, H., YAMAN, H., KUCUKBAYRAK, S. Comparison of the thermal reactivities of isolated lignin and holocellulose during pyrolysis. **Fuel Processing Technology**, v. 91, p. 759–764, 2010.

HERRERO, M.; IBAÑEZ, E.; SEÑORANS, F.J.; CIFUENTES, A.; J. Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga: Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1047, n. 2, p. 195–203, 2004.

HIMMEL, ME; DING, S-Y.; JOHNSON, D.K.; ANDEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v.315, p. 804–807, 2007.

HÖLKER, U. & LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v, 8, p. 301-306, 2005.

HROMIŠ, N. M.; LAZIĆ, V. L.; MARKOV, S. L.; VAŠTAG, Z. G.; POPOVIĆ, S. K.; ŠUPUT, D. Z.; DŽINIĆ, N. R.; VELIĆANSKI, A. S.; POPOVIĆ, L. M. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. **Journal of Food Engineering**, v. 158, n. 1, p. 86-93, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2017. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/pesquisa/16/12705>. Acesso: 08 de Janeiro de 2019.

ISRAEL M. C., Uso de Resíduo do Processamento de Palmito para a Produção de Enzimas Hidrolíticas por Fungos do Gênero Polyporus. 2005. 135f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau/SC.

JAYANI R.S., SAXENA S., GUPTA R.; Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.40: n.9: 2931-2944, 2005.

JORGE, N. & LUZIA, D. M. M. Caracterização dos óleos das sementes de *Pachira aquatica Aublet* para uso alimentar. **Acta Amazonica**. v. 42, p. 149-156, 2012.

JOHANSSON, C., BRAS, J., MONDRAGON, I., NECHITA, P., PLACKETT, D., SIMON, P. AUCEJO, S. Renewable fibers and bio-based materials for packaging applications. A review of recent developments. **BioResources**, v.7, n. 2, p. 2506–2552, 2012.

JUWON, A. D.; AKINYOSOYE, F. A.; KAYODE, O. A. Purification, characterization and application of polygalacturonase from *Aspergillus niger* CSTRF. **Malaysian Journal of Microbiology**, v.8, 175e183, 2012.

KANT, S.; VOHRA, A.; GUPTA, R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. **Protein Expression and Purification**, v. 87, n. 1, p. 11-16, 2013.

KAR, S.; RAY, R.C.. Purification, Characterization and Application of Thermostable Exo-Polygalacturonase From *Streptomyces Erumpens* Mtcc 7317. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 133–147, 2011.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KEEGSTRA, K. Plant Cell Walls. **Plant Physiol**, v. 154, p. 483–486, 2010.

KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 21-34, 2013.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R.J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 344-352, 2007.

KUSUMA, M.P.; BHARGAVI, M.Vijaya. Studies on production, purification and molecular characterisation of polygalacturonase from *Bacillus subtilis*. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 1, p. 1–6, 2014.

LASON, E., OGONOWSKI, J. Lipase – characterization, applications and methods of immobilization. *Chemik*, v. 64, n. 2, p. 97-102, 2010.

LAVORGNA, M.; PISCITELLI, F.; MANGIACAPRA, P.; BUONOCORE, G. G. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 82, n. 2, p. 291-298, 2010.

LI, C.; WANG, Q.; ZHAO, Z.K. Acid in ionic liquid: An efficient system for hydrolysis of lignocellulose. **Green Chem.**, v. 10, p.177–182, 2008.

LIAO, H.; FAN, X.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHAN, Q.; XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 122-134, 2015.

LIN, L.; WANG, B.; WANG, M.; CAO, J.; ZHANG, J.; WU, Y.; JIANG, W. Effects of a chitosan based coating with ascorbic acid on post-harvest quality and core browning of 'Yali' pears (*Pyrus bertschneideri* Rehd.), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Beijing, v. 88, p. 877-884, 2008.

LIMA, J. P.; AZEVEDO, L.; SOUZA, N. J.; NUNES, E. E.; VILAS BOAS, E. V. B. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit in vivo and its phenolic profile identification. **Food Research International**, v. 75, p. 216–224, 2015(b).

LIMA, J. P.; FANTE, C. A.; PIRES, C. R. F.; NUNES, E. E.; ALVES, R. R.; ELIAS, H. H. S.; NUNES, C. A.; VILAS BOAS, E. V. de B. The antioxidative potential and volatile constituents of mangaba fruit over the storage period. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 1-6, 2015(a).

