

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA

INSTITUTO DE QUÍMICA

EVA ZOPELÁRIO SALEMA FERRO

Efeitos do uso de resíduos agroindustriais de juçara (*Euterpe edulis*) e açai (*Euterpe oleracea*)
como fontes de carbono em produção de mananases por *Aspergillus niger*

Rio de Janeiro
2024

Eva Zopelário Salema Ferro

Efeitos do uso de resíduos agroindustriais de juçara (*Euterpe edulis*) e açaí (*Euterpe oleracea*) como fontes de carbono em produção de mananases por *Aspergillus niger*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química com Atribuições Tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do grau de Químico com atribuições tecnológicas.

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Sposina Sobral Teixeira
Prof. Dra. Ayla Sant'Ana da Silva

Rio de Janeiro - RJ
2024

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

Z395e Zopelario Salema Ferro, Eva
Efeitos do uso de resíduos agroindustriais de
juçara (*Euterpe edulis*) e açaí (*Euterpe oleracea*) como
fontes de carbono em produção de mananases por
Aspergillus niger / Eva Zopelario Salema Ferro. --
Rio de Janeiro, 2024.
101 f.

Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira .
Coorientadora: Ayla Sant'Ana da Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Química, Bacharel em Química, 2024.

1. Resíduos agroindustriais. 2. Semente de açaí. 3.
Semente de juçara. 4. Mananases. 5. *Aspergillus*
niger. I. Sposina Sobral Teixeira , Ricardo,
orient. II. Sant'Ana da Silva, Ayla, coorient. III.
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

EVA ZOPELÁRIO SALEMA FERRO

Efeitos do uso de resíduos agroindustriais de juçara (*Euterpe edulis*) e açaí (*Euterpe oleracea*) como fontes de carbono em produção de mananases por *Aspergillus niger*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química com atribuições tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Químico com atribuições tecnológicas.

Rio de Janeiro, 07 de agosto de 2024.

Prof^o. Ricardo Sposina Sobral Teixeira

(Orientador, Doutor, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ)

Profa. Elisa d' Avila Costa Cavalcanti

(Doutora, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ)

Prof. Gabriel Rocha Martins

(Doutor, Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo – USP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Eliane e Flávio, sem eles eu não poderia estar cursando o que amo. À minha mãe, o amor da minha vida e minha eterna escola de perseverança, bravura e, é claro, amor. Ao meu pai, quem sempre me deu suporte para buscar minha independência e sempre está ao meu lado, me apoiando e incentivando. Vocês construíram tudo isso comigo.

Agradeço aos meus orientadores, Ayla e Ricardo, pela oportunidade e suporte. Agradeço também ao Ricardo pelos conselhos, ensinamentos e, principalmente, por ter aberto as portas do Laboratório Bioetanol para mim, onde me apaixonei pela pesquisa e sou muito feliz. Deixo minha gratidão a todos do Bioetanol: Carlota, Douglas, Francinaldo, Giselle, Luisa, Lucas, Letícia, Michelle, Otto, Priscilla, Raquel, Rodrigo e Victor. Cada um me ajudou em alguns passos, ou muitos, desse projeto. Além de ótimas companhias e parceiros de bancada, são pessoas extremamente competentes, as quais eu tenho carinho e admiração.

Agradeço às minhas irmãs Jaqueline e Bruna, por todos os ensinamentos, convivência e por sempre acreditarem na minha capacidade. Amo vocês. E, ainda, um agradecimento especial aos meus sobrinhos, Joana e Heitor, que são as minhas maiores paixões. É muito distante pensar que a maior parte da minha vida foi sem vocês, porque hoje eu não me reconheço sem as suas existências.

Agradeço à minha vó Eva, por todo amor, apoio e carinho, acho lindo como a alegria mora em seus olhos. Agradeço aos meus tios Débora e Joca por todas as conversas à mesa, conselhos e apoio em meus sonhos, vocês também são parte disso. Agradeço aos meus primos Daniele e Lucas por serem irmãos para mim, pelas companhias de filmes e risadas, crescer com vocês é felicidade.

Agradeço ao Janela, uma pessoa que conheci na faculdade e hoje divido a vida. Obrigada pelo companheirismo e amor. Não posso deixar de agradecer aos meus sogros, Ana e Henrique, pelos almoços em família, caronas para faculdade e o carinho de sempre. Obrigada André, Ju, Luiz e Martin por fazerem eu me sentir em casa com vocês e compartilharem toda a família comigo. Agradeço ao vô Joaquim e vô Fátima, que têm seus espaços reservados em meu coração.

À Isabella agradeço por mais de 11 anos de amizade e amor, te admiro muito e sou absolutamente grata por ter você. Minha grande companheira de leituras e sonequinhas no sofá. Agradeço à todas as amigas que adquiri durante o percurso da graduação. Obrigada, Luan, por nossa amizade e por me ensinar muita coisa sobre a vida, te admiro demais! Além de toda

a ajuda na pesquisa, seja teórica ou experimental, você foi essencial. Obrigada, Nichollas, por ser esse amigo que carrego todos os dias, você merece todas as coisas boas desse mundo, eu amo você e amo nós. Agradeço ao João, que esteve comigo desde o princípio da graduação e está ao final dela. Você é um irmão para mim, te admiro tanto, seja pela inteligência ou pelo coração, eu sei que sempre posso contar com você, obrigada por isso. Agradeço ao Marcos por todos os conselhos acadêmicos, a minha evolução durante a graduação está muito atrelada a você, é difícil pôr em palavras o que você significa para mim, além da nossa amizade e todos os momentos felizes. Paulo, você é mais do que um amigo, obrigada por sempre me ouvir e estar sempre comigo quando preciso. Eu amo a nossa amizade e amo você. Agradeço ao Marcão por todas as cervejas, almoços e conversas sobre a vida, é um amigo que levo para fora da vida acadêmica com muito amor. Agradeço ao Lessa, que além da vida na faculdade, é meu companheiro de lar. Obrigada por sua amizade e confiança, dividir os dias com você é um prazer. Além de todos os outros amigos que passaram um bom trecho ao meu lado durante essa trajetória e com quem esbarro sempre, seja pelos corredores do IQ ou pelos corredores da vida.

Deixo o agradecimento final aos meus avós, Irene e Jorge, pessoas que me ensinaram sempre sobre o amor de verdade e o cuidado. Gosto de pensar que vocês estariam felizes por mim. Sinto a falta de vocês todos os dias.

“Por isso, estou aqui. Não para tentar compreender, mas, sim, para me despir de todas as vendas, de todas as máscaras, e desarmada, de alma exposta e olhos bem abertos, experimentar uma nova maneira de perceber as coisas e de considerar a minha existência”

(MARÍLIA ARNAUD, Suíte de silêncios, 2012).

RESUMO

Mananases são enzimas que hidrolisam mananas, polissacarídeos de reserva de parede celular das plantas. Apesar de serem menos estudadas do que outras enzimas, a demanda por mananases está crescendo devido às suas diversas aplicações industriais, sendo importantes para processos eficientes e mais sustentáveis. Sementes de açaí (*Euterpe oleracea*) e juçara (*Euterpe edulis*), ricas em mananas, são promissoras como fonte de carbono para a produção de mananases. O Brasil, líder na produção de açaí, também está incentivando a produção da polpa de juçara, anteriormente ameaçada de extinção, agregando valor ambiental, econômico e social. Assim, o cerne do projeto foi a produção de mananases pelos fungos filamentosos *Aspergillus niger* 205 e 1234 em meio de cultivo submerso, utilizando, individualmente, as sementes de juçara e açaí como fontes de carbono indutoras da produção de mananases. Como essas sementes possuem, além dos carboidratos, outros compostos em sua composição, como diferentes concentrações de compostos fenólicos, a influência desses no crescimento do fungo e no processo de produção de mananases também foi avaliada. Os melhores resultados obtidos em termos de atividade enzimática de mananases utilizando sementes de açaí e juçara *in natura* para o *A. niger* 1234 foram de 6,85 e 20,15 UI/mL, respectivamente, e para o *A. niger* 205, as atividades enzimáticas obtidas foram de 3,65 e 4,05 UI/mL, respectivamente. Portanto, neste estudo, o *A. niger* 1234 foi considerado, um melhor produtor de mananases utilizando as sementes de açaí e juçara. Também foi realizada a extração de compostos fenólicos das sementes com etanol 65% e acetona 70%, seguida da avaliação da produção enzimática a partir de *A. niger* 1234. Os resultados mostraram que a presença de compostos fenólicos nas sementes de juçara não afeta significativamente a produção de mananases, com uma atividade de $22,14 \pm 0,01$ e $19,99 \pm 1,82$ UI/mL no 7º dia de produção, para a semente *in natura* e após a extração, respectivamente. No caso das sementes de açaí, as procianidinas, que são compostos fenólicos, afetaram negativamente a produção de enzimas, resultando em atividades de $6,34 \pm 0,25$ e $17,77 \pm 1,31$ UI/mL, para as sementes *in natura* e após a extração, respectivamente, no 7º dia de produção. Os resultados obtidos neste estudo, somado à literatura sugerem que as procianidinas presentes nas sementes de açaí causam alterações na produção de mananases. Dessa forma, as procianidinas afetam significativamente o metabolismo e a sobrevivência de microrganismos, modulando respostas ao estresse.

Palavras-chave: resíduos agroindustriais, semente de juçara, semente de açaí, mananases, *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Mananases are enzymes that break down mannans, which are polysaccharides used for storing energy in plants cell wall. Although they are less studied compared to other enzymes, the need for mananases is growing because they have many industrial uses and can help make processes more efficient and sustainable. Açai (*Euterpe oleracea*) and juçara (*Euterpe edulis*) seeds, which are rich in mannans, are promising sources of carbon for producing mananases. Brazil, a top producer of açai, is also encouraging juçara pulp production, which was once at risk of disappearing, thus adding environmental, economic, and social value. The main focus of this project was to produce mananases using filamentous fungi *Aspergillus niger* 205 and 1234 in submerged culture, with açai and juçara seeds used individually as carbon sources to promote mananase production. Since these seeds contain not only carbohydrates but also other compounds like phenolic substances, their effect on fungal growth and mananase production was also studied. The best results for mananase activity using raw açai and juçara seeds with *A. niger* 1234 were 6.85 and 20.15 U/mL, respectively. For *A. niger* 205, the activities were 3.65 and 4.05 U/mL, respectively. Therefore, *A. niger* 1234 was found to be a better mananase producer using açai and juçara seeds. Additionally, phenolic compounds were extracted from the seeds using 65% ethanol and 70% acetone, and the production of mananases by *A. niger* 1234 was then evaluated. The results showed that phenolic compounds in juçara seeds did not significantly affect mananase production, with activities of 22.14 ± 0.01 and 19.99 ± 1.82 U/mL on the 7th day for raw and extracted seeds, respectively. In contrast, procyanidins in açai seeds negatively affected enzyme production, leading to activities of 6.34 ± 0.25 and 17.77 ± 1.31 U/mL for raw and extracted seeds, respectively, on the 7th day. This study, along with existing literature, suggests that procyanidins in açai seeds impact mananase production and affect the metabolism and survival of microorganisms by modulating their stress responses.

Keywords: Agroindustrial by-products, juçara seed, açai seed, mananases, *Aspergillus niger*.

Lista de figuras

- Figura 1 - Pesquisa das palavras “cellulases”, “xylanases” e “mannanases” como única palavra-chave na base Scopus entre 1990 e 2023, dados anuais..... 22
- Figura 2 – Pesquisa na base Scopus apenas como títulos de artigos, nos anos de 2010 à 2024, mostrando a produção por países. Acima: pesquisa das palavras-chave “production” e “enzymes”; Abaixo: pesquisa da palavra-chave “mannanases”. 23
- Figura 3 - Estruturas química dos monômeros, dímeros e trímeros de procianidinas. Adaptado de Rue *et al.* (2018). 25
- Figura 4 - Representação da estrutura química do ácido 4-hidróxibenzóico (CAS: 99-96-7), fórmula química :4-(OH)C₆H₄COOH. 26
- Figura 5 - Estrutura química da manana linear, ou manana pura, onde “M” são unidades de manose ligadas pelos carbonos C1 e C4 por ligações do tipo β -1,4. Adaptado de Holtzaple (2003). 29
- Figura 6 - Estrutura química da glucomanana, onde “M” são unidades de manose e “G” são unidades de glicose, ligadas pelos carbonos C1 e C4 por ligações do tipo β -1,4. Adaptado de Holtzaple (2003). 29
- Figura 7 - Estrutura química da galactomanana, onde “M” são unidades de manose e “G” são unidades de glicose, ligadas pelos carbonos C1 e C4 por ligações do tipo β -1,4, e “L” são unidades de galactose, ligadas por carbonos C1 e C6 por ligações do tipo α -1,6. Adaptado de Holtzaple (2003). 30
- Figura 8 - Diagrama da coordenada da reação $S \rightarrow P$, comparando a reação catalisada por enzima (em azul) e não catalisada. Retirado de Nelson e Cox (2013). 31
- Figura 9 - Estruturas químicas de diferentes mananas e enzimas necessárias nas suas hidrólises. Estrutura (A): cadeia de manana linear, onde se tem uma β -manosidade, que atua nas extremidades para liberar o monossacarídeo manose, e uma β -mananase que atua no meio de cadeias de glucomananas rompendo em oligossacarídeos de glucomanose, como na estrutura (C). Estrutura (B): cadeia de glucomanana, onde se tem uma β -glicosidade, que atua nas extremidades contendo ligações de glicose e manose por β -1-4, rompendo em seus respectivos monômeros. Estrutura (C): Cadeia de galactomanana, onde se tem uma α -galactosidade atuando nas ramificações de galactose, produzindo o monossacarídeo galactose. Adaptado de Holtzaple (2003). 33
- Figura 10 - Mecanismo de ação hidrolítica da β -mananase. A primeira etapa de glicosilação resulta na formação de uma enzima oligossacarídica complexada (A + B). Dependendo das

condições do meio, uma molécula de água (C + D) pode atacar o oligossacarídeo para liberar o oligossacarídeo ou um novo monossacarídeo. O oligossacarídeo (E + F) pode se ligar para liberar uma espécie de oligossacarídeo recém-formada. O produto deixa a enzima em seu estágio de protonação original e uma nova reação de hidrólise ou transglicosilação pode ser catalisada. Adaptado de Van Zyl <i>et al.</i> (2010).....	35
Figura 11 - Cenário mundial do mercado enzimas industriais. Retirado de Mordor Intelligence Research & Advisory (2023).....	36
Figura 12 - Palmeira de açai (Euterpe oleracea) - Fonte: palmeira-açaí	41
Figura 13 - Aspectos estruturais do fruto açai: 1) Diagrama da seção transversal do fruto, se tem respectivas estruturas indicadas; 2) Visão geral do pericarpo da fruta por microscopia. Adaptado de Pessoa <i>et al.</i> (2010)	42
Figura 14 - Perfis de DRX das amostras moídas de (a) semente inteira de açai; (b) caroço da semente de açai e (c) fibras da semente de açai. Retirado de Monteiro <i>et al.</i> (2019)	45
Figura 15 - Identificação e distribuição espacial de procianidinas em sementes de açai pelo MALDI-MSI. A: imagem histológica; B – D: sobreposições de pico de procianidina tipo B; Sobreposições de pico de procianidina tipo A com uma ligação interflavan e sobreposições de pico de procianidina tipo A com duas ligações interflavan. Retirado de Martins <i>et al.</i> (2020).....	46
Figura 16 - Palmeira de juçara com frutos. Retirado de EMBRAPA (2022).....	47
Figura 17 - Nomenclatura de uma palmeira. Adaptado de Sodré (2005).....	49
Figura 18 - Semente de juçara inteira. Autoria própria.	49
Figura 19 - Despulpamento do fruto de juçara. Retirado de Embrapa (2022)	50
Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura colorida (MEV) de corpo frutífero do fungo <i>Aspergillus niger</i> , na ponta de um conidióforo. Retirado de SCIENCE PHOTO (2024). 53	53
Figura 21 - Moinho de facas (Fritsch - P19), localizado no Laboratório de Bioetanol na UFRJ.	54
Figura 22 - Placas de Petri com meio PDA com perfurações preenchidas por extratos de açai e juçara, respectivamente, e com água estéril como branco, inoculadas com <i>Aspergillus niger</i> 1234.....	61
Figura 23 - Amostras de sementes de juçara: (a) semente inteira; (b) camada de fibra da que envolve a semente; (c) semente partida ao meio, após remoção das fibras externas; (d) sementes moídas após a remoção das fibras externas. Fonte: Autoria própria.	63

- Figura 24 - Amostras de sementes de açaí: (a) semente inteira; (b) semente após remoção das fibras externas; (c) camada de fibra da que envolve a semente; (d) sementes inteiras moídas. Retirado de Monteiro *et al.* (2019)..... 63
- Figura 25 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando macaúba, juçara e LBG como fontes de carbono..... 66
- Figura 26 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 205, utilizando macaúba, juçara e LBG como fontes de carbono..... 66
- Figura 27 - Extrato etanólico de semente de juçara (dois primeiros frascos a esquerda) e açaí (dois últimos frascos a direita), respectivamente. 67
- Figura 28 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando juçara *in natura* e juçara após extração como fontes de carbono..... 68
- Figura 29 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando açaí *in natura* e açaí após extração como fontes de carbono. 69
- Figura 30 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando juçara e açaí após extração, e LBG como fontes de carbono..... 69
- Figura 31 - Diferentes morfologias de *A. niger* 1234 em inóculos com diferentes fontes de carbono. Meio com LBG (locust bean gum) (frasco à esquerda), meio com macaúba *in natura* (frasco central), meio com juçara *in natura* (frasco à direita). 72
- Figura 32 - Formação de *pellets* de *A. niger* 1234 em inóculos com diferentes fontes de carbono. A. Meio com juçara *in natura*; B. Meio com juçara após extração; C. Meio com açaí *in natura*; D. Meio com açaí após extração..... 73
- Figura 33 - Pellet de *Aspergillus niger* 1234 visto em microscópio 10x e 40x, respectivamente. Na primeira figura existe a região do núcleo (parte central, maciça e mais escura do pellet), seguida do corpo e fronteira (na segunda figura é possível perceber a região da fronteira entre o corpo do pellet e a região peluda), e por fim, a região “peluda” onde as hifas se encontram mais dispersas (região superficial da primeira figura). 74
- Figura 34 - Acompanhamento do crescimento da biomassa do *Aspergillus niger* 1234 e pH em meio fermentativo com semente de açaí *in natura* como fonte de carbono..... 75
- Figura 35 - Acompanhamento do crescimento da biomassa do *Aspergillus niger* 1234 e pH em meio fermentativo com semente de açaí após extração como fonte de carbono..... 75
- Figura 36 - Placas de PDA (potato agar dextrose). Controle *A. niger* 1234: fungo sem extrato etanólico; Controle meio: meio sem a presença do fungo ou extrato etanólico; Açaí 1x: fungo com extrato etanólico bruto de semente de açaí sem concentração; Açaí 2x: fungo com o extrato etanólico de semente de açaí duas vezes concentrado; Açaí 4x: fungo com o

extrato etanólico de semente de açaí quatro vezes concentrado; Juçara 1x: fungo com extrato etanólico bruto de semente de juçara sem concentração; Juçara 4x: fungo com o extrato etanólico de semente de juçara quatro vezes concentrado; Juçara 5,7x: fungo com o extrato etanólico de semente de juçara aproximadamente seis vezes concentrado.....77

Figura 37 - Placas de PDA (potato agar dextrose) com poços. a: poços preenchidos com extrato etanólico de semente de açaí nos primeiros dias de crescimento; b. juçara: poços preenchidos com extrato etanólico de semente de juçara nos primeiros dias de crescimento; c e d. açaí: poços preenchidos com extrato etanólico de semente de açaí no meio do processo de crescimento; e. poços preenchidos com extrato etanólico de semente de juçara no meio do processo de crescimento; B. poço preenchido com água como padrão positivo. Inoculados com *A. niger* 1234.....77

Figura 38 - Estágios de maturação da semente de açaí e suas relações com conteúdo fenólico. Adaptado de Martins *et al.* (2022)79

Figura 39 – Célula de *Cryptococcus neoformans* por microscopia eletrônica, indicada a sua parede celular, onde a membrana plasmática pode ser discernida em contato com a superfície interna da parede celular. Adaptado de Vargas *et al.* (2024) 82

Figura 40 – Esquema da parede celular e membrana plasmática de um fungo. Retirado de Vargas *et al.* (2024)..... 82

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação de enzimas	32
Tabela 2 - Dados da literatura de caracterização da semente de açaí.....	44
Tabela 3 - Composição química das sementes inteiras de juçara de dois lotes diferentes, expressas em percentual de matéria seca.	63
Tabela 4 - Comparação da atividade enzimática de mananases, em UI/mL, por diversos fungos, com fontes de carbono e pH do meio diferentes.....	7070
Tabela 5 - Comparação entre os conteúdos fenólicos totais e atividades antioxidantes entre as sementes de açaí e juçara reportados na literatura.	788

Lista de quadros

Quadro 1 - Principais produtos comerciais contendo mananases, bem como as empresas detentoras das marcas e aplicações. Adaptado de Dawood e Ma (2020)	37
Quadro 2 - Mecanismos envolvidos nas interações entre procianidinas e leveduras.	790

Lista de Abreviações

BD – Batata dextrose;

CAZy – Banco de dados de enzimas ativas de carboidratos;

CE ou EC – Comissão de Enzimas (do inglês, “Enzyme Commission”);

CMI – Concentração Mínima Inibitória;

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento;

DNS - Ácido 3,5-dinitro salicílico;

DP – Grau de polimerização (Degree of polymerization);

DRX – Difração de raios-X

DWF - Massa seca do fungo (Dry Weight of Fungus);

FS - Fermentação submersa;

GH – Glicosil hidrolases;

GRAS - Generally Recognized as Safe;

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography);

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

IGC – Conselho internacional de grãos (International Grains Council).

LBG - Goma de alfarroba (Locust Bean Gum);

NREL –Laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory);

PDA - Ágar dextrose de batata (Agar Potato Dextrose);

PFNMs – Produtos Florestais Não Madeireiros;

pH - Potencial hidrogeniônico;

PIB – Produto interno bruto.

SUMÁRIO

Lista de figuras	10
Lista de tabelas	14
Lista de quadros	15
Lista de Abreviações	16
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1. COPRODUTO AGROINDUSTRIAL.....	27
3.1.1. Mananas	28
3.2. ENZIMAS.....	30
3.2.1. Mananases	32
3.3. AÇAÍ.....	40
3.3.1. Mercado e produção	40
3.3.2. Descrição botânica	41
3.3.3. Semente de açaí	43
3.4. JUÇARA (<i>Euterpe edulis</i>).....	47
3.4.1. Mercado e produção	47
3.4.2. Descrição botânica	48
3.4.3. Semente de juçara.....	50
3.5. BIOPROCESSO SUBMERSO.....	51
3.6. FUNGOS FILAMENTOSOS	52
3.6.1. <i>Aspergillus niger</i>	52
4. METODOLOGIA.....	54
4.1. Sementes de juçara e açaí	54
4.2. Caracterização do coproduto agroindustrial	54
4.2.1 Análise do teor de extrativos	55
4.2.2 Hidrólise ácida do coproduto agroindustrial para caracterização química	55
4.2.3 Análise do teor de sólidos insolúveis	56

4.2.4 Análise da composição de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência	56
4.3. Extração a partir de solventes orgânicos.....	58
4.4. Manutenção e propagação de esporos de <i>Aspergillus niger</i>	58
4.5. Bioprocesso submerso	58
4.6. Dosagem atividade enzimática	59
4.7. Determinação da inibição em placa de 97 poços	60
4.8. Teste de inibição em poços em placas de PDA	60
4.9. Acompanhamento de crescimento de biomassa	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Caracterização da semente de juçara e açaí	62
5.2 Produção enzimática	65
5.3 Crescimento da biomassa fúngica.....	74
5.4 Concentração do extrato bruto inibitória e teste de poços em PDA	76
5.5 Composição fenólica, atividade antioxidante e efeitos na produção enzimática.....	78
6. CONCLUSÃO	84
7. PERSPECTIVAS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. INTRODUÇÃO

No contexto atual, a ampla utilização de fontes de matéria-prima não renováveis, como petróleo, carvão e gás natural, juntamente com a alta geração de resíduos agroindustriais, promovem impactos climáticos, ambientais e urbanos expressivos (AWASTHI *et al.*, 2022; MARTINAZZO *et al.*, 2015). Portanto, observa-se uma crescente busca por tecnologias mais limpas, que minimizem os danos ao meio ambiente e à saúde humana.

Resíduos e coprodutos agroindustriais, das matrizes orgânicas da agroindústria, são substâncias abundantes em carbono, provenientes do processamento de matérias-primas como frutas, madeira e cultivares de importância econômica produzidos em larga escala, como cana de açúcar, soja, milho, trigo, arroz, entre outros. Logo, nesse setor é comum o descarte de cascas, talos, folhas e sementes durante o processamento dessas matrizes, gerando grandes quantidades de lixo orgânico, destacando-se como um desafio ambiental e econômico (AWASTHI *et al.*, 2022).

O Brasil é um dos maiores geradores de resíduos agroindustriais, devido a sua posição de destaque na produção agrícola mundial, estando entre os 10 maiores produtores de grãos do mundo. Em 2020, o Brasil atingiu o posto de maior exportador em valor de grãos, arrecadando 37 bilhões de dólares em 2020 e 419 bilhões entre 2000 e 2020 (ARAGÃO, 2020). Além disso, a grande biodiversidade do país contribui para a geração de resíduos diversos oriundos do processamento de frutos e vegetais, uma vez que o país tem mais de 49 mil espécies vegetais catalogadas (BFG, 2021). Portanto, são geradas milhares de toneladas de resíduos anualmente. Ainda, vale ressaltar que o país já vem sendo um destaque na utilização de biomassa lignocelulósica residual de cana-de-açúcar para a produção de etanol celulósico e processos de produção energética por cogeração (SANTIAGO E RODRIGUES, 2017). Contudo, apesar da grande diversidade e quantidade de coproduto gerado, existe um potencial expressivo a ser explorado no campo da produção enzimática a partir das diferentes matérias-primas disponíveis no Brasil em larga escala.

As biomassas vegetais agroindustriais constituem-se, muitas vezes, de diversos polissacarídeos que, por sua vez, podem ser utilizados para diversos produtos de alto valor agregado (SANTIAGO E RODRIGUES, 2017; AWASTHI *et al.*, 2022). Para isso, essas biomassas, em geral, necessitam de um pré-tratamento, para desconstrução de sua estrutura recalcitrante, e seus carboidratos poliméricos precisam passar por uma etapa de hidrólise enzimática, total ou parcial, para liberação de monossacarídeos ou oligossacarídeos que podem servir no processo de produção de outros produtos.

O açaí é um fruto proveniente da palmeira *Euterpe oleracea*, nativo da floresta amazônica (DE OLIVEIRA, TRUGILHO e DE OLIVEIRA, 2022). No Brasil, a polpa de açaí vem apresentando um aumento na sua popularidade e consumo, mas a sua extração e cultivo resultam em produtos não só valorizados em território nacional, mas também, de destaque em outras partes do mundo, como Estados Unidos, Japão, Holanda, Reino Unido, Austrália, entre outros países (EMBRAPA, 2021). Segundo dados do IBGE (2022), o estado do Pará é responsável pela maior produção nacional de açaí, representando cerca de 96% desse total, e foram produzidos mais de 1,5 milhões de toneladas do fruto só neste ano. Assim, é possível estimar uma produção de resíduo anual apenas pelo estado de mais de 1 milhão de toneladas.

Por outro lado, a juçara, da mesma espécie do açaí, possui uma polpa que apresenta propriedades e características sensoriais semelhantes a polpa de açaí, vem ganhando espaço. A juçara é o fruto, produzido pela palmeira *Euterpe edulis*, cultivada nas áreas litorâneas de Mata Atlântica, principalmente nas regiões sul e sudeste do país (DE MELLO, ROSA e SIMÕES, 2022). A caça ilegal e venda do palmito de juçara fez com que a mesma entrasse para o quadro de espécies em risco de extinção, visto que a espécie é monocaule e a extração do palmito envolve a retirada do tronco inteiro e, conseqüentemente, a sua morte (TROIAN, 2014). Como forma de contornar essa problemática, foi incentivada a exploração de sua polpa, impulsionando o plantio e colheita exclusivamente de frutos. Além das causas ambientais, incentivando o manejo sustentável da espécie, a agricultura familiar é responsável por 90% da produção de juçara no Vale do Itajaí, no Estado de Santa Catarina, favorecendo a parte socioeconômica da produção do fruto (TROIAN, 2014). Segundo dados da Conab (2020), Santa Catarina foi o maior produtor nacional do fruto, e na época a produção era estimada em 150 a 200 mil quilos de frutos por ano, o que gera resíduos anuais, aproximadamente, de 135 a 180 mil quilos.

