

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

INSTITUTO DE QUÍMICA

IZABELLE MARIE DA SILVA

Uso de coprodutos da cadeia produtiva da laranja pré-tratados em reator hidrotérmico
como fonte de carbono na produção de hidrolases por *Aspergillus awamori*

Rio de Janeiro

2024

IZABELLE MARIE DA SILVA

Uso de coprodutos da cadeia produtiva da laranja pré-tratados em reator hidrotérmico como fonte de carbono na produção de hidrolases por *Aspergillus awamori*

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.

Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira (DBq-IQ/UFRJ)

Coorientadora: Leda Maria Fortes Gottschalk (Embrapa Agroindústria de Alimentos)

Rio de Janeiro

2024

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, Isabelle Marie
dl11u Uso de coprodutos da cadeia produtiva da laranja
pré-tratados em reator hidrotérmico como fonte de
carbono na produção de hidrolases por *Aspergillus*
awamori / Isabelle Marie da Silva. -- Rio de
Janeiro, 2024.
103 f.

Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira.
Coorientador: Leda Maria Fontes Gottschalk.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Química, Bacharel em Química, 2024.

1. Bioquímica. 2. Pré-tratamento Hidrotérmico. 3.
Laranja. 4. Produção de enzimas. I. Sposina Sobral
Teixeira, Ricardo, orient. II. Fontes Gottschalk,
Leda Maria, coorient. III. Título.

Izabelle Marie da Silva

Uso de coprodutos da cadeia produtiva da laranja pré-tratados em reator hidrotérmico como fonte de carbono na produção de hidrolases por *Aspergillus awamori*

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.

Aprovada em: 09/12/2024



Ricardo Sposina Sobral Teixeira (Orientador), Doutor - IQ/UFRJ



Elisa d'Avila Costa Cavalcanti (Banca Examinadora), Doutora – IQ/UFRJ



Edmar das Mercês Penha (Banca Examinadora), Doutor - Embrapa Agroindústria de Alimentos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó, Maria Isabel, uma guerreira que nunca desistiu e sempre me incentivou a seguir meus sonhos.

Saudades eternas.

"O que acho interessante é como tantos supervilões são cientistas. Se o mundo não me respeitar, posso mudar de lado."

- Sheldon Cooper (The Big Bang Theory)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Leila, por ser a maior incentivadora dos meus sonhos e por me dar suporte durante toda a minha vida. Agradeço ao meu pai, Adalberto, por torcer por mim em todos os momentos. Agradeço ao meu namorado, Hugo Dias, que esteve comigo em todas as ocasiões, por me apoiar e por ter trazido leveza durante toda a nossa jornada, te amo meu amor. Agradeço à minha cachorrinha, Luna, por ser a melhor companheira que eu poderia ter. Agradeço ao primo, André, por ser o maior exemplo para mim. Agradeço à toda minha família, por me acolherem.

Agradeço ao meu amigo, Lucas Vieira, por me guiar, me ensinar e ser um grande parceiro de laboratório. Agradeço aos meus amigos, Caroline Thiemy e Lucas Cavalcanti, por me ajudarem e estarem presentes nos momentos difíceis. Agradeço ao meu amigo, Luan Holanda, por ser a pessoa mais inspiradora e esforçada. Agradeço aos meus amigos, Gabriel Macedo e Larissa Oliveira, por me fazerem rir e me incentivarem. Agradeço às minhas amigas, Julia Vaz e Juliana Duarte, por sempre se preocuparem comigo e dizerem que tudo ficaria bem. Agradeço ao meu cunhado, Artur Dias, por ter me ajudado a passar em Computação.

Agradeço aos professores, Sérgio Machado, Aline Domingos, Viviane Gomes, Lúcia Siqueira, Bruno Scardua e Elisa Cavalcanti pelas aulas incríveis, pelas lições dadas, pela parceria, pelo exemplo, pelo carinho e por me tornarem uma aluna melhor.

Agradeço aos meus orientadores, Ricardo Teixeira e Leda Maria por me auxiliarem a concluir o curso de graduação, pela orientação durante o projeto e pela confiança depositada em mim. Agradeço à toda equipe do Laboratório Bioetanol por ter me ajudado e me ensinado muitos conceitos necessários para minha formação.

RESUMO

Pectinases são enzimas que hidrolisam cadeias da pectina, polissacarídeo presente na parede celular vegetal. Apesar de menos estudadas na literatura em comparação com outras hidrolases, como celulasas e xilanases, possuem grande relevância industrial, especialmente na clarificação de sucos e frutas. Essas enzimas podem ser produzidas por diversos microrganismos, sendo os fungos filamentosos os principais produtores industriais devido à sua capacidade de secretar grandes quantidades de pectinases na presença de fontes de carbono indutoras que contenham pectina. O bagaço de laranja (*Citrus sinensis*), coproduto rico em pectina gerado na extração de suco, é uma potencial fonte de carbono para a produção de pectinases, especialmente no Brasil, maior produtor mundial de laranja. Por ser uma biomassa recalcitrante, pode ser necessário um pré-tratamento para melhorar a acessibilidade aos carboidratos. Então, o foco deste trabalho foi a produção de pectinases e xilanases por *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 em cultivo submerso, utilizando como fontes de carbono as frações líquidas resultantes do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja a 70, 100, 140 e 180°C. Como neste pré-tratamento ocorre a formação de produtos de degradação de açúcares, como hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, estes compostos foram quantificados para avaliar sua influência no cultivo. As frações líquidas que apresentaram as maiores concentrações de HMF e furfural foram as de 140°C, $11,06 \pm 0,10$ e $73,03 \pm 1,80$ mg/L, e 180°C, $262,27 \pm 2,61$ e $673,51 \pm 33,07$ mg/L, respectivamente. As maiores atividades de pectinases foram 17,74, 16,96 e 21,45 UI/mL utilizando, como fonte de carbono, as frações líquidas de 70 e 100°C e o bagaço de laranja, respectivamente. Estes resultados mostram que as maiores quantidades dos produtos de degradação inibiram a ação microbiana e afetaram o rendimento da produção enzimática nas frações líquidas de 140 e 180°C. Então, foram escolhidas as frações líquidas de 70 e 100°C para estudo comparativo com o bagaço de laranja. As atividades de pectinases mostram que não houve diferença significativa entre o pré-tratamento a 100°C e o bagaço de laranja, $19,69 \pm 2,51$ e $21,57 \pm 1,71$ UI/mL, respectivamente. Para as xilanases, a maior atividade obtida foi $42,78 \pm 0,36$ UI/mL utilizando a fração líquida de 70°C, 361% maior que utilizando o bagaço de laranja, $9,28 \pm 0,83$ UI/mL. Os resultados apresentados neste trabalho, mais os dados da literatura, sugerem que o pré-tratamento hidrotérmico é efetivo na extração de pectina e hemicelulose, mas a formação de altas concentrações de inibidores afeta significativamente a ação dos microrganismos.