LIU, D.; ZHONG, T.; CHANG, P.R.; LI, K.; WU, Q. Starch composites reinforced by bamboo cellulosic crystals, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2529-2536, 2010.

LOTTI, M.; TRAMONTANO, A.; LONGHI, S.; FUSETTI, F.; BROCCA, S.; PIZZI, E.; ALBERGHINA, L. Variability within the *Candida-Rugosa* Lipases Family. **Protein Engineering**, v. 7, n. 4, p. 531-535, 1994.

LOUSADA JUNIOR, J. E.; NEIVA, J. N. N.; RODRIGUEZ, N. M.; PIMENTEL, J. C. M. P., LÔBO, R. N. B. Consumo e Digestibilidade de Subprodutos do Processamento de Frutas em Ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 659-669, 2005.

MACHADO, A P. F.; PASQUEL-REÁTEGUI, J. L.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, n. 3, p. 675-683, 2015.

MACIEL, M. H. C.; HERCULANO, P. N.; FERNANDES, M. J. S.; PORTO, T. S.; LIMA, J. S.; MAGALHES, O. C.; SILVA, L. R. C.; PORTO, A. L.F.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Pectinolytic complex production by *Aspergillus niger* URM 4645 using yellow passion fruit peels in solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 3313–3322, 2014.

MACIEL, M. M. J.; CASTRO E SILVA, A.; TELLES RIBEIRO, H. C. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.13, p. 1-13, 2010.

MADELEINE-PERDRILLAT, C., KARBOWIAK, T., RAYA, J., GOUGEON, R., BODART, P. R., DEBEAUFORT, F. Water-induced local ordering of chitosan polymer chains in thin layer films. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 107–114, 2015.

MAGALHÃES, E. R. B.; SILVA, F. L.; SOUSA, M. A. DOS S. B.; SANTOS, E. S. Use of different agro-industrial wastes and produced water for bio-surfactant production. **Biosci., Biotech. Res. Asia**, v. 15, n. 1, 17-26, 2018.

MARQUES, A.C. Propriedades funcionais de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes condições de preparo e uso em alimentos. [Dissertação de mestrado]. Santa Maria, RS: Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008, 115p.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of  $\alpha$ -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 27, p. 220-227, 2012.

MARTINS, C. R. & FARIAS, R. M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola – Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 20-32. 2002.

MARTINS, E. S.; LEITE, R. S.R.; SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus* on submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1199–1205, 2011.

MARTOS, M. A. BUTIUK, ANA PAULA; ROJAS, N. L.; ALBERTO, R. Purification and Characterization of a Polygalacturonase Produced by *Wickerhamomyces anomalus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 587–594, 2014.

MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. A. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale, L*) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 143-150, 2005.

MATÍNEZ-CAMACHO, A. P. Chitosan composite films: thermal, structural, mechanical properties. *Carbohydrate Polymers, Barking*, v. 82, n. 2, p. 305-315, 2010.

MATOS, J. R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 32-65, 2009.

MÉLO, B. C. A. Produção de Celulases por Fermentação em Estado Sólido em Resíduo de Acerola (*Malpighia sp.*) Utilizando *Trichoderma reesei*. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 116 p. 2016.

MELZER, M.; BLIN, J.; BENSAXHRIAC, A.; VALETTE, J.; BROUST, F. Pyrolysis of extractive rich agroindustrial residues. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 448–460, 2013.

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.

MINJARES-CASSANCO, A.; TREJOR-AGUILLAS, B.A.; AGUILAR, G. Physiological comparison between pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* adopted either to solid state fermentation or submerged fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 21, 26-27, 1997.

MOHAN, A. M. Global biopolymers market expected to grow to 2.4 billion lb by 2016. <http://www.packworld.com>, Acesso em 03 de Maio de 2019.

MOHAMED, S.A.; FARID, N. M.; HOSSINY, E. N.; BASSUINY, R. I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 54–64, 2006.

MONTEIRO, S.N.; CALADO, V.; MARGEM, F.M.; RODRIGUEZ, R.J.S.; Thermogravimetric stability behavior of less common lignocellulosic fibers – a review, **J. Mater. Res. Technol.**, v.1, p. 189–199, 2012.