O fruto de juçara é rico em diferentes macros e micronutrientes, além de ser uma fonte de vitaminas, como C e E, e apresentar propriedades antioxidantes, devido a presença de seus compostos fenólicos (CARDOSO *et al.*, 2015; BICUDO, RIBANI, e BETA, 2014; BORGES *et al.*, 2013; DE BRITO *et al.*, 2007). Da mesma forma, o fruto do açaí também possui uma composição rica em fenólicos, vitaminas e nutrientes, importantes para a defesa antioxidante e saúde do corpo humano (YAMAGUCHI *et al.*, 2015), portanto, com a premissa de alimentação saudável cada vez maior, o valor nutricional de ambos os frutos faz com que haja uma crescente busca e a exploração da polpa seja industrialmente atrativa. Contudo, em ambos os frutos, a polpa consiste apenas em 15%, aproximadamente, do peso do fruto maduro, enquanto a semente representa em torno de 85%, o que seria direcionado como resíduo das produções comerciais (MONTEIRO *et al.*, 2019; BICUDO, RIBANI e BETA, 2014). Visto que as sementes

correspondem a composição majoritária dos resíduos agroindustriais de açaí e de juçara, além de não se ter um processamento que separe as sementes de fibras, entre outras possíveis composições no meio, o presente trabalho trata os resíduos como sementes.

Hoje em dia, um pequeno percentual destes resíduos é direcionado para ração animal e adubo, podendo nesses casos serem classificados como coprodutos do processamento dos frutos. No entanto, ainda existe um grande acúmulo desses materiais, que passam a serem tratados como resíduo, visto a escassa disponibilidade de métodos adequados de reaproveitamentos, resultando assim, num grave problema ambiental e urbano no caso do açaí. Atualmente, com o estímulo à comercialização da polpa de juçara, a geração de resíduos agroindustriais durante a produção da polpa, não é um grande problema, ao contrário da comercialização do açaí, que ocorre em larga escala. No entanto, isso pode se tornar uma questão no futuro. Portanto, encontrar formas sustentáveis de reutilizar esses resíduos é uma maneira proativa de lidar com essa possível problemática. Assim, existe um crescente interesse para o desenvolvimento de processos visando o aproveitamento desses coprodutos agroindustriais.

As sementes, principal subproduto do processamento dessas frutas, são ricas em carboidratos e também são fontes de extratos ricos em compostos fenólicos (INADA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2019). O principal carboidrato presente nessas sementes é a manana linear, que é um polímero de manose, onde seus percentuais variam entre 50-55% e em torno de 60%, para açaí e juçara, respectivamente (MARCONI, 2024; RAMBO *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2019). Essas características indicam um forte potencial na indução da produção enzimática por fungos, especificamente na produção de mananases, enzimas que degradam cadeias de mananas.

As enzimas vêm desempenhando papéis importantes no contexto industrial, como a sua aplicação na produção de biocombustível, ração animal, processamento de alimentos e bebidas, detergentes, anti-espessantes, indústria têxtil e de produção de papel (DAWOOD e MA, 2020). A utilização de enzimas em processos industriais desperta grande interesse, devido às vantagens que oferecem em relação ao seu menor consumo energético, processos mais limpos, sem geração de poluentes e rejeitos danosos ao meio ambiente, maior especificidade e facilidade de obtenção por meio da biotecnologia. Além disso, o uso da catálise a partir de enzimas pode proporcionar um produto final mais puro, e possui potencial redução de custos laboratoriais e equipamentos, devido a condições mais brandas de processo (DAWOOD e MA, 2020).

Portanto, existe uma demanda crescente do estudo de enzimas e sua produção, como é possível visualizar a partir de uma pesquisa realizada na base Scopus, utilizando como palavras-

chaves “*cellulases*”, “*xylanases*” e “*mannanases*”, visto que são enzimas utilizadas na indústria e que pertencem ao grupo das hidrolases ativas em carboidratos. Além disso, foram encontradas quantidades mais expressivas de publicações para celulases e xilanases, comparado às mananases nos últimos 23 anos, como mostrado na figura 1. Desse modo, demonstra-se a necessidade de ampliar as pesquisas relativas às mananases.

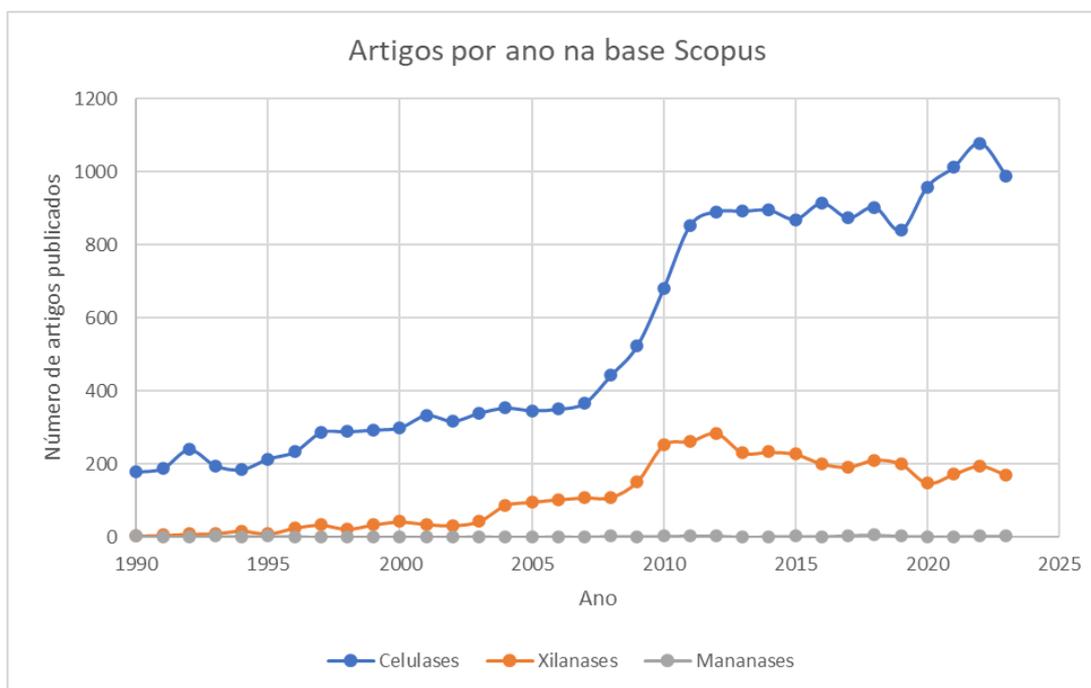


Figura 1 - Pesquisa das palavras “*cellulases*”, “*xylanases*” e “*mannanases*” como única palavra-chave na base Scopus entre 1990 e 2023, dados anuais.

Diversos microrganismos são conhecidos por serem capazes de produzir mananases, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Em especial, os fungos filamentosos são mais amplamente empregados para este fim, por conta de sua habilidade de secretar suas enzimas de forma extracelular, facilitando sua recuperação e processamento (TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Um dos fungos empregados na produção de mananases é o *Aspergillus niger* (FAVARO *et al.*, 2010; BASMACK, 2024; NUNES, 2024), e, ainda, ao pesquisar por “*mannanase AND Aspergillus niger*” como título-resumo-palavra-chave na base Scopus, foram encontrados apenas 96 artigos entre 1990 e 2023. Portanto, existe ainda uma necessidade de estudos mais aprofundados neste campo, dada a importância tecnológica dessas enzimas na produção de bioprodutos a partir de biomassas vegetais ricas em mananas (DAWOOD e MA, 2020).

O país ocupa a quarta posição na produção mundial de artigos relacionados a produção de enzimas, na base Scopus, nos últimos 14 anos, e está entre os 10 países que detêm artigos

relacionado à mananases, como mostra a figura 2, o que indica um papel relevante na pesquisa e desenvolvimento com relação a produção de enzimas, além de um certo destaque com relação ao estudo de mananases. Assim, existe uma oportunidade de contribuir com estudos para cobrir essa lacuna de conhecimento sobre mananases e alavancar o desenvolvimento tecnológico nessas áreas. Ao mesmo tempo, o uso de biomassas nativas residuais como as sementes de juçara e açai, para a produção de mananases, se soma às oportunidades identificadas. Isso é particularmente relevante considerando que o mercado de enzimas no Brasil contribui para o dinamismo de outros setores industriais, como têxtil e mercado de papel e celulose, embora ainda seja relativamente pequeno em comparação ao mercado global (INDUSTRIAL ENZYME MARKET, 2023).

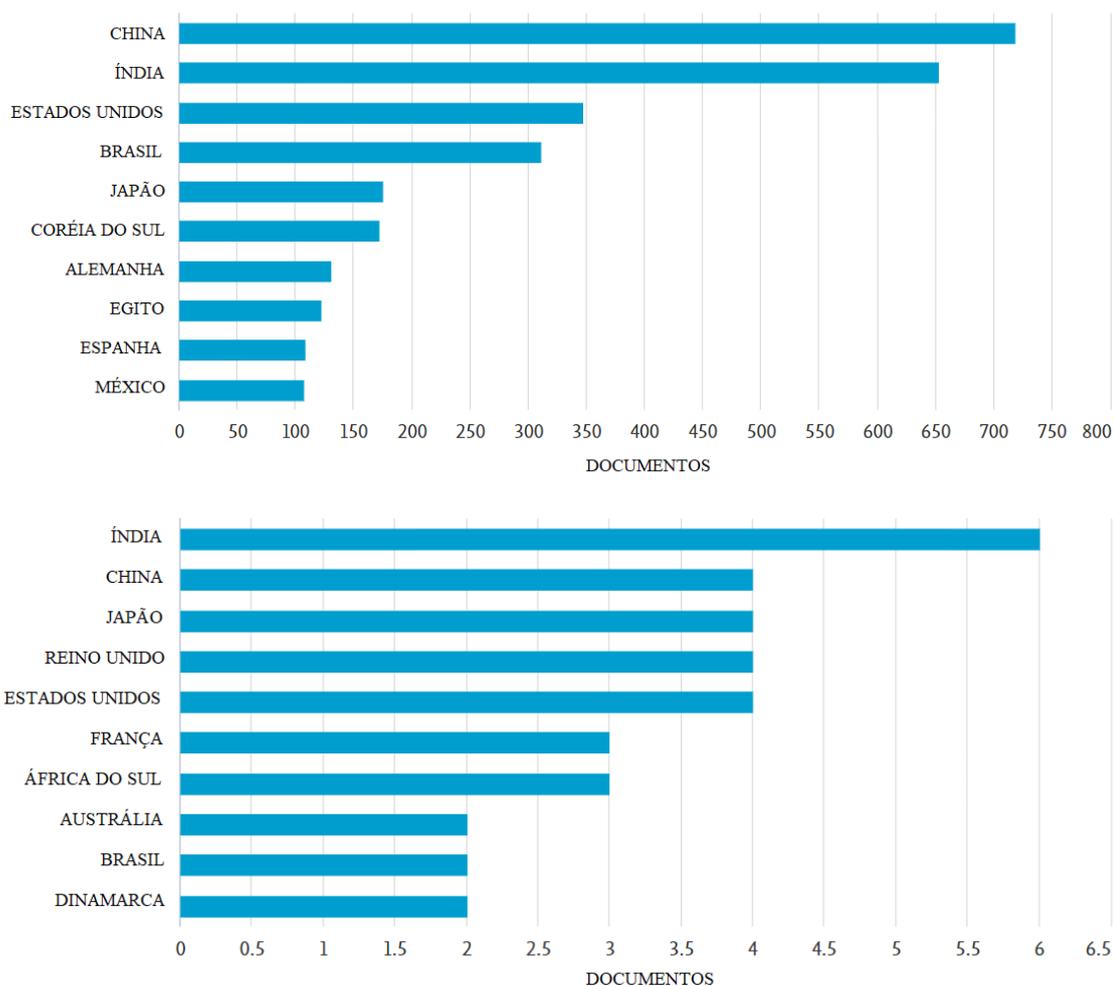


Figura 2 – Pesquisa na base Scopus apenas como títulos de artigos, nos anos de 2010 à 2024, mostrando a produção por países. Acima: pesquisa das palavras-chave “*production*” e “*enzymes*”; Abaixo: pesquisa da palavra-chave “*mannanases*”.

No entanto, ao se estudar a produção enzimática a partir dos resíduos agroindustriais de açaí e juçara, é interessante se atentar aos metabólitos secundários presentes nesses vegetais, que podem acabar influenciando na produção de enzimas. Dentro os metabólitos secundários de plantas que são relatados como potenciais interferentes no processo de produção de enzimas podem citar os compostos fenólicos, os quais são metabólitos secundários comum em endospermas de sementes, sendo compostos bioativos e com alta atividade antioxidante (BICUDO *et al*, 2014, BORGES *et al*, 2013, RUFINO *et al*, 2010, WU *et al*, 2012). Assim, como a presença de tais compostos já foi relatada nas sementes de açaí e juçara, é necessário entender seus efeitos na produção enzimática de cada fungo estudado.

Especificamente, compostos fenólicos já foram reportados em matrizes de semente de açaí, sendo identificadas procianidinas (figura 3), incluindo seus monômeros, catequina e epicatequina, e procianidinas do tipo B e tipo A (MARTINS *et al*, 2020).

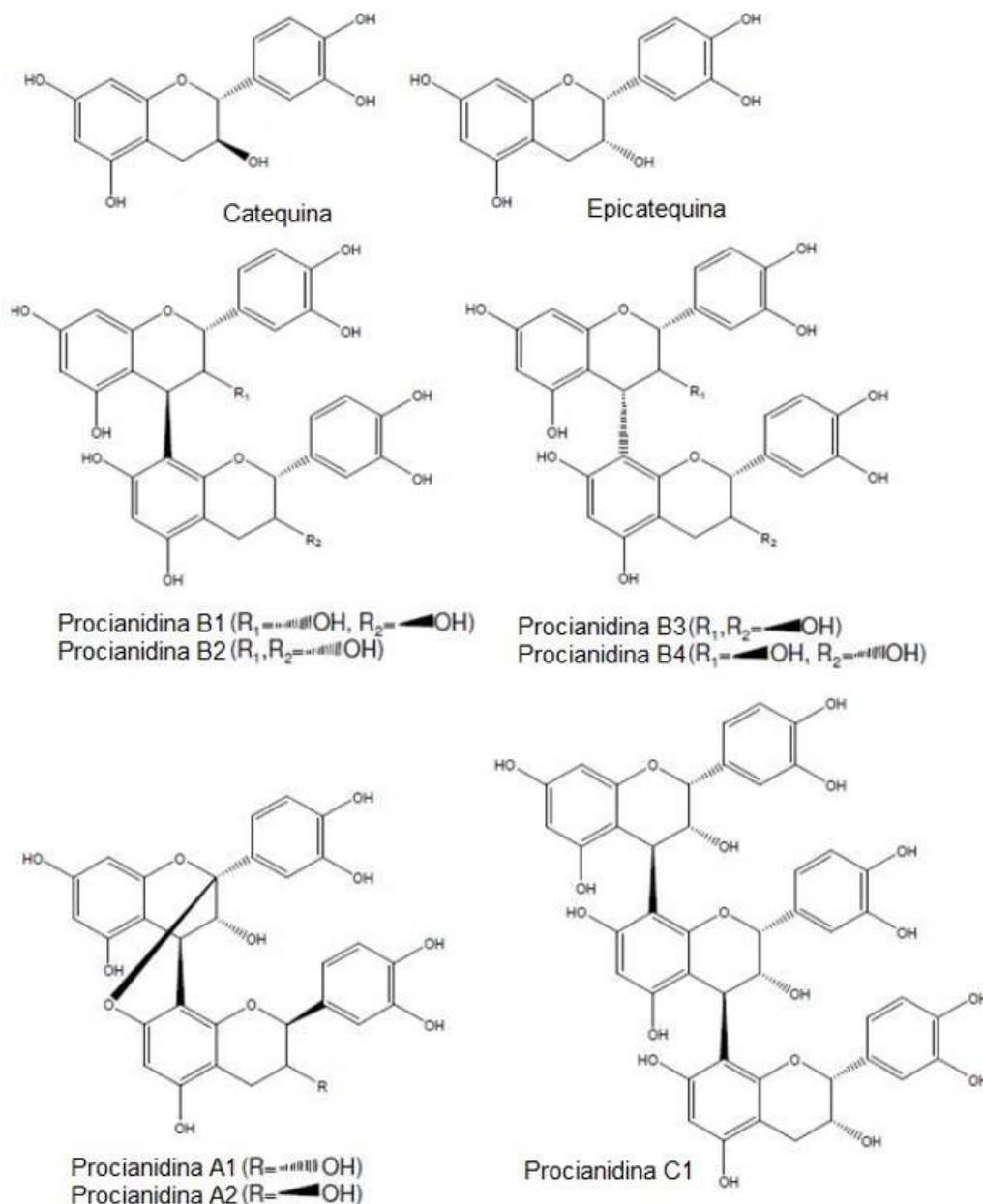


Figura 3 - Estruturas química dos monômeros, dímeros e trímeros de procianidinas. Adaptado de Rue *et al.* (2018).

A presença de compostos fenólicos também já foi reportada em sementes de juçara, sendo indicada, principalmente, a presença do ácido 4-hidroxibenzoico (figura 4), representando 79% do conteúdo fenólico total (INADA *et al.*, 2015). Esses compostos fenólicos simples podem estar na sua forma livre ou ligados como glicosídeos simples e possuem atividade antimicrobiana e antioxidante reportada (AYDOGDU, SUMNU e SAHIN, 2019; SIMÕES *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2005)

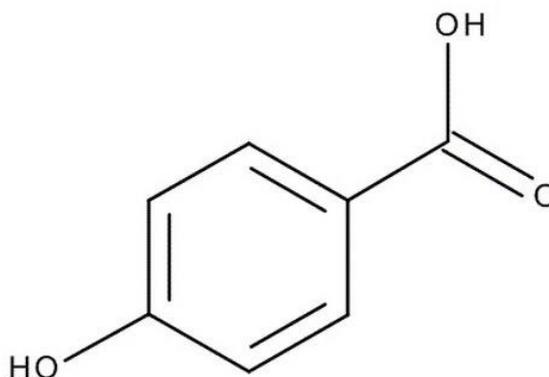


Figura 4 - Representação da estrutura química do ácido 4-hidróxibenzóico (CAS: 99-96-7), fórmula química :4-(OH)C₆H₄COOH.

Estruturas fenólicas permitem doação de próton ao radical livre, regenerando os compostos oxidativos e interrompendo processos de oxidação. Dependendo da concentração e espécie fúngica, esses compostos presentes nas sementes de açaí e juçara podem apresentar atividade fungicida ou fungistática, podendo atuar afetando a respiração pela inibição da fosforilação oxidativa, interrompendo a síntese de ácidos nucleicos e a síntese proteica e, como também, prejudicando funções da membrana celular (RUE *et al.*, 2018; FRASAO *et al.*, 2018; KOCH *et al.*, 2019; INADA *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2022). Portanto, a presença desses metabólitos na composição das sementes pode ter uma influência negativa no desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, na produção das enzimas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo o estudo do uso dos resíduos agroindustriais de açaí (*Euterpe oleracea*) e juçara (*Euterpe edulis*) na indução da produção de mananases de *Aspergillus niger* 205 e 1234, como fontes de carbono, em um meio de cultura submerso.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a composição química do resíduo agroindustrial de juçara e açaí;
- Avaliar a produção de mananases a partir de *Aspergillus niger* 205 e 1234;

- Avaliar a influência dos compostos fenólicos presentes nesses resíduos no crescimento do fungo e a produção de mananases, através da utilização dos resíduos *in natura* e após extração por solventes, nos meios de cultivo;
- Avaliar os efeitos dos extratos de açaí e juçara no crescimento do fungo e no seu processo de produção de esporos em placas com meio de cultivo sólido;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. COPRODUTO AGROINDUSTRIAL

O conceito de biomassa é descrito por diversos autores como qualquer material vegetal que seja renovável em um período inferior a 100 anos (PROBSTEIN e HICKS, 1982; KLASS, 1998). Nessa perspectiva, recursos energéticos como petróleo, carvão mineral e xistos betuminosos, apesar de terem origem vegetal, não são considerados renováveis. Ademais, uma definição mais abrangente de coproduto engloba todo material de origem orgânica, como madeira, detritos animais e resíduos orgânicos (NOGUEIRA e LORA, 2003; MARTINAZZO *et al.*, 2015). Portanto, exemplos de biomassas agroindustriais se destacam como casca de arroz, serragem, bagaço de cana-de-açúcar e sementes como subprodutos da extração da polpa de frutas, onde essa biomassa gerada se desdobra em duas nomenclaturas: resíduo e coproduto. A principal diferença entre ambos é que o coproduto faz referência ao material provindo da agroindústria em que existe a possibilidade de reutilização, para diversos fins, já o resíduo se enquadra num material resultante sem possibilidade atualmente de transformação em outros produtos que agregam valor econômico (MARTINAZZO *et al.*, 2015).

A produção agrícola se encaixa como uma das principais atividades que movem a economia mundial, no Brasil, em 2023, a agropecuária movimentou cerca de 680 bilhões de reais, onde a safra 2022/23 foi recorde, com alta de 15%, sendo a maior da série histórica, que ajudou a alavancar o Produto Interno Bruto (PIB) do país (CONAB, 2023). Além disso, o Conselho Internacional de Grãos (IGC, na sigla em inglês) estimou a produção mundial de grãos e fibras em 2023/24 para 2,31 bilhões de toneladas, onde apenas o Brasil tem sua produção estimada em 312,3 milhões de toneladas, sendo um grande protagonista no cenário agro mundial (CONAB, 2023; IGC, 2024).

Sabendo que o processamento de toda essa matéria da indústria agrícola gera um quantidade expressiva de resíduos e coprodutos, onde em cadeias de produção de polpa de açaí e juçara, os subprodutos correspondem a mais de 80% do volume total de entrada (BUFALINO

et al., 2018; BICUDO *et al.*, 2014), a reinserção dessa matéria em cadeias produtivas surge como uma alternativa economicamente favorável e que promove o desenvolvimento sustentável, onde pode-se obter produtos de valor agregado, reduzindo danos ambientais e urbanos, causado pelo acúmulo de subprodutos de processos agroindustriais.

Esses coprodutos possuem em sua maioria uma mesma gama de metabólitos, diferenciando em seus teores, como a celulose, um homopolissacarídeo de glicose e o composto mais abundante em plantas, a lignina, uma macromolécula de origem fenólica, e hemiceluloses, heteropolissacarídeos ramificados, que variam entre espécies (KASCHUK, 2019). Além disso, existem os coprodutos não celulósicos, que não se enquadram na classificação de lignocelulolíticos, não possuindo a glicose como açúcar principal, como grãos de café, sementes de tâmara, açaí e de juçara. Esses apresentam altos percentuais de polissacarídeos de reserva, como a manana, onde a manose é identificado como o principal açúcar (RAMBO, SCHMIDT e FERREIRA, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, de MELLO, ROSA e SIMÕES, 2022).

3.1.1. Mananas

As mananas desempenham uma ampla gama de funções, apresentando maior deposição como polissacarídeos de reserva de parede celular em algumas sementes de espécies de plantas, conferindo proteção contra impactos mecânicos, proporcionando dureza e resistência, pois é um polissacarídeo de alto grau de compactação (MONTEIRO *et al.*, 2019). A cadeia de manana linear, ou manana pura (figura 5), é caracterizada por ligações intramoleculares β -(1,4) entre os monossacarídeos de manose, o que favorece a conformação linear. Ademais, pode haver a formação de uma estrutura supramolecular de manana pura, onde devido à formação de diversas ligações intermoleculares de hidrogênio, se tem a diminuição entrópica do sistema, sendo favorável termodinamicamente, o que resulta numa estrutura cristalina e de difícil solubilização (VAN ZYL *et al.*, 2010). Contudo, o grau de polimerização da manana, entre 15 e 200, comparado ao grau de polimerização da celulose, entre 300 e 3000, é baixo (NATTORP *et al.*, 1999; VAN ZYL *et al.*, 2010).

O baixo grau de substituição de d-galactose, por ligação α -1,6, resulta em duas formas de mananas: (i) cadeias lineares com grau de polimerização (DP) de cerca de 15, que se compactam em estruturas densas e cristalinas (chamadas de manana I ou A), e (ii) microfibrilas menos cristalinas com um DP maior, em torno de 80 (chamadas de manana II ou B) (VAN ZYL *et al.*, 2010). Ambas são insolúveis e fornecem rigidez e proteção ao endosperma. Com um grau

de polimerização mais baixo, as cadeias poliméricas podem se alinhar e se empacotar de maneira mais ordenada, o que permite uma formação de arranjos mais regulares e compactos, resultando em estruturas cristalinas mais densas. Enquanto em cadeias mais longas, as interações intermoleculares são mais variadas e mais desordenadas, o que reduz a formação de padrões cristalinos regulares.

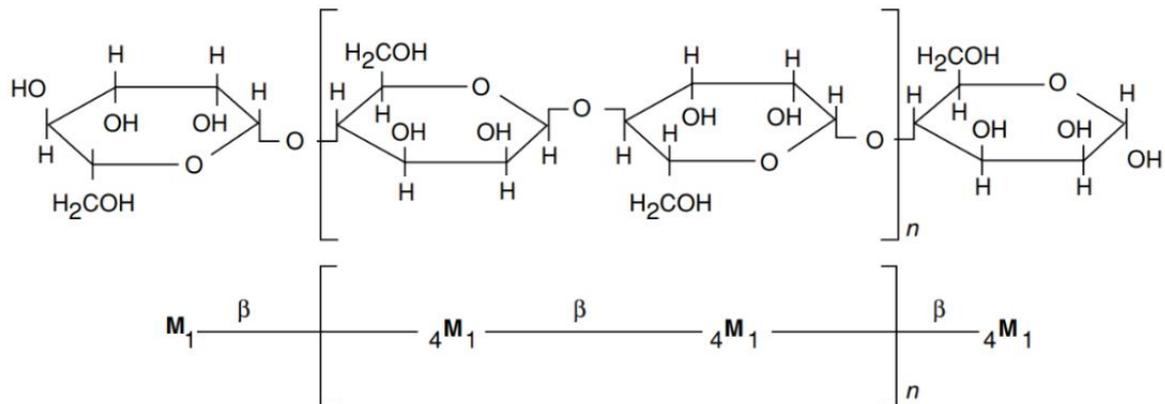


Figura 5 - Estrutura química da manana linear, ou manana pura, onde “M” são unidades de manose ligadas pelos carbonos C1 e C4 por ligações do tipo β -1,4. Adaptado de Holtzaple (2003).

Além disso, outro importante subgrupo da família das mananas presente em endospermas de sementes são as glucomananas (figura 6), que são compostas por cadeias lineares de manose e glicose, ligadas predominantemente por ligações do tipo β -1,4.

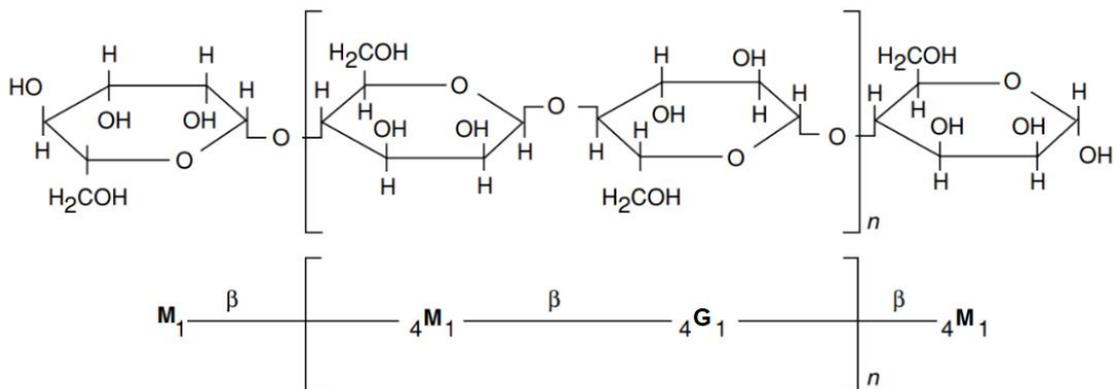


Figura 6 - Estrutura química da glucomanana, onde “M” são unidades de manose e “G” são unidades de glicose, ligadas pelos carbonos C1 e C4 por ligações do tipo β -1,4. Adaptado de Holtzaple (2003).

E, ainda, uma cadeia principal de glucomanana com ramificações de galactose ligadas por α -1,6 em resíduos de d-glicosil ou d-manosil com uma proporção, geralmente, de manose:glicose:galactose de 3:1:1 é denominada como galactomanana (figura 7). Os grupos

laterais de galactose presentes nas galactomananas evitam a associação estreita entre polímeros adjacentes, resultando em uma estrutura mais amorfa que retém água e contribui para sua solubilidade em água, e essa capacidade de reter água é especialmente crucial para a sobrevivência a longo prazo de sementes, já que durante a germinação, esses polissacarídeos podem ser mobilizados como polissacarídeos de reserva (VAN ZYL *et al.*, 2010).