Palavras-chave: bagaço de laranja, pectinases, xilanases, pré-tratamento hidrotérmico, *Aspergillus awamori*.

ABSTRACT

Pectinases are enzymes that hydrolyze pectin chains, a polysaccharide found in the plant cell wall. Despite being less studied in the literature compared to other hydrolases, such as cellulases and xylanases, they hold great industrial relevance, especially in juice and fruit clarification. These enzymes can be produced by various microorganisms, with filamentous fungi being the main industrial producers due to their ability to secrete large amounts of pectinases in the presence of carbon sources containing pectin. Orange peel (*Citrus sinensis*), a pectin-rich byproduct generated during juice extraction, is a potential carbon source for pectinase production, particularly in Brazil, the world's largest orange producer. As it is a recalcitrant biomass, a pretreatment may be required to improve carbohydrate accessibility. The focus of this study was the production of pectinases and xylanases by *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 in submerged culture, using liquid fractions resulting from the hydrothermal pretreatment of raw orange peel at 70, 100, 140, and 180°C as carbon sources. During this pretreatment, sugar degradation products such as hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural are formed. These compounds were quantified to evaluate their influence on the culture. The liquid fractions with the highest concentrations of HMF and furfural were those treated at 140°C (11.06 ± 0.10 and 73.03 ± 1.80 mg/L, respectively) and 180°C (262.27 ± 2.61 and 673.51 ± 33.07 mg/L, respectively). The highest pectinase activities were 17.74, 16.96, and 21.45 U/mL, using as carbon sources the liquid fractions from 70 and 100°C and the orange peel, respectively. These results indicate that higher concentrations of degradation products inhibited microbial activity and affected enzymatic production yields in the liquid fractions from 140 and 180°C. Thus, the liquid fractions from 70 and 100°C were selected for a comparative study with orange peel. The pectinase activities revealed no significant difference between the pretreatment at 100°C and orange peel, with activities of 19.69 ± 2.51 and 21.57 ± 1.71 U/mL, respectively. For xylanases, the highest activity was 42.78 ± 0.36 U/mL using the liquid fraction from 70°C, which was 361% higher than when using orange peel (9.28 ± 0.83 U/mL). The results presented in this study, along with literature data, suggest that hydrothermal pretreatment is effective in extracting pectin and hemicellulose, but the formation of high concentrations of inhibitors significantly affects microbial activity.

Keywords: orange bagasse, pectinases, xylanases, hydrothermal pretreatment, *Aspergillus awamori*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resíduos agroindustriais gerados em território brasileiro. Adaptado de IBGE (2023)	19
Figura 2 - Cadeia principal da pectina contendo unidades de ácido galacturônico. Autoria própria.....	21
Figura 3 - Representação do encaixe entre o substrato e o sítio ativo da molécula da enzima. Retirado de Robinson (2015).....	23
Figura 4 - Redução da energia de ativação do estado de transição requerida para iniciar a reação. Sem biocatalisador (a), com biocatalisador (b). Retirado de Robinson (2015)	25
Figura 5 - Pesquisa na base Scopus utilizando as palavras-chaves " <i>cellulases</i> ", " <i>xylanases</i> " e " <i>pectinases</i> " entre 1994 e 2024, resultados expressos anualmente.	26
Figura 6 - Resultados obtidos na base Scopus ao pesquisar as palavras-chaves " <i>production</i> " e " <i>enzymes</i> " em títulos de artigos, de 2004 a 2024.....	26
Figura 7 - Resultados obtidos na base Scopus ao pesquisar as palavras-chaves " <i>production</i> " e " <i>pectinases</i> " em títulos de artigos, de 2004 a 2024.	27
Figura 8 - Proposta estrutural da cadeia da pectina, onde a homogalacturonana e a ramnogalacturonana I são estruturas externas à ramnogalacturonana II (VINCKEN, SCHOLS, <i>et al.</i> , 2003).....	30
Figura 9 - Proposta da estrutura da ramnogalacturonana I mostrando a contribuição de cada composto em sua cadeia complexa (VINCKEN, SCHOLS, <i>et al.</i> , 2003).....	30
Figura 10 - Cenário do mercado mundial de comercialização de pectinases e prospecção de crescimento até 2030.	32
Figura 11 - Estrutura molecular da xilana e enzimas xilanolíticas envolvidas na sua degradação. Ac: grupo acetil; α -Araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcUA: ácido α -4-O- metilglicurônico. Retirado de (BEG, KAPOOR, <i>et al.</i> , 2001).	33
Figura 12 - Cenário mundial de produção de xilanases e prospecção de crescimento até 2032. Retirado de (MARKET RESEARCH FUTURE, 2023).....	34
Figura 13 - Microscopia óptica do corpo frutífero do fungo <i>Aspergillus awamori</i> (LOTFY, SAYED, <i>et al.</i> , 2021).....	36
Figura 14 - Estrutura do complexo lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) presente na parede celular de plantas e vegetais. Adaptado de VOLYNETS, EIN-MOZAFFARI, <i>et al.</i> , 2017.	38

Figura 15 - Composição ilustrativa da parede celular vegetal em biomassas pécticas. Retirado de Carpita (2011).	38
Figura 16 - Laranjeira (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck). Retirado de MANISH, MAHESH, et al. 2013.	39
Figura 17 - Segmentos da fruta da laranja. Autoria própria.	40
Figura 18 - Bagaço de laranja após a extração da polpa para produção de suco. Fonte: <i>Ellen Macarthur Foundation</i> .	42
Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de laranja in natura, à esquerda com aumento de 1000x e à direita com aumento de 3500x, apresentado por Martini (2009).	43
Figura 20 - Ilustração de como o pré-tratamento age na estrutura do complexo lignocelulósico, facilitando o acesso às enzimas. Retirado de Volynets, Ein-Mozaffari, et al. (2017).	44
Figura 21 - Reação de degradação de pentoses (xilose e arabinose) provenientes da Hemicelulose, em furfural. Autoria própria.	46
Figura 22 - Reação de degradação de hexoses (glicose) em hidroximetilfurfural. Autoria Própria.	47
Figura 23 - Moinho de facas modelo Pulverisette P-19 (Fritsch, Alemanha), localizado no Laboratório Bioetanol na UFRJ.	49
Figura 24 - Hidrólise ácida do bagaço de laranja in natura. Tubos de hidrólise com a biomassa antes (A) e depois (B) da hidrólise.	51
Figura 25 - Reator Parr modelo 4848B, localizado no Laboratório Bioetanol na UFRJ	54
Figura 26 - Amostra de bagaço de laranja in natura antes de passar pelo moinho de facas, à esquerda, e moída e peneirada, à direita.	61
Figura 27 - Cromatograma obtido na quantificação de ácido poligalacturônico na amostra de bagaço de laranja in natura hidrolisado.	63
Figura 28 - Cromatograma obtido na quantificação de ácido galacturônico na amostra de bagaço de laranja in natura hidrolisado.	63
Figura 29 - Perfil de temperatura (eixo primário) e pressão (eixo secundário) ao longo do tempo para pré-tratamento hidrotérmico, nas condições de (A) 70°C por 30 minutos, (B) 100°C, (C) 140°C e (D) 180°C por 60 minutos, do bagaço de laranja in natura.	66
Figura 30 - Frações sólidas úmidas do bagaço de laranja pré-tratado hidrotermicamente a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D), à esquerda. Frações sólidas secas do bagaço de laranja pré-tratado hidrotermicamente a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D), à direita.	68

