



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

CECÍLIA ELISA DE SOUSA MUNIZ

**PRODUÇÃO DE PECTINASE UTILIZANDO O RESÍDUO DA GOIABA COM
SEMENTE POR MEIO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

CAMPINA GRANDE – PB

2015

CECÍLIA ELISA DE SOUSA MUNIZ

**PRODUÇÃO DE PECTINASE UTILIZANDO O RESÍDUO DA GOIABA COM
SEMENTE POR MEIO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Monografia apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Estadual da Paraíba
como requisito parcial para obtenção do título
de Graduação em Química Industrial.

Orientadora: Ângela Maria Santiago

**CAMPINA GRANDE – PB
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

M966p Muniz, Cecília Elisa de Sousa.

Produção de pectinase utilizando o resíduo da goiaba com sementes por meio da fermentação em estado sólido [manuscrito] / Cecília Elisa de Sousa Muniz. - 2015.
52 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Ângela Maria Santiago,
Departamento de Química".

1. Goiaba. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Enzima poligalacturonase. 4. Pectinase. I. Título.

21. ed. CDD 664.07

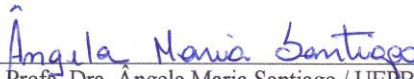
CECÍLIA ELISA DE SOUSA MUNIZ

**PRODUÇÃO DE PECTINASE UTILIZANDO O RESÍDUO DA GOIABA COM
SEMENTE POR MEIO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

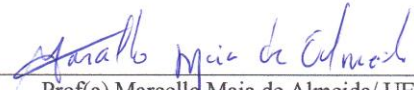
Monografia apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Estadual da Paraíba
como requisito parcial para obtenção do título
de Graduação em Química Industrial.

Aprovada em 20 / 10 / 2015

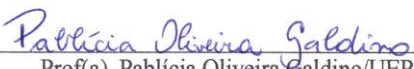
Nota: 9,9 (muito bom)



Prof(a) Dra. Angela Maria Santiago / UEPB
Orientadora



Prof(a) Marcelo Maia de Almeida / UEPB
Examinador



Prof(a) Pablicia Oliveira Galdino / UEPB
Examinadora

A meu pai Durval Muniz que partiu para a eternidade quando eu ainda dava os primeiros passos dessa longa caminhada, deixando um vazio que jamais será preenchido.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, que me ajudou e me capacitou para que pudesse chegar até aqui. Pensei que esse dia jamais chegaria, mas olhando para o que pra traz ficou, percebo o quão rápido esses anos se passaram.

A toda a minha família pelo amor, carinho, paciência e compreensão.

A minha mãe Angelina que nos momentos em que mais precisei sempre surgia com uma palavra de encorajamento fazendo com que eu nunca desistisse.

A minha irmã Joana e ao meu irmão João que estiveram sempre ao meu lado, me suportando nos momentos mais estressantes.

Ao homem que Deus escolheu para estar comigo por toda vida, meu noivo Bruno, pelo amor, companheirismo, amizade e principalmente pela paciência, suportando meu mau humor, minhas ansiedades, minhas crises de estresse. Obrigado amor.

Ao meu primo Mateus pela paciência e ajuda.

A minha tia Marli que no primeiro ano de graduação abriu as portas de sua casa para mim, fazendo dela também a minha casa. Obrigado tia, a senhora contribuiu muito para que eu chegasse até aqui.

As minhas amigas do peito, Hakyanna, Juliana e Maria que dividiram ao longo desses quatro anos não só a sua casa, mas também os seus corações, sendo socorro de todas as horas. Juntas, compartilhamos de muitas alegrias e vitórias que nos fortaleceu e nos ajudou a chegar até aqui. Também ao meu cunhado Kyrton, que já mora no meu coração, por todos os momentos que me fizeste sorrir, mesmo quando eu não tinha motivos para isso.

As minhas amigas, Adrienne, Ana Zélia, Denise, Kézia, Tércila e Jakeline obrigado por tudo que vocês já fizeram por mim. Amigas vocês são a prova viva de que amizade verdadeira existe.

A Universidade Estadual da Paraíba e ao corpo docente do Centro de Ciências e Tecnologia, que ao longo desses quatro anos e meio de aprendizado, contribuíram cada um do seu jeito para minha formação. Muito obrigado por todas as contribuições, não só através dos conteúdos, mas também com suas experiências de vida.

A professora Djane de Fátima que me deu a primeira oportunidade para iniciar no mundo da pesquisa, abrindo as portas do seu projeto de iniciação científica.

A minha orientadora Ângela Maria Santiago que nos últimos dois anos de graduação me concedeu a oportunidade de está no seu projeto de pesquisa, compartilhando comigo não

só a sua vasta experiência profissional como também o seu enorme conhecimento. Professora ao longo desses anos a senhora foi um canal de conhecimento rico, que eu tive o prazer de ter ao meu lado, muito obrigado por todas as contribuições.

Aos meus queridos colegas da turma de química industrial 2011.1, que compartilharam comigo ao longo desses anos todas as emoções de uma graduação, alegrias, tristezas, ansiedades, mas sempre com vitória no final. Amigos vocês ficarão marcados na minha história para sempre.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.

Eclesiastes 3. 1.

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial do resíduo da goiaba para a produção da enzima poligalacturonase, por meio da fermentação em estado sólido, utilizando como agente fermentativo o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916. Primeiramente realizou-se a lavagem do resíduo em água clorada a 2,5% seguido da secagem em estufa com circulação de ar a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante. Depois de seco o resíduo foi triturado para obtenção da granulometria adequada ao processo de fermentação em estado sólido. A caracterização físico-química do mesmo, mostrou que este pode ser utilizado satisfatoriamente como substrato para a produção da enzima poligalacturonase, apresentando bons níveis de pectina 9,95%, açúcares redutores, 27,12%, pH 3,52, teor de água, 10,04%, massa específica real, 1,42 g/mL e massa específica aparente, 0,65 g/mL. Quanto à distribuição granulométrica, a maioria das partículas do resíduo apresentavam dimensões variando entre 0,840 e 0,425 mm, reafirmando a viabilidade de utilizar esse resíduo na fermentação em estado sólido, já que partículas maiores possibilita maior espaço entre elas, que faz com que haja redução do rendimento da absorção dos nutrientes pelos micro-organismos. O processo fermentativo ocorreu com umidade inicial do meio de 50% e concentração da fonte nitrogênio de 1%, durante um período de 72 horas, onde a cada 7, 22, 30, 44, 50, 66 e 72 horas de cultivo eram retiradas amostras para realização das análises de umidade do meio, pH, açúcares redutores e atividade poligalacturonásica (PG). A atividade poligalacturonásica máxima alcançada foi de 5,39 U/g em 30 horas de fermentação.

Palavras Chaves: Resíduos agroindustriais, pectinases, fermentação.

ABSTRACT

This experimental work aims to evaluate the guava residue potential for the enzyme polygalacturonase production through solid-state fermentation using as agent fermentative the microorganism *Aspergillus niger* CCT 0916. Primarily, the residue was washed with 2.5% chlorinated water, and then it was dried in an oven with air circulation at $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ until reaching a constant weight. After drying, the residue was triturated to obtain the adequate granulometry to the solid-state fermentation process. The physicochemical characterization of the flour from the guava showed good results such as pectin 9.95%, reducing sugars 27.12%, pH 3.52, water content 10.04%, bulk density 1.42 g/mL and apparent density 0.65 g/mL. Therefore, the flour could be used satisfactorily as a substrate for a polygalacturonase enzyme production. In terms of granulometric distribution, the majority of the residue particles had sizes ranging from 0.840 to 0.425 mm. It supports the feasibility of using this residue in solid-state fermentation because larger particles allow more space between them. Thus, it means that there is reduced efficiency absorption by the microorganism. The fermentation process occurred, for a period of 72 hour, at the following environmental conditions: 50% of initial humidity and 1% of nitrogen source concentration. Each 7, 22, 30, 40, 50, 66 and 77 hours of cultivation, samples were taken to perform the following physical, chemical and biological analyzes: humidity, pH, reducing sugars and exo-polygalacturonase activity. The higher polygalacturonase activity achieved in this experimental work was 5.39 U/g in 30 hours of fermentation.