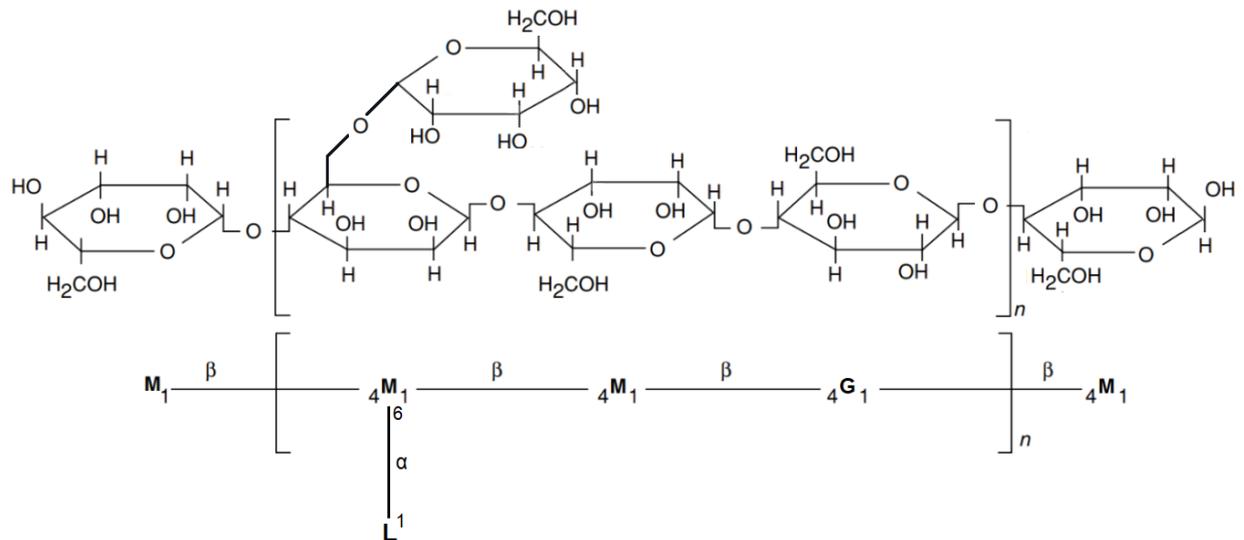


Figura 7 - Estrutura química da galactomanana, onde “M” são unidades de manose e “G” são unidades de glicose, ligadas pelos carbonos C1 e C4 por ligações do tipo β -1,4, e “L” são unidades de galactose, ligadas por carbonos C1 e C6 por ligações do tipo α -1,6. Adaptado de Holtzaple (2003).

O grau dessa ramificação define as relações estrutura-função, de forma que quanto menos ramificado, maior a indicação de que a função biológica está relacionada com a dureza e proteção do embrião contra danos mecânicos e flutuações na disponibilidade de água, e quanto mais ramificado, mais solúvel o polissacarídeo se torna e maior a função como relações hídricas (HOLTZAPPLE, 2003; VAN ZYL *et al.*, 2010). Portanto, moléculas de mananas lineares e galactomananas estão envolvidas no desenvolvimento de sementes e vão desempenhar funções durante fases distintas nesse processo.

3.2. ENZIMAS

O estudo da bioquímica se inicia com a ação enzimática e a percepção da catálise, reconhecida pela primeira vez no final dos anos 1700 com a digestão da carne (NELSON e COX, 2013). Em 1850, Louis Pasteur identificou a conversão de açúcar em álcool como catalisada por "fermentos". Em 1926, James Sumner isolou e cristalizou a urease, aprofundando

o entendimento das enzimas. John Haldane, então, propôs a ligação entre enzimas e substratos, estabelecendo a noção de catálise enzimática (NELSON e COX, 2013).

Todos os processos bioquímicos são regidos por enzimas, as quais atuam de forma sequencial e estritamente organizadas, catalisando reações específicas, degradando as moléculas dos nutrientes, conservando e transformando energia química, além de atuar na edificação de macromoléculas, partindo de precursores elementares.

É também importante salientar que a atividade catalítica da enzima atua na velocidade das reações, proporcionando a rota com menor energia de ativação. Numa reação, as moléculas necessitam atingir um nível de energia mais alto (barreira de energia) para que se chegue ao produto. O ponto de mais alta energia é onde se tem o estado de transição, o qual não deve ser confundido com os intermediários de uma reação, mas sim é um estado com a mesma probabilidade do estado S (substrato) e P (produto), é um evento que envolve a quebra de ligação, formação de ligação ou formação de carga. Portanto, a energia de ativação (ΔG^\ddagger) é a diferença energética entre o estado basal (energia do substrato) e o estado de transição. É um parâmetro que afeta diretamente a velocidade da reação, tendo uma relação inversamente proporcional com o mesmo. Outros parâmetros, como temperatura e pressão, também afetam essa velocidade pois aumentam a energia do sistema, suplantando a barreira de energia. A atividade catalítica da enzima é um fator que afeta a velocidade, pela diminuição da energia de ativação, assim como apresentado na figura 8.

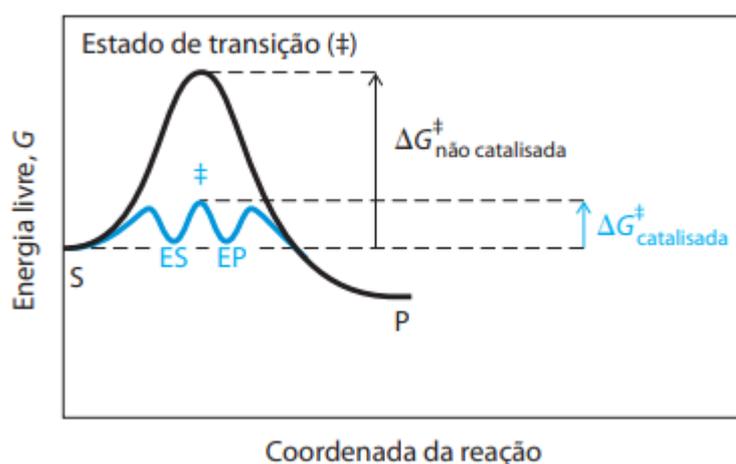


Figura 8 - Diagrama da coordenada da reação $S \rightarrow P$, comparando a reação catalisada por enzima (em azul) e não catalisada. Retirado de Nelson e Cox (2013).

As enzimas são classificadas a partir de cada tipo de reação catalisada, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação de enzimas

Classe	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Lipases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares
7	Translocases	Catalisam o movimento de íons ou moléculas através das membranas ou sua separação dentro das membranas.

As enzimas podem ser derivadas de fontes vegetais, animais e microbianas, e desempenham um papel crucial em diversos processos industriais, abrangendo setores como têxtil, farmacêutico, alimentício, papel e celulose (MONTEIRO e SILVA, 2009; BORIN *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2019). Neste cenário, observa-se um aumento global no uso de enzimas industriais, no entanto, o Brasil ainda é majoritariamente dependente de importações desses compostos e apresenta um uso relativamente limitado de enzimas em suas operações industriais, em comparação com outros países (MONTEIRO e SILVA, 2009). Portanto, é crucial a busca pela consolidação do Brasil como um produtor de tecnologia enzimática, visando a autonomia e o avanço em seu desenvolvimento industrial.

3.2.1. Mananases

As enzimas envolvidas na hidrólise das mananas são classificadas como mananases (figura 9), as quais pertencem à classe das glicosil hidrolases (GH) (EC 3.2.1.-). São enzimas hidrolíticas que atuam na quebra da ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato (COUTURIER *et al.*, 2022; ORTIZ-RAMÍREZ *et al.*, 2023). O agrupamento em classes de glicosil hidrolases dessas enzimas é baseado na sequência de aminoácidos, similaridade estrutural e mecanismo de atuação, seguindo a

glucomanana internamente, liberando cadeias de β -1,4-mananoligossacarídeos mais curtas. Também se tem a atuação das β -manosidases (EC 3.2.1.25), que são exo-hidrolases, ou seja, liberam o monômero manose das cadeias de mananas, atacando as ligações terminais nas extremidades não redutoras, e, também, clivando mananobioses (dissacarídeos 2- α -mananobiose) em unidades monoméricas de manose. Outra principal enzima que atua nesse processo é a β -glicosidase (EC 3.2.1.21), que atua na hidrólise de terminais não redutores de cadeias oligoméricas derivadas da degradação de glucomananas ou galactoglucomananas, liberando grupos 1,4-glucopiranose. Existem, também, as α -galactosidases (EC 3.2.1.22), que atuam na remoção dos grupos laterais de galactomananas, liberando unidades monoméricas de galactose. Ainda, pode-se ter a atuação da enzima acetilmanana esterase (EC 3.1.1.6), no caso da presença do grupo lateral acetil em cadeias de galactomananas (HOLTZAPPLE, 2003; COUTURIER *et al.*, 2022; ORTIZ-RAMÍREZ *et al.*, 2023).

A estrutura cristalina dessas β -mananases indica um sítio ativo em forma de fenda aberta com resíduos de glutamato catalíticos (ácido/base e nucleofílicos) (VAN ZYL *et al.*, 2010). O seu mecanismo de ação envolve inicialmente um ataque nucleofílico ao carbono anomérico, com um deslocamento geral catalisado por um ácido do grupo de saída, deixando uma enzima glicosil covalente intermediária (figura 10 A-B), e então, a água ataca o centro anomérico do intermediário no processo catalisado por uma base formando o produto e liberando a enzima em seu estado original (figura 10 C-D). Além disso, dependendo das condições do meio, é possível que o ataque da água seja substituído por um ataque reativo de moléculas doadoras, como derivados de flúor ou altas concentrações de oligossacarídeos, ocorrendo, então, uma transglicosilação (figura 10 E-F) (VAN ZYL *et al.*, 2010).

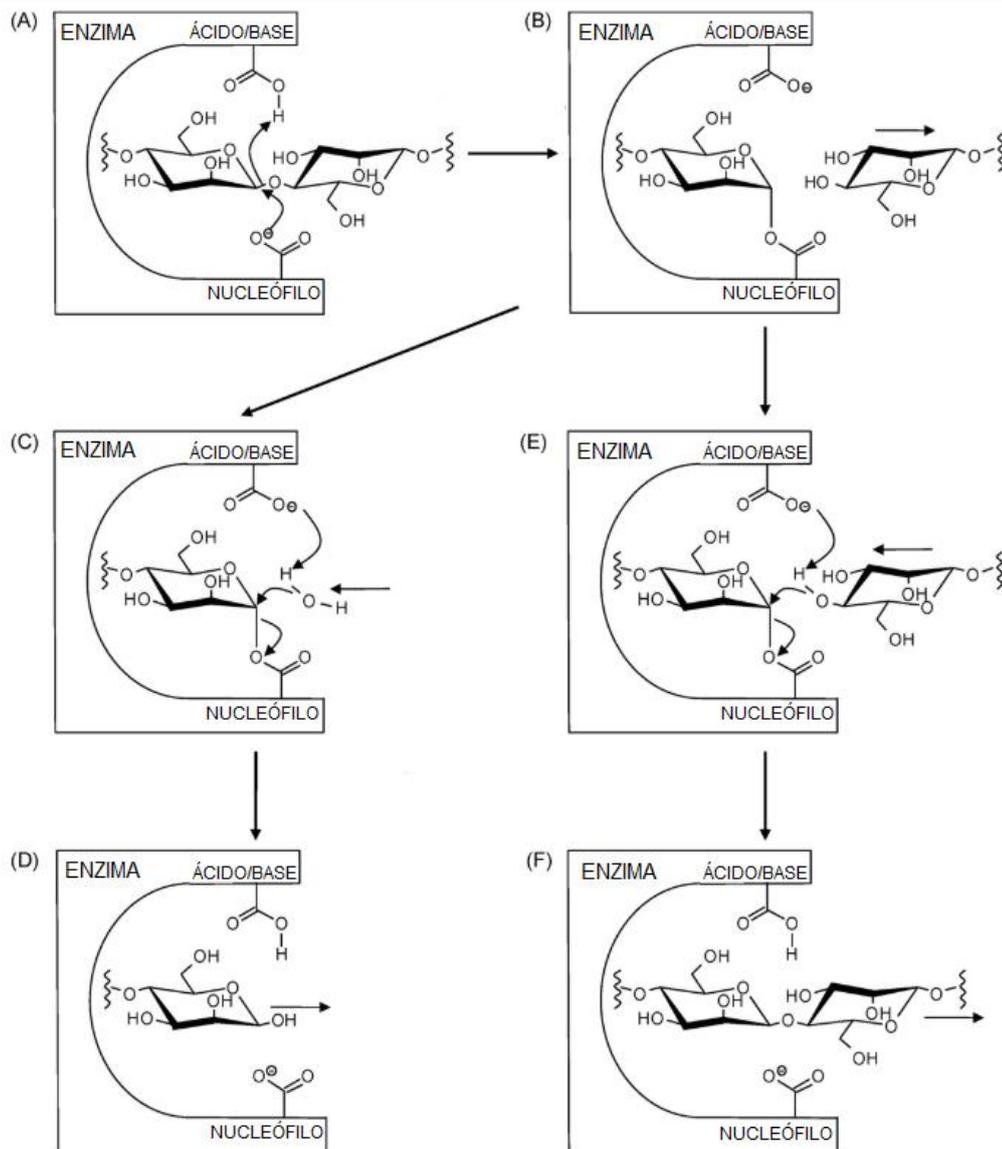


Figura 10 - Mecanismo de ação hidrolítica da β -mananase. A primeira etapa de glicosilação resulta na formação de uma enzima oligossacarídica complexada (A + B). Dependendo das condições do meio, uma molécula de água (C + D) pode atacar o oligossacarídeo para liberar o oligossacarídeo ou um novo monossacarídeo. O oligossacarídeo (E + F) pode se ligar para liberar uma espécie de oligossacarídeo recém-formada. O produto deixa a enzima em seu estágio de protonação original e uma nova reação de hidrólise ou transglicosilação pode ser catalisada. Adaptado de Van Zyl *et al.* (2010)

3.2.2. Produção industrial de enzimas e aplicações

As enzimas estão sendo cada vez mais empregadas em diversos processos industriais, uma vez que a globalização e o aumento das atividades de pesquisa e desenvolvimento dentro do mercado de enzimas aumentam o seu crescimento, onde o setor industrial representa cerca

de 60% deste mercado. Além disso, após os antibióticos, as enzimas constituem os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica (MONTEIRO e ROBERTO, 2009).

O mercado de empresas fabricantes de enzimas é segmentado por classes de enzimas (carboidrases, proteases, lipases, etc.), áreas de aplicação, como processamento de alimentos, ração animal, saúde, têxteis, processamento de couro, detergentes e produtos de limpeza, biocombustíveis, cosméticos, entre outras, e também por localização geográfica (Ásia-Pacífico, América do Norte, Europa, América do Sul e Oriente Médio e África). Espera-se um crescimento no mercado de mais de 6% anualmente, visto que a médio prazo, fatores como a diversidade de aplicação de enzimas, aumento das normas e regulamentações ambientais relativas ao uso de produtos químicos provavelmente impulsionará o crescimento do mercado de enzimas industriais (figura 11) (MORDOR INTELLIGENCE RESEARCH & ADVISORY, 2023).



Figura 11 - Cenário mundial do mercado enzimas industriais. Retirado de Mordor Intelligence Research & Advisory (2023)

O Brasil se destaca como o país líder no mercado de enzimas da América do Sul, com a Argentina em segundo lugar. Isso se deve ao amplo setor industrial, forte na agricultura, agropecuária, biotecnologia, produção de bioetanol e outros setores que demandam o uso intensivo de enzimas (MORDOR INTELLIGENCE RESEARCH & ADVISORY, 2023). Além da presença de grandes empresas internacionais no território, o crescimento na pesquisa e desenvolvimento na área de biotecnologia do país.

Com relação ao mercado das mananases, existem duas importantes aplicações comerciais nos setores de detergentes e ração animal. Na indústria de detergentes, a enzima *Mannaway* (*Novozymes*) (XIE, CAO e ZHOU, 2019), é utilizada por marcas renomadas como *Tide*, pertencente à holding *Procter & Gamble*, e *Omo*, da holding *Unilever* (SCHÄFER *et al.*, 2005). Além dessa, são também utilizadas na formulação de detergentes, incluindo *Mannastar*® (*Dupont*) (ENZYME SOLUTIONS, 2024) e *Purabrite*™ *Mannanase* (*Dupont*) (XIE, CAO, ZHOU, 2019). No âmbito da produção de ração animal, existe uma variedade de produtos baseados em mananases disponíveis no mercado, como *CTCzyme*®, *Nutrizyme*®, *DigeGrain M* e *Mannazyme XP*® (DAWOOD e MA, 2020). Ademais, tem-se a *Hemicell*® (*Elanco*) sendo recomendado especialmente para rações que contêm farelo de soja, por sua riqueza em mananas (ELANCO, 2024). Outras mananases comerciais podem ser observadas no quadro 1.

Quadro 1 - Principais produtos comerciais contendo mananases, bem como as empresas detentoras das marcas e aplicações. Adaptado de Dawood e Ma (2020)

Empresa	País	Fonte da mananase	Marca registrada	Aplicação	Referência bibliográfica
Elanco	Estados Unidos	<i>Paenibacillus lentus</i>	Hemicell®	Ração Animal	ELANCO, 2024
CTC Bio Inc	Coréia do Sul	<i>Bacillus lentus</i>	CTCzyme®	Ração Animal	CTC BIO, 2024
Sunson	China	<i>Bacillus lentus</i>	Nutrizyme®	Ração Animal	SUNSON, 2024
Novo Nordisk	Dinamarca	<i>Aspergillus niger</i>	Gamanase®	Detergente / Controle de lodo	VAN PEE, VAN SPEYBROECK e VAN POELE, 1996
Advanced Enzymes	Índia	<i>N. I.</i>	DigeGrain M	Ração Animal	ADVANCED ENZYMES, 2024
Novozymes	Dinamarca	<i>Talaromyces leycettanus</i>	Mannaway	Detergente	XIE, CAO e ZHOU, 2019
Aumgene Biosciences	Índia	<i>N. I.</i>	Mannazyme XP®	Ração Animal	AUMGENE BIOSCIENCES, 2024
PhylloZyme	Estados Unidos	<i>Trichoderma reesei</i>	Cp-mannanase	Detergente / Têxtil	KUMARI <i>et al.</i> , 2019

Genencor International	Estados Unidos	N. I.	MannaStar™	Detergente	Fødevarer, 2007
Megazyme	Irlanda	<i>Aspergillus niger</i>	E-BMANN	Indústrias de alimentos e ração, biocombustíveis e produção de papel	MEGAZYME, 2024
Dupont	Estados Unidos	<i>Fungal β-mannanase</i>	Purabrite™	Detergente	XIE, CAO e ZHOU, 2019

N.I.: Não identificado

As enzimas são muito utilizadas na formulação de detergentes, visto que a sua ação específica promove a lise dos resíduos alimentares nos tecidos, sem a danificação dos mesmos. Também, na indústria de ração animal para tratar os coprodutos agroindustriais que compõem a formulação das rações, visto que não teriam uma digestão eficaz no organismo do animal, utilizando-se enzimas para deixar os compostos biodisponíveis. Além dessas, existem outras aplicações industriais das mananases, como na indústria petroquímica, onde a fraturação de poços é um procedimento comum na extração de petróleo e gás. Esse processo envolve a necessidade de quebrar o fluido injetado de maneira controlada após a fratura das formações rochosas, para facilitar a liberação e recuperação do óleo ou gás aprisionado, fazendo a aplicação de beta mananases durante a perfuração, algo vantajoso. Atualmente, para otimizar a extração, utiliza-se uma combinação de goma guar e areia para preencher o poço, seguida pela pressurização até a fratura das rochas (THOMBARE *et al.*, 2016). Para promover um escoamento eficiente do produto extraído, é essencial diluir a solução polimérica, assim, as β -mananases, que efetivamente hidrolisam a goma guar em temperaturas superiores a 80°C, são adequadas para essa finalidade. Um exemplo dessa aplicação é a utilização mananases comerciais produzidas pela empresa Diversa (EUA), conhecidas pelo desempenho excepcional nesses tipos de operações. São comercializadas como *Pyrolase160* e *Pyrolase 200*, são produzidas pelo fungo *Thermotoga sp* e possuem uma elevada termoestabilidade (DAWOOD e MA, 2020).

Além disso, outras enzimas provindas de fungos são excelentes candidatas para a aplicação de perfuração de poços. Na literatura, destaca-se o uso de uma β -mananase (DtManB), provinda do fungo *Dictyoglomus thermophilum*, que possui alta estabilidade e atividade na temperatura exigida (HU *et al.*, 2014), como também, a enzima TtMan5A, uma β -

mananase termoestável derivada do fungo *Talaromyces trachyspermus* tem uma temperatura ideal de 85°C e boa atividade catalítica em uma ampla faixa de pH (ICHINOSE *et al.*, 2017).

Ademais, com o aumento da preferência por consumo de produtos naturais, tem-se a maior procura por sucos de frutas. Contudo, o suco natural é tipicamente viscoso e turvo, tendendo a sedimentar durante o armazenamento (NAGAR *et al.*, 2012). Para que possa ser comercializado, é necessário primeiro clarificá-lo. A viscosidade e a turbidez são causadas principalmente pela presença de pectina, amido e compostos celulósicos e hemicelulósicos, assim, o uso de enzimas microbianas para processar esses polissacarídeos resulta em uma hidrólise eficiente, tornando o suco mais agradável ao paladar e estável para armazenamento (DAWOOD e MA, 2020). Logo, a β -mananase atua na fração da manana da hemicelulose, o que reduz a viscosidade do suco e libera a água retida, provocando um aumento no volume do suco, também. Mananases produzidas por *Lactobacillus plantarum* e por *Bacillus pumilus* são descritas em processos de clarificação de sucos de pêssego, laranja e maçã (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2017).

A mananase também participa da indústria do café, atuando na hidrólise do extrato. O principal resíduo produzido durante a produção do café solúvel é o café moído que consiste principalmente de polissacarídeos como galactomanana e celulose, e esses polissacarídeos não são solubilizados durante o processo de extração e, portanto, são deixados como sólidos insolúveis (DAWOOD e MA, 2020). Portanto, a aplicação de β -mananase é considerada eficaz na hidrólise e solubilização dos sólidos residuais, aumentando o rendimento dos solúveis em café instantâneo. Ao utilizar a β -mananase (Man1) em conjunto com outras enzimas, foi observado um efeito aditivo, e não sinérgico, sugerindo que a β -mananase desempenha um papel chave no aumento do rendimento de sólidos solúveis. Este rendimento é ainda mais elevado, com um aumento de 56%, quando um coquetel comercial de celulase é combinado com a β -mananase, destacando o potencial para melhorar o processamento do café solúvel (DAWOOD e MA, 2020).

Na indústria de biocombustível, a manana também possui importante papel, onde a produção de bioetanol é dividida em dois grupos: de primeira de segunda geração. O etanol de primeira geração é produzido através da fermentação de biomassa alimentar, semelhante ao processo usado na fabricação de vinho e cerveja. O etanol de segunda geração, por outro lado, é feito a partir da fermentação de biomassa lignocelulósica, que inclui partes mais fibrosas das plantas. No entanto, para fermentar esses materiais, é necessário um pré-tratamento para quebrar as paredes celulares resistentes das plantas, através de enzimas de microrganismos que decompõem os polissacarídeos das paredes celulares em açúcares simples. Como a manana é

um dos componentes da biomassa lignocelulósica, a adição de mananases no processo é de extrema importância, gerando manose, um açúcar que depois pode ser fermentado por leveduras para gerar etanol de segunda geração (DAWOOD e MA, 2020).

O processo de produção ecológico, a redução de resíduos, a economia de energia e o aumento da demanda industrial estão impulsionando o mercado de enzimas no Brasil. O aproveitamento de coprodutos agroindustriais para a produção de enzimas é vantajoso devido à sua riqueza em carbono, nitrogênio, vitaminas e minerais, sendo uma fonte de energia renovável, limpa, abundante e de baixo custo, além de reduzir impactos ambientais (REIS, 2022). A produção de mananases está especialmente ligada ao tratamento de coprodutos agroindustriais, pois as mananas, presentes em plantas e algumas algas, são essenciais na indução de enzimas por microrganismos, especialmente fungos (MOREIRA e FILHO, 2008). Essas enzimas facilitam a conversão de resíduos vegetais em açúcares simples, que podem ser usados em processos biotecnológicos, como a produção de biocombustíveis e produtos químicos de valor agregado (DAWOOD e MA, 2020). Assim, as mananases ajudam a reduzir a poluição e a gestão de resíduos, promovendo a eficiência econômica e contribuindo para a economia circular e a sustentabilidade ambiental.

3.3. AÇAÍ

3.3.1. Mercado e produção

O açaí (*Euterpe oleracea* Martius) é um fruto de grande importância na socio biodiversidade amazônica, estando profundamente ligado aos estilos de vida das comunidades extrativistas e aos hábitos culturais dos estados do delta do Amazonas (DE OLIVEIRA, TRUGILHO e DE OLIVEIRA, 2022). Além disso, o fruto é de suma importância na nutrição diária de populações ribeirinhas e na composição da renda de milhares famílias dessas regiões. Apenas no ano de 2022, o Brasil produziu 1,9 milhões de toneladas do fruto de açaí (IBGE, 2022). Na Amazônia, a agroindústria do açaí é responsável por aproximadamente 93% da produção extrativista vegetal não madeireira do Brasil, onde o estado do Pará é o principal produtor nacional (IBGE, 2022).

O principal produto da cadeia do açaí é o fruto, que passa por um processamento mecânico com água para separar o epicarpo (parte de interesse comercial) do mesocarpo e endocarpo, conhecidos como caroço ou semente, que são tratados como resíduos (DE OLIVEIRA, TRUGILHO e DE OLIVEIRA, 2022). Em muitas áreas rurais e urbanas da Amazônia, as sementes são lavadas, ensacadas e descartadas nos pontos de venda, onde,

geralmente, essas sementes são recolhidas pelo serviço de limpeza pública ou por empresas terceirizadas (DE OLIVEIRA, TRUGILHO e DE OLIVEIRA, 2022). As sementes representam até aproximadamente 85% da massa total do fruto, gerando uma grande quantidade de resíduos.

3.3.2. Descrição botânica

Segundo Nogueira *et al.* (2006), em termos morfológicos, essa espécie apresenta um caule do tipo estipe, geralmente multicaule na fase adulta (figura 12), com até 45 estipes por touceira. O caule é cilíndrico, anelado, ereto, fibroso e sem ramificações, podendo atingir até 30 metros de altura e um diâmetro de 12 a 18 cm.



Figura 12 - Palmeira de açai (*Euterpe oleracea*) - Fonte: palmeira-açai

O fruto é uma drupa globosa, pesando entre 0,8 g e 2,3 g, com diâmetro de 1 a 2 cm, verde brilhante quando imaturo e violáceo ou verde quando maduro, dependendo do tipo. O epicarpo é fino, com 1 a 2 mm de espessura, e a parte comestível varia de 5% a 20% do fruto, apresentando variações acentuadas, principalmente, devido ao genótipo da planta. A maior parte do fruto é representada pela semente, a qual possui um envoltório mesocárpico fibroso, endocarpo duro, embrião diminuto e endosperma abundante e ruminado, sendo recalcitrante (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

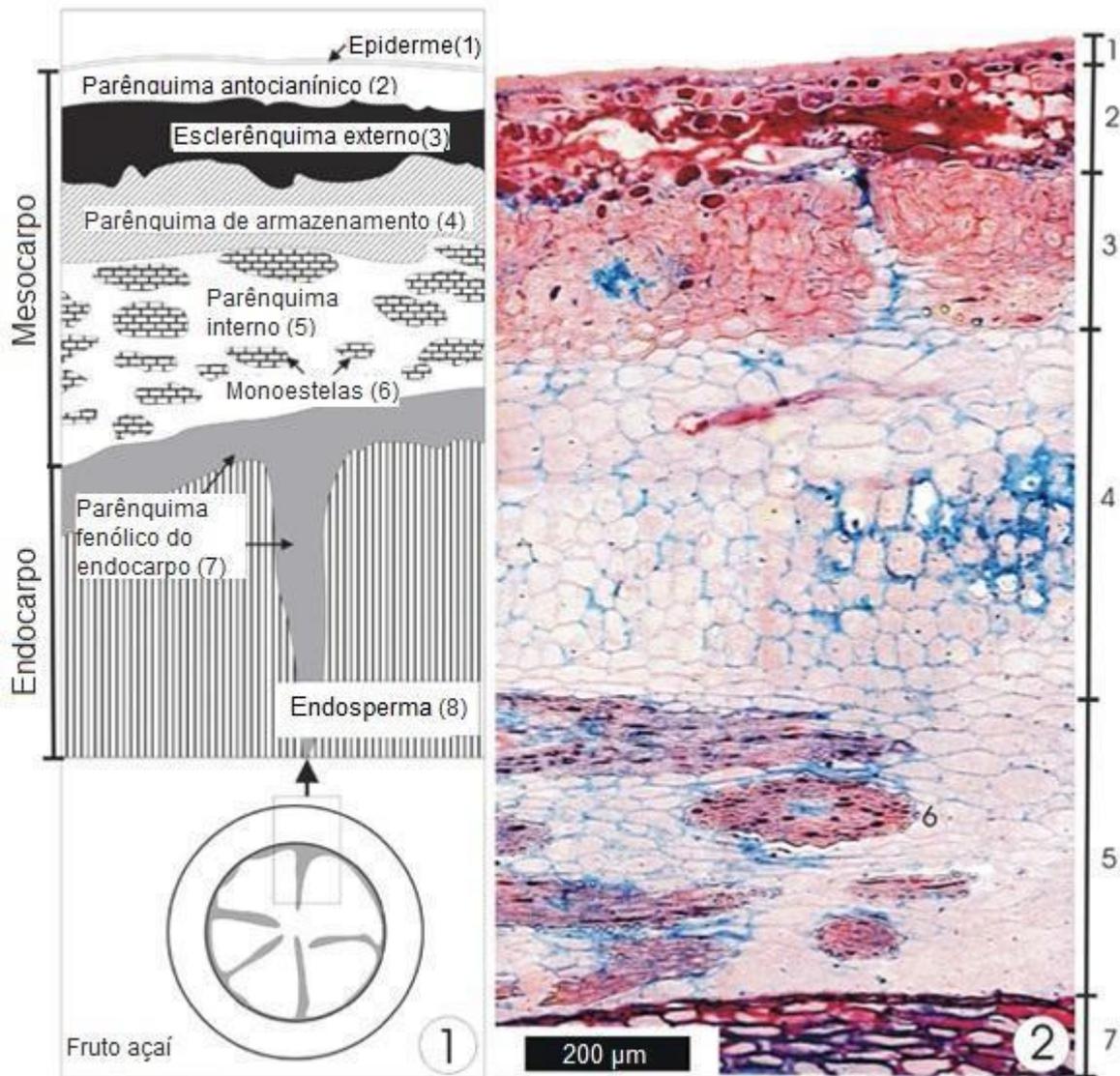


Figura 13 - Aspectos estruturais do fruto açai: 1) Diagrama da seção transversal do fruto, se tem respectivas estruturas indicadas; 2) Visão geral do pericarpo da fruta por microscopia. Adaptado de Pessoa *et al.* (2010)

Na figura 13, tem-se um detalhamento do mesocarpo e endocarpo do fruto do açai. De acordo com Pessoa *et al.* (2010), a epiderme e o parênquima antocianínico, ou externo, do fruto do açai são ricos em antocianinas. O parênquima é um tipo de tecido fundamental em plantas, composto por células vivas e paredes celulares finas. Essas células são bastante versáteis e desempenham várias funções essenciais, dependendo de sua localização e especialização dentro da planta e seiva elaborada. Ainda, na figura 13, tem-se o parênquima de armazenamento (4), o qual contém lipídios, e o parênquima interno que suporta os monoestelos, que são estruturas compostas por um único feixe vascular central onde encontram-se os tecidos vasculares responsáveis pelo transporte de água e nutrientes.