Figura 31 - Frações líquidas do bagaço de laranja pré-tratado hidrotermicamente a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D).	68
Figura 32 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 70°C por 30 minutos.	71
Figura 33 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 100°C por 60 minutos.	71
Figura 34 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 140°C por 60 minutos.	72
Figura 35 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 180°C por 60 minutos.	72
Figura 36 - Precipitação da pectina presente nas frações líquidas do PTH por adição de etanol 96%.	73
Figura 37 - Precipitação da pectina presente nas frações líquidas do PTH com adição de etanol 96% após uma hora de repouso.	74
Figura 38 - Pectina extraída e seca em estufa a peso constante de cada fração líquida após o PTH a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D). Autoria própria.....	75
Figura 39 - Espectro de infravermelho das frações líquidas, liofilizadas, resultantes do PTH do bagaço de laranja <i>in natura</i> a 70°C, 100°C, 140°C e 180°C.	77
Figura 40 - Espectro de FTIR do bagaço de laranja <i>in natura</i> (a), casca de laranja (b), casca de banana (c) e casca de manga (d) (SÁNCHEZ OROZCO, BALDERAS HERNÁNDEZ, <i>et al.</i> , 2014).	78
Figura 41 - Espectro de varredura na faixa do UV-Vis (200 - 600 nm) das frações líquidas diluídas obtidas nos PTH de 70°C, 100°C, 140°C e 180°C.	79
Figura 42 - Evolução do crescimento e formação de esporos do fungo filamentosso <i>Aspergillus awamori</i> em placas de PDA em 3 dias (A), 5 dias (B) e 7 dias (C).	82
Figura 43 - Microscopia óptica da estrutura morfológica do <i>Aspergillus awamori</i> cultivado em PDA, aumento de 400x.	82
Figura 44 - Contagem em câmara de Neubauer, aumento de 100x (A) e 400x (B).	83
Figura 45 - Atividade de pectinases em UI/mL produzidas a partir do <i>Aspergillus awamori</i> , utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C, 100°C, 140°C e 180°C e bagaço de laranja <i>in natura</i> como fontes de carbono.	84
Figura 46 - Atividade de xilanases em UI/mL produzidas a partir do <i>Aspergillus awamori</i> , utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C, 100°C, 140°C e 180°C e bagaço de laranja <i>in natura</i> como fontes de carbono.	85

- Figura 47 - Atividade de pectinases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus awamori*, utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C e bagaço de laranja *in natura* 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. 86
- Figura 48 - Atividade de xilanases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus awamori*, utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C e bagaço de laranja *in natura* 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. 87
- Figura 49 - Formação de pellets de *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 em inóculos com a fração líquida do PTH a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D) como fonte de carbono. 91
- Figura 50 - Morfologia do *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 em inóculo contendo o bagaço de laranja *in natura*. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação primária de enzimas	24
Tabela 2 - Classificação de pectinases conforme seu mecanismo de ação em diferentes partes da cadeia de pectina (UENOJO, PASTORE, 2007).	31
Tabela 3 - Classificação de xilanases conforme seu mecanismo de ação na cadeia da Xilana (SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002).....	34
Tabela 4 - Composição química do bagaço de laranja apresentada por Rivas et al (2013).....	42
Tabela 5 - Dados para a construção da curva de calibração para determinação do teor de açúcares redutores.....	57
Tabela 6 – Dados para a construção da curva de calibração de ácido galacturônico para dosagem de atividade de pectinases	59
Tabela 7 – Dados para a construção da curva de calibração de xilose para a dosagem da atividade de xilanases.	60
Tabela 8 - Composição química do bagaço de laranja <i>in natura</i> , expressa em percentual de massa seca.....	62
Tabela 9 - Composição da estrutura lignocelulósica presente no bagaço de laranja <i>in natura</i>	63
Tabela 10 - Análise elementar do bagaço de laranja <i>in natura</i>	65
Tabela 11 - Recuperação de sólidos de bagaço de laranja após o pré-tratamento hidrotérmico.	67
Tabela 12 - Registro de pH da suspensão de sólidos antes e depois de cada pré-tratamento, e concentração de açúcares redutores em cada fração líquida antes e após a hidrólise ácida.	69
Tabela 13 – Massa (g), concentração (g/L) e recuperação percentual (m/m) de pectina presente nas frações líquidas resultantes do PTH.....	74
Tabela 14 - Bandas obtidas em espectroscopia de infravermelho entre 4000 e 600 cm ⁻¹ para cada PTH.	77
Tabela 15 - Quantificação dos produtos de degradação, HMF e furfural, formados durante o PTH do bagaço de laranja <i>in natura</i>	80
Tabela 16 - Comparação da atividade enzimática de pectinases, em UI/mL, por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> , com fontes de carbono e pH diferentes.	88
Tabela 17 - Tamanho dos pellets de <i>A. awamori</i> em cada fração líquida.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AFEX – *Ammonia Steam Explosion*