Key words: Agribusiness residue, pectinases, fermentation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Frutos da Goiaba	17
FIGURA 2 - Resíduos Agroindustriais	18
FIGURA 3 – Estrutura primária da molécula de pectina	20
FIGURA 4 – Pontos de ataque da enzima pectinase sobre a molécula de pectina.....	21
FIGURA 5 – Etapas de obtenção da enzima poligalacturonase	31
FIGURA 6 – Etapas de preparação dos resíduos da goiaba	32
FIGURA 7 – Conjunto de peneiras	33
FIGURA 8 – Agitador de peneiras	33
FIGURA 9 –Distribuição granulométrica do resíduo da goiaba.....	40
FIGURA 10 – Acompanhamento Cinético do processo de produção da exopoligalacturonase obtida da resíduo seco do resíduo da goiaba.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Quantidade mínima de água para sobrevivência dos fungos.....	28
TABELA 2 – Caracterização físico-química dos resíduos da goiaba	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2. Objetivos Específicos	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.2 Resíduos Agroindustriais.....	17
2.3 Substâncias Pécnicas	18
2.4 Enzimas Pectinolíticas	19
2.4.1 Enzima Poligalacturonase (PG).....	21
2.5 Aplicação das Enzimas Pectinolíticas	21
2.6 Fermentação em Estado Sólido	22
2.6.1 Fatores que influenciam a fermentação em estado sólido	23
2.6.1.1 Tamanho do Substrato.....	26
2.6.1.2 Temperatura.....	26
2.6.1.3 pH.....	27
2.6.1.4 Aeração.....	27
2.6.1.5 Umidade e Atividade de água.....	28
2.6.1.6 Micro-organismo.....	30
2.6.1.7 Substrato.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Local de Realização da Pesquisa	30
3.2 Matéria-Prima.....	30
3.3 Métodos	30
3.3.1 Preparação do resíduo seco da goiaba	31
3.3.2 Caracterização dos resíduos secos da goiaba	31
3.3.2.1 Granulometria.....	33
3.3.2.2 Massa específica aparente.....	33
3.3.2.3 Massa específica real.....	34
3.3.2.4 pH, Teor de Água, Sólidos Solúveis, Cinzas.....	34
3.3.2.5 Açúcares Redutores.....	34
3.3.2.6 Pectina.....	35
3.3.3 Processo Fermentativo.....	34

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Caracterização físico-química da resíduo seco do resíduo da goiaba.....	40
4.2 Processo Fermentativo.....	40
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira, através do cultivo de várias espécies, alcança, dia a dia, maior expressão na agricultura nacional e conta com amplas possibilidades de expansão, haja vista que o país dispõe de extensas áreas com condições climáticas favoráveis tanto para cultivares de clima temperado quanto tropical. A fruticultura ocupa cerca de 2 milhões de hectares do território nacional e gera mais de 5 milhões de empregos no campo, a atividade tem valor bruto de produção superior a R\$ 23 bilhões, fazendo com que o Brasil siga como o terceiro maior produtor de frutas do mundo, com uma produção de 41,3 milhões de toneladas, ficando atrás apenas da China e da Índia (IBGE, 2013; ABF, 2015).

Segundo o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE, 2010) os excelentes índices de produtividade e os resultados comerciais obtidos nas últimas safras são fatores que demonstram a vitalidade desse setor, que veio para ficar e para se desenvolver.

A goiaba (*Psidium guajava L.*) é uma das frutas tropicais mais populares que são cultivadas e consumidas em todo o mundo. A goiabeira planta nativa de região tropical, com grande adaptação a climas subtropicais, desenvolve-se muito bem em quase todo o território nacional. Pomares comerciais de goiaba para a industrialização são encontrados desde o Rio Grande do Sul, passando por São Paulo, Minas Gerais, Goiás até o Norte e Nordeste brasileiro (PEREIRA, 2003).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas a Paraíba em 2013 produziu cerca de 2.446 toneladas de goiaba em 451 hectares de plantio, arrecadando no final da safra 17753 mil reais aproximadamente (IBGE, 2013).

A importância econômica da cultura, tanto para o mercado interno como para exportação, ocorre em virtude das várias formas de aproveitamento do fruto para produção de polpa, na indústria de néctar, sucos, compotas, biscoitos e muitos outros produtos, além de ser amplamente consumida como fruta fresca. (POLINFRUT, 2005).

Pedrosa et al., (2013) afirmam que o setor agroindustrial tem colaborado para o crescimento econômico do país, entretanto, tem contribuído sistematicamente para a geração de grandes quantidades de resíduos. Seu manejo inadequado pode contaminar o solo, ar e corpos hídricos, criando problemas ambientais. Mas apesar dos resíduos agroindustriais apresentarem elevado potencial poluente, eles não podem ser considerados como lixo, pois possuem valor econômico agregado e podem ser tratados e aproveitados no próprio setor agroindustrial.

Nos últimos anos, há um grande interesse no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos vem sendo desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (SANCHÉS, 2009).

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) é um bioprocessos que desempenha um papel de destaque no aproveitamento dos resíduos agroindustriais, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de um alto valor agregado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Aproveitar o resíduo da goiaba proveniente de uma indústria de polpa de fruta para utilizá-lo como substrato na produção de pectinases por meio da fermentação em estado sólido (FES) utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916 como agente da fermentação.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Secar o resíduo da goiaba em estufa com circulação de ar na temperatura de $55\pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Caracterizar o resíduo seco da goiaba quanto a granulometria, massa específica aparente, massa específica real, porosidade, teor de água, atividade de água, cinzas, pH, sólidos solúveis, açúcares redutores e pectina;
- Avaliar a potencialidade deste resíduo como substrato na produção da enzima poligalacturonase (PG) por meio da fermentação em estado sólido (cinética fermentativa) e do micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Goiaba

A goiabeira pertence ao gênero *Psidium*, da família *Myrtaceae*, que é composta de mais de 70 gêneros e 2.800 espécies, sendo que 110 a 130 dessas espécies são natural da América Tropical e Subtropical. No entanto, hoje esta espécie (*Psidium guajava*) encontra-se amplamente difundida por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (MEDINA, 1988).

A goiaba se sobressai em relação às outras frutas tropicais em produtividade e adaptabilidade. As cultivares de goiaba exibem uma grande diversidade quanto ao tamanho da árvore, hábitos de safras e rendimento de produção, bem como no tamanho do fruto, forma, qualidade e época de amadurecimento. A qualidade das frutas é determinada por inúmeras características desejáveis, tais como, valor nutricional, sabor, qualidade no processamento e vida de prateleira (SPILLER, 2012; SHARMA et al., 2010; WANG, 2010).

A goiaba (Figuras 1) é bem conhecida pela sua grande adaptação ao crescimento e produção de frutos em diferentes locais do mundo. A sua polpa pode ser doce e apresentar uma coloração rosada forte com número de sementes e firmeza variáveis, dependendo da espécie. A goiaba é uma fruta muito rica em vitaminas A e C, ômega 3 e 6, ácidos graxos poli-insaturados e, especialmente em fibra dietética. Ela também apresenta bons níveis de minerais que são necessários à dieta tais como potássio e magnésio, amplo perfil de nutrientes essenciais, ácidos, açúcares e pectina, além de taninos, flavonóides, óleos essenciais, álcoois sesquiterpenoides e ácidos triterpenoides. A goiaba é comercialmente utilizada na produção de sucos, sorvetes, biscoitos e vários produtos de panificação (ANDRADE et al., 2009; IHA 2008, RODRIGUES, 2011).

FIGURA 1- Frutos da goiaba



FONTE - Google, 2015

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011) o Brasil em 2010 foi considerado o maior produtor mundial de goiabas vermelhas, com uma produção de 316.363 toneladas distribuídas em 15.375 hectares de área colhida. A maior área de plantio de goiaba no Brasil concentra-se na região Sudeste e Nordeste, destacando-se os estados de São Paulo e Pernambuco como sendo os maiores produtores do fruto (AGRIANUAL, 2009).

2.2 Resíduos agroindustriais

O crescimento acelerado da população mundial e de indústrias levou a sociedade moderna a enfrentar um dos principais problemas ambientais, a superprodução de lixo. A maioria desses resíduos é proveniente dos grandes centros de abastecimento e da agroindústria, como a casca do coco verde (resíduo da produção da água de coco verde), bagana de carnaúba (resíduo da produção da cera de carnaúba) bagaço de cana (resíduo da produção de álcool e açúcar) e da goiaba (que são provenientes da produção de doces, polpa de fruta congelada e sorvetes) (ARAÚJO, 2009).

Segundo Lousada et al., (2006) as agroindústrias constantemente tem investido no aumento da capacidade de processamento, gerando grandes quantidades de resíduos (Figura 2) que em muitos casos, são considerados custos operacional para as empresas ou fonte de contaminação ambiental (PEDROSA, 2013).

FIGURA 2 - Resíduos Agroindustriais



FONTE – Google, 2015

Apesar dos resíduos agroindustriais apresentarem elevado potencial poluente, eles não podem ser considerados como lixo, pois possuem valor econômico agregado e podem ser tratados e aproveitados no próprio setor agroindustrial. Em termos legais, a Lei 12.305/2010 que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, sujeita os responsáveis pela geração de resíduos sólidos a obrigatoriedade de uma gestão e gerenciamento observando a seguinte

ordem de prioridade: a não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento dos resíduos sólidos e disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos (BRASIL 2010, VALENTE et al., 2009).

Dentre as várias frutas destinadas ao processamento industrial, a goiaba é considerada altamente promissora pela sua alta rentabilidade e grande possibilidade de expansão no Brasil, gerando resíduos de fácil manipulação (NEIVA et al., 2002).