MOOD, S. H; GOLFESHAN, A. H; TABATABAEI, M; JOUZANI, G. S; NAJAFI, G; H; GHOLAMI, M; ARDJMAND, M. "Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment", **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

MOREIRA, T. M.; SEO, E. S. M. Obtenção e caracterização de polímero reforçado com fibras da folha de milho. **Revista Matéria**, São Paulo, v. 21, n. 4, p.1054-1068, 2016.

MOSIER, N; WYMAN, C; DALE, B; ELANDER, R; LEE, Y. Y; HOLTZAPPLE, M; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; MORAES, R. O. Bioproducts for organic agriculture. In: National simpósio de bioprocessos, 16, Curitiba, 2007. Anais. 2007.

MORAES, S. L.; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P.; GUIMARÃES, Y. B. T. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. *Revista IPT | Tecnologia e Inovação* v.1, n.4, 58-73, 2017.

MORETTI, M. M. S; MARTINS, D. A. B; DA SILVA, R; RODRIGUES, A; SETTE, L. D; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Braz. J. Microbiol**, v. 43, p.1062–1071, 2012.

MORETTO, E & FETT, R.; *Technology of Vegetable Oils and Fats in the Food Industry*, 1st. Ed., Varela: São Paulo, 1998.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ARAÚJO, N. C. C.; ALMEIDA, A. S. Quality of fruits native to latin america for processing: mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). *Acta Horticulturae*, Leuven. v.2, n.575, p.549-554, 2002.

MOURA, N.C. Características físico-químicas, nutricionais e sensoriais de pão com adição de linhaça. 2008. [Dissertação em Ciência e Tecnologia de Alimentos]. São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008, 95p.

MRUDULA, S; ANITHARAJ, R. Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**. v. 6, p. 64-71, 2011.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F. Enzimas - Poderosa máquina na indústria. In: **Ciência Hoje**, v. 41, p. 28-33, 2007.

NASCIMENTO FILHO, W. B. & FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Rev. Virtual Quim.** v. 7, n. 6, p 1968-1987, 2015.

NASCIMENTO, V. M., MANRICH, A., TARDIOLI, P. W., GIORDANO, R. C., ROCHA, G. J. M., GIORDANO, R. L. C.. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. *Bioethanol* v. 2, p. 112-125, 2016. doi: 10.1515/bioeth-2016-0008.

NAGAI, M.; KATSURAGI, T.; TERASHITA, T.; YOSHIKAWA, K.; SAKAI, T. Purification and characterization of an endo- polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v 64, p. 1729-1732 , 2000.

NÓBREGA, E.M.; OLIVEIRA, E.L.; GENOVESE, M.I.; CORREIA, R.T.P. The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata*) residue. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 39, p. 131-141, 2015.

NOGUEIRA, C. C.; PADILHA, C. E. A.; JESUS, A. A.; SOUZA, D. F. S.; ASSIS, C. F.; JUNIOR F. C.S.; SANTOS, E. S. Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 259-266, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.091>.



NORA, C. D.; MÜLLER, C. D.; BONA, G. S.; RIOS, A. O.; HERTZ, P. F.; JABLONSKI, A.; JONG, E. V.; FLÔRES, S. H. Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, n. 1, p. 18-25, 2014.

NÚÑEZ-FLORES, R., GIMÉNEZ, B., FERNÁNDEZ-MARTÍN, F., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., MONTERO, M. P., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 163–172. 2013.

OLIVEIRA, S. D.; PADILHA, C. E. A.; AZEVEDO, E. A.; PIMENTEL, V. C.; ARAÚJO, F. R.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 937-944, 2018.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. Produção de celulases por *Aspergillus fumigatus* através da fermentação em estado sólido e recuperação e purificação por extração micelar em duas fases aquosas. Tese (Doutorado). 144f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Natal, 2018.

ONGARATTO, R. S.; VIOTTO, L. A. Enzyme optimization to reduce the viscosity of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) juice. *Braz. J. Food Technol.* v. 19, e2015041, 2016.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

ORTEGA, L.M.; KIKOT, G.E.; ROJAS, N.L.; LÓPEZ, L. M. I.; ASTORECA, A. L.;ALCONADA, T. M. Production, characterization, and identification using proteomic tools of a polygalacturonase from *Fusarium graminearum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. S170–S177, 2014.

PADILHA, C. E. A.; DANTAS, P. V. F.; NOGUEIRA, C. C.; LEITÃO, A. L. S.; ALMEIDA, H. N.; SOUZA, D. F. S.; OLIVEIRA, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Enhancing the recovery and concentration of polyphenols from camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. *McVaugh*) by aqueous two-phase flotation and scale-up process, *Separation Science and Technology*, (2018), 53:13, p. 2126-2135, DOI: 10.1080 / 01496395.2018.1442865.