ATR - *Attenuated Total Reflectance*

CAGR – *Compound Annual Growth Rate*

CWMI – *Common-Wealth Mycological Institute*

DRX – *Difração de Raio-X*

ES – *Enzima-Substrato*

FDA – *Food and Drug Administration*

FF – *furfural*

FS – *Fermentação submersa*

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

HMF – *5-hidroximetilfurfural*

HPLC-DAD - *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector*

HPLC-RI – *High Performance Liquid Chromatography – Refractive Index*

IBGE – *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*

NREL – *National Renewable Energy Laboratory*

PDA – *Potato Dextrose Agar*

pH – *Potencial Hidrogeniônico*

PTH – *Pré-tratamento Hidrotérmico*

UV-Vis – *Ultravioleta-Visível*

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. Enzimas	22
2.1.1. Aplicações industriais de enzimas	25
2.1.2. Pectinases.....	29
2.1.3. Xilanases.....	32
2.2. Fungos filamentosos	34
2.2.1. <i>Aspergillus awamori</i>	35
2.3. Biomassa lignocelulósica	37
2.4. Biomassa da Laranja	39
2.4.1. Características morfológicas e botânicas.....	39
2.4.2. Produção mundial e comercialização	40
2.4.3. Coproduto agroindustrial da laranja	41
2.5. Pré-tratamento	43
2.5.1. Pré-tratamento hidrotérmico.....	45
2.6. Bioprocesso em estado submerso	47
3. OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo Geral	48
3.2. Objetivos Específicos	48
4. METODOLOGIA	48

4.1. Bagaço de laranja <i>in natura</i>	49
4.2. Caracterização da biomassa <i>in natura</i>	49
4.2.1. Determinação da massa de extrativos.....	49
4.2.2. Determinação da composição química do coproduto por HPLC	50
4.2.3. Determinação do teor de lignina solúvel	52
4.2.4. Determinação do teor de cinzas totais	52
4.2.5. Determinação do teor de sólidos insolúveis	52
4.2.6. Análise elementar	53
4.3. Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço da laranja	53
4.4. Caracterização da fração líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico 55	
4.4.1. Medição de pH.....	55
4.4.2. Análises espectroscópicas.....	55
4.4.3. Identificação e quantificação de pectina.....	55
4.4.4. Determinação de produtos de degradação por HPLC	56
4.4.5. Determinação de açúcares redutores antes e após hidrólise ácida das frações líquidas 56	
4.5. Manutenção e propagação de esporos de <i>Aspergillus awamori</i>	57
4.6. Bioprocesso submerso	58
4.7. Dosagem da atividade enzimática	58
4.7.1. Dosagem da atividade de pectinase	58
4.7.2. Dosagem da atividade de xilanase.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. Caracterização do bagaço de laranja <i>in natura</i>	61
5.2. Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja	65
5.2.2. Caracterização das frações líquidas	69
5.2.3. Identificação e quantificação de pectina.....	70
5.2.4. Espectros de FTIR das frações líquidas liofilizadas.....	76

5.2.5.	Espectros de varredura na faixa do UV-Vis.....	78
5.2.6.	Quantificação de produtos de degradação	80
5.3.	Propagação de <i>Aspergillus awamori</i>	81
5.4.	Produção enzimática	83
6.	CONCLUSÃO	93
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira é uma das maiores produtoras globais de frutas ricas em pectina, como frutas cítricas, maçã e goiaba, sendo a maior produtora mundial de laranja, uma grande fonte de pectina, detendo 34,0% da produção mundial. O estado de São Paulo detém cerca de 70% da produção nacional, que é principalmente utilizada para exportação de suco (SANTOS, NÄÄS, *et al.*, 2013). Segundo o IBGE (2023) a quantidade de laranja produzida em território nacional em 2023 foi maior que 17 milhões de toneladas com valor de produção de, aproximadamente, R\$ 20 bilhões.

Em consequência de ser um dos maiores exportadores de produtos agroindustriais, o Brasil também é um dos maiores geradores de resíduos agroindustriais provenientes de culturas como a cana-de-açúcar, soja, milho, café e o maior quando se trata da produção de laranja. Esses resíduos incluem bagaço, cascas, palhas e sementes, os quais apresentam grande potencial para reaproveitamento na produção de bioenergia, biocombustíveis e insumos para indústria química e farmacêutica. Como boa parte da laranja é processada para produção de suco, o resultado é que a cada tonelada de laranja processada cerca de 45% a 60% do peso da fruta se torna um coproduto, incluindo casca, sementes e polpa, gerando entre 8 e 10 milhões de toneladas por ano de resíduo agroindustrial proveniente da cadeia produtiva da laranja (ALMAS TAJ AWAN, 2013).



Figura 1 - Resíduos agroindustriais gerados em território brasileiro. Adaptado de IBGE (2023)

Essas biomassas residuais são um matérias-primas promissoras para processos biotecnológicos devido ao seu alto teor de carboidratos, que, por exemplo, podem ser utilizados como substratos para produção de enzimas ou podem ser recuperados para geração de biocombustíveis e outros bioprodutos. No contexto de servirem como fonte de carbono para a produção de enzimas por microrganismos, se destacam os fungos filamentosos. A produção de enzimas por fungos filamentosos envolve processos de cultivo que exploram a capacidade desses microrganismos em sintetizar e secretar grandes quantidade de enzimas extracelulares. Em condições de cultivo adequadas, em cultivo submerso ou em estado sólido, fungos como *Aspergillus* e *Trichoderma* utilizam substratos ricos em carbono e nitrogênio, como essas biomassas residuais, para crescer e produzir enzimas específicas. Eles são capazes de produzir enzimas hidrolíticas, como celulasas, pectinases e xilanases, que possuem grande aplicação na degradação de polissacarídeos complexos presentes em materiais lignocelulósicos (VOLYNETS, EIN-MOZAFFARI, *et al.*, 2017).

Os principais componentes das biomassas lignocelulósicas – celulose, hemicelulose, lignina e pectina – constituem a estrutura da parede celular das plantas (BALAT, 2011). Celulose é um homopolissacarídeo de glicose. As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados ricos em xilose, arabinose, glicose, galactose e outros açúcares, enquanto a pectina é um heteropolissacarídeo formado majoritariamente por resíduos de ácido galacturônico. Esses carboidratos podem ser metabolizados por fungos filamentos para produzir enzimas hidrolíticas como pectinases e xilanases. A laranja (*Citrus sinensis*) é um exemplo de biomassa lignocelulósica rica em pectina (Figura 2) e hemicelulose, encontradas na casca e no bagaço. Estes coprodutos da indústria de cítricos contém quantidades significativas de ácido galacturônico, xilose, arabinose e outros açúcares, os tornando substratos com potencial para produção de pectinases e xilanases (MARTINI, 2009). A utilização do bagaço e a casca da laranja possui vantagens como a valorização de resíduos agroindustriais e a produção sustentável de enzimas.