A maior parte da produção da goiaba é destinada à indústria de doces, sucos geleias, polpa congelada, néctares, sorvetes, sendo essas as principais formas de consumo da fruta no Brasil. Durante o processo de beneficiamento dos frutos há o descarte das sementes juntamente com as cascas, as quais constituem o resíduo que usualmente é descartado pela agroindústria. No caso da goiaba que é destinada à produção de sucos e doces, cerca de 30% do seu peso é resíduo, constituído principalmente de sementes e cascas, tendo potencial quantitativo para serem utilizados em bioprocessos (NASCIMENTO et al., 2010; SANTIAGO, 2012).

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (SANCHÉS, 2009).

Por serem resíduos ricos em nutrientes, toda e qualquer técnica que vise seu aproveitamento é muito importante, já que a reutilização desses resíduos irá contribuir não só para a melhoria do meio ambiente como também agregar valor ao produto e diminuir o custo de industrialização, o que conseqüentemente aumenta as oportunidades de emprego nas indústrias (MATOS, 2005; UCHOA et al., 2008).

2.3 Substâncias Pécicas

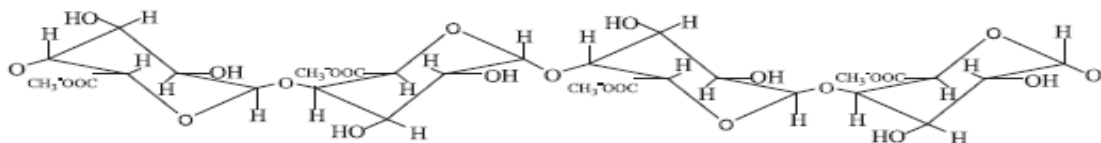
Substâncias pécicas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média das plantas, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células vegetais superiores. Quimicamente é um complexo coloidal de polissacarídeos, composto de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; SOUZA, 2008).

Segundo Kashyap et al., (2001) a Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécnicas em quatro tipos principais: protopectina, ácido pécnico, ácido pécico e pectina.

A protopectina é uma substância pécica insolúvel em água, presente em tecidos intactos. O ácido pécnico é uma cadeia de poligalacturonas com até 75% de unidades de galacturonatos metilados. O ácido pécico é uma substância solúvel em água, compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil éster. E a pectina designa ácidos pécnicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster. Em uma fruta verde, a pectina é ligada a microfibras celulosas na parede da célula. Essa pectina é insolúvel e por isso confere rigidez as paredes da célula. Porém, durante o amadurecimento a estrutura da pectina é alterada através de enzimas naturalmente presentes nas frutas. Estas alterações envolvem o desarranjo da cadeia de pectina ou de correntes laterais presas às unidades que compõem a cadeia principal. O resultado é a solubilização da molécula de pectina (SOUZA 2008).

A Figura 3 exibe uma estrutura primária de uma molécula de pectina. Ela basicamente consiste em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido α -1, 4-D-galacturônico e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais (ALKORTA, 1998; GUMMADI, 2003; SILVA 2005; UENOJO e PASTORE, 2007).

FIGURA 3: Estrutura primária de uma molécula de pectina



FONTE - Uenojo e Pastore (2007)

2.4 Enzimas Pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécnicas presentes nas células vegetais. São produzidas pela maioria das plantas superiores, por fungos filamentosos, por algumas bactérias e por poucas leveduras (MARTIN et al., 2007). Elas são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade, melhorar e aumentar a eficiência da filtração e da clarificação, no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas, na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais, na fermentação de chá, café e cacau, na extração de óleos vegetais e de polpa

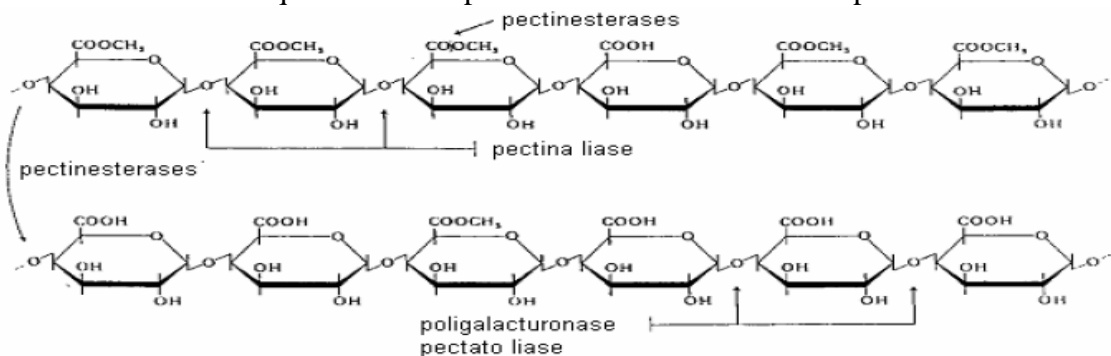
de tomate, e ainda no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxteis e de papel (ALMEIDA et al., 2005; GUMMADI, 2003; SILVA et al., 2005; UENOJO e PASTORE, 2007;).

Segundo Uenojo e Pastore (2007) as pectinases também são utilizadas para reduzir o amargor excessivo em cascas de citrus, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados.

As pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4, entre unidades de ácidos galaturônicos ou seu derivado metoxilado. Em virtude disso as pectinases podem causar importantes alterações na textura de frutas e hortaliças. Sua aplicação na indústria de alimentos pode trazer uma série de benefícios à obtenção de produtos de origem vegetal (KOBLOITZ, 2010).

A classificação das enzimas pécticas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico (Figura 4) pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica ou terminal. Existem basicamente três tipos de pectinases, a pectina esterase que remove os grupos metil éster, as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas; e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (MALVESSI e SILVEIRA, 2004; OLIVEIRA, 2013).

FIGURA 4: Pontos de ataque da enzima pectinase sobre a molécula de pectina.



FONTE - Santos, (2007).

Segundo Bon et al., (2008) no grupo das esterases estão classificadas as pectinesterases e no grupo das despolimerases as poligalacturonase e as pectina-liases. A diferença entre as enzimas despolimerases está no modo dessas atuarem no substrato. As pectina-liases agem preferencialmente em pectinas altamente metiladas e hidrolisa cadeias poligalacturônicas, para dar oligossacarídeos com graus variados de metilação, e as poligalacturonases hidrolisam o ácido péctico e a pectina em ácido galacturônico e

oligossacarídeos respectivamente. Entretanto, dentre todas as enzimas pectinolíticas a poligalacturonase é a mais estudada, com inúmeras pesquisas voltadas para sua produção.

2.4.1 Enzima Poligalacturonase (PG)

São enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) da cadeia de ácido poligalacturônico. As poligalacturonases são classificadas em endopoligalacturonase que hidrolisam as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) internas de forma randômica, causando a despolimerização da molécula e liberando oligômeros de ácidos poligalacturônico e em exopoligalacturonases que removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (MARTIN, 2006).

A poligalacturonase (PG) é apontada como a principal enzima despolimerase. Elas são úteis devido a sua alta atividade enzimática e ótima em meios levemente ácidos. Mas a principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos sendo, portanto, usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração (GUMMADI e PANDA, 2003; MARTIN, 2006; SOUZA, 2010; ZHENG e SHETTY, 2000;). Além disso, fazem parte também em processos fermentativos de café e chá, tratamento de resíduos vegetais e extração de óleos (UENOJO E PASTORE, 2007).

Santos et al., (2015) avaliaram a atividade enzimática de poligalacturonase com diferentes proporções de casca de coco verde e sabugo de milho, por meio da fermentação em estado sólido, alcançando uma atividade poligalacturonásica máxima 45,08 U/g.

2.5 Aplicação das Enzimas Pectinolíticas

Segundo Uenojo e Pastore (2007) por volta de 1930 às enzimas pectinases começaram a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas. Mas somente a partir de 1960, quando os estudos sobre a natureza química de tecidos vegetais se tornaram mais aparentes, é que os cientistas começaram a utilizar as enzimas de forma mais eficiente.

O interesse em se utilizar as pectinases tem aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos (GUMMADI e PANDA, 2003).

Na indústria de sucos de frutas as pectinases são responsáveis pela sua consistência, turbidez e aparência. A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a

viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (UENOJO e PASTORE, 2007).

Segundo os mesmos autores a combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, são usadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. A adição de α -amilase e amiloglicosidase, ativas a pH ácido, é usada no processamento de frutas contendo amido, especialmente maçã, para prevenir turvação. O uso de enzimas de maceração aumenta o rendimento da extração e melhora o processamento, sem aumento de custos. Essas enzimas são utilizadas após o corte da matéria-prima, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes da fruta. Após a extração, pectinases são adicionadas para clarificação e diminuição de viscosidade para facilitar a filtração e concentração.

Na recuperação de óleos essenciais a aplicação de pectinases hidrolisa os complexos de pectina-proteína, liberando o óleo, aumentando o rendimento, diminuindo o tempo de processo e melhorando a qualidade do produto final. Já na indústria de vinhos a adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco, reduz o tempo de clarificação e aumenta o conteúdo de terpenos no vinho, resultando no melhoramento das características visuais (cor e turbidez), quando comparadas com vinhos não tratados (UENOJO e PASTORE, 2007).