O endocarpo forma filamentos no endosperma, que são marrons no estado fresco e vermelhos escuros nas seções (PESSOA *et al.*, 2010). O parênquima interno é a parte interna do mesocarpo, e o endocarpo possui parênquima rico em compostos fenólicos e esclerênquima, que é um tipo de tecido vegetal especializado em fornecer suporte mecânico e resistência às plantas. As células do esclerênquima são extremamente rígidas e duras devido à deposição de lignina nas paredes celulares.

3.3.3. Semente de açaí

O processo tecnológico empregado para comercialização da polpa do fruto do açaí, acaba gerando um volume de resíduo 4,25 vezes maior do que a polpa obtida, sendo caracterizado pela semente, principalmente, mas também por fibras e sólidos retidos no processo de peneiramento, constituídos de partes da polpa do fruto. Considerando em torno de 5% de fibras, 4% de sólidos retidos e 70-85% da semente (PESSOA *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2019).

A semente de açaí possui um alto teor de carboidratos, sendo seu principal componente a manana. Entretanto, é possível encontrar na literatura diversos artigos que indicaram a celulose como principal polissacarídeo das sementes de açaí (ALTMAN, 1956, OLIVEIRA, KOMESU e FILHO, 2014; OLIVEIRA, KOMESU e FILHO, 2015; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2008). Monteiro e colaboradores (2019) sugeriram que tais informações contraditórias poderiam ser consequência do uso de métodos de caracterização química inespecíficos, que levaram à conclusão que o conteúdo de manana seria equivalente à celulose. Isso porque alguns métodos utilizados medem o teor de fibra total por gravimetria, ao invés de realizar a identificação dos açúcares monoméricos por cromatografia. Como, a manana das sementes de açaí é bastante resistente à hidrólise ácida diluída, devido a sua alta recalcitrância, é provável que tenha sido classificada por celulose por métodos gravimétricos, uma vez que todo o resíduo obtido após a hidrólise com ácido diluído é considerado celulignina e o percentual de hemicelulose é obtido por diferença. (MONTEIRO *et al.*, 2019).

Considerando os fatos supracitados, as caracterizações do fruto do açaí descritas por Monteiro *et al.* (2019) e Rambo, Schmidt e Ferreira (2015) mostram resultados coerentes entre si e a manana como polissacarídeo principal, variando cerca de 47 a 53%, além da presença de outros polissacarídeos como glucana, xilana, galactana e arabinana, respectivamente da maior concentração para a menor.

Tabela 2 - Dados da literatura de caracterização da semente de açai.

Material	Semente	Semente + fibra - Lote 1	Semente + fibra - Lote 2
Extrativos	9,50 ± 0,04	15,45 ± 0,95	9,89 ± 2,09
Cinzas	0,69 ± 0,04	0,61 ± 0,09	0,44 ± 0,02
Lignina	17,30 ± 0,33	18,34 ± 0,64	19,54 ± 1,56
Manose anidra	53,60 ± 0,05	47,09 ± 1,42	52,46 ± 1,51
Glicose anidra	8,66 ± 0,03	6,09 ± 0,67	8,40 ± 0,52
Arabinose anidra	0,69 ± 0,10	0,40 ± 0,02	0,63 ± 0,03
Xilose anidra	3,18 ± 0,40	1,83 ± 0,33	2,05 ± 0,22
Galactose anidra	1,43 ± 0,03	1,79 ± 0,21	1,51 ± 0,27
Total	95,05	91,6	94,92
Protocolo de caracterização	NREL/TP-510-42618		
Fonte	Rambo, Schmidt e Ferreira, 2015	Monteiro <i>et al.</i> ; 2019	

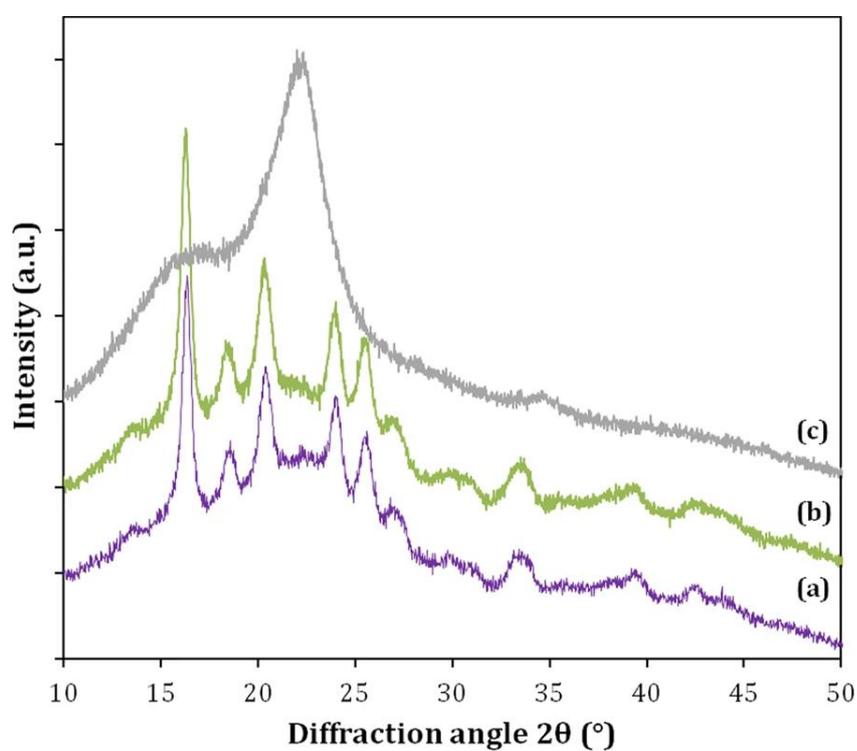


Figura 14 - Perfis de DRX das amostras moídas de (a) semente inteira de açaí; (b) caroço da semente de açaí e (c) fibras da semente de açaí. Retirado de Monteiro *et al.* (2019)

De forma a reiterar os valores indicados pela caracterização descrita na tabela 2, foi descrito no trabalho de Monteiro *et al.* (2019) o perfil de difração de raio x (DRX) de amostras de sementes inteiras (figura 14- a), caroço da semente (figura 14- b) e fibras de açaí (figura 14- c), onde as fibras da semente apresentaram padrão de difração típico da celulose I com dois picos em 2θ iguais a 16,0 e 22,0, que correspondem aos planos cristalinos da celulose 110 e 200, respectivamente, o que é coerente com o seu teor de glucana. Já as sementes não apresentaram pico de difração correspondente à celulose, o que confirma que a celulose não é seu principal polissacarídeo.

Adicionalmente, o perfil fenólico da semente de açaí é extremamente rico em procianidinas, que fazem parte da família dos flavonoides (BARROS *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2020). Esses compostos fenólicos possuem uma capacidade antioxidante particularmente alta, ajudando a proteger as sementes contra danos oxidativos durante o armazenamento e a germinação. Além disso, contribuem para a estabilidade das sementes, prolongando sua viabilidade, assim, aumentam a capacidade de germinação mesmo após longos períodos de armazenamento (DIXON e SARNALA, 2020; NETO *et al.*, 2023). A figura 15 apresenta a distribuição de procianidinas nas sementes, obtida por imageamento por espectrometria de massas, indicando a localização das procianidinas. Como o tecido da semente é dividido em embrião, endocarpo e tegumento, as imagens sugerem que as procianidinas estão presentes apenas no tegumento irregularmente desenvolvido dentro do endosperma (MARTINS *et al.*, 2020).

As sementes de açaí apresentam diversos tipos de procianidinas, incluindo monômeros de procianidina (flavan-3-ols-(+)-catequina e (-)-epicatequina) e oligômeros com grau médio de polimerização de cerca de 10 (MARTINS *et al.*, 2020).

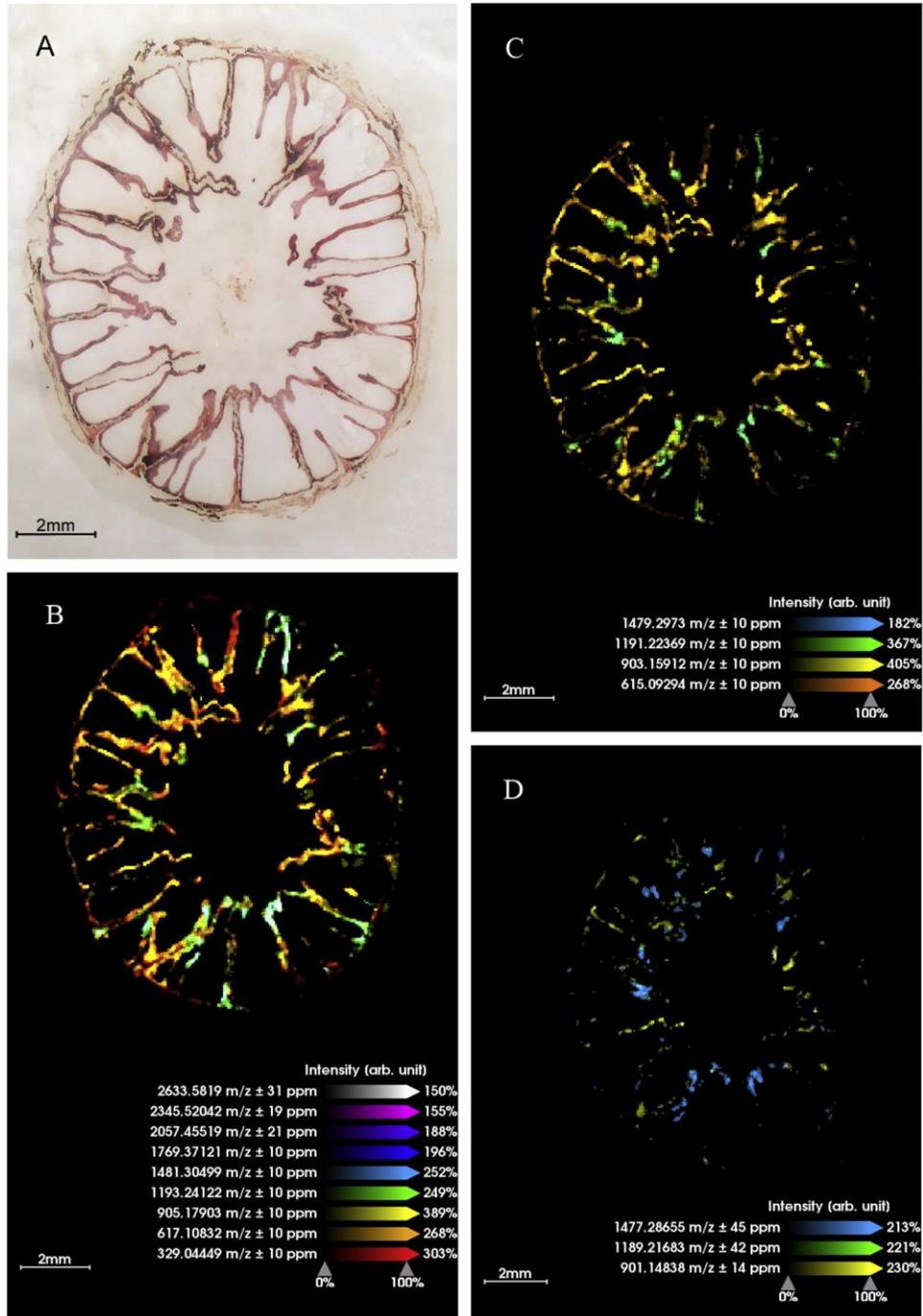


Figura 15 - Identificação e distribuição espacial de procianidinas em sementes de açai pelo MALDI-MSI. A: imagem histológica; B – D: sobreposições de pico de procianidina tipo B; Sobreposições de pico de procianidina tipo A com uma ligação interflavan e sobreposições de pico de procianidina tipo A com duas ligações interflavan. Retirado de Martins *et al.* (2020).

3.4. JUÇARA (*Euterpe edulis*)

3.4.1. Mercado e produção

Desde a década de 1960, a palmeira de juçara (*Euterpe edulis* Martius) tem sido amplamente utilizada para a produção de palmito, sendo um dos mais importantes produtos florestais não madeireiros (PFNMs) brasileiros por sua qualidade e sabor superiores aos das demais espécies do gênero *Euterpe* (DE MELLO, ROSA e SIMÕES, 2022). Porém, a palmeira juçara é uma espécie monocaule (figura 16), ou seja, para a produção de palmito é necessário sacrificar a palmeira inteira. Dessa forma, a exploração desenfreada levou a espécie a ser incluída na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção na categoria vulnerável (BRASIL, 2008, 2014) e por isso a sua exploração desde 2008 ficou proibida. Entretanto, essa espécie ainda sofre a extração ilegal devido ao valor agregado ao seu palmito.



Figura 16 - Palmeira de juçara com frutos. Retirado de EMBRAPA (2022)

Em vista disso, na última década, foi iniciado um grande incentivo à exploração da produção de sua polpa, provocando uma mudança no uso econômico da espécie e revolucionando o papel socioeconômico e ecológico dessa palmeira. Assim, tem-se estímulo ao plantio da palmeira e colheita de frutos, e então, a espécie passa de um quadro de quase extinção para um forte potencial de manejo sustentável. A palmeira de juçara é encontrada em florestas das regiões Sul e Sudeste do Brasil, com produção expressiva no Estado de Santa Catarina. Um exemplo é a produção de juçara no Vale do Itajaí, no Estado de Santa Catarina,

majoritariamente conduzido por empreendimentos de agricultura familiar, favorecendo a parte socioeconômica da produção do fruto (TROIAN, 2014).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) não realiza levantamento de dados de produção do fruto da juçara, mas segundo dados do CONAB (2021), em ordem decrescente de produção do fruto de juçara, tem-se, os Estados de Santa Catarina, São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Segundo a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de SC (Epagri), estima-se que sejam processadas anualmente de 150 a 200 mil kg de frutos de juçara (equivalentes a 500-600 mil tigelas de açaí de 300 g). No Vale do Ribeira (SP), a estimativa de produção anual é de 665 a 1.746 kg de polpa de juçara (CONAB, 2021). No litoral do Rio Grande do Sul (Maquiné, Caraá e Três Cachoeiras) a produção estimada é de 28,5 mil kg de polpa.

A demanda pela polpa dos frutos da juçara para a preparação de diversos produtos tem aumentado devido ao seu alto potencial energético e sabor distinto. Seu processo de obtenção da polpa é o mesmo passado pela polpa de açaí e suas características nutricionais também são comparáveis (TROIAN, 2014).

3.4.2. Descrição botânica

A palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) ocorre no domínio morfoclimático da Floresta Atlântica do Brasil e áreas subjacentes, em altitudes entre o nível do mar e 100 m, nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, alcançando, também, o nordeste da Argentina e o sudeste do Paraguai (EMBRAPA, 2022).

O indivíduo adulto de *E. edulis* possui um estipe solitário (caule único), ou raramente em touceiras, ereto, com 5 a 12 metros de altura. Tem entre 8 e 15 folhas que medem de 0,8 a 1,4 metros de comprimento, variando em coloração de verde oliva a verde escuro, às vezes com manchas avermelhadas ou alaranjadas. As inflorescências infrafoliares (figura 17) têm cerca de 1 metro de comprimento e ficam em uma posição medianamente horizontal durante a fase de abertura dos botões florais (antese), com pedúnculos (hastes que sustentam as flores, e posteriormente os frutos, de uma inflorescência) de 4 a 8,5 cm de comprimento (EMBRAPA, 2022).

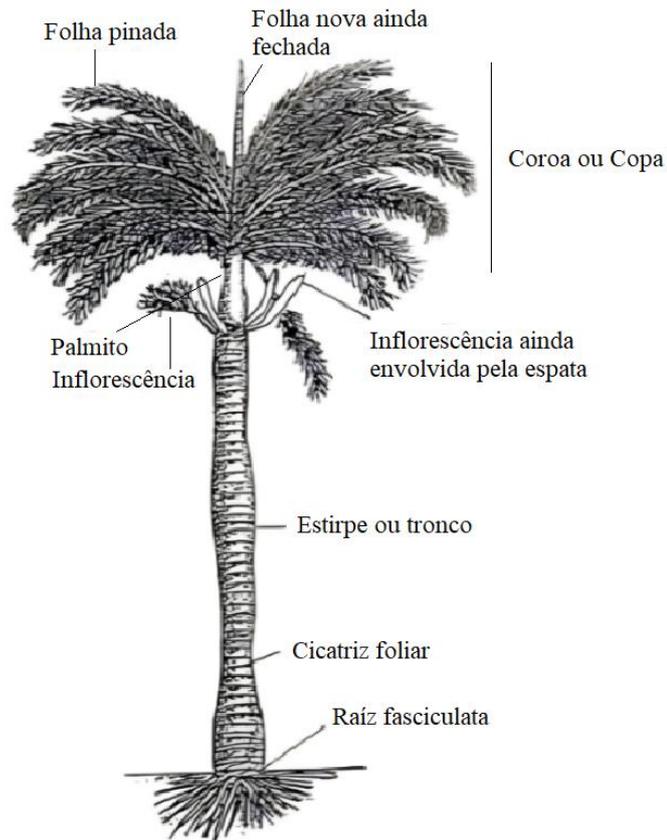


Figura 17 - Nomenclatura de uma palmeira. Adaptado de Sodré (2005)

Os frutos de *E. edulis* têm entre 1 e 1,4 cm de diâmetro e se formam em infrutescências (cachos de frutos) derivadas das inflorescências. São esféricos, sem pelos, e de cor quase preta ou negro-brilhante quando maduros (figura 18). O pericarpo envolve a semente de forma contínua, apresentando um formato de anel na periferia do fruto em corte transversal. O epicarpo é membranáceo e o mesocarpo é carnoso e muito fino, composto por tecido parenquimático rico em óleos e pigmentos, sendo um alimento muito apreciado pela fauna (EMBRAPA, 2022).



Figura 18 - Semente de juçara inteira. Autoria própria.

3.4.3. Semente de juçara

Após o processamento da retirada de polpa de juçara (figura 19), a maior parte dos sólidos residuais é a semente, assim como o açaí, uma vez que correspondem à parte majoritária do fruto (cerca de 80%). Assim como para o açaí, considerando em torno de 5% de fibras, 4% de sólidos retidos e 70-85% da semente, o presente trabalho tratará o resíduo provindo do processamento do fruto de juçara como semente, por sua porcentagem majoritária e seu processamento sem distinção das outras partes.



Figura 19 - Despulpamento do fruto de juçara. Retirado de Embrapa (2022)

As principais reservas no endosperma de juçara são lipídios, proteínas e hemiceluloses, onde lipídios e proteínas estão no citoplasma como corpos proteicos e lipídicos, e as hemiceluloses, principalmente mananas, formam as paredes celulares espessadas. A manana é a principal reserva presente na parede celular, confere dureza e proteção ao embrião em formação. No entanto, essa resistência mecânica exercida pela manana resulta em um longo período de germinação, pois requer esforços consideráveis de crescimento por parte do embrião (BUCKERIDGE, 2010; MOURA *et al.*, 2019; DE MELLO, 2022).

As sementes de juçara, assim como as de açaí, são classificadas como recalcitrantes. A recalcitrância está ligada a alta umidade relativa de uma semente, onde possuem necessariamente um teor de água elevado, precisando manter a hidratação para manter a sua viabilidade e germinação (DE MELLO, 2022). A recalcitrância se relaciona com a presença de carboidratos insolúveis. No caso de sementes, esses carboidratos geralmente podem ser armazenados em formas que não se movem facilmente dentro da célula, e a estrutura

proporcionada pelos mesmos contribuem para uma alta resistência física da semente, protegendo-a contra estresses mecânicos e desidratação. Assim, em ambientes onde existe uma variação expressiva de umidade, os carboidratos insolúveis ajudam a manter a forma da semente.

A maior parte do perfil fenólico da semente de juçara é encontrado na forma insolúvel ligado aos carboidratos (89% dos compostos totais da semente). Diferentemente da sua polpa, o principal composto fenólico da semente é o ácido 4-hidroxibenzoico, representando 79% do teor total de compostos fenólicos (INADA *et al.*, 2015). O conteúdo fenólico total da semente é em torno de 47 mg/ 100 g de massa seca. No entanto, vale ressaltar que não existem muitos dados sobre a composição fenólica de semente de juçara na literatura.

3.5. BIOPROCESSO SUBMERSO

Um bioprocessamento é um conjunto de técnicas em que se utiliza de organismos vivos ou produtos formados por eles, como enzimas, para produzir substâncias ou realizar transformações bioquímicas. Esses processos são essenciais em várias indústrias, como farmacêutica, alimentícia, de bebidas, biocombustíveis e produtos químicos (TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Os bioprocessos podem ser divididos em várias etapas principais, como a preparação do meio de cultura, na qual se consiste em preparar o ambiente no qual os organismos irão crescer, fornecendo nutrientes essenciais, etapa de inoculação, que é a introdução dos organismos ou células no meio de cultura preparado, fermentação ou bioconversão, etapas onde ocorre a produção do produto desejado por meio da atividade metabólica dos organismos, podendo ocorrer em condições aeróbicas ou anaeróbicas, dependendo do tipo de processo (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2008; KASCHUK, 2019; VÉLEZ-MERCADO *et al.*, 2021). Além da recuperação e purificação do produto final desejado, como também a análise e controle do processo é essencial para obtenção de condições ótimas e produto final de qualidade. Ademais, são processos que proporcionam métodos sustentáveis e eficientes.

A fermentação submersa (FS) ou bioconversão submersa é muito utilizada para a produção de enzimas, incluindo as mananases (BORIN *et al.*, 2015). É um modo específico de produção onde os microrganismos crescem em um meio líquido, que contém nutrientes dissolvidos. Esse tipo de processo oferece vantagens como a facilidade de controle dos parâmetros operacionais, como agitação, aeração, pH, temperatura, concentração de oxigênio

dissolvido, entre outros fatores (DA SILVA, 2023). Além da facilidade de escalonamento para produção em larga escala, tornando-a industrialmente mais viável.

3.6. FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos são um grupo de fungos que crescem formando filamentos, ou seja, formando as hifas. Essas hifas se entrelaçam para formar uma estrutura chamada micélio, que é visível a olho nu. Eles são diferentes dos fungos unicelulares, como as leveduras, por sua estrutura multicelular e modo de crescimento.

Diversos microrganismos produzem mananases, incluindo bactérias, leveduras e fungos. Entre as bactérias, as mananases são comuns em bactérias Gram-positivas, como várias espécies de *Bacillus* (VAN ZYL *et al.*, 2010). Nos fungos, as mananases foram isoladas de espécies como *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, os quais possuem níveis de atividades de mananases que variam significativamente entre si (MARCUS, 2014; BLIBECH *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2004).

Dentre os fungos do gênero *Aspergillus*, a espécie *Aspergillus niger* foi identificada como a melhor produtora de mananases extracelulares (ALSARRANI, 2011; NUNES, 2019). É reconhecida como uma das espécies de microrganismos mais importantes utilizados na biotecnologia, sendo utilizada há algumas décadas para a produção de enzimas extracelulares e ácido cítrico, os quais são considerados substâncias seguras pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos. Também é popular pela utilização em biotransformações e tratamentos de resíduos (SCHUSTER, 2002).

3.6.1. *Aspergillus niger*

O nome *A. niger* foi preservado por razões econômicas e de recuperação de informações, apesar de nomes mais antigos. Consensos taxonômicos baseados em dados moleculares identificam *A. tubingensis* como a única outra espécie comum intimamente relacionada na série *Aspergillus nigri*. *A. niger* cresce na poeira doméstica, no solo e em matéria vegetal em decomposição, incluindo alimentos estragados. Como outros fungos filamentosos, deve ser manuseado com cuidado para evitar a formação de pó de esporos e ser inalado, contudo, não traz problema significativo de alergia ou micopatologia comparado a outros fungos filamentosos (SCHUSTER, 2002).

Na figura 20, é possível observar o corpo frutífero do fungo *Aspergillus niger*, na ponta de um conidióforo, onde as pequenas esferas são os esporos, suas células reprodutivas. E ao fundo, é possível observar as hifas, que são uma rede de filamentos vegetativos.

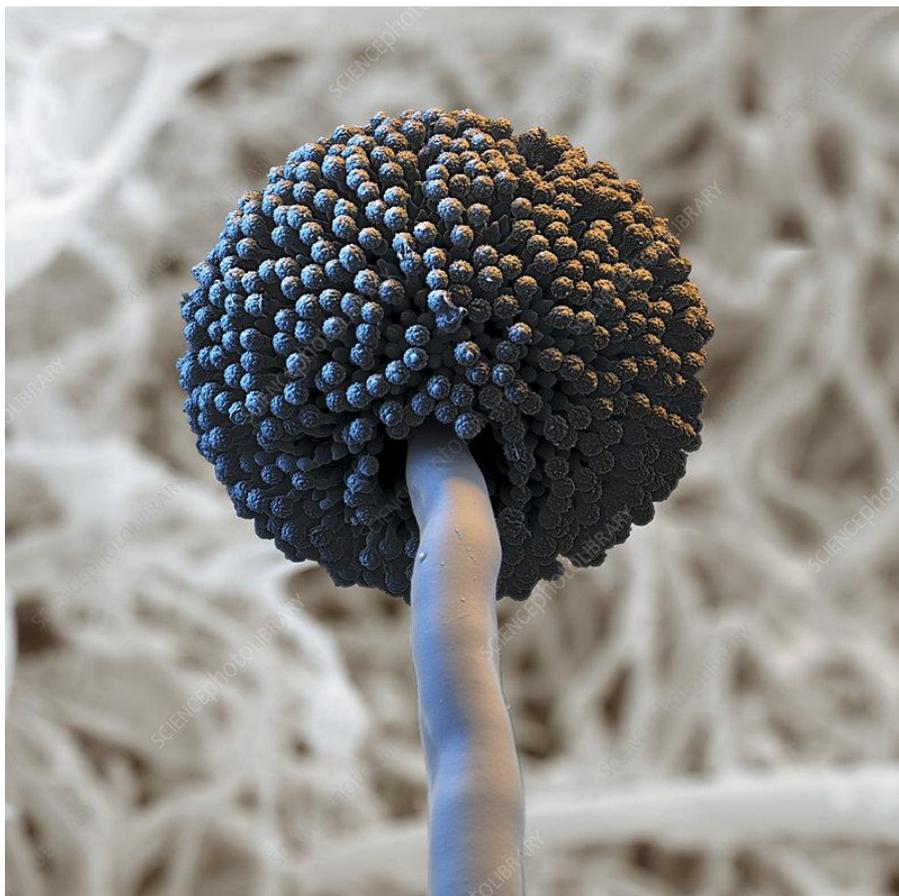


Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura colorida (MEV) de corpo frutífero do fungo *Aspergillus niger*, na ponta de um conidióforo. Retirado de SCIENCE PHOTO (2024)

O *A. niger* é reconhecido por secretar extracelularmente uma variedade de enzimas capazes de catalisar a hidrólise de coprodutos vegetais em açúcares. Ademais, muitas enzimas produzidas pelo *A. niger* são classificadas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*, termo em inglês) pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, ou seja, são consideradas seguras desde que cepas não patogênicas e não toxigênicas sejam utilizadas e que boas práticas de fabricação sejam seguidas (SCHUSTER *et al.*, 2002).