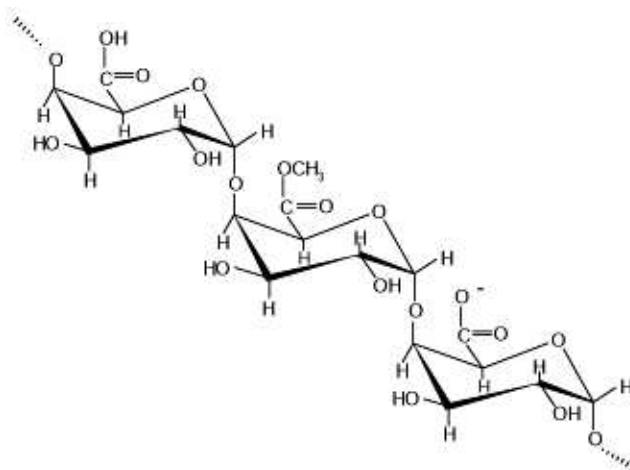


Figura 2 - Cadeia principal da pectina contendo unidades de ácido galacturônico. Autoria própria.

A estrutura complexa da biomassa lignocelulósica, incluindo a presença de lignina e ligações rígidas de polímeros de carboidratos, tornam essa biomassa recalcitrante aos microrganismos. Dependendo da composição e estrutura da biomassa, existe a necessidade de realizar um pré-tratamento para aumentar a acessibilidade dos microrganismos aos carboidratos poliméricos e, por consequência, induzir a produção de enzimas para sua hidrólise em monômeros. Os pré-tratamentos como explosão a vapor, tratamento em ácido ou base diluídos e hidrotérmico (autohidrólise), quebram a barreira de lignina e solubilizam a hemicelulose e parte da pectina no caso da laranja, facilitando o acesso às cadeias de celulose e pectina insolúveis na fração sólida e das cadeias de hemicelulose e pectina solúveis da fração líquida para ação microbiana (VARGA, RÉCZEY, *et al.*, 2004).

O pré-tratamento hidrotérmico é um processo que utiliza água em altas temperaturas para diminuir a recalcitrância do complexo lignocelulósico. Seu objetivo é a desestruturação pela solubilização da hemicelulose e de parte da pectina, para exposição da celulose, aumentando a sua acessibilidade para ação das enzimas hidrolíticas (SAADATINAVAZ, KARIMI, *et al.*, 2021). Em contrapartida, além de disponibilizar açúcares no meio, pode ocorrer a formação de produtos de degradação, em condições mais extremas, como o hidroximetilfurfural e furfural, provenientes da degradação de hexoses e pentoses, respectivamente. Enquanto estes compostos são valiosos para indústria química e de biocombustíveis, eles agem como inibidores em processos fermentativos (YUE, HU, *et al.*, 2022). Então, é necessário que as condições de pré-tratamento sejam otimizadas, minimizando a formação destes produtos, e maximizando a produção enzimática.

Nesse contexto, o presente trabalho visa encontrar condições de pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de laranja (*Citrus sinensis*) que solubilizem a hemicelulose e pectina para a fração líquida e que formem o mínimo dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural. Em sequência, tem o objetivo de avaliar essa fração líquida, rica em pectina e hemicelulose solúvel, como fonte de carbono no cultivo submerso de *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 para produção de pectinases e xilanases. Estudar a produção de enzimas hidrolíticas com meios complexos, contendo resíduos agroindustriais, tem o potencial de agregar valor aos resíduos, diminuir custos dos meios de produção de enzimas e induzir a produção de altos níveis de enzimas específicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item é apresentada uma revisão bibliográfica a respeito de conceitos fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

2.1. Enzimas

A denominação “enzima” provém de duas palavras gregas: *en* que significa “dentro de” e *zume* que significa “levedura”. Utilizada pela primeira vez pelo fisiologista alemão, Wilhelm Kühne em 1878 ao estudar como leveduras conseguiam produzir álcool através de açúcares (ROBINSON, 2015). As enzimas são catalisadores biológicos que auxiliam no aumento da velocidade de reações bioquímicas em organismos vivos ou em processos industriais, nas quais são muito utilizadas. Em 1980, ocorreu um dos maiores avanços científicos quanto a caracterização de enzimas, por conta da sua cristalização, que mostrou a associação da estrutura proteica e sua ação catalítica.

A reação de catálise, em geral, envolve o aumento da velocidade da conversão de um substrato em um produto e as enzimas se mostram de grande vantagem em realizar esses processos por conta de inúmeros fatores. Um deles é a sua alta capacidade seletiva para alguns tipos específicos de substrato, que pode ser referente a grupos ou moléculas. Esta característica pode ser bem observada em reações bioquímicas que ocorrem em vias metabólicas em organismos vivos, como a oxidação da β -D-glicose pela glicose oxidase na via glicolítica, que

mostra sua total especificidade por este substrato. Outro exemplo é a utilização de dispositivos, como biossensores de glicose, que auxiliam na determinação do teor de glicose em uma matriz complexa, como sangue e urina (ROBINSON, 2015).

Até 1958, acreditava-se na teoria de Emil Fischer (1894) de que a especificidade da enzima com o substrato vinha do exato formato do encaixe entre os dois (modelo chave-fechadura, como na Figura 3), até que Daniel Koshland apresentou o modelo do encaixe induzido, onde a enzima mudaria seu formato para que o substrato se encaixasse de forma correta.

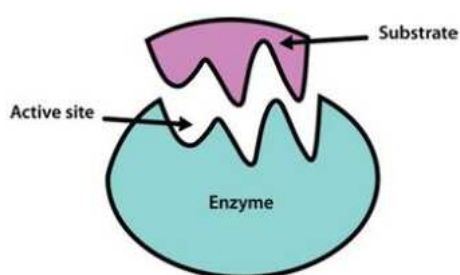


Figura 3 - Representação do encaixe entre o substrato e o sítio ativo da molécula da enzima.

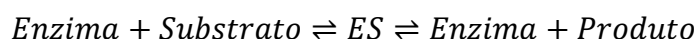
Retirado de Robinson (2015).

Elas também são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam, e são, ao todo, seis classificações gerais, explicitadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação primária de enzimas

Classificação das enzimas	Classe das enzimas	Tipo de reação
1.	Oxidoredutases	Oxidação/Redução (transferência de elétrons)
2.	Transferases	Transferência de grupos funcionais (fosfato, amina, acil e carboxi)
3.	Hidrolases	Quebra de ligações covalentes eliminando uma molécula de água
4.	Liasas	Quebra de ligações C-C, C-O, C-N e eliminação de outros grupos.
5.	Isomerasas	Isomerização (conversão de uma molécula de um isômero para outro)
6.	Ligases	Ligação de duas moléculas, realizando a hidrólise de uma molécula com alto teor energético, como ATP (adenosina trifosfato)

A catálise enzimática se dá pela formação do complexo enzima-substrato (ES), conexão que ocorre no sítio ativo da enzima:



A seta que mostra a ligação entre a enzima e o substrato indica que esta reação é reversível, informando que o complexo pode se desassociar para enzima e substrato ou continuar para a formação do produto. A constante de equilíbrio dessa reação, conhecida como a constante de Michaelis, K_m , rege a afinidade e a estabilidade desse complexo durante o processo. Ela representa a concentração do substrato enquanto a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima. Quando o valor de K_m é baixo, significa que o equilíbrio da reação está deslocado para a formação do produto (MARANGONI, 2003).