As pectinases também são utilizadas na fermentação de cafés e chás, pois aceleram o processo, melhorando a qualidade do produto final. Enzimas pécticas são adicionadas para remover a camada de mucilagem do grão, constituída de três quartos de substâncias pécticas. Na indústria têxtil essas enzimas podem ser usadas para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais. (UENOJO e PASTORE, 2007).

2.6 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido é um processo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre. É definida como o processo de fermentação realizada sobre um material não solúvel, ou sólido natural, que atua tanto como suporte físico, quanto como fonte de nutrientes ou ainda como substrato. O baixo teor de água significa que a fermentação pode ser efetuada apenas por um número limitado de micro-organismos, principalmente leveduras e fungos, embora algumas bactérias também possam ser utilizadas. O teor de água do substrato

deve variar entre 12% e 80%, pois abaixo desse limite mínimo, os micro-organismos não se desenvolvem. (COUTO e SANROMÁN, 2006; SANTOS, 2007).

Embora a fermentação em estado sólido tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, tem se estendido às indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, toxinas, agentes de biorremediação, cogumelos comestíveis, polissacarídeos microbianos, biopesticidas, enriquecimento protéico de alimentos fermentados, pré-digestão de rações animais, enzimas e variações dos tradicionais alimentos fermentados. De uma forma geral, a aplicação comercial dos processos de fermentação em estado sólido pode ser dividida em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindústrias; 2) aplicações economicamente lucrativas, como produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados (PALMA, 2003; OLIVEIRA, 2013).

Na fermentação em estado sólido podem ser destacadas algumas características, tais como, alta produtividade, alta concentração dos produtos e menor requerimento de espaço e energia. Entretanto ela apresenta dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, teor de água e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de água, o que acaba favorecendo o uso de fungos filamentosos no processo, devido os mesmos se adaptar bem a essa condição (PANDEY et al., 1999).

2.6.1 Fatores que influenciam a fermentação em estado sólido

As condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto. Na fermentação em estado sólido o controle das condições ambientais se torna mais difícil devido à heterogeneidade da suspensão de células microbianas e da solução de nutrientes e produtos na fase sólida. O baixo teor de água na fermentação em estado sólido possibilita um pequeno volume de reator por massa de substrato, o que simplifica a separação do produto. No entanto, existem sérios problemas com respeito à mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, teor de água, formação de gradientes de pH, nutrientes e produtos como consequência da heterogeneidade do sistema (SANTOS, 2007).

2.6.1.1 Tamanho do substrato

A forma e o tamanho da partícula são extremamente importantes para o processo fermentativo. Afetam a relação área superficial e volume da partícula, o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas. Geralmente, partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Porém, uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato que pode interferir na respiração microbiana, podendo resultar em pouco crescimento. Enquanto que partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, mas limitam a superfície para ataque microbiano. O tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e a disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanho variando entre 1 mm e 1 cm tem sido frequentemente utilizadas na fermentação em estado sólido (MITCHELL et al. 2000; PANDEY 1999; SOUZA, 2008).

Paris et al., (2012) comparou a produção de diferentes tipos de complexos enzimáticos por fermentação em estado sólido utilizando diferentes tipos de sojas (orgânica, transgênica e convencional) com o fungo *Aspergillus niger*. Os grãos foram fragmentados e classificados em diferentes tamanhos de partícula (1,4; 1,0; 0,6 e 0,3 mm). A maior atividade enzimática, 0,264 U/h, foi observada para a protease, utilizando soja convencional com teor de água inicial de 50%, à 144 horas de fermentação, com concentração inicial do inóculo de 4.106 e tamanho de partícula de 0,6 mm.

2.6.1.2 Temperatura

Os processos fermentativos caracterizam-se por serem exotérmicos. Durante a fermentação em estado sólido, grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do microrganismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as fermentações em estado sólido, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (PINTO et al., 2006).

Martins (2006) utilizando como substrato os bagaços da cana-de-açúcar e da laranja e como agente fermentativo o fungo *Thermoascus aurantiacus*, observou que na fermentação em estado sólido a temperatura ótima para a atividade das pectinases ficou em torno de 60-

65°C. A pectinase obtida da fermentação em estado sólido teve a sua atividade aumentada até a temperatura de 65°C, na qual ocorreu o pico de atividade de 4,8 U/mL. Em valores mais elevados de temperatura, a atividade decresceu, perdendo cerca de 87% de atividade a 85°C.

2.6.1.3 pH

Segundo Pandey (2003) mesmo o pH sendo um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro, durante a fermentação não é fácil de ser realizado.

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos preferem pH baixo (4,5 – 5,0), afetando o metabolismo dos microrganismos por alterar seu conjunto enzimático. O pH de um cultivo varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do microrganismo. Quando ácidos orgânicos são secretados, como ácidos acético ou láctico, causam o decréscimo do pH. Entretanto, o consumo destes ácidos quando presente no meio fermentativo causa o aumento do pH (SANTOS, 2007).

Souza (2008) utilizando como substrato o resíduo do maracujá e o fungo *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 para produção de pectinases por meio da fermentação em estado sólido, verificou que a produção desta enzima manteve-se estável na faixa de pH entre 3,5 e 5,5, atingindo 250 U/g de meio fermentado para a atividade pectinolítica e 20,9 U/g para atividade poligalacturonásica, em 44 e 66 horas de fermentação respectivamente. Entretanto essa atividade não foi mais detectada para valores de pH acima de 6,5.

2.6.1.4 Aeração

Segundo Oliveira (2013) os sistemas de fermentação em estado sólido têm caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato. Como no meio não existe água livre, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio tornam-se fatores cruciais para o processo fermentativo. A transferência de oxigênio acontece, fundamentalmente, em duas instâncias: transferência interpartículas e transferência intrapartículas. A maioria dos cultivos em estado sólido permite o livre acesso do oxigênio atmosférico ao substrato, já que o oxigênio é capaz de se difundir, com rapidez, pelo filme líquido superficial formado nas partículas do substrato.

A aeração está diretamente relacionada ao desenvolvimento do fenômeno de secagem. Este fenômeno é indesejável em todos os sistemas de fermentação em estado sólido, pois a desidratação do meio faz com que a transferência de nutrientes e metabólitos seja lenta ou nula. O desenvolvimento microbiano requer um grande consumo de oxigênio, logo a passagem de ar através do meio permite elevadas taxas de crescimento e produtividade (PINTO et al., 2006).

Martins et., (2008) avaliaram a influência da aeração na produção de lipase utilizando como agente fermentativo os micro-organismos *Phialemonium sp* e o *Aspergillus fumigatus*. As taxas de aeração estudadas foram de 60 e 120 mL g⁻¹ h⁻¹. Utilizando o micro-organismo *Phialemonium sp*. a atividade lipolítica máxima encontrada foi 129,50 U/g, quando utilizada aeração de 60 mL g⁻¹ h⁻¹. Já para o *Aspergillus fumigatus* nas mesmas condições de aeração, 60 mL g⁻¹ h⁻¹, a atividade lipolítica máxima foi de 119,46 U g⁻¹.

2.6.1.5 Teor de Água e Atividade de água

De todos os parâmetros em um processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na fermentação em estado sólido, devido ao grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida. Nela, a água está relacionada a dois parâmetros. O primeiro é o teor de água, que diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio. O segundo é a atividade de água, definida pela Equação 1, que está relacionada a quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato para o microrganismo. A atividade de água afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO et al., 2006).

$$A_w = \frac{P}{P_0} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

A_w = atividade de água;

P = pressão de vapor d água do substrato;

P₀= pressão de vapor da água pura.

Um nível de teor de água alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca

gasosa, enquanto que baixos níveis de teor de água levam a um crescimento menor em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado. A umidade nos processos de fermentação em estado sólido geralmente varia entre 30 e 85%. O teor de água ótimo para o cultivo do microrganismo na fermentação em estado sólido é dependente da capacidade do substrato em reter água. O nível de teor de água ótimo para o cultivo de *Aspergillus niger* em arroz, por exemplo, é de 40%, enquanto que para a polpa de café é de 80%. Isto demonstra a insegurança de usar o teor de água como parâmetro de crescimento do microrganismo. O requerimento de água pelo microrganismo deve ser definido em termos de atividade de água (A_w) e não através do teor de água do substrato sólido (SANTOS, 2007).

Mas deve-se lembrar de que na fermentação em estado sólido, cada micro-organismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento. A atividade de água ótima para fungos é por volta de 0,7; para leveduras 0,8 e para bactérias 0,9 (OLIVEIRA, 2013). Na Tabela 1 é possível observar os respectivos valores de atividade de água para alguns fungos.

TABELA 1 - Atividade de água mínima necessária à sobrevivência de fungos

Fungos	Atividade de água (a_w)
<i>Aspergillus restrictus</i>	0,70
<i>Aspergillus halophilicus</i>	0,68
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,73
<i>Aspergillus candidus</i>	0,80
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,80
<i>Aspergillus flavus</i>	0,85
<i>Aspergillus niger</i>	0,77*
<i>Penicillium</i> (diversas espécies)	0,85

FONTE - SOUZA (2008).