Com relação a produção de mananases a partir de um coproduto agroindustrial rico em manana, o metabolismo do *Aspergillus niger* envolve uma série de processos bioquímicos complexos e altamente regulados. A produção de enzimas é regulada geneticamente, onde a presença de manana no meio induz a expressão de genes que codificam para mananases, assim, reguladores transcricionais específicos reconhecem a presença de manana ou seus produtos de degradação e ativam a transcrição desses genes. As enzimas são secretadas extracelularmente, onde a eficiência da produção enzimática pode ser influenciada por vários fatores ambientais,

como pH, temperatura e, principalmente, disponibilidade de nutrientes e concentração de oxigênio. O ajuste ótimo desses fatores pode maximizar a produção de enzimas.

4. METODOLOGIA

4.1. Sementes de juçara e açaí

As sementes de juçara e açaí foram cedidas pelas empresas Silo - Arte e Latitude Rural (Serra da Mantiqueira, Brasil) e Açaí Amazonas Ltd (Óbidos, Pará, Brasil), respectivamente. As sementes foram pré-tratadas em moinho de facas modelo P19 – (Fritsch, EUA) (figura 21) de modo a preparar e selecionar partículas menores do que 2 e 1,5 mm, respectivamente. Essas granulações foram utilizadas na extração a partir de solventes orgânicos e na produção enzimática. Além disso, foram secos à temperatura ambiente até a umidade atingir valores próximos ou abaixo de 10%, para caracterização química.



Figura 21 - Moinho de facas (Fritsch - P19), localizado no Laboratório de Bioetanol na UFRJ.

4.2. Caracterização do coproduto agroindustrial

O procedimento de caracterização foi realizado de acordo com os trabalhos realizados por Moore e Johnson (1967), pelo protocolo ASTM E1758-01 (2003) e Milne *et al.* (1992).

4.2.1 Análise do teor de extrativos

Inicialmente, o coproduto foi sujeito à análise do teor de extrativos, onde uma amostra sólida de aproximadamente 5,0 g foi tratada com solvente em duas fases distintas por meio de um extrator Soxhlet contendo cartuchos de celulose, aquecido em manta de aquecimento. A primeira fase de extração foi a partir da utilização de água por um período de 8 horas e a segunda fase consistiu no uso de etanol 96% (p/v) durante 8 horas. A quantidade de substâncias extraíveis foi determinada por diferença de massa, em relação à massa inicial, após a secagem do material na estufa a vácuo a 35°C durante 48 horas, seguindo os procedimentos analíticos padrão para a determinação de substâncias extraíveis em biomassas, conforme adotado pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (SLUITER *et al.*, 2008). O cálculo para a determinação do percentual de extrativos (%E) é representado pela equação 1.

$$\%E = 100 - \left(\frac{m_{\text{filtro+am sem ext.}} - m_{\text{filtro}}}{(m_{\text{filtro+am}} - m_{\text{filtro}}) * \left(1 - \frac{\%umidade}{100}\right)} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

No qual m_{filtro} representa a massa do filtro de celulose vazio, $m_{\text{filtro+am}}$ representa a massa do filtro de celulose somado a massa de amostra adicionada, %umidade representa o percentual de umidade da amostra que foi adicionada ao filtro de celulose e, finalmente $m_{\text{filtro+am sem ext}}$ representa a massa do filtro somada a massa de amostra sem extrativo que pode ser obtida após a secagem do conjunto a vácuo.

Após o processo de secagem do material, a composição de carboidratos e lignina do material sólido foi determinada seguindo os procedimentos analíticos recomendados pelo NREL (SLUITER *et al.*, 2008).

4.2.2 Hidrólise ácida do coproduto agroindustrial para caracterização química

Para realizar a hidrólise ácida, inicialmente foram utilizados 0,3 g da amostra e 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p) a uma temperatura de 30 °C por 1 hora para a etapa de hidrólise ácida. Em seguida, a mistura foi diluída com 84,0 mL de água ultrapura, resultando em uma concentração de ácido de 4% (p/p), e esta solução diluída foi autoclavada a 121°C por 1 hora na seguinte etapa da hidrólise ácida. Após o resfriamento, a mistura foi filtrada a vácuo. Após as duas etapas de hidrólise ácida, a fração solúvel foi neutralizada usando carbonato de cálcio (Merck) até o pH atingir valores entre 6 e 7. A fração sólida foi separada por filtração com cadinhos filtrantes por bomba à vácuo. A fração líquida foi filtrada em filtro de membrana de

PTFE para ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nesta fração foram quantificadas as concentrações de açúcares monoméricos presente na amostra.

4.2.3 Análise do teor de sólidos insolúveis

O sólido obtido durante a hidrólise ácida é utilizado na determinação da quantidade de lignina insolúvel utilizando técnica de gravimetria. O sólido remanescente é desidratado em um forno a 105 °C durante 24 horas. Para calcular a proporção de lignina insolúvel em ácido, é essencial levar em conta a porção sólida restante, composta pela soma do percentual de lignina insolúvel em ácido e pelo conteúdo total de cinzas do material, como mostra na equação 2.

$$\%Resíduo\ sólido = \%Lignina_{insolúvel} + \%Cinzas \quad \text{Eq. 2}$$

O teor de cinzas totais foi determinado pela calcinação de 1 g de amostra extraída em um forno mufla a 575 ± 25 °C durante 6 h, de acordo com o procedimento adotado pelo NREL (SLUITER *et al.*, 2005). Todas as amostras foram quantificadas em triplicata. As equações usadas para determinar o percentual de lignina insolúvel e cinzas totais foram calculadas pelas equações 3 e 4 respectivamente.

$$\%Lignina_{insolúvel} = \left(\frac{m_{cad+residuo} - m_{cad}}{massa\ da\ amostra_{seca}} \right) - \%Cinzas \quad \text{Eq.3}$$

$$\%Cinzas = \frac{m_{cad+residuo} - m_{cad}}{massa\ da\ amostra_{seca}} \quad \text{Eq. 4}$$

O termo m_{cad} , se refere a massa do cadinho vazio e seco, $m_{cad+residuo}$ representa a massa do cadinho seco contendo o resíduo após secagem e o termo $m_{cad+cinzas}$ se refere a massa do cadinho somada as cinzas obtidas após a calcinação.

4.2.4 Análise da composição de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência

Na determinação da concentração dos açúcares monoméricos (monossacarídeos solúveis), celobiose, açúcares totais (monossacarídeos e oligossacarídeos) proveniente de procedimentos de hidrólise ácida e enzimática, foram identificados e quantificados por meio de

HPLC. No estudo foi utilizado um *HPLC ULTIMATE 3000*, *Thermo Scientific* - E.U.A., apresentada na figura 11, equipada com um detector de índice de refração, *RefractorMax*, com software *Chromeleon 7.1* (*Dionex Ltd.*, Canadá). O software utilizado foi o *Chromeleon 7.1*. As colunas utilizadas consistem em uma pré-coluna *deashing* (4.6 mm I.D. × 30 mm, BioRad, EUA), uma pré-coluna *Aminex Carbo P* (4.6 mm I.D. × 30 mm, BioRad, EUA), e uma coluna analítica *Aminex HPX-87P* (7.8 mm I.D. × 300 mm, BioRad, EUA). Os parâmetros cromatográficos adotados águas deionizadas (Milli-Q) grau reagente tipo I (18 MΩ-cm de resistividade), filtrada em filtro de 0,2 μm com um fluxo de 0,6 mL por minuto; temperatura do forno (apenas para coluna analítica): 80°C; temperatura do *Post-Column Cooler*: 45 °C; temperatura do amostrador automático: 15 °C; temperatura do detector: 45 °C e tempo de corrida: 25 min.

Para a correção de possíveis perdas de carboidratos durante as etapas de autoclavação durante a hidrólise ácida, foram feitos padrões de recuperação, onde a correção foi calculada pelo percentual de recuperação de açúcares, descrito pela equação 5.

$$\%Rec_{açúcares} = \frac{Conc.detectada\ pelo\ HPLC}{Conc.conhecida\ antes\ da\ hidrólise} * 100$$

Eq. 5

Como na biomassa os carboidratos estão presentes em sua forma polimérica, torna-se necessário aplicar um fator de correção para que haja correspondência entre as formas monoméricas e poliméricas. Este fator é igual a 0,88 (ou 132/150) para açúcares de 5 carbonos ou 0,90 para açúcares de 6 carbonos. O cálculo deste fator se baseia na perda de uma molécula de água para cada ligação. Sendo assim, pela equação 6, tem se:

$$C_{anidro} = C_{x,açúcar} * fator\ de\ correção \quad Eq. 6$$

Para o cálculo do percentual de cada açúcar nas amostras foi utilizada a equação 7.

$$\%Açúcar_{sem\ extrativo} = \%Açúcar_{sem\ extrativo} * \left(\frac{100 - \%Extrativos}{100} \right)$$

Eq. 7

4.3. Extração a partir de solventes orgânicos

Para a extração exaustiva, foram realizadas 6 extrações sequenciais a partir do mesmo coproduto. Todas as extrações foram realizadas com 12,5% de sólidos (m/v) em um *shaker* aclimatado a 55°C, sob agitação orbital a 120 rpm, durante 60 minutos. As cinco primeiras extrações foram realizadas utilizando etanol 65% (v/v) como solvente, enquanto a última foi realizada com acetona 70% (v/v). Após cada extração, o material foi filtrado a vácuo em membrana de fibra de vidro. O material vegetal foi lavado, recuperado e utilizado na extração seguinte. Após as extrações, o material foi seco à temperatura ambiente.

As frações líquidas resultantes da primeira extração etanólica de ambas as sementes foram concentradas em rotavapor *Büchi® Rotavapor® RII*, de modo a se obter 3 concentrações diferentes a partir de cada extrativo. Para o extrato etanólico de açaí foi obtido um extrato 1 vez concentrado, 2 vezes e 4 vezes. Para o extrato etanólico de juçara foi obtido um extrato 1 vez concentrado, 4 vezes e 5,7 vezes.

4.4. Manutenção e propagação de esporos de *Aspergillus niger*

A suspensão de esporos dos fungos *Aspergillus niger* 1234 e 205 (CFAM/Fiocruz - coleção de fungos da Amazônia) foram obtidos a partir de esporos armazenados em meio Castellani, após o cultivo em placas de Petri com meio sólido PDA (*Agar Potato Dextrose*) a 30°C por 9 dias. A suspensão de esporos foi preparada a partir de uma raspagem das placas com alças estéreis e solução salina esterilizada (NaCl 0,9%). Em seguida, foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos, a fase líquida foi descartada e os esporos foram acondicionados em solução glicerol 20%, na proporção de 1mL de suspensão de esporos para 5 mL de solução de glicerol e armazenados em tubos criogênicos a -20°C.

A contagem de esporos foi realizada na câmara de Neubauer através de microscopia óptica.

4.5. Bioprocesso submerso

O pré-inóculo foi cultivado em 2 dias com 1% (v/v) de suspensão de esporos (acima de 10^7 conídios/mL) como inóculos a 30 °C, sob agitação de 200 rpm. Após esse período as enzimas foram produzidas em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo com 40 g/L da fonte de carbono e 5 g/L do extrato de levedura com 10% (v/v) de pré-inóculo durante 7-10 dias, nas mesmas condições de temperatura e agitação do pré-inóculo (NUNES, 2019).

A cada 24 horas foram retiradas alíquotas dos meios de produção enzimática e por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos, foram separados o extrato bruto do meio da biomassa fúngica e coproduto. Em seguida, o sobrenadante foi acondicionado em -20°C para posterior determinação da atividade enzimática de mananases.

4.6. Dosagem atividade enzimática

A dosagem de mananases foi quantificada por meio da liberação de açúcares redutores totais utilizando o reagente de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) que consiste na reação equimolar dos açúcares redutores liberados da hidrólise do substrato pelas mananases com o DNS (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (MALDONADE *et al.*, 2013).

Na dosagem de atividade enzimática foi utilizado LBG (*Locust bean gum*) (Sigma Aldrich) a 0,5% (m/v) como substrato em tampão citrato 50 mM com um pH 4,8. O substrato ficou sob agitação a 100 rpm a 50°C durante 2 horas, após esse período manteve-se em agitação overnight à temperatura ambiente. Em seguida, o substrato foi centrifugado durante 10 minutos a 5000 rpm para remover a parte insolúvel presente e em seguida ele foi acondicionado a -5°C. Os extratos brutos da produção foram incubados a 50°C com o substrato na razão 1:1 durante 10 minutos, no final desse tempo foi coletado um ponto de 0,5 mL da mistura reacional. Em cada ponto foi adicionado 0,5 ml de reagente de DNS e em seguida foi levado para aquecimento a 100°C por 5 minutos. Após ser aquecido foi adicionado 6,5 ml de água para a leitura da absorbância a 540nm no espectrofotômetro (STALBRAND *et al.*, 1993, ALSARRANI *et al.*, 2011).

A concentração de açúcares redutores totais liberados foi calculada pelo fator de conversão obtido na curva padrão de manose e a determinação da atividade enzimática de mananases foi calculada de acordo com a equação 8, onde uma unidade internacional (UI) corresponde a 1µmol de produto gerado por minuto, em condições de velocidade inicial.

$$AE \left[\frac{UI}{mL} \right] = \frac{D \cdot \Delta \cdot Vr (mL)}{fc \left(\frac{abs}{\mu mol \cdot mL} \right) \cdot t (min) \cdot Ve (mL)}$$

Eq. 8

4.7. Determinação da inibição em placa de 97 poços

A concentração inibitória mínima dos extratos brutos de açaí e juçara contra o *Aspergillus niger* 1234 foi obtida usando o método de microdiluição seriada CLSI (M27-A3/M27-S3) com alterações (SILVA *et al.*, 2018). Inicialmente, foi realizado o crescimento do fungo filamentososo em placa de Petri com meio PDA a 25 °C por 7 dias. Então, após o crescimento e esporulação efetiva, foi preparado uma suspensão de esporos em água destilada estéril, que foi filtrada em tecido *Miracloth*® e teve sua concentração corrigida para 10⁴ conídios/mL por contagem em câmara de Neubauer.

Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 50 µL de caldo batata dextrose (BD), 100 µL da suspensão de esporos e 50 µL da amostra, sendo a absorvância em 600 nm lida nos tempos inicial e final dos ensaios. As microplacas foram incubadas 25 °C por 48 horas. Cada concentração dos extratos brutos de açaí (1x, 2x e 4x) e juçara (1x, 4x e 5,7x) foram avaliadas em octuplicata, sendo usados controles de meio de cultivo não inoculado e do fungo. A indicação do extrato bruto concentrado inibidor é considerada a menor concentração em que não se detecta crescimento fúngico por turbidez do poço inoculado e/ou que não se tenha diferença estatística entre a absorvância inicial e final do experimento. Foram lidas as absorvâncias em 0 horas, 24 e 48 horas.

Após as 48 horas, foram retiradas alíquotas dos poços e passadas para placas de Petri com meio PDA, sendo mantidas em temperatura ambiente até 7 dias, de modo a avaliar o crescimento dos poços controles e inoculados com os extratos.

4.8. Teste de inibição em poços em placas de PDA

Foi avaliada a atividade inibitória dos extratos de açaí e juçara por perfuração em meio de PDA em placas de Petri. Inicialmente, foi realizada a remoção do meio de cultura sólido com auxílio de um objeto cilíndrico estéril de 5-6 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais foram preenchidos com os extratos de açaí e juçara em suas respectivas concentrações (MOODY *et al.*, 2004). Como controle negativo foi adicionado água estéril em um dos poços. A disposição dos poços é demonstrada na figura 22. As placas foram inoculadas com *Aspergillus niger* 1234.

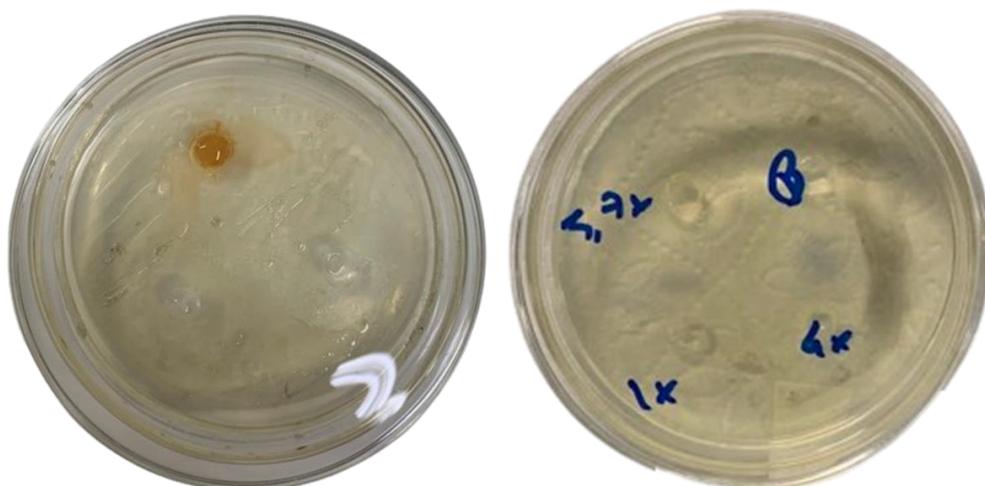


Figura 22 - Placas de Petri com meio PDA com perfurações preenchidas por extratos de açaí e juçara, respectivamente, e com água estéril como branco, inoculadas com *Aspergillus niger* 1234.

4.9. Acompanhamento de crescimento de biomassa

Para a determinação da massa de biomassa fúngica obtida na produção enzimática foram utilizados frascos de *Erlenmeyers* de sacrifício, ou seja, cada dia foi um ambiente único de produção. Para tanto, os béqueres foram secos a 105°C por 24 horas e após esse período foram pesados em balança analítica. Em seguida, foram transferidos os volumes totais do meio, no caso, 50 mL de cada frasco de *Erlenmeyer*, para dois tubos Falcon de 50 mL cada, e centrifugados em 6000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi estocado para análises de atividade enzimática e pH, e o precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado novamente. O processo de lavagem foi realizado em triplicata.

Em seguida, a biomassa lavada foi transferida para os béqueres previamente secos e pesados e levadas para secagem na mufla à 105°C por 24 horas. Após esse tempo, os béqueres contendo biomassa (valor de biomassa do fungo + massa da fonte de carbono) foram pesados em balança analítica. Foi realizada a digestão ácida da biomassa do fungo utilizando a solução de Ácido acético (80%) + Ácido nítrico (100%) na proporção de 10:1 (7,5 mL de solução para 50 mL de amostra) em banho maria a 100°C por 30 minutos, dentro da capela de exaustão. O tempo de degradação do fungo foi contado a partir do momento em que foi atingido a temperatura de 100 °C. A amostra digerida foi transferida para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas nas mesmas condições supracitadas. O sobrenadante foi desprezado e o corpo de fundo foi lavado com água destilada e centrifugar novamente, onde esse processo foi realizado em triplicata.

A massa resultante foi transferida novamente para os béqueres e secas na mufla à 105°C por 24 horas. Após a secagem os béqueres foram pesados para quantificação da massa seca (massa da fonte de carbono). A determinação da massa seca de fungo (DWF - *Dry Weight of Fungus*, termo em inglês) é calculada pela diferença de peso, como mostra a equação 9.

$$M_{biomassa} = (m_{b\u00e9quer} + biomassa + coproduto - m_{b\u00e9quer}) - (m_{b\u00e9quer} + coproduto - m_{b\u00e9quer})$$

Eq. 9

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da semente de juçara e açai

No início deste trabalho, não se tinha na literatura dados da caracterização para a semente de juçara. Então, inicialmente, foi realizada a caracterização da composição química da semente de juçara com a finalidade de analisar a sua adequação como fonte de carbono para a indução da produção mananases. Para a semente de açai, foram utilizados os dados de caracterização apresentados na tabela 2 da seção 3.3.3, de um trabalho recente do grupo (MONTEIRO *et al.*, 2019).

Analisando macroscopicamente as sementes, foi observado que a semente de juçara é envolta por uma camada de fibra (figura 23-a) onde sua massa média é de 0,77 g ± 0,25, as amostras variaram de 0,31 a 1,12 g. Para as sementes inteiras de açai (figura 24-a) os valores reportados são de 0,78 g ± 0,12 (MONTEIRO *et al.*, 2019), de modo que pelas semelhanças botânicas é esperado a similaridade entre os valores. O percentual de massa de fibra de açai (figura 24-c) em relação à semente inteira (figura 24-a) é equivalente a 5,97% ± 1,45 (MONTEIRO *et al.*, 2019). Para todas as metodologias empregadas, as sementes de juçara e açai passaram por moinho de facas apresentando a granulação indicada na figura 23-d e 24-d, respectivamente.

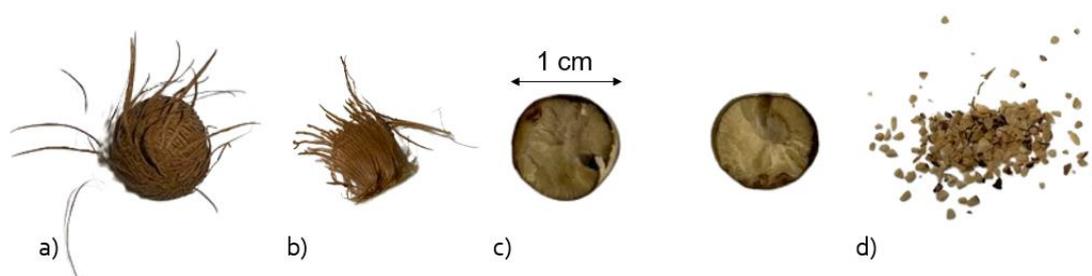


Figura 23 - Amostras de sementes de juçara: (a) semente inteira; (b) camada de fibra da que envolve a semente; (c) semente partida ao meio, após remoção das fibras externas; (d) sementes moídas após a remoção das fibras externas. Fonte: Autoria própria.

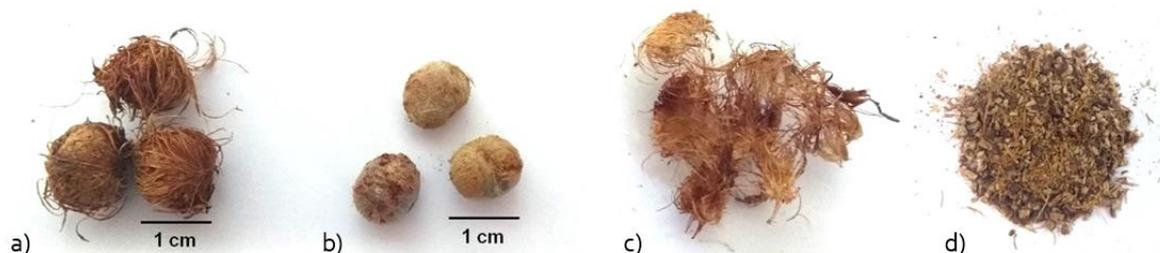


Figura 24 - Amostras de sementes de açai: (a) semente inteira; (b) semente após remoção das fibras externas; (c) camada de fibra da que envolve a semente; (d) sementes inteiras moídas. Retirado de Monteiro *et al.* (2019).

Com relação à caracterização química das sementes de juçara, mostra-se na tabela 3 os resultados do presente trabalho e uma comparação com os resultados obtidos por Marconi (2024). É possível observar o alto teor de manose no conteúdo hidrolisado, que ocorre por conta de as paredes secundárias das células do endosperma das sementes conterem pouca celulose, assim, são constituídas principalmente por polissacarídeos não celulósicos de armazenamento, como mananas, galactomananas, glucomananas, xiloglucanas e galactanas, os quais são digeridos durante a o processo de germinação (MONTEIRO *et al.*, 2019).

Tabela 3 – Composição química das sementes inteiras de juçara de dois lotes diferentes, expressas em percentual de matéria seca.

Material	Semente de juçara			
Extrativos	13,28 ± 0,43		7,60 ± 0,84	8,34 ± 0,52
Cinzas	0,99 ± 0,61		1,98 ± 0,07	2,00 ± 0,16
Resíduos insolúveis	15,95 ± 0,35	13,14 ± 2,15	12,74 ± 2,98	7,90 ± 1,34
Manose anidra	60,60 ± 4,02	61,61 ± 1,87	66,17 ± 3,77	66,70 ± 5,47
Glicose anidra	9,12 ± 1,37	8,78 ± 0,06	3,79 ± 0,05	5,55 ± 0,30
Arabinose anidra	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Xilose anidra	4,67 ± 0,69	3,27 ± 0,33	1,48 ± 0,15	0,35 ± 0,19
Galactose anidra	4,46 ± 0,49	2,23 ± 0,57	1,53 ± 0,09	0,00 ± 0,00
Total	109,07 ± 7,96	103,3 ± 6,02	95,29 ± 7,90	90,84 ± 7,98

Fonte	Marconi, 2024	Presente trabalho
--------------	---------------	-------------------

É possível observar diferenças nos percentuais para os diferentes lotes, até mesmo a diferença entre as caracterizações do mesmo lote, e essa distinção observada pode ser explicada por uma diferença de maturação entre as sementes. O desenvolvimento dos frutos de *E. edulis* e *E. oleracea* ocorre em três fases: aquosa, gelatinosa e sólida (DE MELLO *et al.*, 2022), onde o amadurecimento é acompanhado por diminuição do teor de umidade, açúcares solúveis, proteínas e amido, e apresentam uma estrutura subcelular associada a um comportamento extremamente recalcitrante. Além do papel de reserva de parede celular, as galactomananas influenciam no fluxo de água, devido à sua maior solubilidade, nos primeiros estágios da maturação (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). O grau de ramificações de galactose em mananas vai definir as relações estrutura-função, uma vez que quanto mais ramificado, mais solúvel o polissacarídeo e maior a participação deste em funções como as relações hídricas, visto que esse polissacarídeo absorve, proporcionalmente, grande quantidade de água e a distribui ao redor do embrião. Já quanto menor o grau da ramificação, maior a função biológica relacionada a dureza e proteção do embrião, característica do final do desenvolvimento dos frutos (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

A alta presença de manose em comparação aos outros açúcares, assim como para as caracterizações de semente de açaí, descritas na tabela 2 da seção 3.3.3, sugere que o polissacarídeo majoritário é a manana linear (cadeia linear de manana com mais de 90% de manose) (MONTEIRO *et al.*, 2019). A qual apresenta alto grau de interatividade intermolecular, formando cristais na parede celular, o que confere dureza e diminui sua solubilidade, e por isso são associados a um sistema de proteção do embrião contra danos mecânicos (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Além disso, fatores climáticos durante a floração influenciam a produção de frutos, e essa relação pode ser estendida à formação de metabólitos nas sementes, por exemplo, a alta precipitação e umidade reduzem a presença de polinizadores e causam danos às flores, prejudicando a formação de pólen e diluindo a concentração de açúcares no néctar, os quais são precursores importantes para a síntese de metabólitos, essenciais para o desenvolvimento saudável das sementes (DE MELLO *et al.*, 2022).

Os resíduos insolúveis apresentados podem conter percentuais de lignina, porém é necessário análises mais específicas para determinar o conteúdo desses resíduos insolúveis (MONTEIRO *et al.*, 2019).

A porcentagem de extrativos obtidos para o açaí foi reportada entre 9 e 15% (tabela 2, item 2.3.3.), enquanto para a juçara, o valor ficou entre 7 e 13%. Essa porcentagem, tanto para o açaí quanto para a juçara, se relaciona com a composição fenólica, uma vez que possuem uma parcela solúvel em água e etanol (MONTEIRO *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2016). Entretanto, existe uma parcela insolúvel em solventes orgânicos, visto que os compostos fenólicos podem se ligar aos carboidratos da parede celular formando interações de hidrogênio, as quais são formadas entre grupos hidroxila de polifenóis e átomos de oxigênio das ligações glicosídicas ou grupos hidroxilas de polissacarídeos (MONTEIRO *et al.*, 2019). No caso das procianidinas, composição fenólica majoritária do açaí, estudos também destacaram o aumento da interação com o aumento do grau de polimerização de procianidinas, e para essas sementes é reportado uma maior presença de procianidinas com alto grau de polimerização, portanto, a extração desses compostos com solventes orgânicos não é completamente efetiva (MARTINS *et al.*, 2020). A outra parte do percentual pode ser uma gama de compostos presentes nas sementes e que possuem solubilidade em água e etanol.

No caso da juçara, que possui uma composição fenólica majoritária em ácido 4-hidroxibenzoico, também é possível obter uma parcela do ácido fenólico no valor de extração, onde considerando as ligações covalentes desses ácidos com os polissacarídeos da parede, também não é representado em sua totalidade dentro do valor de extrativos apresentado. Além das interações entre os compostos, a recalcitrância, rigidez e propriedades estruturais das sementes também podem ser fatores importantes para a dificuldade das extrações orgânicas (JAKOBEK, 2015; MARCONI, 2024).

Portanto, ao relacionar os dados da caracterização é possível deduzir que as sementes juçara são boas indutoras de enzimas mananases, visto a presença majoritária de mananas. A mesma premissa vale para os dados reportados na literatura para as sementes de açaí (MONTEIRO *et al.*, 2019). No entanto, considerando os dados disponíveis na literatura de caracterização química dos extrativos de ambas, é necessário avaliar o impacto de tais compostos no cultivo dos fungos.