PAN, X.; LI, K.; MA, R.; SHI, P.; HUANG, H.; YANG, P.; MENG, K.; YAO, B. Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. **Food Chemistry**, v. 188, p. 569–575, 2015.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, p.1153 – 1169, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H. D.; DOMINGUES, J. M. Biotechnological Production of Xylitol. Part 3: Operation in Culture Media Made From Lignocellulose Hydrolisates. **Bioresource Technology**, v.66, p. 25-40, 1998.

PAULA, A. V. Reestruturação da gordura do leite por interesterificação enzimática utilizando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. 2011. 212 p. Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2011.

PEDROLI, D. B.; GOMES, E.; MONTI, R; CARMONA, E. C. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 144, p. 191–200, 2008.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 87, p. 1318-1325, 2012.

PEREIRA, JR. N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M, “Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery”. In: Pereira, Jr.N. (ed), Series on Biotechnology, 1 ed., Rio de Janeiro, Brazil, Brazilian National Library, 2008.

PEREIRA, C. S. S. Avaliação de diferentes tecnologias na extração de *Jatropha curcas* L. Seropédica, RJ, 2009. 86 p. Dissertação - Mestrado em Engenharia Química pelo Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. UFRRJ.

PERFEITO, D. G. A. Processamento da polpa de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). 2014. 212p. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PERFEITO, D. G. A.; CARVALHO, N. LOPES, M. C. M.; SCHMIDT, F. L. Caracterização de frutos de mangabas (*Hancornia speciosa* Gomes) e estudo de processos de extração da polpa. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 2, n. 3, p. 1–7, jul./set. 2015.

POLETTO, P.; BORSOI, C.; ZENI, M.; SILVEIRA, M. M. Downstream processing of pectinase produced by *Aspergillus niger* in solid state cultivation and its application to fruit juice clarification. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 391-397, 2015. ISSN 0101-2061. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6659>.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, n.2, p.161–179, 2006.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A. Química de Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Rev. Virtual Química**. v. 5, n. 1, p. 2-15, 2013.

RAMAKRISHNAN, V.; GOVEAS, L. C.; NARAYAN, B.; HALAMI, P. M. Comparison of lipase production by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 and *Pediococcus acidilactici* MTCC 11361 using fish waste as substrate: Optimization of Culture Conditions by Response Surface Methodology. **ISRN Biotechnology**, vol. 2013, Article ID 980562, 9 pages, 2013. <https://doi.org/10.5402/2013/980562>.

RAMÍREZ-TAPIAS, Y.; RIVERO, C. W.; BRITOS, C. N.; TRELLES, J. A. Alkaline and thermostable polygalacturonase from *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 with applications in waste waters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1–8, 2015.

RANGANA, S. Manual of analysis of fruit and vegetable products. New Delhi: MCGraw-Hill, 1977.

REDDY, J.P.; RHIM, J.W. Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose, **Carbohydr. Polym.** v. 110, p. 480–488, 2014.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Production of lipases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* by solid state fermentation, evaluation of substrate specificity and its use in esterification and alcohololysis reactions. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

ROCHA, J. C. Produção, avaliação da estabilidade e aplicação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* IOC 4003 usando resíduos de frutas tropicais como substrato. Dissertação de Mestrado. 108f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal / RN, Brasil. 2018.

ROCHA, G.J.M; GONÇALVES, A. R. OLIVEIRA, B. R. OLIVARES, E. G. ROSSELL, C. E. V. Steam Explosion pretreatment reproduction and alkaline delignificatioin reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, vol. 35, p.274-279, Janeiro, 2012. ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.010>.

RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T1814-2.pdf>. Acesso em: 15 de agosto de 2018.

RODRIGUES, C. M. Caracterização qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007. 199p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

RODRIGUES, P. O.; SANTOS, B. V.; COSTA, L.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Xylanase and beta-glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 453-459, 2017.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

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

SAGAR, N. A.; PAREEK, S.; SHARMA, S.; YAHIA, E. M.; LOBO, M. G. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, 512–531, 2018. DOI: 10.1111/1541-4337.12330

SAKAMOTO, T.; BONNIN, E.; QUEMENER, B.; THIBAUT, J. F. Purification and characterization of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 1, p.10–18, 2002.