Santos et al., (2008) através da aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase utilizando como agente o micro-organismo *Aspergillus niger* na fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju verificou que, a melhor condição de produção da poligalacturonase foi com teor de água inicial de 40%, 1% de sulfato de amônia e sem adição do fosfato de potássio atingindo uma atividade poligalacturonásica de 16 U/g .

Oliveira (2014) verificou que o teor de água se mostrou significativa para a atividade enzimática através da utilização do fungo *Penicillium chrysogenum* no processo de

fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju adicionado de pectina cítrica usada para indução. A atividade da enzima foi máxima (82,07 U/mL) quando se utilizou 60% de teor de água umidade inicial e solução nutritiva contendo 4% de pectina cítrica.

2.6.1.6 Micro-organismo

As enzimas pectinolíticas, são produzidas somente por vegetais e micro-organismos. Por serem de origem fúngica atrai mais atenção, uma vez que oferecem um enorme potencial para a indústria. Quase todas as preparações comerciais de pectinases são produzidas a partir de fungos, principalmente de *Aspergillus niger*. Na verdade pectinases microbianas são responsáveis por quase 25% do mercado global de vendas de enzimas (MOHAMED, 2009).

Os fungos filamentosos são os micro-organismos mais adaptáveis ao processo de fermentação em estado sólido. São capazes de crescer em baixos valores de atividade de água e altas pressões osmóticas. O próprio modo de crescimento dos fungos gera uma vantagem sobre os micro-organismos unicelulares. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas hifas permitem aos fungos uma rápida colonização dos substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. De forma coordenada ao crescimento, os metabólicos excretados pelo micro-organismo permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes (PINTO, 2003).

O *Aspergillus niger* é o mais utilizado para a produção industrial de pectinases. Este fungo sintetiza a poligalacturonase (PG) polimetilgalacturonase (PMG), pectinliase (PL) e pectinesterase (PE) (PANDA et al, 1999).

Oliveira (2013) estudou a produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando o resíduo agroindustrial de manga como substrato e o fungo *Aspergillus niger* CCT 0916 como agente da fermentação. A máxima produção da enzima poligalacturonase, com atividade de 7,66 U/g, foi obtida em 43 horas de fermentação.

Souza (2010) produziu a enzima poligalacturonase por meio da fermentação em estado sólido utilizando como substrato o resíduo seco da casca e do albedo do maracujá (*Passiflora edulis*) e como agente da fermentação o fungo filamentoso *Aspergillus niger* CCT 0916. A máxima atividade poligalacturonásica (20,9 U/g) foi alcançada às 66 horas de fermentação, para 40% de umidade inicial e 1% da concentração da fonte de nitrogênio.

2.6.1.7 Substrato

Segundo Oliveira (2013) na fermentação em estado sólido para a produção de pectinases, há a necessidade de ter-se um meio de cultivo com balanceamento adequado de nutrientes.

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, entretanto, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos. Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos, cuja disposição no meio ambiente causam sérios problemas de poluição. Com o advento da inovação biotecnológica na área de enzimas e tecnologia das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas. Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode ser sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de maior valor agregado como as enzimas (OLIVEIRA, 2013; UENOJO e PASTORE, 2007).

O material sólido atua como fonte de nutrientes para a cultura de micro-organismos e também como suporte para as células (PANDEY, 2003). Farelos, cascas, bagaços de frutas da agroindústria (maçã, goiaba, maracujá, pedúnculo de caju) e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação (PINTO et al., 2006).

Muitos substratos sólidos são complementados com fontes solúveis de nitrogênio durante a sua preparação, já que o nitrogênio é um nutriente importante no desenvolvimento microbiano. Muitos fungos obtêm o nitrogênio a partir de fontes inorgânicas, como nitratos e sais de amônia. Porém, algumas espécies exigem substratos nitrogenados orgânicos (MITCHELL et al., 2000).

Os substratos que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina têm mostrado altos rendimentos em enzimas. A presença de pectina no meio, além do efeito indutivo, favorece a excreção de pectinases pelos fungos produtores (FONTANA et al., (2005); PANDEY et al., 1999).

Dantas e Aquino (2010) avaliaram o potencial de resíduos agroindustriais (torta de mamona, torta de babaçu, sementes de abóbora, casca de abacate e borra de café), como substratos para a obtenção de lipase microbiana utilizando o microrganismo *Aspergillus niger* como agente da fermentação. A maior produção de lipase ($24,6 \text{ U g}^{-1}$) foi obtida quando utilizou-se como substrato a torta de babaçu contendo um teor de água de 45% (b.u) à 168 horas de fermentação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Realização da Pesquisa

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ) da Universidade Federal de Campina Grande-PB (UFCG) e no Laboratório de Físico-Química do Núcleo de Pesquisa em Alimentos (NUPEA) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

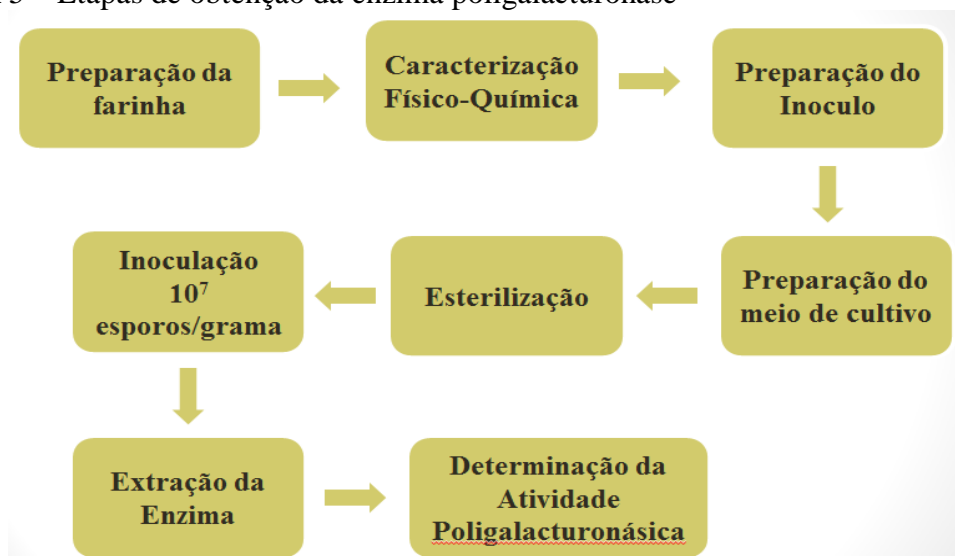
3.2 Matéria-Prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o resíduo da goiaba, oriundo de uma indústria de produção de polpa de fruta localizada na cidade de Campina Grande, estado da Paraíba.

3.3 Métodos

A Figura 5 exibe todas as etapas que foram desenvolvidas para a obtenção da enzima poligalacturonase.

FIGURA 5 – Etapas de obtenção da enzima poligalacturonase



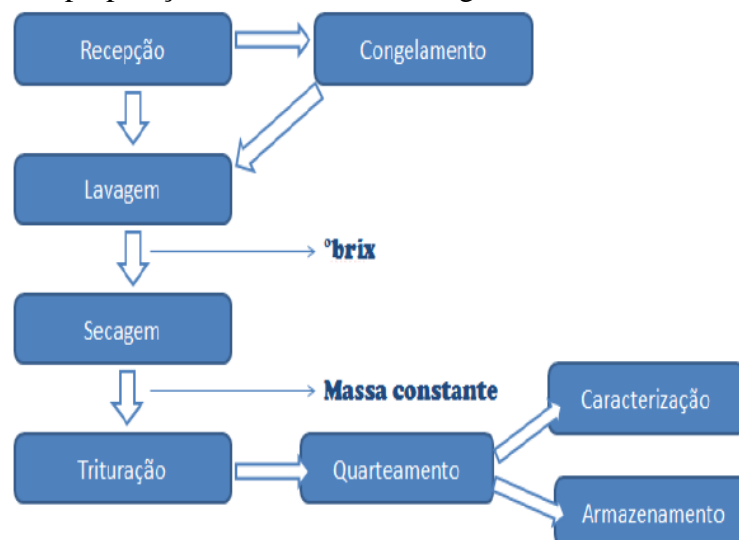
3.3.1 Preparação do resíduo seco do resíduo seco da goiaba

Na recepção do resíduo da goiaba realizou-se imediatamente o seu congelamento com a finalidade de conservar as suas propriedades e evitar uma possível degradação.

O resíduo foi descongelado, lavado em água clorada a 2,5%, enxaguado com água corrente e pesado em balança semi-analítica. Em seguida foi colocado em bandejas de alumínio e levado a estufa com circulação forçada de ar a temperatura de $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante. O resíduo seco foi triturado em moinho de facas, para obtenção da granulometria adequada ao processo de fermentação em estado sólido. Em seguida fez-se uma homogeneização de todo o resíduo e o submeteu a técnica do quarteamento, cuja finalidade era a retirada de uma amostra que representasse uniformemente todo o resíduo. Depois do quarteamento retirou-se 100 g para a realização da caracterização físico-química e o restante do resíduo seco armazenou-se em recipiente de vidro hermeticamente fechado à temperatura ambiente.