5.2 Produção enzimática

De forma a avaliar a viabilidade da indução de enzimas pelas sementes de açaí e juçara, foram realizadas produções de mananases com o fungo filamentosso *Aspergillus niger*. Inicialmente, optou-se por avaliar dois fungos de coleção do laboratório utilizando apenas a semente de juçara como fonte de carbono, a fim de selecionar o fungo de estudo com esses

experimentos preliminares. Assim, as figuras 25 e 26 apresentam uma comparação da produção extracelular de mananases por *Aspergillus niger* 1234 e *A. niger* 205 utilizando sementes de juçara como fonte de carbono, comparadas com diferentes fontes de carbono, incluindo como referência, como a macaúba (*Acrocomia aculeata*), fruto provindo de uma palmeira e que possui teor de manana significativo (DA SILVA, SILVA e PARENTE, 2009), LBG (*locust bean gum*) que é uma galactomanana comercial e a própria semente de juçara.

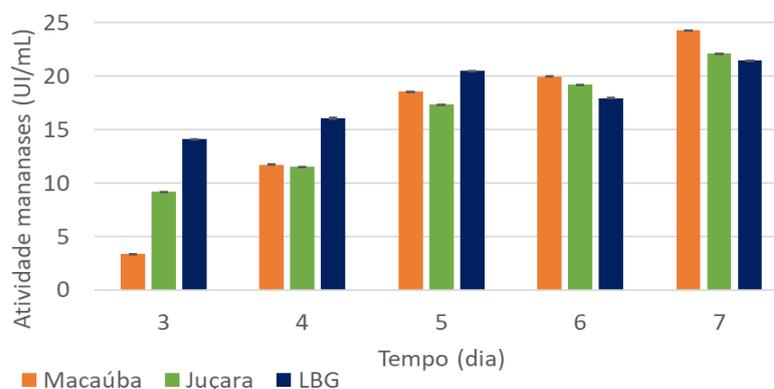


Figura 25 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando macaúba, juçara e LBG como fontes de carbono.

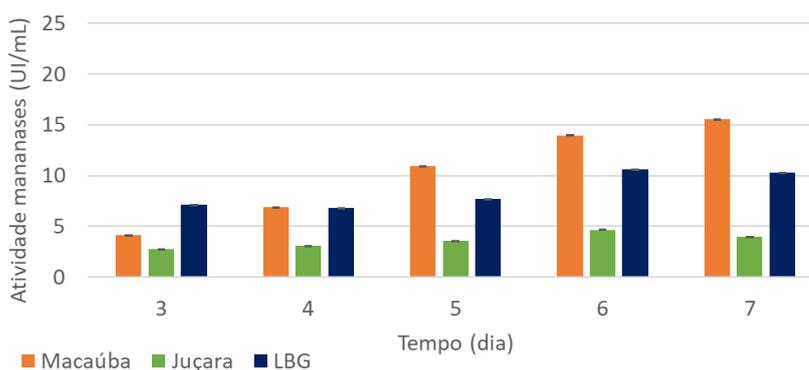


Figura 26 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 205, utilizando macaúba, juçara e LBG como fontes de carbono.

Ao relacionar os resultados obtidos nos gráficos 25 e 26 acima, no sétimo dia de produção enzimática, o *A. niger* 1234 apresentou uma atividade superior em 60%, 450% e 110% da atividade correspondente às enzimas pelo *A. niger* 205, para a macaúba, juçara e LBG como fonte de carbono, respectivamente. Portanto, todas as produções enzimáticas a seguir foram realizadas apenas com o fungo *A. niger* 1234, visto sua melhor capacidade de produção.

Além da produção com a semente em sua forma *in natura*, as sementes passaram por um processo de extrações sucessivas com álcool e acetona, a fim de exaurir os compostos fenólicos solúveis em solventes orgânicos. Dessa forma, ao comparar os extratos obtidos após a primeira extração para as sementes de açaí e juçara, foi observado uma grande discrepância por análise visual qualitativa (figura 27). Essa diferença colorimétrica pode ser explicada pela presença majoritária das procianidinas no extrato da semente de açaí, as quais proporcionam a coloração vermelha (MALIEN-AUBERT, DANGLES e AMIOT, 2002; MARTINS *et al.*, 2020), o que não é visto no extrato de semente de juçara, que não possui procianidinas, sendo abundante no ácido 4-hidroxibenzoico, que não agrega nenhuma coloração intensa (INADA *et al.*, 2015).

Além disso, é importante ressaltar que esses extratos ricos em compostos fenólicos, como as procianidinas, obtidas a partir de sementes de frutos, são de grande importância no mercado devido às essas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (SILVA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2020; INADA *et al.*, 2015; de Mello *et al.*, 2022). Esses compostos têm aplicações diversas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, onde são utilizados para melhorar a estabilidade de produtos, prolongar sua vida útil e potencializar efeitos benéficos à saúde, o que amplia seu valor no desenvolvimento de novos produtos terapêuticos e nutracêuticos. Logo, apesar de ser um possível problema para a produção enzimática do presente trabalho, esses extratos possuem aplicações importantes.

As sementes obtidas após o processo de extração foram utilizadas na produção enzimática, a fim de se comparar os efeitos desses compostos extraíveis.



Figura 27 - Extrato hidro-etanólico de semente de juçara (dois primeiros frascos a esquerda) e açaí (dois últimos frascos a direita), respectivamente.

As produções enzimáticas realizadas para comparar as atividades resultam nos dados mostrados nas figuras 28, 29 e 30. Na figura 28, observa-se que a extração das sementes de

juçara não resultou em diferença estatisticamente significativa na produção enzimática. Isso pode estar atrelado a uma possível extração de nutrientes essenciais no meio para a produção de enzimas, de forma que ao passo que extraia a composição fenólica, que apresenta atividade antimicrobiana, também são podem ser retiradas proteínas importantes para o fungo.

Já no caso das sementes de açaí (figura 29), houve um aumento de 180% na atividade das mananases, indicando que a extração é uma etapa crucial para a produção enzimática, já que os resultados entre as produções com as sementes *in natura* e após a extração são diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Além disso, comparando as produções enzimáticas induzidas pelas sementes após a extração com a produção utilizando o LBG, foram obtidos resultados semelhantes.

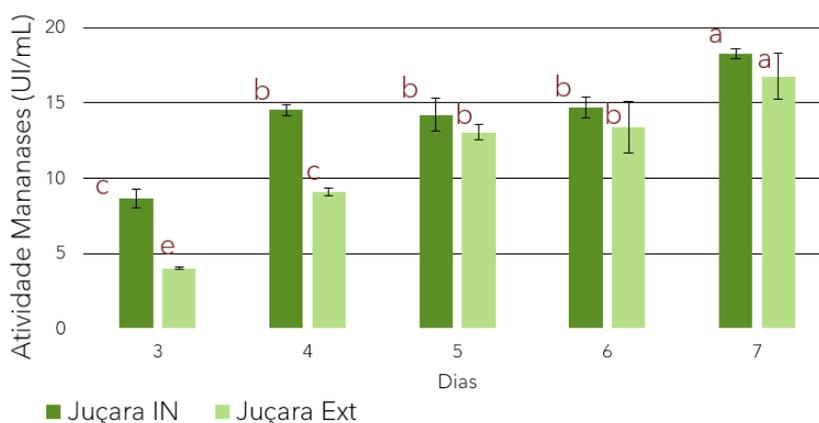


Figura 28 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando juçara *in natura* e juçara após extração como fontes de carbono.

Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

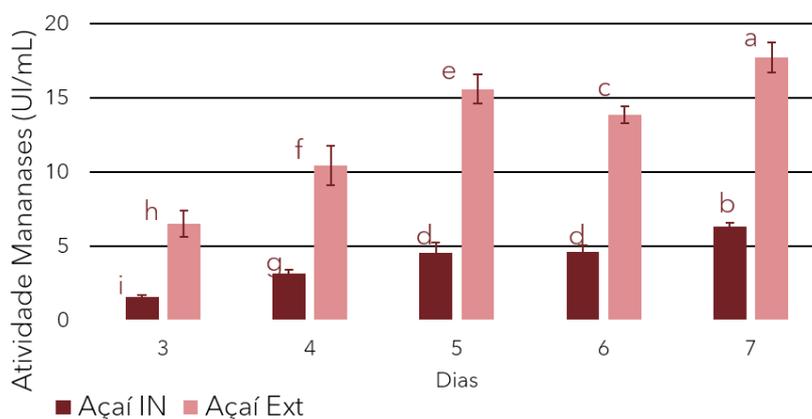


Figura 29 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando açai *in natura* e açai após extração como fontes de carbono.

Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

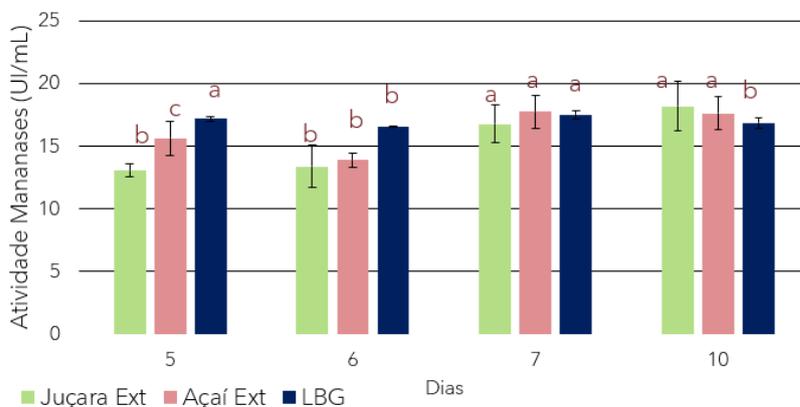


Figura 30 - Atividade de mananases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus niger* 1234, utilizando juçara e açai após extração, e LBG como fontes de carbono.

Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

O LBG é uma goma obtida das sementes da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*), cultivada abundantemente na região do Mediterrâneo, especialmente na Espanha, Itália e Chipre. É uma galactomanana, ou seja, um polissacarídeo de alto peso molecular composto por unidades de galactose e manose, tendo em sua estrutura uma cadeia linear de unidades β -D-manopiranosil ligadas em $1 \rightarrow 4$, com resíduos de α -D-galactopiranosil ligados em $(1 \rightarrow 6)$ como cadeias laterais (MUDGIL, BARAK e KHATKAR, 2014).

O LBG, sendo uma galactomanana comercial não cristalina, é mais facilmente degradado pelos fungos, resultando em uma produção enzimática eficiente devido à sua estrutura acessível. Em contraste, as sementes de açai e juçara, ricas em mananas com alto grau de cristalinidade, apresentam uma estrutura mais complexa e resistente à degradação enzimática. Isso pode resultar em uma taxa de consumo mais lenta e, possivelmente, em uma menor produção de mananases em comparação com o LBG. A diferença na estrutura dessas fontes de mananas pode influenciar diretamente a eficiência do fungo em degradá-las e, conseqüentemente, na quantidade de enzimas produzidas, deste modo, os resultados semelhantes obtidos de atividades enzimáticas quando utilizadas as sementes ou a galactomanana comercial indicam um resultado significativo de produção de enzimas (figura 30), uma vez que as fontes de carbono com maior nível de dificuldade de acesso pelo fungo

apresentam resultados semelhantes àsquelas mais disponíveis. Além disso, ao analisar os dias de produção, o sétimo e o décimo dias apresentaram produções enzimáticas estatisticamente iguais. Portanto, por questões de custo e tempo, a produção enzimática é mais eficiente até o sétimo dia.

Avaliando dados de atividade de mananases publicados na literatura utilizando fungos *Aspergillus* (tabela 4) é possível observar que não existe uma relação estreita entre as metodologias de produção e dosagem de atividade enzimática de mananases, de modo que é observado diferenças entre valores de pH, fontes de carbono escolhidas e sua concentração no cultivo, além do tempo de cultivo e percentual de substrato utilizado para o ensaio de atividade enzimática. Por exemplo, alguns trabalhos reportados na tabela 4, utilizaram uma concentração de substrato de 1%, enquanto o presente estudo usou 0,5% de LBG, além de algumas fermentações terem sido realizadas em biorreatores e em temperaturas diferentes, enquanto no presente trabalho foi realizado em Erlenmeyer acondicionado em shaker. Devido a essas diferenças metodológicas, a comparação entre os dados de atividade obtidos é dificultada.

Tabela 4 - Comparação da atividade enzimática de mananases, em UI/mL, por diversos fungos, com fontes de carbono e pH do meio diferentes.

Microorganismo	Fonte de carbono	pH	Atividade enzimática (UI/mL)	Fonte
<i>Aspergillus niger</i> 1234	Torta de grãos de café	5,5	23,1	Barros, 2023
<i>Aspergillus niger</i> 1234	LBG	4,8	15,0	Tomaz, 2024
<i>Aspergillus niger</i> 205	LBG	6,5	2,89	Nunes, 2019
<i>Aspergillus niger</i> NCH-189	Copra desengordurada	6,5	28,0	Lin e Chen, 2004
<i>Aspergillus niger</i>	-	5,0	2,90	Alsarrani, 2011
<i>Aspergillus foetidus</i>	casca de soja	5,5	6,39	Marco, 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i>	LBG	6,0	19,9	Purchart <i>et al.</i> , 2010

Contudo, trabalhos realizados por Tomaz (2024), Barros (2023) e Nunes (2019) no Laboratório Bioetanol da UFRJ, com uma metodologia semelhante ao presente trabalho, relataram um pico de atividade de 15,0, 23,1 e 2,90 UI/mL no 7º dia utilizando resíduos de café e LBG como fontes de carbono nos cultivos. Neste trabalho, os cultivos apresentaram os

seguintes picos de atividade no 7º dia de produção enzimática: $22,14 \pm 0,01$ UI/mL para a semente de juçara *in natura*, $19,99 \pm 1,82$ UI/mL para a semente de juçara após extração, $6,34 \pm 0,25$ UI/mL para sementes de açaí *in natura* e $17,77 \pm 1,31$ UI/mL para sementes de açaí após extração. Portanto, num panorama geral, os resultados obtidos neste trabalho representam valores compatíveis ou mais elevados se comparados à literatura.

Ainda, foi observada a formação de *pellets* utilizando sementes de açaí e juçara como fontes de carbono no meio de cultivo, o que não ocorreu com outras fontes de carbono utilizadas nos experimentos preliminares, como macaúba e LBG, nos quais o fungo cresceu e se dispersou no meio em sua forma filamentosa (figura 31). *Pellets* são agregados de hifas em formato esférico ou oval, podendo atingir diversos diâmetros, desde micrômetros até milímetros, onde não existe um consenso se a sua formação é benéfica ou ineficiente para bioprocessos, sendo necessário analisar caso a caso (PIRT, 1966; VEITER RAJAMANICKAM e HERWIG, 2018). Além disso, é reportado na literatura que alguns parâmetros como agitação, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, pH, vestígios de metais, entre outros, vão afetar a formação de *pellets*. A partir de uma comparação visual dos meios de cultivo com as sementes *in natura* e após as extrações também foi possível perceber uma diferença entre as morfologias dos *pellets* (figura 32), onde a extração de compostos solúveis promoveu o aumento do seu diâmetro.

Ravula (2017) reportou o crescimento de *pellets* de *Neurospora intermedia* em meios com a presença de inibidores como ácido cítrico, hidroximetilfurfural e furfural, que promoveram um aumento na produção de etanol mesmo na presença de agentes inibidores. Ou seja, em alguns casos, principalmente em presença de agentes que causam algum estresse, a forma de *pellets* pode trazer benefícios ao bioprocessos. Zhang e Zhang (2016) escrevem que a formação de *pellets* é influenciada por interações eletrostáticas, hidrofobicidade e componentes específicos da parede de esporos, nos quais as interações eletrostáticas são resultantes de forças de Van der Waals e repulsão de cargas negativas de grupos carboxílicos na estrutura da parede de esporos. Assim, geralmente, um menor tamanho de *pellets* está associado a maiores rendimentos de processos, visto que há uma melhora do transporte de nutrientes entre as regiões dos *pellets* (figura 33).

Essa última afirmação não condiz com a produção enzimática em meio com sementes de açaí como fonte de carbono, uma vez que o maior diâmetro de *pellets* resultou em maior atividade enzimática. Uma possível explicação é que as procianidinas de alto grau de polimerização (DP), conhecidas por sua alta atividade antimicrobiana (MARTINS *et al.*, 2020), estão mais aderidas à parede celular das sementes de açaí. A extração com solventes orgânicos remove esses compostos na forma solúvel, mas ao passo que o fungo consome o resíduo sólido,

as procianidinas com maior DP que não foram extraídas por solvente são liberadas, mantendo um agente antimicrobiano no meio, mas em menores concentrações, o que permite o crescimento, refletido no aumento do diâmetro.

A complexidade do assunto vai para além da formação dos *pellets* em si, sendo necessário relacionar a outros fatores do meio e compostos. Assim, a formação de *pellets* é um indício de algum agente inibidor no meio e/ou mesmo a falta de algum nutriente, está influenciando o metabolismo do fungo, além da capacidade de resposta de proteção a esses fatores.



Figura 31 - Diferentes morfologias de *A. niger* 1234 em inóculos com diferentes fontes de carbono. Meio com LBG (locust bean gum) (frasco à esquerda), meio com macaúba *in natura* (frasco central), meio com juçara *in natura* (frasco à direita).

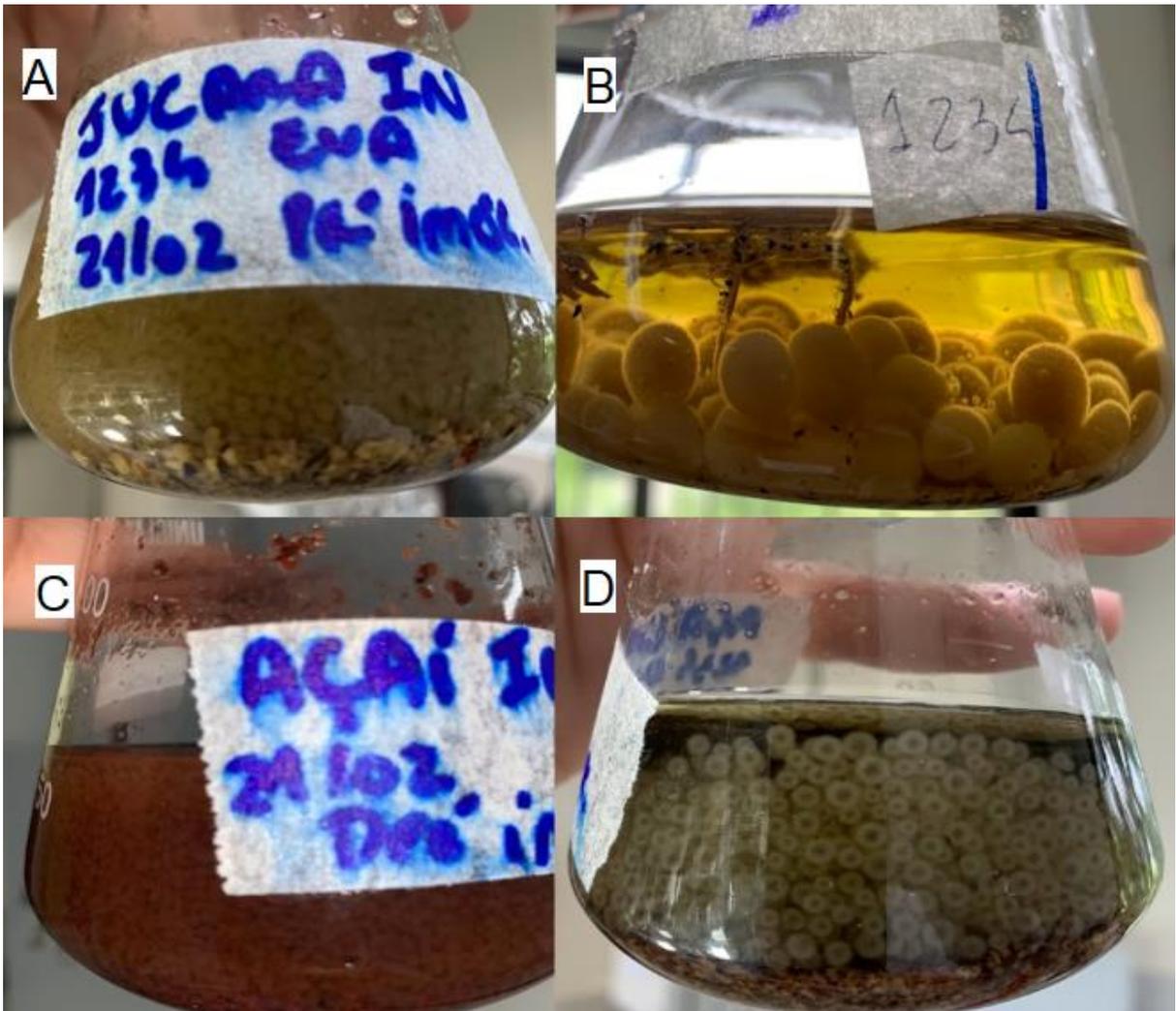


Figura 32 - Formação de *pellets* de *A. niger* 1234 em inóculos com diferentes fontes de carbono. A. Meio com juçara *in natura*; B. Meio com juçara após extração; C. Meio com açai *in natura*; D. Meio com açai após extração.

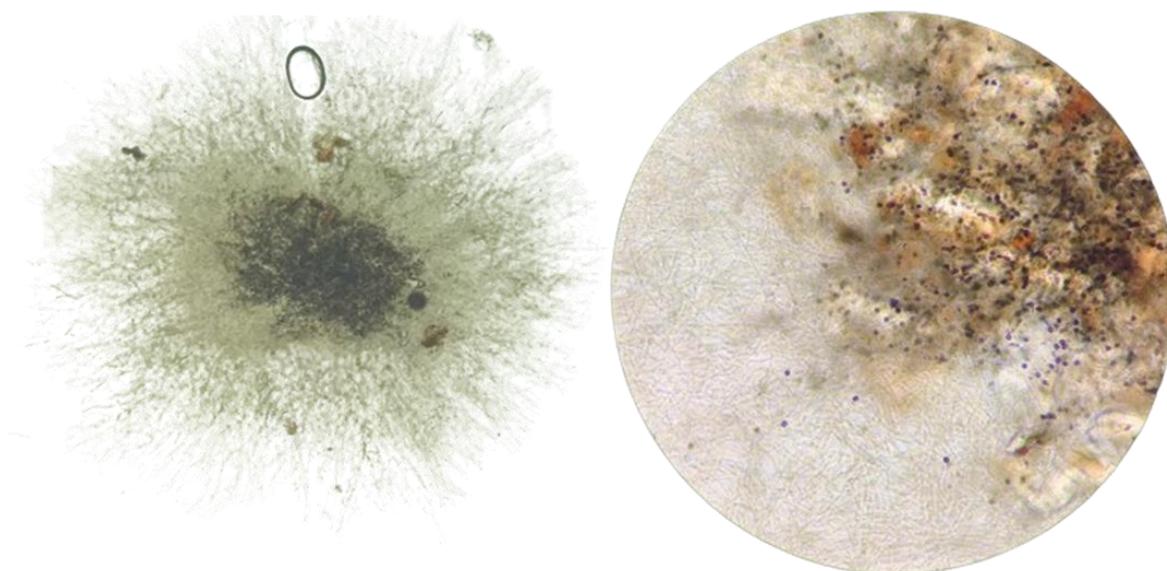


Figura 33 - Pellet de *Aspergillus niger* 1234 visto em microscópio 10x e 40x, respectivamente. Na primeira figura existe a região do núcleo (parte central, maciça e mais escura do pellet), seguida do corpo e fronteira (na segunda figura é possível perceber a região da fronteira entre o corpo do pellet e a região peluda), e por fim, a região “peluda” onde as hifas se encontram mais dispersas (região superficial da primeira figura).

Portanto, essas diferenças morfológicas observadas e as atividades enzimáticas apresentadas para as sementes de açaí e juçara antes e depois da extração podem ser explicadas por seus conteúdos de compostos fenólicos (MONTEIRO *et al.*, 2019). Apesar da extração da semente de juçara não ter influenciado a produção de mananases, o cultivo nessa fonte também resultou em uma resposta ao estresse, com a formação de pellets. Assim, os resultados são coerentes, visto que os extratos das sementes ricas nesses compostos possuem uma atividade antimicrobiana já conhecida e podem provocar mudanças no metabolismo, alterando a produção de enzimas (ALEJO-ARMIJO *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2020).

5.3 Crescimento da biomassa fúngica

Foi realizada uma análise quanto ao crescimento da biomassa fúngica durante o processo de produção enzimática utilizando como fontes de carbono: sementes de açaí *in natura* e sementes de açaí após a extração, a fim de verificar alguma inibição ou retardamento. Assim, comparando os resultados do crescimento da biomassa fúngica durante o tempo de produção no meio com açaí *in natura* (figura 34) e no meio com açaí após extração (figura 35), observa-se que a produção de biomassa foi menor no meio com açaí *in natura*. Além disso, houve menor variação no crescimento ao longo do tempo de produção, indicando uma estagnação ou até mesmo uma certa inibição do crescimento.

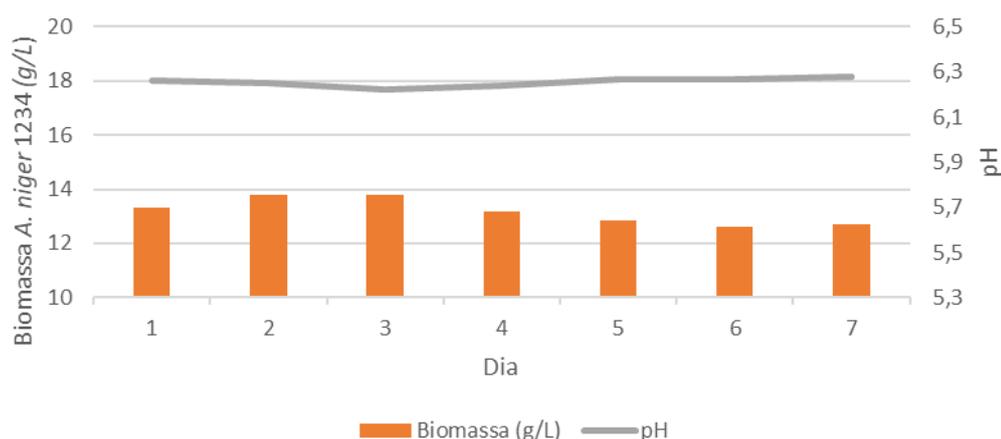


Figura 34 - Acompanhamento do crescimento da biomassa do *Aspergillus niger* 1234 e pH em meio fermentativo com semente de açaí *in natura* como fonte de carbono.

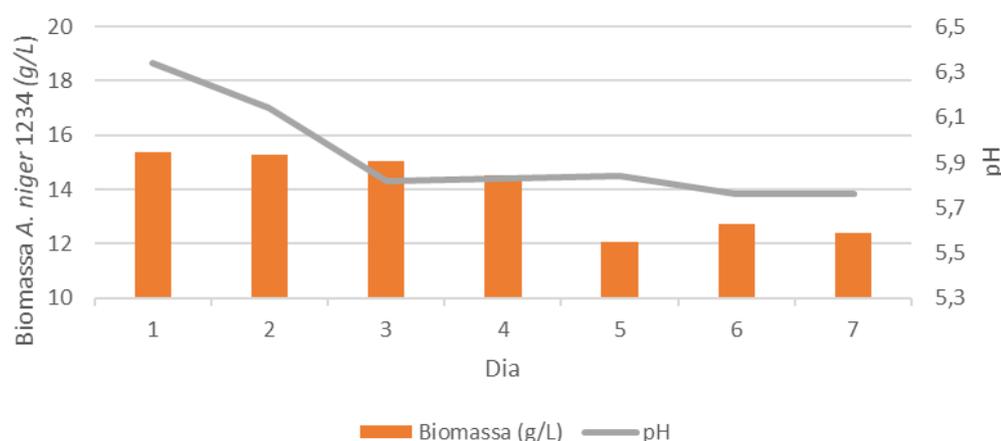


Figura 35 - Acompanhamento do crescimento da biomassa do *Aspergillus niger* 1234 e pH em meio fermentativo com semente de açaí após extração como fonte de carbono.

Além disso, o pH também não apresentou variação no meio com açaí *in natura*. Com o açaí após a extração, o pH do meio apresentou uma pequena variação, comum de bioprocessos. É reportado na literatura a produção de alguns ácidos orgânicos por *Aspergillus niger* a partir do consumo de açúcares, onde a principal fonte de geração de ácidos orgânicos em *A. niger* é através do ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs, que é a via degradativa no metabolismo para a geração de ATP e fornece intermediários para a biossíntese de aminoácidos (ANDERSEN, LEHMANN e NIELSEN, 2009; PÉREZ e VÁZQUEZ, 2023). Portanto, uma possível explicação para essa completa estabilização é que se tenha uma inibição da produção de ácidos orgânicos no meio rico em procianidinas, enquanto no meio após a extração se tenha alguma produção de modo a gerar uma ligeira variação no pH, mesmo que em meio tamponado.