SÁNCHEZ, O. J & CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresources Technology**, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. D. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 430-436, 2015.

SANDRI, I.G.; LORENZONI, C.M.T.; FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT Food Science and Technology**. v. 51, p. 469–475, 2013.

SANTOS, E. A. L.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; SANTANA, L.C.L.A. Lipase from *Aspergillus niger* obtained from mangaba residue fermentation: Biochemical characterization of free and immobilized enzymes on a sol-gel matrix, **Acta Scientiarum Technology**, v. 39, n.1, p.1-8, 2017.

SANTOS, R. M. Produção e caracterização de bio-óleo a partir de resíduo agroindustrial de semente de mangaba. São Cristóvão, 82p. Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido usando pedúnculo de caju como substrato. Tese - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal / RN Brasil, 2007.

SAXENA, R. & SINGH, R. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1334-1342, 2011.

SAXENA, S.; SHUKLA, S.; THAKUR, A.; GUPTA, R. Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 55, n. 1, p. 33-51, 2008.

SCHUTYSER, W.; RENDERS, T.; VAN DEN BOSCH, S.; KOELEWIJN, S. F.; BECKHAMB, G. T.; SELS, B. F. Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. **Chemical Society Reviews**, v. 3, p. 647-1134, 2018.

SHABAZI, M.; RAJABZADEH, G.; ETTOLAIE, R.; RAFE, A. Kinetic study of k-carrageenan degradation and its impact on mechanical and structural properties of chitosan/k-carrageenan film. **Carbohydrate Polymers**. V. 142, p. 167-176, 2016.

SHANKAR, S.; REDDY, J. P.; RHIM, J. W. Effect of lignin on water vapor barrier, mechanical, and structural properties of agar/lignin composite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, 267-273, 2015.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M.. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, p. 45–60, 2013.

SHARMA, S. K.; BANSAL, S.; MANGAL, M.; DIXIT, A. K.; GUPTA, R. K.; MANGAL, A. K. Utilization of Food Processing By-products as Dietary, Functional, and Novel Fiber: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, V. 56, p. 1647-1661, 2016.

SHU, Z.-Y.; JIANG, H.; LIN, R.-F.; JIANG, Y.-M.; LIN, L.; HUANG, J.-Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2010.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; LEITE, R. S R; SILVA, R.; FERREIRA, V.; GOMES, E. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1237–1243, 2007.

SILVA, F.L., DE OLIVEIRA CAMPOS, A., DOS SANTOS, D.A., DE OLIVEIRA JÚNIOR, S.D., DE ARAÚJO PADILHA, C.E., DE SOUSA JUNIOR, F.C., DE MACEDO, G.R., DOS SANTOS, E.S.: Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. **Renewable Energy**, v. 116, p. 299–308, 2018.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486–520, 2012.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n. 3, p.144-158, 1965.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; NREL, J.W. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *Natl. Renew. Energy Lab.* 2008; 9. doi:NREL/TP-510-42621

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Nrel/Tp-510-42618*; 2012; 15. DOI:NREL/TP-510-42618

SMITH, J.; HONG-SHUM, L. *Food Additives Data Book*. Malden, MA, USA: Blackwell Science Ltd, 2003. 1016. ISBN 978-1-4051-9543-0.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHER, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, p. 411- 417, 2004.

SORENSEN, A.; LÜBECK P. S.; LÜBECK M.; TELLER, P. J.; AHRING, B. K.  $\beta$ -Glucosidases from a new *Aspergillus* species can substitute commercial  $\beta$ -glucosidases for saccharification of lignocellulosic biomass. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 638–650, 2011. <https://doi.org/10.1139/w11-052>

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on *sardinella* (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 451-457, 2009.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

SOUZA, F. M. & AQUINO, L. C. L., Potential of mangaba seed meal for the lipase production of *Aspergillus niger*: Influence of temperature and humidity in the process. **Scientia Plena**, v. 8, n. 12, p. 1-5, 2012.



SOUZA, J. V. B.; SILVA, É. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Paecilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1, **Process Biochemistry**, v. 39, p. 455-458, 2003.

SPIRIDON, I.; C.A. TEACA; R. BODIRLAU. Preparation and characterization of adipic acid-modified starch microparticles /plasticized starch composite films reinforced by lignin, **J. Mater. Sci.**, v. 46, p. 3241–3251, 2011.