A Figura 6 exhibe as etapas de preparação do resíduo seco da goiaba para a caracterização físico-química, armazenamento e posterior uso nas fermentações.

FIGURA 6- Etapas da preparação do resíduo seco da goiaba.



3.3.2 Caracterização físico-química do resíduo seco da goiaba

Para o resíduo seco da goiaba foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: granulometria, massa específica aparente, massa específica real, pH, cinzas, teor de água, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores (AR), e pectina.

3.3.2.1 Granulometria

Para determinação da granulometria do resíduo seco, inicialmente pesou-se 100 g do resíduo, o qual foi colocado em uma série de peneiras (Figura 7) com malhas de 14 mesh (1,18mm), 20 mesh (0,840 mm), 24 mesh (0,710 mm), 35 mesh (0,425 mm), 48 mesh (0,300 mm) e 60 mesh (0,250 mm), que foram transferidos para o agitador de peneiras Produteste, (Figura 8) durante 30 minutos, conforme as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1984). Ao final, todo o material retido em cada peneira foi pesado e os resultados obtidos foram expressos em percentuais em relação ao peso do material original.

FIGURA 7 – Conjunto de peneiras



FIGURA 8 – Agitador de peneiras



FONTE – Google, 2015.

3.3.2.2 Massa específica aparente (ρ_a)

Para a determinação da massa específica aparente (ρ_a), inicialmente pesou-se 100 g do resíduo seco. Após a pesagem foi colocado, em proveta de 250 mL, de forma suave para evitar a sua compactação. Em seguida fez-se a leitura do volume ocupado pela mesma. A massa específica aparente foi determinada pela Equação 2.

$$\rho_a = \frac{M}{V} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

M = massa do resíduo seco do resíduo da goiaba (g);

V = volume ocupado pelo resíduo seco da goiaba (mL).

3.3.2.3 Massa específica real (ρ_r)

Para a determinação da massa específica real (ρ_r), utilizou-se como referência a relação entre a massa e o volume da amostra, que por sua vez é determinado através do deslocamento de um fluido em uma proveta graduada. Nessa análise utilizou-se o óleo de cozinha, já que se trata de um líquido bastante viscoso, que é capaz de cobrir a superfície das partículas sem que haja a sua penetração nos esporos do resíduo. Além disso, o óleo não o dissolve, tornando-se muito eficiente para a determinação do volume total das partículas. Inicialmente colocou-se 200 mL do óleo em uma de proveta de 500 mL e acrescentou-se aos poucos, de forma suave 100 g do resíduo seco da goiaba, onde pela própria ação da gravidade as partículas se depositavam no fundo da proveta, propiciando assim um deslocamento do volume do óleo. Após a total deposição, fez-se uma nova leitura do volume, determinando o volume final. O volume deslocado é a diferença entre o volume final e inicial. A massa específica real (ρ_r) foi determinada pela Equação 3.

$$\rho_r = \frac{m}{(v_2 - v_1)} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

$(v_2 - v_1)$ = volume deslocado em cm^3 ;

m = massa do resíduo seco da goiaba em g.

3.3.2.4 pH, Teor de Água, Sólidos Solúveis e Cinzas

As determinações do pH, teor de água, sólidos solúveis e cinzas do resíduo seco da goiaba, foram realizadas em triplicata adotando a metodologia descrita por Brasil (2008).

3.3.2.5 Açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi realizada em triplicata conforme a metodologia descrita por Miller (1959).

3.3.2.6 Pectina

Para a determinação da pectina, foi utilizado o procedimento baseado na metodologia descrita por Rangana (1979).

3.3.3 Processo Fermentativo

O processo fermentativo foi baseado na melhor condição descrita por Santiago (2012) quando trabalhou com a resíduo seco da casca da goiaba como substrato e o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916 modificado como agente da fermentação: teor de água inicial do meio foi de 50% e concentração de nitrogênio de 1%.

3.3.3.1 Micro-organismo e Inóculo

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

Os conídios foram retirados do solo estéril com uma alça de platina e transferidos para tubos de ensaios contendo um meio básico, esterilizado em autoclave por 20 minutos a 0,5 atm, constituído de: 10 g/L de pectina cítrica, 3 g/L de nitrato de sódio, 1 g/L de fosfato monopotássio, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 0,5 g/L de cloreto de potássio, 0,01 g/L de sulfato de ferro heptahidratado e 20 g/L de ágar-ágar. Os tubos de ensaio foram inclinados e resfriados a temperatura ambiente (COURI, 1993). O segundo repique foi feito de forma semelhante ao primeiro, este consistiu basicamente na multiplicação dos esporos do primeiro repique em erlemeyers contendo solução de milho. O meio de sabugo foi previamente preparado segundo o protocolo da Embrapa Agroindústria de Alimentos, com sede no Rio de Janeiro- RJ. Este era composto de uma solução A (20 g de fosfato de potássio monobásico dissolvido em água destilada e transferido para um balão volumétrico de 100 mL o qual foi aferido com água destilada) e de uma solução B (3,96 g de sulfato de zinco dissolvido em um pouco de água destilada, em seguida adicionou-se 4,60 g de sulfato de ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5 mL de ácido sulfúrico PA. Após completa dissolução, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL o qual foi aferido com água destilada). Em seguida preparou-se a solução umidificante (2,8 g de peptona foram dissolvidos em um pouco de água

destilada, em seguida a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL). A esta solução adicionou-se ainda 0,19 mL da solução A e 0,025 mL da solução B que foram anteriormente preparadas, por fim aferiu-se o balão volumétrico com água destilada.

Em cada erlenmeyer de 125 mL pesou-se 4,6 g de sabugo de milho seco e moído, e então se adicionou 6 mL da solução umidificante. Em seguida estes foram fechados com tampões de algodão envolvidos em gaze, homogeneizados e esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos.

Para a inoculação no meio de sabugo de milho transferiu-se 10 mL da solução a 0,3% (v/v) de Tween 80 para tubos com os micro-organismos do segundo repique.

Com o auxílio de uma alça de platina os micro-organismos foram suspensos e transferidos para cada frasco que continha o meio com sabugo de milho. Os frascos foram incubados em estufa a 30°C durante 5 dias. Após esse período, os frascos foram armazenados sob refrigeração e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

3.3.3.2 Preparação do meio de cultivo para a fermentação

Pesou-se em um béquer 50 g do resíduo seco. Em seguida foi calculada a quantidade de água a ser adicionada no meio, conforme a Equação 4, para que o mesmo ficasse com o teor de água inicial do meio de acordo com a melhor condição encontrada por Santiago (2012), que foi de 50%. Em seguida pesou-se a quantidade adequada da fonte de nitrogênio, sulfato de amônio, o qual foi diluído na quantidade de água destilada que foi determinada. A água com o sulfato de amônio diluído foi adicionada lentamente ao resíduo seguido de homogeneização. Após a homogeneização, foram distribuídos 10 g desse meio úmido nos erlenmeyer de 250 mL os quais foram tampados com tampão de algodão envolvido com gaze e levados para a autoclave a 1 atm por 15 minutos. Após a esterilização, foram resfriados à temperatura ambiente.

$$m_{H_2O} = m_{Res} \frac{(U_2 - U_1)}{(1 - U_2)} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

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

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

U_1 = teor de água presente no resíduo seco;

U_2 = teor de água requerida pelo processo fermentativo.

3.3.3.3 Inoculação e incubação do meio

Após a esterilização e resfriamento do meio de cultivo foram inoculadas 10^7 esporos/grama de meio em cada erlenmeyer, os quais foram incubados em estufa bacteriológica a temperatura de $30\pm 2^\circ\text{C}$.

O tempo do processo fermentativo foi de 72 horas, sendo retiradas amostras em intervalos de tempo de 0, 7, 22, 30, 44, 50, 66 e 72 horas para a realização das seguintes análises: teor de água, açúcares redutores, pH e atividade poligalacturonásica (PG).

3.3.3.4 Extração das enzimas

O método utilizado para a extração do complexo enzimático foi baseado no trabalho de Castilho (1997). Após a retirada das amostras para análises nos respectivos tempos de fermentação, foi adicionado em cada erlenmeyer de meio fermentado 5,0 mL da solução tampão acetato a 200 mN, com pH 4,5. Após a homogeneização, os frascos foram levados ao banho-maria por 1 hora a temperatura de 30°C . Em seguida as amostras foram filtradas em papel de filtro Wattman1 e determinada a atividade poligalacturonásica.

3.3.3.5 Determinação da atividade poligalacturonásica

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

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

como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido poligalacturônico por minuto de reação, nas condições do ensaio, conforme a Equação 5.

$$\text{AtividadePG} \frac{(U)}{(\text{gdemeiofermentado})} = \frac{(ABSa - ABSb) \times 17 \times 2 \times f}{212,16 \times t} \times RE \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

ABSa: Absorbância da amostra;

ABSb: Absorbância do branco;

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

17: diluição da enzima no meio reacional;

2: diluição dos grupos redutores no reagente DNS;

t: tempo (min);

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

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Físico-Química do Resíduo Seco da Goiaba

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas do resíduo seco da goiaba.