É importante também destacar que uma das dificuldades da técnica utilizada na quantificação da biomassa fúngica durante a produção de enzimas reside no fato de que o fungo degrada parte dessas sementes ao longo do processo, isso significa que a massa das sementes consumidas pelo fungo se mistura com a massa total calculada, dificultando a distinção do valor preciso entre o material original da semente e a biomassa fúngica. Como resultado, o valor da massa das sementes degradadas influencia os resultados, introduzindo uma variável que não é diretamente quantificada e, conseqüentemente, afetando a precisão das medições da biomassa fúngica.

5.4 Concentração mínima inibitória (MIC) do extrato bruto e teste de poços em PDA

Foram realizados testes de inibição com os extratos brutos concentrados a fim de avaliar o comportamento do fungo aos compostos presentes nos extratos e uma possível capacidade fungicida ou fungistática. Os resultados mostraram uma turbidez crescente em todos os poços com o fungo presente com os passar das horas, indicando o crescimento fúngico. Ou seja, não houve inibição do *A. niger* 1234 pelos extratos, mesmo os mais concentrados.

De forma a se entender melhor o efeito dos extratos no microrganismo, os meios dos poços foram transferidos para placas de PDA e então, foram obtidos os resultados da figura 36. É possível observar um aumento na quantidade de células com o aumento da concentração dos extratos de ambas as sementes, comparando com o controle do fungo também.

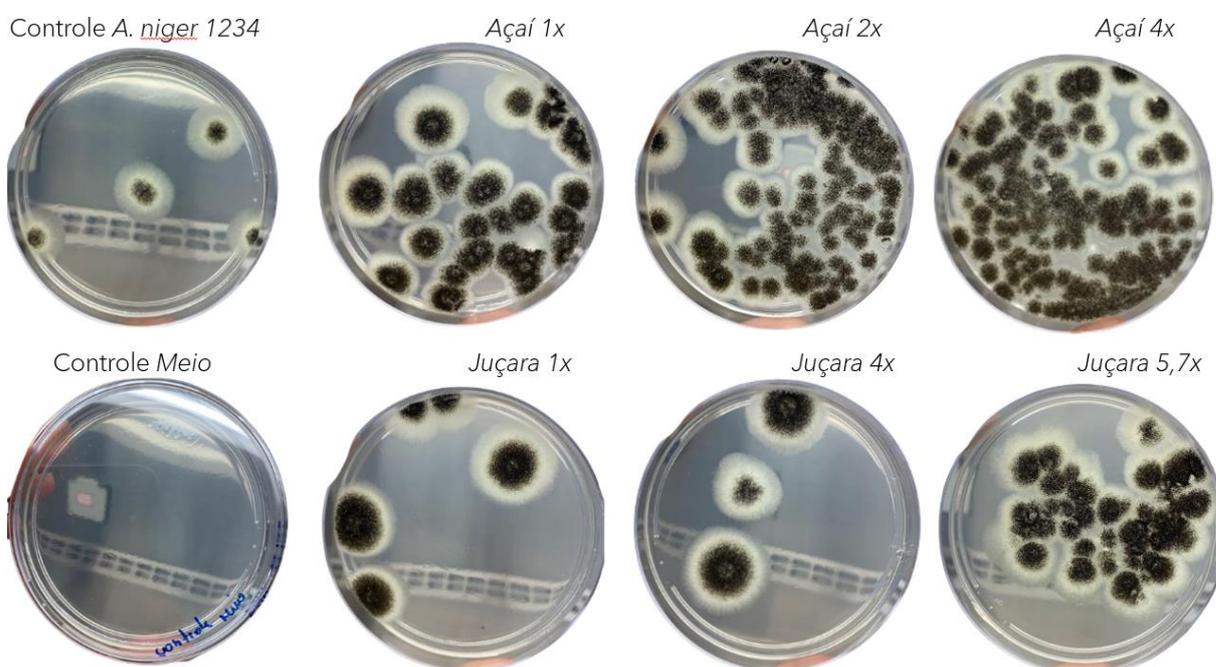


Figura 36 - Placas de PDA (*potato agar dextrose*). Controle *A. niger* 1234: fungo sem extrato etanólico; Controle meio: meio sem a presença do fungo ou extrato etanólico; Açai 1x: fungo com extrato etanólico bruto de semente de açaí sem concentração; Açai 2x: fungo com o extrato etanólico de semente de açaí duas vezes concentrado; Açai 4x: fungo com o extrato etanólico de semente de açaí quatro vezes concentrado; Juçara 1x: fungo com extrato etanólico bruto de semente de juçara sem concentração; Juçara 4x: fungo com o extrato etanólico de semente de juçara quatro vezes concentrado; Juçara 5,7x: fungo com o extrato etanólico de semente de juçara aproximadamente seis vezes concentrado.

É percebido no teste de difusão em placas de PDA com poços um efeito no aumento da velocidade da esporulação (figura 37). Os poços preenchidos com os extratos mais concentrados apresentam uma maior esporulação, mesmo que para o mesmo tempo de crescimento, enquanto o branco não apresentou a indução de maior esporulação. Nas placas de início de crescimento, é possível ver bem claramente esse aumento da esporulação, quanto mais concentrado o extrato, maior a área de esporulação. Nas placas apresentadas que correspondem ao tempo do meio do processo de crescimento é possível observar, ainda, uma zona em volta dos poços com extratos mais escurecida, sendo a maior indução à esporulação.

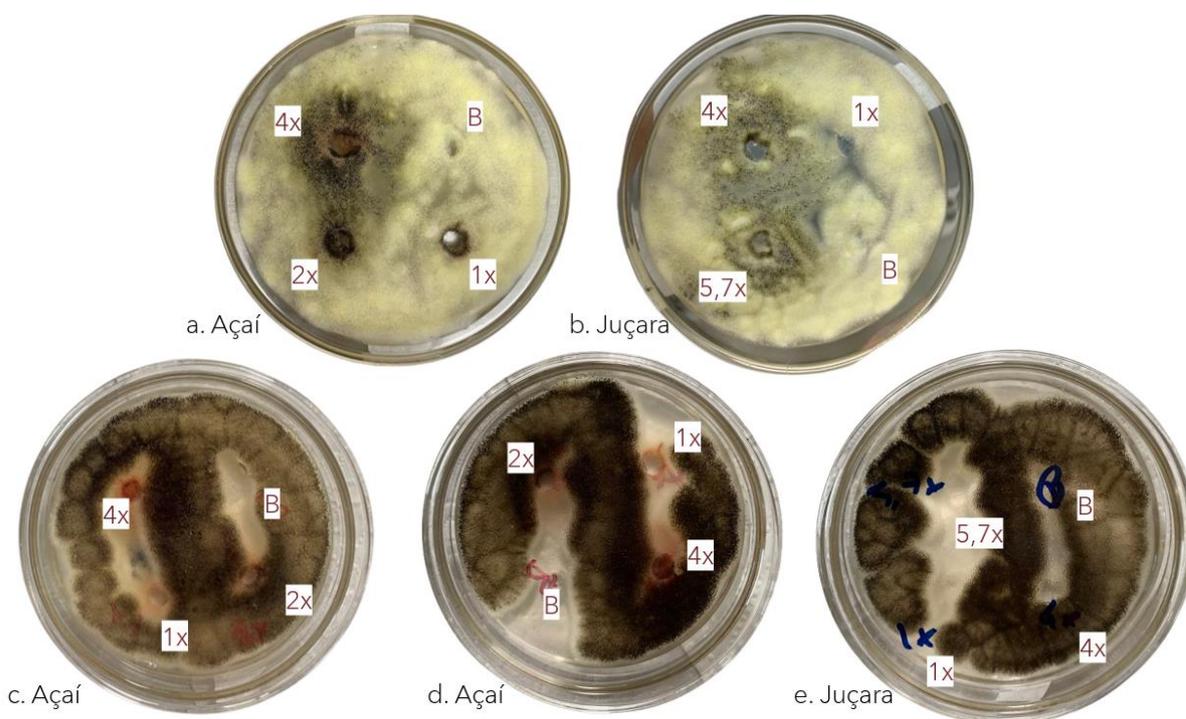


Figura 37 - Placas de PDA (*potato agar dextrose*) com poços. a: poços preenchidos com extrato etanólico de semente de açaí nos primeiros dias de crescimento; b: juçara: poços preenchidos com extrato etanólico de semente de juçara nos primeiros dias de crescimento; c e d. açaí: poços preenchidos com extrato etanólico de semente de açaí no meio do processo de crescimento; e. poços preenchidos com extrato etanólico de semente de juçara no meio do processo de crescimento; B. poço preenchido com água como padrão positivo. Inoculados com *A. niger* 1234.

5.5 Composição fenólica, atividade antioxidante e efeitos na produção enzimática

Como observado na tabela 5, o conteúdo fenólico total das sementes de juçara relatado na literatura varia entre 0,37 e 3,69 mg/g, relativamente menor comparado ao das sementes de açaí, que é acima de 15,08 mg/g. A divergência apresentada nos resultados desta tabela pode ser explicada por diferentes solventes e proporções utilizados na extração dos compostos fenólicos, diferentes metodologias de extração e de análises dos fenólicos totais e capacidades antioxidantes. Martins *et al.* (2021) discute sobre a importância do estudo das possíveis limitações dos ensaios de fenólicos totais, as quais podem ser as principais responsáveis pela discrepância entre os resultados, reiterando a importância da etapa de validação antes da quantificação propriamente dita. Além disso, já foi relatado que a origem geográfica (BORGES *et al.*, 2011) afeta o teor de compostos fenólicos da juçara, assim como também depende de fatores abióticos, nutrição do solo, período de coleta de material vegetal e sazonalidade, entre outros. O estágio de maturação também é bastante significativo para a composição fenólica (BORGES *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2022). Martins *et al.* (2022) mostra que existe uma relação entre o desenvolvimento da semente e sua capacidade antioxidante, conteúdo fenólico e grau de polimerização (figura 38).

Tabela 5 - Comparação entre os compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes entre as sementes de açaí e juçara reportados na literatura.

Semente	Conteúdo fenólico total (mg/100g)	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	Referência
Açaí	28,3	-	Silva <i>et al.</i> (2014)
	$61,6 \pm 0,8$	$642,4 \pm 13,1$	Soares <i>et al.</i> (2017)
	-	$3835,44 \pm 73,50$	Martins <i>et al.</i> (2020)
	$38,4 \pm 0,4$	-	Martins <i>et al.</i> (2021)
Juçara	$4,4 \pm 0,3$	$10,00 \pm 1,00$	Inada <i>et al.</i> (2015)
	3,69	-	de Mello <i>et al.</i> (2022)

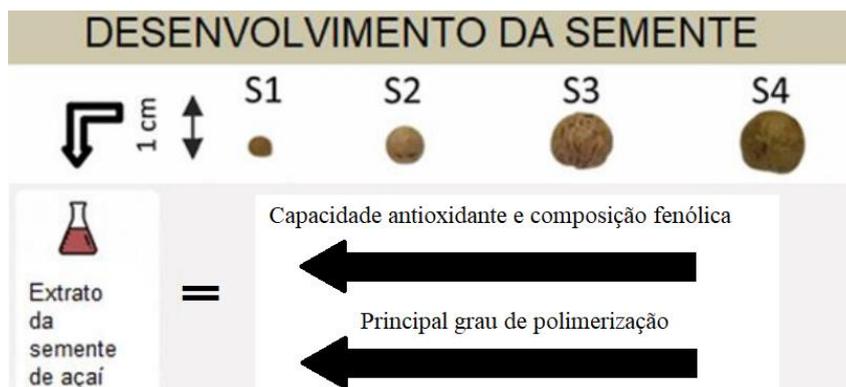


Figura 38 - Estágios de maturação da semente de açaí e suas relações com conteúdo fenólico. Adaptado de Martins *et al.* (2022)

A baixa concentração de compostos fenólicos nas sementes de juçara pode não ser suficiente para causar estresse que prejudique a produção de enzimas ou o crescimento fúngico. Isso explica a similaridade nos valores de atividade de mananases das sementes de juçara antes e após a extração, além da ausência de esporulação acentuada nos testes em placas de PDA (seção 4.3). No caso das sementes de açaí, a alta concentração de compostos fenólicos pode explicar a diferença na produção de enzimas após a extração parcial desses compostos. A maior capacidade antioxidante dos compostos fenólicos nas sementes de açaí, em comparação com as de juçara, pode ser um fator que corrobora as respostas fúngicas observadas, como a maior esporulação e alteração no crescimento da biomassa fúngica, diminuindo-o (seção 4.3).

Os efeitos das procianidinas em microrganismos variam dependendo da concentração, da espécie e da fase de crescimento, mas geralmente envolvem modulação do metabolismo ou atividade antimicrobiana. Estudos mostram que leveduras possuem alta afinidade e capacidade de adsorção para procianidinas extraídas de semente de uva, onde essa adsorção não é limitada à superfície externa da parede celular, mas também ocorre dentro da espessura da parede e pode envolver a passagem de procianidinas através dos poros da parede, levando a interações com a membrana plasmática (NGUELA *et al.*, 2015). O mesmo estudo indica os principais mecanismos envolvidos na adsorção de polifenóis, apresentados no quadro 2, juntamente com outras referências da literatura.

Quadro 2 - Mecanismos envolvidos nas interações entre procianidinas e leveduras.

Mecanismo	Modo de ação	Referência
Porosidade da parede celular:	A estrutura porosa das paredes celulares das leveduras permite que os polifenóis se difundam e se acumulem dentro da parede celular, onde podem interagir com vários componentes celulares.	Nguela <i>et al.</i> , 2015

Interações de hidrogênio:	Os polifenóis são capazes de formar interações de hidrogênio com grupos funcionais presentes na superfície das leveduras. As procianidinas podem interagir e formar complexos com proteínas, como com os grupos hidroxilas das manoproteínas. O que pode afetar processos celulares importantes, como a permeabilidade da membrana e a atividade enzimática.	Nguela <i>et al.</i> , 2015; Sarnoski, Boyer e O’Keefe (2012)
Interações ácido-base de Lewis:	As superfícies das leveduras podem ter propriedades de doador ou acceptor de elétrons, interagindo com os polifenóis.	Nguela <i>et al.</i> , 2015
Reversibilidade da adsorção:	A força das interações entre os polifenóis e as leveduras pode variar, levando a diferentes graus de reversibilidade da adsorção. Alguns polifenóis podem se ligar fortemente às leveduras, enquanto outros podem ser mais facilmente desadsorvidos.	Nguela <i>et al.</i> , 2015
Relação da adsorção e grau de polimerização:	Células viáveis preferem reter procianidinas de baixa massa molecular.	Li <i>et al.</i> , 2015
Alteração da fluidez e função da membrana:	As procianidinas podem interagir com as membranas lipídicas e modificar sua fluidez. De modo a interferir nas funções da membrana, incluindo transporte de nutrientes, sistema respiratório, síntese de componentes celulares, funcionalidade de enzimas associadas à membrana e outros processos celulares.	Sarnoski, Boyer e O’Keefe (2012)
Interação com íons metálicos:	As procianidinas são conhecidas por serem quelantes de metais de transição. Foi reportada a suplementação do meio de cultura com ferro sendo capaz de restaurar a taxa máxima de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Portanto, a inibição do crescimento pode estar relacionada à sua capacidade de interação com íons metálicos, privando assim as leveduras de nutrientes essenciais.	Sarnoski, Boyer e O’Keefe (2012)
Efeitos sinérgicos ou aditivos:	A complexidade dos compostos presentes em extratos obtidos de plantas ou partes dela, ricos em procianidinas, sugere que a inibição do crescimento de leveduras pode ser resultado de efeitos sinérgicos ou aditivos de vários compostos em vez de um único composto.	Sarnoski, Boyer e O’Keefe (2012); Martins <i>et al.</i> , (2020)

A H⁺-ATPase é uma enzima essencial na membrana plasmática de leveduras, responsável pela geração de um gradiente de prótons que acopla a hidrólise de ATP ao transporte transmembrana secundário de solutos e está envolvida na homeostase do pH. Em *Saccharomyces cerevisiae*, as procianidinas demonstram um efeito bifásico, inicialmente inibindo a atividade da H⁺-ATPase e o crescimento celular na fase inicial da fermentação, e posteriormente aumentando o metabolismo celular e a atividade enzimática na fase exponencial média, reduzindo o tempo total de fermentação (LI *et al.*, 2011). Esse efeito adaptativo também foi observado em outras espécies de leveduras, como *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*, onde procianidinas extraídas de cascas de amendoim estenderam a fase de latência do crescimento e inibiram completamente a proliferação em altas concentrações (SARNOSKI, BOYER e O'KEEFE, 2012).

Li *et al.* (2015) estuda a influência do grau de polimerização de compostos fenólicos, como procianidinas, na adsorção pelas células fúngicas, mostrando que um menor grau de polimerização facilita a adsorção por células viáveis. Dessa forma, o grau da polimerização pode estar envolvido na seletividade na adsorção, uma vez que o fungo pode ter uma capacidade diferente de adsorver procianidinas de diferentes tamanhos. Geralmente, compostos fenólicos de maior massa molecular podem estar mais presos às sementes de açaí, interagindo mais fortemente às suas paredes, sendo menos solúveis, portanto, menos disponíveis para serem retirados do meio por extração por solventes orgânicos. Desse modo, o fungo pode adsorver inicialmente, de forma preferencial, procianidinas de menor massa molecular, que são mais solúveis e acessíveis. No entanto, à medida que a fonte de carbono (sementes de açaí) é consumida pelo microrganismo, a liberação de procianidinas mais polimerizadas no meio pode ocorrer, as quais são reportadas atividade antimicrobianas significativas (MARTINS *et al.*, 2020).

Leveduras e fungos filamentosos compartilham características estruturais e funcionais devido à sua natureza eucariótica e fúngica. Ambos possuem paredes celulares compostas principalmente de quitina e glucanos (β -glucanos), além de proteínas estruturais e enzimas, e compartilham a estrutura das membranas plasmáticas (figura 41 e 42). Mesmo com a existência de diferenças, como a maior complexidade de paredes e membranas em fungos filamentosos devido à sua natureza multicelular e maior porosidade, reflexo das adaptações específicas às suas condições ambientais e modos de crescimento (KUYUCAK e VOLESKY, 1989; DE FARIA JÚNIOR, 2011), as similaridades permitem relacionar o modo de ação das

procianidinas na parede celular e membrana plasmática estudados em leveduras com fungos filamentosos.

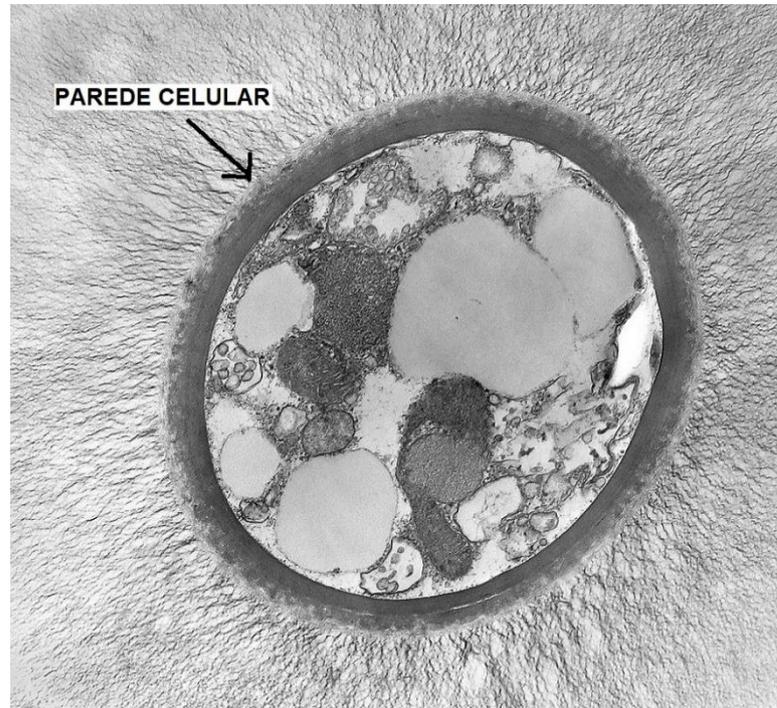


Figura 39 – Célula de *Cryptococcus neoformans* por microscopia eletrônica, indicada a sua parede celular, onde a membrana plasmática pode ser discernida em contato com a superfície interna da parede celular. Adaptado de Vargas *et al.* (2024)

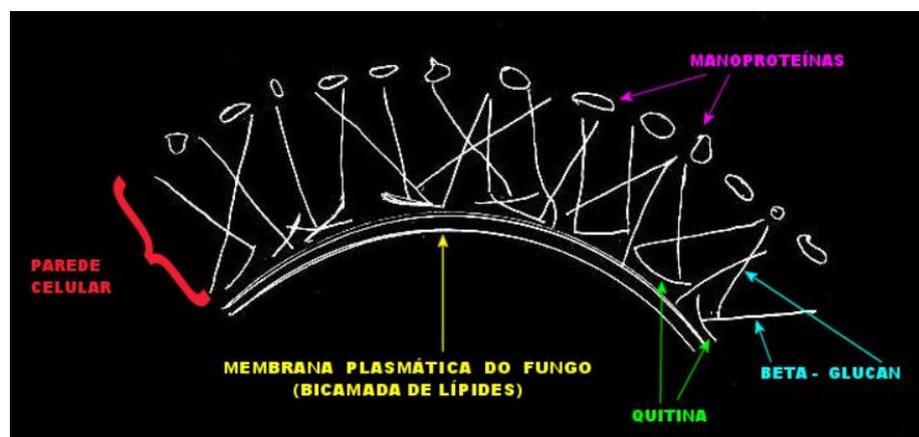


Figura 40 – Esquema da parede celular e membrana plasmática de um fungo. Retirado de Vargas *et al.* (2024)

Adicionalmente, estudos realizados com extratos de sementes de açaí ricos em procianidinas, mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, enquanto catequinas isoladas não apresentaram efeitos significativos, indicando a importância do conjunto de

procianidinas presentes em sementes de açaí para a atividade inibitória (MARTINS *et al.*, 2020).

Estudos sobre o estresse oxidativo em *Aspergillus niger* mostram que baixas concentrações de agentes tóxicos geram respostas adaptativas, ao invés de causar morte celular, como ocorre em altas concentrações, essas respostas incluem inibição do crescimento e produção de enzimas específicas (KREINER, HARVEY e MCNEIL, 2003; LI, MCNEIL e HARVEY, 2008; LYU *et al.*, 2023). Além disso, foi observada a formação de hifas aderidas, semelhantes a *pellets*, sob condições de estresse oxidativo, indicando que o estresse também afeta a morfologia do fungo (KREINER, HARVEY e MCNEIL, 2003). Dessa forma, é entendido que a presença de agentes tóxicos em concentrações brandas pode gerar respostas no crescimento, produção enzimática e morfologia de *A. niger*.

Essa agregação de esporos e formação de *pellets* pode fazer parte da estratégia de adaptação de fungos. Agregados de esporos resultam em colônias maiores em culturas líquidas do que esporos individuais, e essas colônias mais pontuais são mais resistentes ao calor e ao estresse do meio. Os conídios são muito mais resistentes ao estresse do que as hifas vegetativas e, portanto, não são apenas estruturas de dispersão, mas também estruturas de sobrevivência (LYU *et al.*, 2023). Dessa forma, a formação de esporos em detrimento do crescimento vegetativo é mais viável em situações de estresse.

Além disso, foi relatado que a suplementação do meio de crescimento com íons metálicos mostrou que apenas uma adição de íons de ferro poderia restaurar a taxa máxima de crescimento de *S. cerevisiae* (WAUTERS *et al.*, 2001). Isso sugere que a presença de certos íons metálicos pode ser crucial para o crescimento e a atividade enzimática, complementando a influência dos compostos fenólicos, o que seria uma das formas de causar estresse ao fungo apresentada no quadro 9 (página 85).

Dessa forma, considerando todos os resultados experimentais supracitados e trabalhos na literatura, sugere-se que as procianidinas presentes em semente de açaí, por um conjunto de fatores como adsorção nas paredes celulares, interações de hidrogênio com proteínas e interações com a membrana plasmática, poderia causar uma série de disrupções de funções, como as observadas no presente trabalho: alteração na produção de mananases e no crescimento; além do que se sugere na literatura como o desbalanceamento de íons, alterações na expressão gênica, metabolismo de produção de enzimas e até mesmo produção e gestão de ATP, de forma que o fungo prevaleça as suas energias para a resposta adaptativa ao estresse causado. Além disso, a ligação com importantes íons no meio de cultura, como íons de ferro que são importantes no crescimento fúngico, pode gerar uma deficiência nutricional no meio

significativa. Portanto, as procianidinas podem afetar de forma expressiva o metabolismo e a sobrevivência de microrganismos, modulando tanto processos fermentativos quanto respostas ao estresse. Assim, sugere-se trabalhos mais aprofundados a fim de comprovar as hipóteses levantadas neste estudo.

6. CONCLUSÃO

A semente de juçara se mostrou promissora como fonte de carbono em meio de cultivo para produção de mananases por *Aspergillus niger*. A presença de compostos fenólicos em sementes de juçara (*Euterpe edulis*) não provoca alterações metabólicas significativas quanto a produção de enzimas mananases, apresentando uma atividade enzimática de $22,14 \pm 0,01$ UI/mL em seu sétimo dia de produção enzimática na sua forma *in natura*. Já as sementes de açaí (*Euterpe oleracea*), embora ricas em manana, contém compostos fenólicos, como as procianidinas, que resultaram em um efeito significativo na produção de enzimas, afetando-a negativamente, assim como resultando em outras respostas adaptativas do fungo ao estresse. As produções enzimáticas com açaí *in natura* e após a extração apresentaram atividades de $6,34 \pm 0,25$ UI/mL e $17,77 \pm 1,31$ UI/mL, respectivamente, no sétimo dia de produção, indicando a necessidade de extração das procianidinas previamente ao cultivo fúngico. Tal cenário é promissor, uma vez que a produção de enzimas pode ser combinada à produção de outro bioinsumo de alto valor, o extrato de procianidinas, potencialmente favorecendo a viabilidade econômica desse processo.

7. PERSPECTIVAS

Para dar sequência a futuros estudos, seguem os tópicos como perspectivas:

- Realização de um pré-tratamento em moinho de bolas das sementes, a fim de desconstruir a recalcitrância da biomassa e deixar a manana menos cristalina e mais exposta como fonte de carbono, com a finalidade de verificar se existe falta de acessibilidade a fonte de carbono e deficiência nutricional, analisando sua influência na produção de enzimas, além do impacto na formação de pellets;
- Estudar os efeitos dos extratos ricos em compostos fenólicos das sementes em meio de cultivo apenas com LBG como fonte de carbono, a fim de se verificar os impactos na

produção enzimática e morfologia do fungo. Além de verificar possíveis respostas adaptativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIGUZEL A., NADAROGLU H., ADIGUZEL G. Purificação e caracterização de β -mananase de *Bacillus pumilus* (M27) e suas aplicações em alguns sucos de frutas. *J. Ciência Alimentar. Tecnologia*. 52 5292–5298. 10.1007/s13197-014-1609-y. (2015)

ADVANCED ENZYMES. DigeGrain Max: NSP Breakdown and Improve Performance of Modern Pigs and Poultry Diet (2024). Disponível em <https://www.advancedenzymes.com/wp-content/uploads/2021/10/Brochure_DigeGrain-Max.pdf>. Acesso em 28/04/2024

ALEJO-ARMIJO, A., GLIBOTA, N., FRÍAS, M. P., ALTAREJOS, J., GÁLVEZ, A., SALIDO, S., AND ORTEGA-MORENTE, E. Synthesis and Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Properties of A-Type Procyanidin Analogues against Resistant Bacteria in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (9), 2151-2158 (2018)

ALSARRANI, A. Q., Production of Mannan-degrading enzyme by *Aspergillus niger*, *Journal of Taibah University for Science*, Volume 5, Pages 1-6, ISSN 1658-3655, [https://doi.org/10.1016/S1658-3655\(12\)60032-6](https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60032-6). (2011)

ALTMAN, R. F. A. Estudo químico de plantas amazônicas. *Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Norte* 31 , 109–111 (1956).

ANDERSEN, M.R., LEHMANN, L. & NIELSEN, J. Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH. *Genome Biol* 10, R47 (2009).