Um catalisador ou biocatalisador, como as enzimas, aumenta a velocidade da reação porque altera o mecanismo que ocorre, para um em que o intermediário formado no estado de transição possui menor energia de ativação (E_a) do que a reação sem o catalisador (Figura 4). Isso ocorre, porque as enzimas estabilizam esse estado de transição (fase altamente energética) em consequência da formação do complexo enzima-substrato que levam o substrato para a orientação correta, alinha as ligações do substrato e provém um ambiente favorável para a formação do produto. E, então, a taxa de reação (k) é proporcional à fração de moléculas que

possuem energia suficiente para superar a barreira da energia de ativação (MARANGONI, 2003).

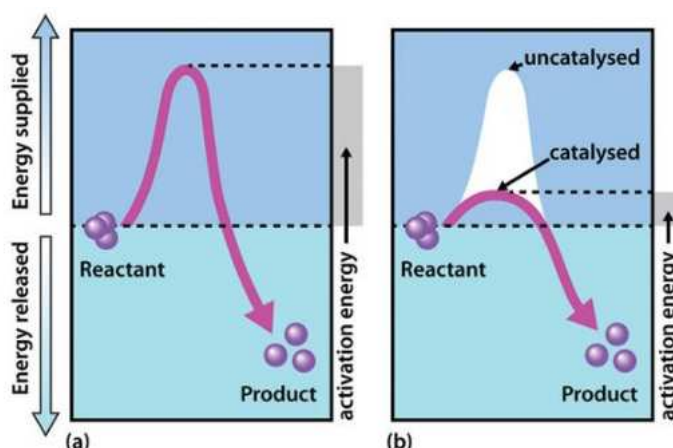


Figura 4 - Redução da energia de ativação do estado de transição requerida para iniciar a reação. Sem biocatalisador (a), com biocatalisador (b). Retirado de Robinson (2015)

Devido à esta característica das enzimas, de diminuir a energia do estado de transição da reação formando um complexo enzima-substrato e, assim, aumentar a velocidade em que as reações bioquímicas ocorrem, a aplicação de enzimas ocorre mundialmente em diversos setores da indústria.

2.1.1. Aplicações industriais de enzimas

O mercado de enzimas, no cenário mundial, é um setor dinâmico e em expansão, com expectativa de atingir US\$ 22,6 bilhões em 2028 com CAGR (Compound annual growth rate) de 14,0% (RESEARCH AND MARKETS, 2024). As enzimas hidrolíticas, incluindo celulasas, amilases, xilanases e pectinases possuem um mercado consolidado na indústria, onde são utilizadas na melhoria da qualidade de diversos produtos, com aumento do valor nutricional e redução do tempo de processamento (RESEARCH AND MARKETS, 2024).

Devido às suas aplicações em diversos ramos da indústria, como alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis, tem aumentado o número de pesquisas sobre como as enzimas podem ser produzidas e aplicadas. Uma pesquisa realizada na base Scopus (Figura 5) utilizando como as palavras-chaves “*cellulases*”, “*xylanases*” e “*pectinases*”, enzimas que são amplamente utilizadas industrialmente, mostrou que o número de artigos publicados

envolvendo pectinases é menos expressivo comparado a celulases e xilanases. Portanto, é uma área com potencial para novas pesquisas que envolvam a produção e aplicação das pectinases.

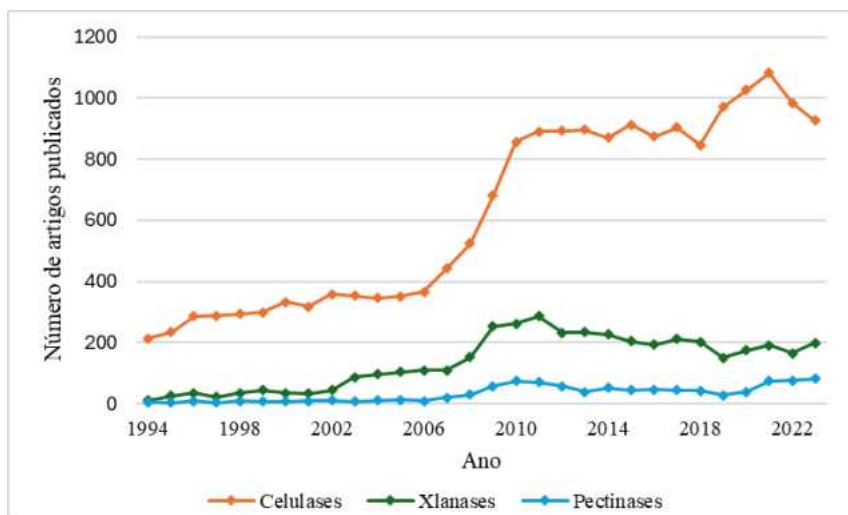


Figura 5 - Pesquisa na base Scopus utilizando as palavras-chaves "*cellulases*", "*xylanases*" e "*pectinases*" entre 1994 e 2024, resultados expressos anualmente.

Na América do Sul, o Brasil lidera as pesquisas em relação à publicação de artigos envolvendo a produção de enzimas, ocupando a quarta colocação mundialmente (Figura 6). Isto mostra que o país contribui consideravelmente na pesquisa e desenvolvimento de métodos para produção e aplicação de enzimas.