TABELA 2 - Caracterização físico-química do resíduo seco da goiaba (casca e semente)

Parâmetros Analisados	Resíduo seco
Teor de Água (%)	10,04
Cinzas (%)	3,01
Pectina (%)	9,95
Açúcares Redutores	27,12
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	32,00
pH	3,52
Massa específica aparente (g/mL)	0,65
Massa específica real (g/mL)	1,42
Porosidade	0,54
Atividade de Água	0,76

O teor de água encontrado no resíduo foi de 10,04%, valor bem próximo do encontrado por Castro et al., (2009), 10,96% quando utilizou a torta de canola como substrato e por Santiago (2012), 12,36% quando trabalhou com a casca da goiaba, podendo-se considerar que este resíduo em estudo possui boa estabilidade física e química, além da possibilidade de armazenamento em temperatura ambiente sem que haja riscos de desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas.

O teor de cinzas obtido foi de 3,01%, está próximo dos valores encontrados por Munhoz et al. (2010) em torno de 3,38% e por Santiago (2012) que foi em média de 3,89 % quando avaliaram a resíduo seco da casca da goiaba.

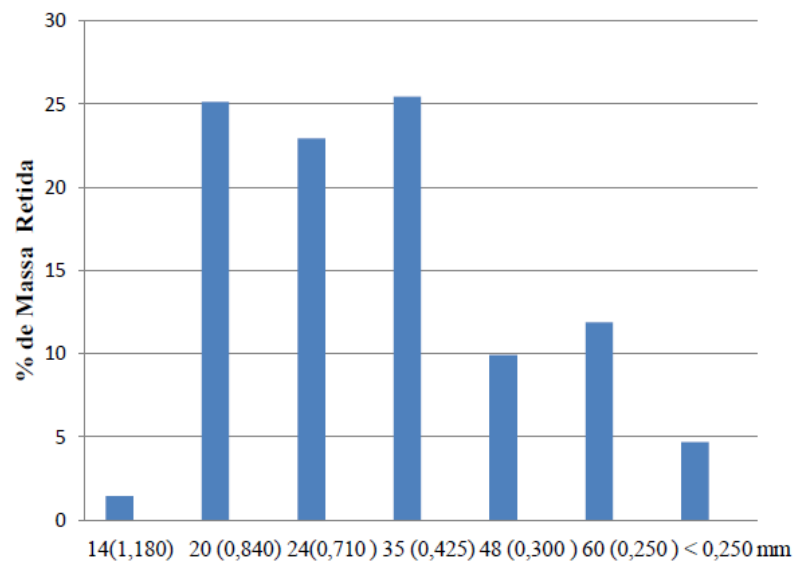
O teor de pectina encontrado foi de 9,95% corroborando com Santiago (2012) o qual encontrou 9,92 %, utilizando como resíduo apenas a casca da goiaba, cujo estágio de maturação “de vez”, portanto este resíduo é bastante promissor na produção das enzimas pectinolíticas.

O pH é um parâmetro que influencia diretamente no processo de fermentação em estado sólido, visto que o crescimento do micro-organismo depende do valor inicial do pH do meio. Segundo Franco (1999) para o micro-organismo utilizado, *Aspergillus niger*, o valor ótimo do pH do meio para seu metabolismo é entre 3,0 e 6,0, portanto o pH 3,52 encontrado está dentro dos valores requerido por tal micro-organismo.

O valor obtido tanto para a massa específica aparente, 0,65g/mL, quanto para a massa específica real, 1,42 g/ mL, evidencia que o resíduo não tende a compactar-se, gerando espaços vazios entre suas partículas e favorecendo na respiração e metabolismo dos micro-organismos.

Em relação à distribuição granulométrica (Figura 9) observa-se que a maioria das partículas do resíduo seco da goiaba possui tamanho que varia entre 20 e 35 mesh, ou seja, apresentam dimensões variando entre 0,840 mm e 0,425 mm, podendo assim ser utilizado no processo de fermentação em estado sólido, já que partículas de tamanho reduzido nesse tipo de fermentação oferece uma área superficial maior ao ataque microbiano, entretanto, estas tendem a compactar-se bem mais facilmente, dificultando assim a respiração dos micro-organismos e a aeração do meio. Já as partículas maiores propiciam um maior espaço interpartículas, reduzindo o rendimento da absorção dos nutrientes pelos micro-organismos diminua (PANDEY, 2001).

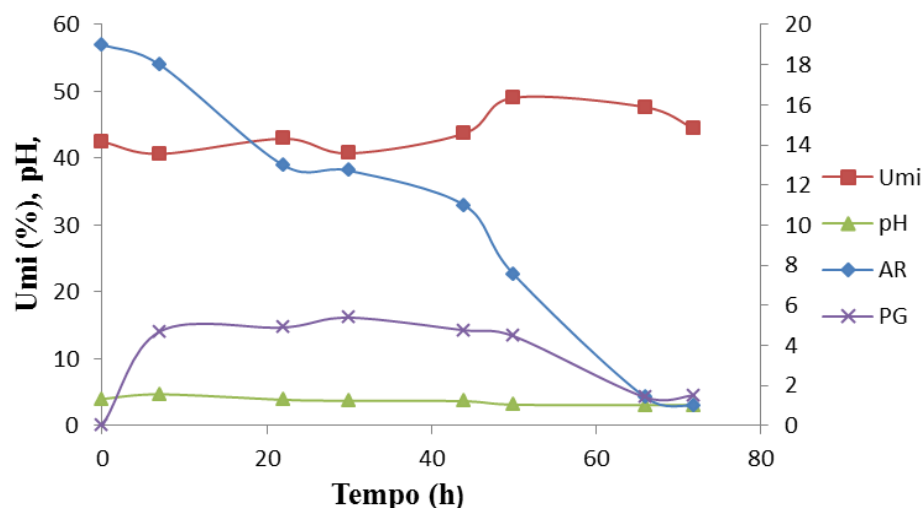
FIGURA 9 - Distribuição granulométrica do resíduo seco da goiaba



4.2 Processo Fermentativo

Realizou-se um acompanhamento cinético da produção da poligalacturonase (PG), do consumo de açúcares redutores, assim como o monitoramento dos parâmetros que influenciam na fermentação no estado sólido tais como teor de água e pH do meio durante um período de 72 horas de cultivo (Figura 10). O teor de água inicial do meio foi de 50% e a concentração de nitrogênio utilizada foi de 1%.

FIGURA 10 – Acompanhamento cinético do processo de produção da PG obtida do resíduo seco da goiaba nas condições de teor de água 50% e nitrogênio 1%



O pH do meio manteve-se praticamente constante durante todo o processo fermentativo. Em relação ao teor de água houve um aumento, esse ganho de água provavelmente é resultado de algumas reações metabólicas que ocorreram durante o processo fermentativo.

A concentração inicial dos açúcares redutores foi de 19% caindo para 1% no final do processo coincidindo com o menor valor da atividade poligalacturonásica que foi de 1,52 U/g. Esse fato aconteceu devido o micro-organismo ter consumido todos os açúcares presentes deixando o meio escasso de nutrientes, e com isso impossibilitando o seu crescimento e consequentemente a produção da enzima.

Observa-se que a maior atividade poligalacturonásica foi de 5,39 U/g em 30 horas de cultivo inferior ao valor encontrado por Santiago (2012), 12,64 U/g, quando trabalhou com a resíduo seco do resíduo da goiaba (casca) no mesmo período de tempo. Este fato pode ser atribuído a vários fatores, dentre eles: o estágio de maturação do fruto e as sementes, as quais

podem ter alguma substância que iniba a produção da enzima, enquanto que a casca da goiaba utilizada por Santiago (2012) possui índices de pectina bem superiores a qual é a substância indutora na produção da enzima poligalacturonase.

Oliveira (2013) estudou a possibilidade de viabilizar a utilização do resíduo da manga como substrato na produção da enzima poligalacturonase por meio da fermentação no estado sólido, utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger* como agente fermentador, obtendo no final uma produção máxima de 7,66 U/g às 43 horas de fermentação.

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

Santiago et al. (2011) estudaram o potencial da casca do umbu como substrato na produção da poligalacturonase por meio da fermentação em estado sólido e o micro-organismo *Aspergillus niger* CCT 0916. A maior atividade alcançada (15,65 U/g) foi obtida com teor de água inicial do meio de 50% (b.u), 10^7 esporos por grama de meio úmido, concentração de sulfato de amônio de 1,0% m/m, pH inicial de 2,2 e temperatura de 30°C às 66 horas de fermentação.

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

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

Pereira et al. (2010) avaliaram o valor nutricional de vários resíduos gerados pelas agroindústrias processadas de polpas de frutas da região sul da Bahia para alimentação de ruminantes e concluíram que o resíduo da goiaba apresentou limitações para ser utilizado na alimentação animal.