ARAGÃO, A., CONTINI, E. O agro no brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020, Embrapa SIRE (2020)

ASTM E1758-01 “Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC.” In 2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International (2003)

AUMGENE BIOSCIENCES. Animal feed enzymes (2024). Disponível em <<https://www.aumgene.com/product-category/animal-feed-enzymes/>>. Acesso em 28/04/2024

AWASTHI MK, AZELEE NIW, RAMLI ANM, RASHID SA, MANAS NHA, DAILIN DJ, ILLIAS RM, RAJAGOPAL R, CHANG SW, ZHANG Z, RAVINDRAN B. Microbial biotechnology approaches for conversion of pineapple waste in to emerging source of healthy food for sustainable environment. *Int J Food Microbiol.* Jul 16;373:109714 (2022)

AYDOGDU, A.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Fabrication of gallic acid loaded Hydroxypropyl methylcellulose nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. *Carbohydrate Polymers*, v. 208, p. 241–250, mar. (2019)

B. FRASAO, M. COSTA, F. SILVA, B. RODRIGUES, J. BALTAR, J. ARAUJO, D. MOREIRA, R. TORREZAN, C. CONTE-JUNIOR. Effect of pequi (*Caryocar brasiliense*) and juçara (*Euterpe edulis*) waste extract on oxidation process stability in broiler meat treated by UV-C. *PloS One*, 13 (12), Article e0208306. (2018)

BARBOSA, A. M., RABELO, V. S. M., MARTORANO, L. G., GIACON, V. M. Caracterização de partículas de açaí visando seu potencial uso na construção civil. *Revista Matéria*, v.24 n. 03. ISSN 1517-7076 artigo e-12435, (2019)

BARROS, L. J. B. M. Otimização da composição nutricional do meio de cultivo para produção de mananases por *Aspergillus niger* 1234 com biomassa de café. 2023. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, (2023)

BFG (The Brazil Flora Group). *Flora do Brasil 2020*. 1-28 pp. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (2021)

BICUDO, M. O. P., RIBANI, R. H., & BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 142–147.; (2014)

BLIBECH, M. *et al.* Purification and characterization of a low molecular weight of β -mannanase from penicillium occitanis Pol6. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, n. 4, p. 1227–1240, fev. (2010)

BORGES, G. D. S. C., GONZAGA, L. V., JARDINI, F. A., MANCINI FILHO, J., HELLER, M., MICKE, G., ... FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI–MS/MS. *Food Research International*, 51, 363–369 (2013)

BORIN GP, SANCHEZ CC, DE SOUZA AP, DE SANTANA ES, DE SOUZA AT, PAES LEME AF, SQUINA FM, BUCKERIDGE M, GOLDMAN GH, OLIVEIRA JV. Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. *PLoS One*. Jun 8;10(6):e0129275. (2015)

BRETHAUER, S., SHAHAB, R., STUDER, M., Impacts of biofilms on the conversion of cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104. 10.1007/s00253-020-10595-y. (2020)

BUFALINO, L.; GUIMARÃES, A. A.; SILVA, B. M. da S., SOUZA, R. L. F. de; MELO, I. C. N.A. de; OLIVEIRA, D. N. P. S. de; TRUGILHO, P. F. Local variability of yield and physical properties of açai waste and improvement of its energetic attributes by separation of lignocellulosic fibers and seeds. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 10, 053102 (2018)

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology*, v. 154, n. 3, p. 1017-1023. (2010)

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. & LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Edição Especial*, p.137-162. (2000)

CAMPOS, C. F. A.; RODRIGUES, K. F.; VAZ, R. G. M. V.; GIANNES, G. C.; SILVA, G. F.; PARENTE, I. P.; AMORIM, A. F.; BARBOSA, A. F. C.; SILVA, M. C.; FONSECA, F. L. R.; ARAÚJO, C. C.; SILVA, V. S.; SILVA, J. R.; SILVA, E. M.; CAMPOS, M. L.; MACHADO, S. B., Enzimas fúngicas em dietas com alimentos alternativos para frangos de crescimento lento, *Revista Desafios –v. 04,n. 02*. (2017)

CARDOSO, A. L., DI PIETRO, P. F., VIEIRA, F. G. K., BOAVENTURA, B. C. B., DE LIZ, S., BORGES, G. S. C., ... DA SILVA, E. L. Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. *Journal of Functional Foods*, 17, 152–162. (2015a)

CARDOSO, L. M., NOVAES, R. D., DE CASTRO, C. A., AZEVEDO, A., GONÇALVES, R. V., RICCI-SILVA, M. E. LEITE, V. Chemical composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: Applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice. *Nutrición Hospitalaria*, 32(2), 702–709. (2015b)

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Produção de grãos na safra 2023/24 deve atingir 312,3 milhões de toneladas influenciada por clima. 07/12/2023, Brasil, Disponível em: CONAB.gov

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Fruto Juçara (2021) Disponível em <<https://www.CONAB.gov.br/info-agro/custos-de-producao/planilhas-de-custo-de-producao/itemlist/category/846-jucara-fruto>> Acesso em 02/06/2024

CONAB. Boletim da Sociobiodiversidade / Companhia Nacional de Abastecimento. – v. 4, n. 2, segundo trimestre de 2020. Brasília: CONAB (2020)

COSTA, J. S.; MELLO, T. DE; FAGUNDES, D. P.; SIMÕES, I. M.; DE ARAUJO, C. P.; FERREIRA, A.; OTONI, W. C.; LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S.; Dynamics of Biochemical and Hormonal Reserves Degradation in Immature Seeds of *Euterpe Edulis Martius* (Arecaceae) During in Vitro Germination. Volume 36, pages 415-426 . Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4379683> (2023)

COUTURIER M, TOUVREY-LOIODICE M, TERRAPON N, DRULA E, BUON L, CHIRAT C, HENRISSAT B, HELBERT W. Functional exploration of the glycoside hydrolase family GH113. *PLoS One*. Apr 22;17(4):e0267509. (2022)

CTC Bio, 2024. Disponível em <<https://www.ctcbio.com/en/business/ctczyme.php>>. Acesso em 28/04/2024

DA SILVA, B. P., SILVA, G. M., PARENTE, J. P., Chemical properties and adjuvant activity of a galactoglucomannan from *Acrocomia aculeata*, *Carbohydrate Polymers*, Volume 75, Issue 3, Pages 380-384, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.031>. (2009)

da SILVA, I. A. caracterização das enzimas β -mananases obtidas por fermentação em estado sólido a partir da biomassa residual do açaí. Monografia - Laboratório de Microbiologia Industrial – Escola de Química (EQ) – Centro de Tecnologia (CT), UFRJ. (2023)

DAWOOD, A., MA, K. Applications of microbial β -Mannanases. *Industrial Biotechnology*, in *Bioengineering and Biotechnology*. (2020)

DE BRITO, E. S., DE ARAÚJO, M. C. P., ALVES, R. E., CARKEET, C., CLEVIDENCE, B., & NOVOTNY, J. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9389–9394. (2007)

DE FARIA JÚNIOR, C. L. L. "Diversidade e aplicações biotecnológicas de leveduras e fungos filamentosos presentes em ambientes aquáticos contaminados com arsênio." Tese de doutorado, UFMG (2011)

DE MELLO, T., ROSA, T.L.M., SIMÕES, I.M. *ET AL*. Reserve mobilization and in vitro germination of *Euterpe edulis* (Martius) seeds at different maturation stages. *Trees* 36, 415–426. (2022)

DE OLIVEIRA, P.R.S., TRUGILHO, P.F. & DE OLIVEIRA, T.J.P. Briquettes of acai seeds: characterization of the biomass and influence of the parameters of production temperature and pressure in the physical-mechanical and energy quality. *Environ Sci Pollut Res* 29, 8549–8558 (2022).

DIXON, RA E SARNALA, S. . Biossíntese de proantocianidinas – Uma questão de proteção *Fisiologia Vegetal* , 184 (2) , 579-591 . (2020)

DREYFUSS, J.L. E OLIVEIRA, J. S. R.; Matriz extracelular e enzimas degradatórias na hematopoese e doenças onco-hematológicas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*;30(5):398-405 (2008)

DRIOUCH, H., HÄNSCH, R., WUCHERPFENNIG, T., KRULL, R., WITTMANN. C. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol Bioeng*. Feb;109(2):462-71. (2012)

DUARTE L, MATTE CR, BIZARRO CV, AYUB MAZ. Review transglutaminases: part II-industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. World J Microbiol Biotechnol. Dec 26;36(1):11. (2019)

ELANCO. Hemicell®, 2024. Disponível em <<https://farmanimal.elanco.com/us/poultry/collection/hemicell>>. Acesso em: 27/04/2024.

EMBRAPA, Publicação sobre a palmeira Juçara mostra relevância e benefícios da espécie. (2022) Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/77061912/publicacao-sobre-a-palmeira-jucara-mostra-relevancia-e-beneficios-da-especie>> Acesso em 02/06/2024

EMBRAPA. Açaí - Mercado Externo, 2021. Disponível em <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/acai/pre-producao/importancia-socioeconomica/mercado-externo>>. Último acesso em 19/05/2024

ENZYME SOLUTIONS, 2024. Disponível em <<https://www.enzymesolutions.com.au/catalogue/4457/cleaning.html>> Acesso em: 27/04/2024.

FERREIRA, D. S., GOMES, A. L., DA SILVA, M. G., ALVES, A. B. AGNOL, W. H. D., FERRARI, R. A., CARVALHO, P. R. N., PACHECO, M. T. B. Antioxidant Capacity and Chemical Characterization of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Fractions. Food Science and Technology 4(5): 95-102 (2016)

FERREIRA, D. S., GOMES, A. L., DA SILVA, M. G., ALVES, A. B. AGNOL, W. H. D., FERRARI, R. A., CARVALHO, P. R. N., PACHECO, M. T. B. Antioxidant Capacity and Chemical Characterization of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Fractions. Food Science and Technology 4(5): 95-102 (2016)

FØDEVARER. DANISCO: Genencor launches MANNASTAR product, a new detergent enzyme specially designed to target stains like chocolate ice cream and salad dressing. (2007). Disponível em <<https://www.altinget.dk/foedevarer/artikel/danisco-genencor-launches-mannastar-product-a-new-detergent-enzyme-specially-designed-to-target-stains-like-chocolate-ice-cream-and-salad-dressing>>. Acesso em 28/04/2024

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, p.353-358, (2005)

HARBONE, J. B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. Third Edition. Thomson Science, (1998)

HOLTZAPPLE, M. T. Hemicelluloses. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, p. 3060–3071. (2003)

HU K., LI C.-X., PAN J., NI Y., ZHANG X.-Y., XU J.-H. Desempenho de uma nova mananase termoestável na quebra de fluidos de fraturamento à base de guar em altas temperaturas com pouca degradação prematura. Apl. Bioquímica. Biotecnologia. 172 1215–1226. 10.1007/s12010-013-0484-8. (2014)

IBGE, Mapa - Açaí (cultivo) - Valor da produção (Mil Reais), (2022) Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/acai-cultivo/br>> Acesso em 15/02/2024

IBGE, PEVS - Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura - 2022. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html>> Último acesso em 19/052024.

ICHINOSE H., SUZUKI K., MICHIKAWA M., SATO H., YUKI M., KAMINO K., *ET AL.* Purificação, clonagem, expressão funcional, estrutura e caracterização de uma β -mananase termoestável de *Talaromyces trachyspermus* B168 e sua eficiência na produção de manooligossacarídeos a partir de resíduos de café. J. Appl. Glicoscos. JAG-2017_2018 65 13–21. 10.5458/jag.jag.jag-2017_018. (2017)

IGC, Grain Market Report, 14/03/2024. Disponível em: https://www.igc.int/en/gmr_summary.aspx

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C.; Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their

fractions, *Journal of Functional Foods*, Volume 17, Pages 422-433, ISSN 1756-464. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>. (2015)

KASCHUK, J. J. Biomassa lignocelulósica como fonte de açúcares fermentescíveis e de materiais: sacarificação de fibras de sisal e preparação de membranas para aplicação em células solares a partir de derivado de celulose. 2019. 210f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. (2019)

KLASS, D. L. Biomass for renewable energy, fuels and chemicals. San Diego: Academic Press, 651p, (1998)

KREINER, M., HARVEY, L. M., MCNEIL, B. Morphological and enzymatic responses of a recombinant *Aspergillus niger* to oxidative stressors in chemostat cultures. *Journal of Biotechnology*, Volume 100, Issue 3, Pages 251-260, ISSN 0168-1656, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00245-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00245-6). (2003)

KUMARI U, SINGH R, RAY T, RANA S, SAHA P, MALHOTRA K, DANIELL H. Validation of leaf enzymes in the detergent and textile industries: launching of a new platform technology. *Plant Biotechnol J*. Jun;17(6):1167-1182. doi: 10.1111/pbi.13122. Epub 2019 Apr 23. PMID: 30963679; PMCID: PMC6523609. (2019)

KUYUCAK, N. e VOLESKY, B. Accumulation of Gold by Algal Biosorbent. *Biorecovery*, 1, 189-204 (1989).

LI, C., ZHOU, J., DU, G., CHEN, J., TAKAHASHI, S., & LIU, S. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. *Biotechnology Advances*, 107630. (2020)

LI, J. Y., DU, G., YANG, X., & HUANG, W.-D. Effect of Proanthocyanidins on Yeast Metabolism, H⁺-ATPase Activity, and Wine Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 512–518. doi:10.5344/ajev.2011.11021. (2011)

LI, Q., BRIAN MCNEIL, B., HARVEY, L. M. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 44, Issue 3, Pages 394-402, ISSN 0891-5849. (2008)

LIN, T. AND CHEN, C. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. *Process Biochemistry*. 39: 1103–1109. (2004)

LYU, J., TEGELAAR, M., POST, H., TORRES, J. T, TORCHIA, C., ALTELAAR, A. F. M., BLEICHRODT R. J., DE COCK, H., LUGONES, L. G., WEST, H. A. B. A heterogeneidade na agregação e germinação de esporos resulta em microcolônias cooperativas de tamanhos diferentes em uma cultura de *Aspergillus niger* mBio, 14, Artigo e0087022,10.1128/corrída.00870-22. (2023)

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Comunicado Técnico 85 Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS (2013)

MALIEN-AUBERT, C.; DANGLES, O. AND AMIOT, M. J. Influence of Procyanidins on the Color Stability of Oenin Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (11), 3299-3305 (2002)

MARCO, J. C. I. Produção e caracterização de mananase de *Aspergillus foetidus* cultivado em casca do grão da soja. vii, 72 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana). Universidade de Brasília, Brasília. (2014)

MARCONI, D. Caracterização e processamento das sementes de juçara (*Euterpe edulis*) e açaí-do-amazonas (*Euterpe precatoria*) para a produção de manose. Orientadora Dr. Ayla Sant'ana. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (2024)

MARTINAZZO, R.; SILVEIRA, C. A. P.; BAMBERG, A. L.; PILLON, C. N.; VALGAS, R. A. Estimativa da geração de coprodutos de processos agroindustriais e da mineração e do potencial de fornecimento de nutrientes para a agricultura / Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 48 p. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1516-8840 ; 385). (2015)

MARTINS, G. R., DO AMARAL, BRUM, BORGES, DE MOURA, FERREIRA, SANGENITO, SANTOS, FIGUEIREDO, DA SILVA, Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of açaí seed (*Euterpe oleracea* Mart.) extracts containing A- and B-type procyanidins, *LWT*, Volume 132, 109830, ISSN 0023-6438 (2020)

MARTINS, G. R., MATTOS, M. M. G., NASCIMENTO, F. M., BRUM F. L., MOHANA-BORGES, R., FIGUEIREDO, N. G., NETO, D. F. M., DOMONT, G. M., NOGUEIRA, F. C. S., CAMPOS, F. A. P. AND DA SILVA, A. S. Phenolic Profile and Antioxidant Properties in Extracts of Developing Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70 (51), 16218-16228 (2022).

MARTINS, G. R.; GUEDES, D.; MARQUES DE PAULA, U. L.; DE OLIVEIRA, M. D. S. P.; LUTTERBACH, M. T. S.; REZNIK, L. Y.; SÉRVULO, E. F. C.; ALVIANO, C. S.; RIBEIRO DA SILVA, A. J.; ALVIANO, D. S. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extracts from Different Varieties: A Source of Proanthocyanidins and Eco-Friendly Corrosion Inhibition Activity. *Molecules*, 26, 3433, (2021)

MARTINS, G.R., DO AMARAL, F.R.L., BRUM, F.L., MOHANA-BORGES, R., DE MOURA, S.S.T., FERREIRA, F.A., SANGENITO, L.S., SANTOS, A.L.S., FIGUEIREDO, N.G., DA SILVA, A. S. A. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) extracts containing A- and B-type procyanidins. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 132, Article 109830, [10.1016/j.lwt.2020.109830](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109830) (2020)

MEGAZYME. Endo-1,4 β -Mannanase (*Aspergillus niger*), (2024) Disponível em <<https://www.megazyme.com/endo-1-4-beta-mannanase-Aspergillus-niger>>. Acesso em 28/04/2024

MELO, P. S., ARRIVETTI, L. O. R., ALENCAR, S. M. & SKIBSTED, L. H. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α -tocopherol of açai seed extracts and grape rachis extracts. *Food Chem.* 213, 440–449 (2016)

MELO, P. S.; SELANI, M. M.; GONÇALVES, R. H.; PAULINO, J. DE O.; MASSARIOLI, A. P.; ALENCAR, S. M. DE. Açai Seeds: An Unexplored Agro-Industrial Residue as a Potential Source of Lipids, Fibers, and Antioxidant Phenolic Compounds. *Ind. Crops Prod.* 161, 113204 (2021)

MENDOZA, M. Aproveitamento do resíduo agroindustrial de juçara (*Euterpe edulis* Martius): Um estudo de diferentes técnicas de extração de compostos fenólicos e antocianinas usando altas pressões. 2016. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (2016)

MILNE, T. A., CHUM, H. L., AGBLEVOR, F. A., JOHNSON, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods." Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar, 2-3 April, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992, pp. 341-366 (1992)

MONTEIRO, A.F., MIGUEZ, I.S., SILVA, J.P.R.B. *et al.* High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. *Sci Rep* 9, 10939 (2019)

MONTEIRO, V. N., & SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista processos químicos*, 3(5), 9-23. (2009)

MOODY, J.O., ADEBIYI, O.A., ADENIYI, B.A. Do Aloe vera and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu). *J Ethnopharmacol* 92: 57-60. (2004)

MOORE, W., and D. JOHNSON. Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture (1967)

MORDOR INTELLIGENCE Research & Advisory. (2023, July). Tamanho do mercado de enzimas industriais e análise de participação – Tendências e previsões de crescimento (2024 – 2029). Mordor Intelligence. Disponível em <<https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/industrial-enzymes-market>> Acesso em 27/04/2024.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 79, p. 165-178, (2008)

MOURA, A. C. F.; RIBEIRO, L. M.; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F. Cytological and histochemical evaluations reveal roles of the cotyledonary petiole in the germination and seedling development of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Protoplasma*, v. 256, p. 1299-1316, (2019)

MUDGIL D, BARAK S, KHATKAR BS. Guar gum: processing, properties and food applications-A Review. *J Food Sci Technol*. Mar;51(3):409-18. doi: 10.1007/s13197-011-0522-x. Epub 2011 Oct 4. PMID: 24587515; PMCID: PMC3931889 (2014)

MUSSATTO, SOLANGE & FERNANDES, MARCELA & MILAGRES, ADRIANE. Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria. *Ciência Hoje*. 41. 28-33. (2007)

NATTORP, A. *et al.* Model for random hydrolysis and end degradation of linear polysaccharides: Application to the thermal treatment of mannan in solution. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 38, n. 8, p. 2919–2926. (1999)

NELSON, D. AND COX, M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th Edition, W.H. Freeman & Company. (2013)

NETO, D. F. M., NASCIMENTO, J. R. S., MARTINS, G. R., SILVA, A. S., DOMONT, G. B., CAMPOS, F. A. P., & NOGUEIRA, F. C. S. Proteomic changes associated with the development of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds. *Proteomics*, 23, 1-8. (2023)

NGUELA, J. M., SIECZKOWSKI, N., ROI, S., & VERNHET, A. Sorption of grape proanthocyanidins and wine polyphenols by yeasts, inactivated yeasts, and yeast cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 660-670. (2015)

NOGUEIRA, L. A.; LORA, H. *Dendroenergia: Fundamentos e aplicações*, 2 ed. (2003)

NOGUEIRA, O. L.; NETO, J. T. F.; DE OLIVEIRA, M S. P.; ROGEZ, H. L. G. Açai: manejo, produção e processamento. *SEMANA DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA Week of Fruit Crop, Floriculture and Agroindustry*, 147 p. Fortaleza: Instituto Frutal, (2006)

NUNES, O. C. Prospecção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de mananases. Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira. 2019. TCC (Graduação - Biomedicina) - Unigranrio, [S. l.], (2019)

NUNES, O. C. Mananases de *Aspergillus niger* 205: Produção e aplicação usando coprodutos agroindustriais. Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira. 2024. Tese de mestrado (Pós-Graduação - Bioquímica) – IQ- UFRJ, (2024)

OLIVEIRA, J. A. R., KOMESU, A. & FILHO, R. M. Hydrothermal pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of seeds of açai (*Euterpe oleracea*) and sugar recovery. *Chem. Eng. Trans.* 37, 787–792 (2014)

OLIVEIRA, J. A. R., MARTINS, L. H. S., KOMESU, A. & MACIEL FILHO, R. Evaluation of alkaline delignification (NaOH) of açai seeds (*Euterpe oleracea*) treated with H₂SO₄ dilute and effect on enzymatic hydrolysis. *Chem. Eng. Trans.* 43, 499–504 (2015)

ORTIZ-RAMÍREZ JA, CUÉLLAR-CRUZ M, VILLAGÓMEZ-CASTRO JC, LÓPEZ-ROMERO E. Fungal Glycosidases in *Sporothrix* Species and *Candida albicans*. *J Fungi (Basel)*. Sep 12;9(9):919. (2023)

PENA, F. E. R. Desenvolvimento da palmeira juçara (*Euterpe edulis Martius*) consorciada com espécies arbóreas e café. Tese (doutorado em produção vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campo dos Goytacazes, RJ (2021).

PÉREZ, J. L., VÁZQUEZ, R. R. Removal of orange G dye by *Aspergillus niger* and its effect on organic acid production. *Prep Biochem Biotechnol*;53(7):860-871 (2023).

PESSOA, J.D.C., ARDUIN, M., MARTINS, M.A., CARVALHO, J.E.U. de Characterization of Açai (*E. oleracea*) Fruits and its Processing Residues. v. 53, n. December, p. 1451–1460. (2010)

PIRT, S.J. A theory of the mode of growth of fungi in the form of *pellets* in submerged culture. *Proc. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* 1966, 166, 369–373 (1966)

PORBSTEIN, R.F.; HICKS, R.E. Synthetic fuels. New York: McGraw Hill Book Company, 490p. (1982)

PUCHART, V., VRSANSKA, M., SVOBODA, P., POHL, J., OGEL, Z., & BIELY, P. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674, 239–250. (2004)

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta*, v. 144, p. 696–703. (2015)

RAVULA, V. K. Study on fungal pellet morphology and its industrial applications. Dissertation. Disponível em: <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:hb:diva-13497>. (2017)

RIGATTO, K. F., BRAIDO, L. S., MARADINI FILHO, A. M., ELABORAÇÃO DE “COOKIES” À BASE DE RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DO FRUTO DA PALMEIRA JUÇARA. 10.29327/cbcp2022.519860. (2022)

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F., LEMO, V., FARINAS, C. S., NETO, V. B. & COURI, S. Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid state fermentation. In 7th Brazilian MRS Meeting (2008a)

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V. ; LEMO, V. Produção de Complexos Lignocelulíticos em Substratos Derivados de Resíduos Agroindustriais por Fermentação Semi-sólida. In: WORKSHOP DE BIOCATALISE E BIOTRANSFORMAÇÃO, 4., 2008, São Carlos. Livro de resumos... São Carlos, SP: Instituto de Química de São Carlos,. p. 107. (2008b)

RUE EA, RUSH MD, VAN BREEMEN RB. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. *Phytochemistry Reviews* : Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Feb;17(1):1-16. DOI: 10.1007/s11101-017-9507-3. PMID: 29651231; PMCID: PMC5891158. (2018)

SANTIAGO, B. L. S., & RODRIGUES, F. DE ÁVILA. PROCESSAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL: UMA REVISÃO. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 3(7), 1011–1022 (2017)

SARNOSKI, P. J., BOYER, R. R., & O’KEEFE, S. F. Application of proanthocyanidins from peanut skins as a natural yeast inhibitory agent. *Journal of food science*, 77(4), M242-M249. (2012)

SCHÄFER, THOMAS & KIRK, OLE & BORCHERT, TORBEN & FUGLSANG, CLAUS & PEDERSEN, SVEN & SALMON, SONJA & OLSEN, HANS & DEINHAMMER, RANDY & LUND, HENRIK. *Enzymes for Technical Applications*. 10.1002/3527600035.bpol7013. (2005)

SCHUSTER, .E., DUNN-COLEMAN, .N., FRISVAD, .J. *et al.* Sobre a segurança do *Aspergillus niger* – uma revisão. *Appl Microbiol Biotechnol* **59** , 426-435 (2002)

SCIENCE PHOTO. *Aspergillus niger* SEM. Disponível em <https://www.sciencephoto.com/media/14616/view/Aspergillus-niger-fungus-sem> Acesso em 05/06/2024

SHANE, S.M. Mechanisms and benefits of mannanoligosaccharides in poultry nutrition. Symposium on biotechnology. (2001)

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. [s.l.] Artmed Editora Ltda, (2017)

SILVA, D.F., VIDAL, F.C.B., SANTOS, D. *et al.* Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complement Altern Med* **14**, 175 (2014)

SLUITER, A. *et al.* Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); (2005) Disponível em: www.nrel.gov.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (2011). Disponível em: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.

SOARES, E.R., MONTEIRO, E.B., DE BEM, G.F., INADA, K.O.P., TORRES, A.G., PERRONE, D., SOULAGE, C. O., MONTEIRO, M.C., RESENDE, A.C., MOURA-NUNES, N., COSTA, C.A., DALEPRANE, J.B. Up-regulation of Nrf2-antioxidant signaling by Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract prevents oxidative stress in human endothelial cells. *J. Funct. Foods*, 37, pp. 107-115, (2017)

SODRÉ, J. B. Morfologia das palmeiras como meio de identificação e uso paisagístico. Monografia de especialização em Plantas Ornamentais e Paisagismo. Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, Brasil (2005)

SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 1, p. 1–19. (2017)

STALBRAND, S., SIIKA-AHO, M., TENKANEN, M., VIIJARI, L. Purification and characterization of two B-mannases from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 229-242, (1993)

SUNSON (2024). Disponível em http://en.sunsonenzymes.com/prod_view.aspx?TypeId=86&Id=254&FId=t3:86:3. Acesso em 28/04/2024

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; DA SILVA HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos Conhecidos, novos aliados. *Rev. Virtual Quim.*, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, (2017)

THOMBARE N., JHA U., MISHRA S., SIDDIQUI M. Goma guar como matéria-prima promissora para diversas aplicações: uma revisão. *Internacional J. Biol. Macromol.* 88 361–372. 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001. (2016)

TROIAN, L. C. *et al.* Cartilha da Juçara: *Euterpe edulis*. Informações sobre Boas Práticas e Manejo. Rede Juçara, Ministério do Meio Ambiente: PDA. 36p. (2014)

TOMAZ, F. S. Purificação e caracterização de endo- β -mananase produzida por *Aspergillus niger* 1234. Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira. 2019. TESE DE MESTRADO (Bioquímica) – Instituto de química da UFRJ, (2024)

VAN PEE, KRISTINE LAURA IGNATIUS; VAN SPEYBROECK, MICHEL M. P.; VAN POELE, JOZEF. Use of mannanases as slime control agents, WO1996036569A1, 1996-11-21. Disponível em <https://patents.google.com/patent/WO1996036569A1/en>. Acesso em 28/04/2024

VAN ZYL, W.H., ROSE, S.H., TROLLOPE, K., GORGENS, J.F., 2010. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochem.* 45, 1203–1213. (2010)

VARGAS, A. A. R., DE LIMA, M. S. X., KALEFF, P. R., ALVARENGA, M. A. M., DA SILVA, C. R. F., PINTO NETO, S. M., PIRES, J. A. P., SILVA, M. R. L. E MARTINS, M. R. Criptococoma em hemisfério cerebral - 4. Microscopia eletrônica. Departamento de Anatomia Patológica, FCM-UNICAMP. Disponível em <https://anatpat.unicamp.br/nptcripto1d.html> Acesso em 25/07/2024

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G.; MORGAN, T. J. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel*, v. 94, p. 1-33 (2012)

VEITER, L., RAJAMANICKAM, V. & HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 2997–3006 (2018)

VÉLEZ-MERCADO MI, TALAVERA-CARO AG, ESCOBEDO-URIBE KM, SÁNCHEZ-MUÑOZ S, LUÉVANOS-ESCAREÑO MP, HERNÁNDEZ-TERÁN F, ALVARADO A, BALAGURUSAMY N. Bioconversion of Lignocellulosic Biomass into Value Added Products under Anaerobic Conditions: Insight into Proteomic Studies. *Int J Mol Sci*. Nov 12;22(22):12249. (2021)

VIEIRA, I.R.S., DA SILVA, A.A., DA SILVA, B.D. *et al.* Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Potential of Green Synthesized ZnO Nanoparticles from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Berry Seed Residue Extract. *Waste Biomass Valor* (2024)

WRIGHT P.J., WALLIS, A.F., Rapid determination of cellulose in plantation eucalypt woods to predict kraft pulps yields *Tappi Journal* v81 n2 p1263Q Feb (1998)

XIE, SHUANG BEIJING; CAO, LIJUAN BEIJING; ZHOU, YUCHENG. Enzymatic treatment of cellulosic textile. PCT/CN2015/079095, 10.07.2019. (2019) Disponível em <<https://patentimages.storage.googleapis.com/b2/e8/b0/2e56db0a913281/EP3143195B1.pdf>> Acesso em: 27/04/2024.

YAMAGUCHI, K. K. L., PEREIRA, L. F. R., LAMARÃO, C. V., LIMA, E. S., VEIGA-JUNIOR, V. F., Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review, *Food Chemistry*, Volume 179, Pages 137-151, ISSN 0308-8146, (2015)

ZHANG J, ZHANG J. The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Crit Rev Biotechnol*. Dec;36(6):1066-1077. (2016)