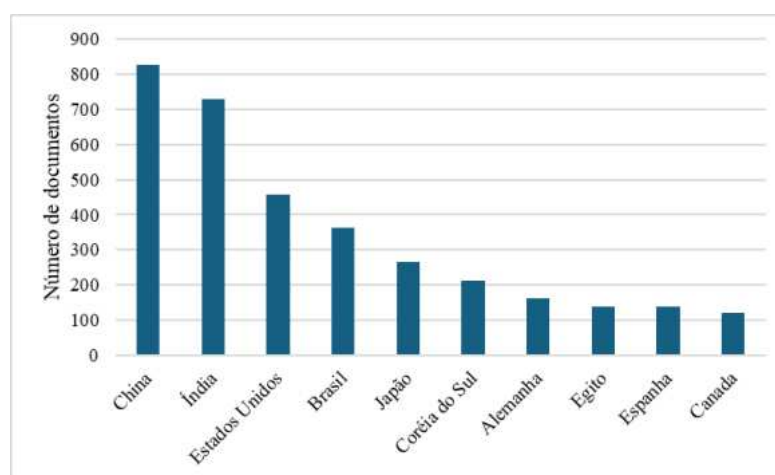


Figura 6 - Resultados obtidos na base Scopus ao pesquisar as palavras-chaves "*production*" e "*enzymes*" em títulos de artigos, de 2004 a 2024.

Ao se tratar de pectinases, o Brasil ocupa a posição de protagonismo em relação a publicação de artigos envolvendo a produção dessas enzimas, se destacando acima de países com alto índices de publicações em geral (Figura 7). A partir desses dados, pode-se afirmar que os artigos publicados nacionalmente possuem grande importância para a dinâmica do mercado de pectinases, porém observa-se que ainda é necessário que haja mais publicações, visto que o número ainda é baixo em comparação à produção de enzimas em geral, para que, assim, seja possível o melhor entendimento sobre essa enzima e suas aplicações.

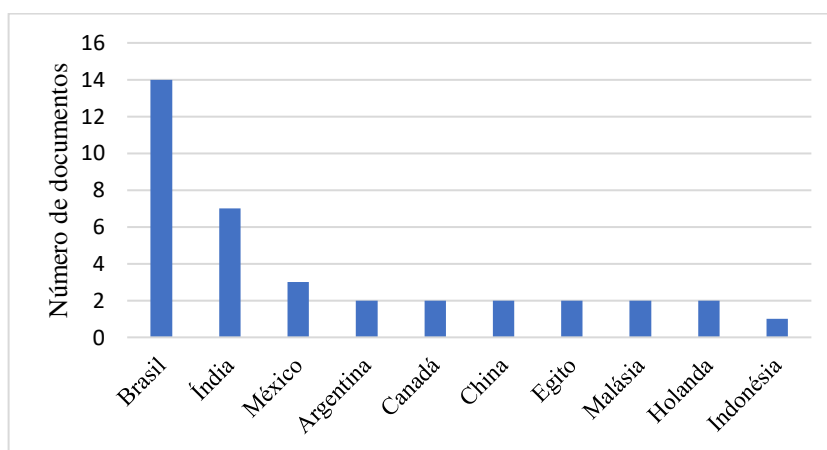


Figura 7 - Resultados obtidos na base Scopus ao pesquisar as palavras-chaves "*production*" e "*pectinases*" em títulos de artigos, de 2004 a 2024.

Diversos microrganismos são utilizados na produção industrial de enzimas devido à sua vasta disponibilidade na natureza e rápido crescimento. A tecnologia do DNA recombinante tem realizado modificações genéticas em microrganismos visando aumentar a produção enzimática (ILLANES, CAUERHFF, *et al.*, 2012). A produção de enzimas provenientes de microrganismos possui grande utilidade em diversas indústrias, por conta da grande variedade de condições físico-químicas que elas podem ser aplicadas e da variedade de reações que são capazes de realizar (SINGH, KUMAR, *et al.*, 2016).

Uma das maiores aplicações de enzimas de origem microbiana está na indústria alimentícia, onde essas moléculas são utilizadas na melhoria da produção, sabor, aroma, cor, textura, aparência e valor nutricional (NEIDLEMAN SL, 1984). Na produção de pães, são utilizadas amilases para aumentar a maciez, lipases e xilanases são usadas para aumentar a estabilidade e a glicose oxidase é usada para auxiliar na elasticidade da massa (MONFORT, BLASCO, *et al.*, 1999). Na produção de laticínios, enzimas como: lipases, lactases, proteases, transglutaminases e esterases, são utilizadas, também, para melhorar as características

organolépticas dos produtos comercializados. Além disso, também auxiliam na maior estabilidade do produto, viabilizando que os produtores aumentem o prazo de validade (QURESHI, KHARE, *et al.*, 2015). Na indústria de bebidas não-alcoólicas, que incluem água, sucos da fruta, chá e café, celulases, amilases e pectinases são muito utilizadas na clarificação, liquefação, rendimento e maceração dos frutos e grãos (KUMAR, S., 2015). Para bebidas alcoólicas, amilases são utilizadas na hidrólise do amido em açúcar para posterior fermentação e para remoção da turbidez (OKAFOR, 2007). Na produção de rações, algumas hidrolases, como xilanase e β -glicosidase são adicionadas para ajudar na digestão da celulose em alguns animais que são monogástricos, e fitases são amplamente utilizadas para auxiliar na ligação natural com fósforo em ácido fítico em cereais (BHAT, 2000) (LEI, STAHL, 2000).

Devido ao crescente consumo de plásticos mundialmente, começaram a ser utilizados polímeros biodegradáveis (biopolímeros) que são oriundos de fonte de carbono renováveis, como biomassa. Nesse caso, enzimas como as lipases são cruciais para a catálise da polimerização e produção de poliéster biodegradável (VROMAN, TIGHZERT, 2009).

Na indústria de celulose e papel, vem surgindo uma grande necessidade no tratamento de resíduos gerados, devido ao longo tempo de degradação. Algumas enzimas auxiliam na retirada da tinta do papel, como lipases (KIRK, JEFFRIES, 1996), e xilanases e ligninases são utilizadas para a remoção de lignina e hemicelulose (MAIJALA, KLEEN, *et al.*, 2008).

O uso de enzimas na degradação de poluentes tem sido amplamente empregado, incluindo rejeitos de grandes indústrias até os rejeitos de casas. Para este tratamento, são utilizadas diversas enzimas (amidases, amilases, celulases, glucoamilases, pectinases, proteases, lipases e oxidoredutases) devido à complexidade da matriz e para que a bioconversão do material seja feita de forma efetiva em algo que não traga danos para o meio ambiente (RIFFALDI, LEVI-MINZI, *et al.*, 2006).

Um setor que tem ganhado muito evidência há alguns anos é a produção de biocombustíveis, que geralmente utilizam enzimas como lipases, celulases e xilanases na produção de ácidos graxos de metil ésteres e decomposição de material lignocelulósico para produção de bioetanol, através da formação de açúcares por ação das enzimas (CARDONA, QUINTERO, *et al.*, 2010).