5 CONCLUSÃO

O resíduo seco da goiaba pode ser considerado viável para ser utilizado como substrato na fermentação no estado sólido para produção de enzimas pectinases, já que este apresentou condições favoráveis à adaptação do fungo, *Aspergillus niger*, e níveis de pectina e açúcares propícios para o seu crescimento.

O maior valor da atividade poligalacturonásica obtida foi atingido com teor de água inicial do meio de cultivo de 50% (b.u), atividade de água de 0,76 e concentração de sulfato de amônio de 1,0%. O pico de atividade foi de 5,39 U/g em 30 horas de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRINUAL, Anuário da Agricultura Brasileira. Instituto FNP: São Paulo, 497p. 2009.

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

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes – a review. *Process Biochemistry*, v.33, n.1, p.21-28, 1998.

ALMEIDA, C.; Brányik, T.; Moradas-Ferreira, P.; Teixeira, J.; *Process Biochem.* 2005.

ANDRADE, R. D. et al. Caracterización físicoquímica y reológica da la pulpa de guayaba (*Psidium guajava L.*) variedades híbrido de Klom Sali. Puerto Rico. Red. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Medellin, v. 16, p. 13-18. 2009.

ANUÁRIO DA FRUTICULTURA 2014. REETZ, E. R. et al. Editora Gazeta, p.104, ISSN 1808-4931, 2015.

ARAÚJO, D. B., JUNIOR, R. N. A., BEZERRA, F. C., CRISÓSTOMO, L. A., OLIVEIRA, W. R. Caracterização química de substratos formulados a partir de resíduos agroindustriais e agropecuários. Universidade Federal do Ceará, 2009.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Brasília: Editora MS. 2008, 1017p

BRASIL. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Lei 12.305. Brasília, DF: Congresso Nacional, 2010.

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

CASTRO, R. J. S., FREITAS, A. C., ADOLFO, G., PINTO, S. Efeito da quantidade inicial de água na síntese de protease por *aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal 2009.

CGEE- Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, tecnologia e inovação para o desenvolvimento da Amazônia Legal, volume 19, número 38, ISSN 1413-9375. Brasília, junho de 2014.

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

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

DANTAS, E. M., AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87, 2010 ISSN 1517-8595.

FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. Anais... Recife: 2005. CD.

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

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

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, ISSN 0101-3963, 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pb&tema=lavourapermanente2013>.

Acessado em 21/11/2015

IHA, M. S. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava L.*) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Brazian Journal Pharmaceutical*. V. 18, n. 3, 2008.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, v.77, n.3, p. 215-227, 2001.

KOBLITZ, M.,G.,B. *Bioquímica de Alimento : Teoria e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LOUSADA, J. R. et al. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Revista Ciência Agronômica*, Ceará, v. 37, n. 1, 2006.

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

MARTIN, N.; GUEZ, M. A. U.; SILVA, R.; GOMES, E. Utilização de resíduos agroindustriais em Fermentação em Estado Sólido (FES) para avaliar a produção de Poligalacturonase (PG) pelo fungo termofílico *Rhizomucor* sp N31. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. Anais... Curitiba: 2007. CD.

MARTIN, N. Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase. 2006. 65f. Dissertação (Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

MARTINS, E. Purificação e caracterização bioquímica de poligalcturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido. 108f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2006.

MARTINS, V. G., KALIL, S. J., COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Revista Química Nova*, Vol. 31, No. 8, 1942-1947, 2008.

MATOS, A. T. Tratamento de Resíduos Agroindustriais. Vicososa: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 2005.

MEDINA, J. C. Cultural. In: Instituto de tecnologia de alimentos. Goiaba 2, Ed. Campina; ITAL, p. 1-21, 1988.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 68, p. 61 – 138, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic AID reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959

MOHAMED, S. A.; AL-MALKI, A. L.; KUMOSANI T. A. Characterization of a Polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* Grown on Citrus Peel with Application for Apple Juice. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3): 2770-2777, 2009.

MUNHOZ, C. L.; ARGANDOÑA, E. J. S.; JÚNIOR, S. S. M. Extração de pectina de goiaba desidratada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.1, 2010.

NASCIMENTO, R. Potencial antioxidante de resíduo agroindustrial de goiaba. 2010. 110f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2010.

NEIVA, J. N. M. et al. Avaliação do valor nutritivo de silagens de capim elefante. (*Pennisetum purpureum*) com diferentes níveis de subproduto da goiaba In: 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Recife. Anais, SBZ. 2002. CD ROM.

OLIVEIRA, S. D.J., SOUZA FILHO. P. F., BATISTA, M.C., MACEDO, G. R. Efeito da umidade e da indução pela adição de pectina cítrica na fermentação semi-sólida para a produção de pectinases pelo fungo *penicillium chrysogenum* utilizando o pendúculo de caju como substrato. 54^o Congresso de Química, 2014.

OLIVEIRA, A. C. Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica L.*). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetiniga, 60p, 2013.

PADMA, P. N., ANURADHA, K., REDDY, G. Pectinolytic yeast isolates for active polygalacturonase production. *Innovative food and Emerging Technologies*, v. 12, p, 178-184, 2011.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDA, T.; NAIDU, G.S.N., SINHA J. Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. *Process Biochemistry* 35, 187–195, 1999.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v. 77, p. 149 162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. Solid–state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech, 2001

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

PARIS, L. D., Scheufele, F. B., Júnior, A. T., Guerreiro, T. L., Hasan, S. D. M. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. Revista Acta Scientiarum, ISSN 1807-8621, v. 34, n. 2, p. 193-200, Apr.-June, 2012.

PEDROSA, T. D., FARIAS, C. A. S., PEREIRA, R. A., FARIAS, E. T. R. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos na compostagem de resíduos agroindustriais. Revista nativa, sinop, v. 01, n. 01, p. 44-48, out./dez. 2013.

PEREIRA, F.M. **Goiaba**. [S.l.]: Toda Fruta, 2003. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=1562>. Acesso em: 21 de novembro de 2015.

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

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. Rev. Quím. Ind., n.724, p.17-20, 2006.

POLINFRUT - Plano de manejo para polinizadores de fruteiras. Goiaba, 2005.

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

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B., COURI, S. e CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.

SANCHÉS, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnological Advances*, Berlin, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTIAGO, A.M. Estudo do potencial das cascas de Umbu (*Spondia tuberosa*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), goiaba (*psidium guajava*). Na produção e recuperação de poligalacturonase. Campina Grande, 2012. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). UFCG, Campina Grande, 2012

SANTIAGO, A.M., ANJOS, D. A., ALCÂNTARA, S. R., CONRADO, L. S. O. Aproveitamento da casca do umbu seco na produção de pectinase por *Aspergillus níger* em cultivo semissólido. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul-RS, 2011. Anais, CD-ROM.

SANTOS, K. M., ARAÚJO, M. L., SILVA, G. F., ABUD, A. K. S., OLIVEIRA, JR. M. Avaliação das atividades enzimáticas de pectinase e poligalacturonase com diferentes proporções de casca de coco verde e sabugo de milho. Blucher Proceedings- XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, ISSN: 2359-1757. vol. 1, nº 2, 2015. Acessado: junho 2015.

SANTOS. S. F. M., SOUZA. R. L. A., ALCÂNTARA, S. R., PINTO, G. A. S., SILVA, F. L. H., MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.10, n.2, p.101-109, 2008, ISSN 1517-8595

SANTOS, S. F. M.; Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SHARMA, A. ET AL. Morphological and chemical characterization of *Psidium* species. Nortulae Botanicae Horti Agrobotanici cluj Napoca. Cluj-Napoca. V. 38. n.1. p. 28-32, 2010.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. Brazilian Journal of Microbiology, v.33, n.4, p.318-324, 2002.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

SOUZA, R. L. A. Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2008.

SOUZA, R. L. A., OLIVEIRA, L. S. C., SILVA, F. L. H., AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.9, p.987-992, 2010 Campina Grande, PB, UAEA/UFCG.

SPILLER, S. H. Pectina de Goiaba: Avaliação de Métodos de extração e análise de esterases durante o amadurecimento (Solubilização de Membranas e Eletroforese). Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras, 2012. 102 f. Dissertação de Mestrado.

UCHOA, A. M. A., COSTA, J. M. C., GERALDO ARRAES MAIA, G. A., SILVA, E. M. C., CARVALHO, A. F. F. U., MEIRA, T. R. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. *Segurança Alimentar e Nutricional*. Campinas: p. 58-65, 2008. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/arquivo_san/5_09_artigo_1418_Parametros_FisicoQuimicos.pdf Acessado em março de 2015.

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

VALENTE, B. S. et al. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. *Archivos de Zootecnia, Córdoba*, v. 58, n. 1, p. 9-85, abr. 2009.

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

WANG, D., GARTUNG, J. Infrared canopy temperature of early-ripening peach trees under postharvest deficit irrigation. *Agricultural Water Management*. Amsterdam. V. 97, p. 787-1794, 2010.

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