STASOFT INC: StatSoft, <http://www.statsoft.com/>, (2005).

SUDHEER R.; DUTTA, P. K.; MEHROTRA, G. K. Lignin incorporated antimicrobial chitosan film for food Packaging application. **Journal of Polymer Materials**, v. 34, n. 1, p. 171-183, 2017.

SUN, J. X.; ZHAO, H; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 331-339, 2004.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459-465, 2003.

TASTAN, Ö.; FERRARI, G.; BAYSAL, T.; DONSI, F. Understanding the effect of formulation on functionality of modified chitosan films containing carvacrol nanoemulsions, **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 756-771, 2016, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.036>.

TAVARES, V.B.; SIVIERI, K.; CERON, C.R.; SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, p. 722-725, 1998.

TEIXEIRA, A. Z.; NASCIMENTO, M. M. F.; RODRIGUES, S. Á.; TRINDADE, J.L.F. Physical-chemical characterization, bio-conversion of agroindustrial residues and comparison of inoculation methods. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, p. 450-457, 2011.

TOMAS, M.; TOYDEMIR, G.; BOYACIOGLU, D.; HALL, R.; BEEKWILDER, J.; C. E. The effects of juice processing on black mulberry antioxidants. **Food Chemistry**, v.186, p. 277-284, 2015.

TOURNOUR, H. H.; SEGUNDO, M. A.; MAGALHÃES, L. M. BARREIROS, L.; QUEIROZ, J.; CUNHA, L. M. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolic with antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 397-406, 2015.

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

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly (vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. **Carbohydrate polymers**, Barking, v. 79, n. 3, p. 711-716, 2010.

THOMAZ, D. T.; MAGALHÃES, W. L. E.; LIMA, E. A.; SILVA, H. D. Poder calorífico da madeira e do carvão vegetal: lignina e carbono fixo como determinantes. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 6, 2007, Colombo, Anais, Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, 169–183, 2000.

UDAY, U. S; BANDYOPADHYAY, T. K; BHUNIA, B. Rapid development of xylanase assay conditions using Taguchi methodology. **Bioengineered**, v. 7, n.6, p. 424–431, 2016.

UENOJO, M. Produção e caracterização de sabores de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 388-394, 2007.

URBÁNSZKI, K., SZAKÁCS, G., TENGERDY, R.P. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. **Biotechnol. Lett.** v. 22, p. 65–69, 2000.

VAKHLU, J. & KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69-85, 2006.

VENKATESWAR, R. L.; GOLI, J. K.; GENTELA, J.; KOTI, S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299-310, 2016.

VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas alcoólicas – Ciência e tecnologia. São Paulo: Blucher. 2010. 461p.

VIEIRA NETO, R. D. Potential fruit trees for the coastal and coastal littoral trays. Aracaju: Embrapa, 2002. 216 p.

VIEIRA, G.S. Desenvolvimento e caracterização de barras de cereais com mangaba. 2007. Monografia (Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sergipe, SE, 2007.

VIVEK, R. RAJASEKHARAN, M.; RAVICHANDRAN, R.; SRIGANESH, K.; VAITHEESWARAN, V. Pectinase production from Orange peel extract and dried Orange peel solid as substrates using *Aspergillus niger*. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*. v.6, p. 445 – 453, 2010.

XIA, J.-L.; LI, P.-J. Pectic Enzymes. **In Reference Module in Food Science**; Elsevier: Amsterdam, 2018.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, vol. 67, 2014, Pages 319-338, ISSN 0961-9534, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>.

YUAN, P.; MENG, K.; WANG, Y.; LUO, H.; SHI, P.; HUANG, H.; BAI, Y.; YANG, P.; YAO, B. A protease-resistant exo-polygalacturonase from *Klebsiella sp.* Y1 with good activity and stability over a wide pH range in the digestive tract. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 171–176, 2012.

ZHANG, Y. H. P; HIMMEL, M. E; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHAO, H.; JONES, C. L.; BAKER, G. A.; XIA, S.; OLUBAJO, O.; PERSON, V. N. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. **J Biotechnol**, v. 139, p. 47-54, 2009.

ZHOU, H.; LI, X; GUO, M.; XU, Q.; CAO, Y.; QIAO, D.; CAO, Y.; XU, H. Secretory Expression and Characterization of an Acidic Endo-Polygalacturonase from *Aspergillus niger* SC323 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 999–1006, 2015.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 84, n. 1, p. 335-342, 2011.