Portanto, o desenvolvimento de processos de produção de enzimas é fundamental para promover soluções sustentáveis e eficientes em vários setores da indústria. As enzimas possuem grande importância no processamento de alimentos, produção de biocombustíveis, produtos

farmacêuticos e gestão de resíduos devido à sua especificidade, habilidade de atuar em condições amenas requerindo menos energia em comparação à processos químicos tradicionais. Ao reduzir custos, amplia o número de processos que podem ser realizados com enzimas.

2.1.2. Pectinases

As pectinases foram umas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente, inicialmente em produção de vinho e sucos de fruta em 1930. Seu papel se tornou mais significativo em 1960 com a melhor compreensão da composição química do tecido vegetal. Atualmente, as pectinases são essenciais no processamento de diversos sucos, tecidos e aplicações biotecnológicas devido à sua capacidade de degradar substâncias pécicas (KASHYAP, VOHRA, *et al.*, 2001).

As substâncias pécicas são componentes de uma camada delgada do material extracelular chamada de lamela média, que fica localizada entre as paredes celulares primárias das células de plantas superiores. Elas são macromoléculas conectadas por ligações glicosídicas que atuam como ligação entre as células das paredes celulares para mantê-las unidas. Dentre elas, tem-se a protopectina, ácido pectínico, ácido pécico e pectina (UENOJO, PASTORE, 2007).

A pectina possui uma estrutura complexa de polissacarídeos com cadeia estrutural de ligações axiais de ácido galacturônico conectadas por ligações $\alpha(1-4)$ que constituem a homogalacturonana (Figura 8), podendo estar com grupos acetil ou metil acoplados na forma de ésteres. Quando conectadas a outros polissacarídeos e proteínas, podem formar cadeias de protopectina, que são insolúveis em água. Outras partes da pectina são chamadas de ramnogalacturonanas I e II, que são cadeias não-lineares mais complexas que contém outros açúcares como galactose, arabinose e xilose (Figura 9) (WILLATS, KNOX, *et al.*, 2006).

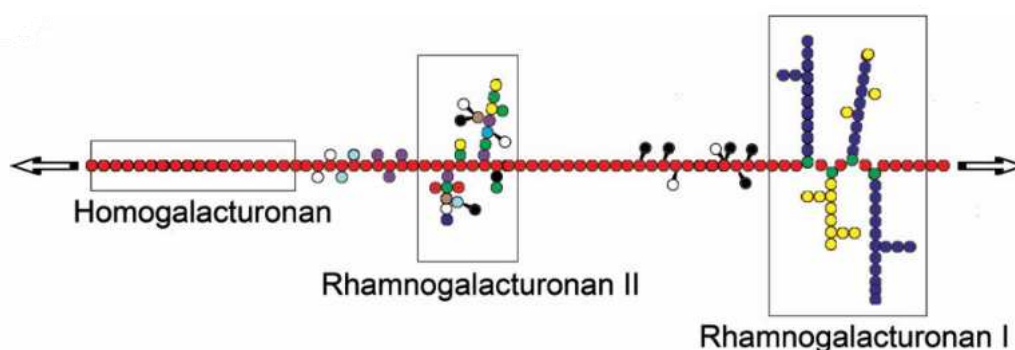


Figura 8 - Proposta estrutural da cadeia da pectina, onde a homogalacturonana e a ramnogalacturonana I são estruturas externas à ramnogalacturonana II (VINCKEN, SCHOLS, *et al.*, 2003).

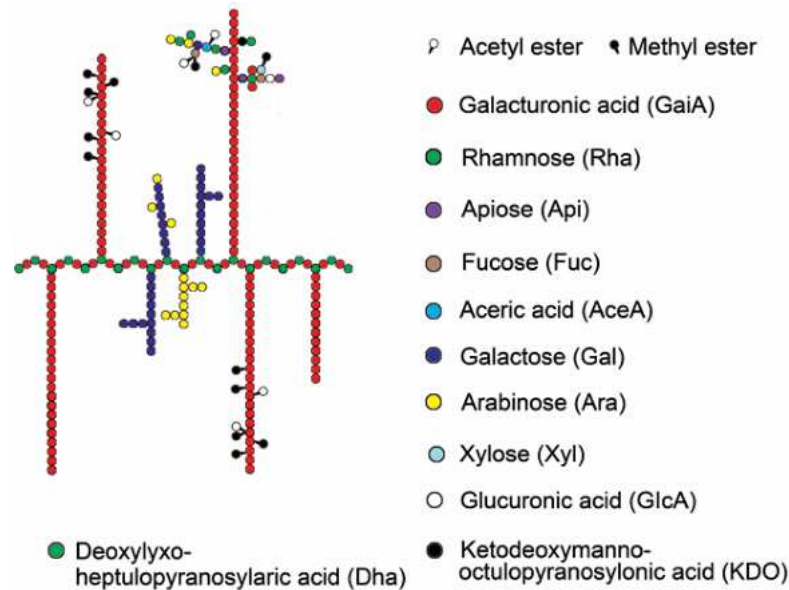


Figura 9 - Proposta da estrutura da ramnogalacturonana I mostrando a contribuição de cada composto em sua cadeia complexa (VINCKEN, SCHOLS, *et al.*, 2003).

Sua característica mais marcante é a habilidade de formar gel com açúcares e ácidos, dependendo da condição empregada, devido ao seu grau de neutralização e presença de grupos metil éster, que conferem capacidade de criar suspensões coloidais quando em contato com ácido galacturônico e água, através do processo de “*cross-linking*” (WHITAKER, 1994).

As pectinases podem ser classificadas de acordo com o tipo de substrato (esqueleto galacturônico) que elas utilizam (pectina, ácido péctico ou D-galacturonato), o tipo de reação que são capazes de fazer (eliminação ou hidrólise) e se a clivagem é em locais internos da cadeia (endo-, liquefação ou despolimerização) ou se é nas extremidades (exo- ou sacarificação) (PEDROLI, MONTEIRO, *et al.*, 2009). Na Tabela 2 abaixo estão descritas as classificações de pectinases.

Tabela 2 - Classificação de pectinases conforme seu mecanismo de ação em diferentes partes da cadeia de pectina (UENOJO, PASTORE, 2007).

Classificação de pectinases	Tipo de reação
Protopectinases	Solubilização da protopectina em pectina solúvel
Pectina metil esterases (PME) (EC 3.1.1.11)	Desesterificação do grupo metoxil da pectina, formando ácido péctico e metanol
Pectina acetil esterases (PAE) (EC 3.1.1.-)	Hidrólise do grupo acetil éster da pectina, formando ácido péctico e acetato
Polimetilgalacturonase (PMG)	Clivagem de ligações $\alpha(1-4)$ na cadeia da pectina
Poligalacturonases (PG) (EC 3.2.1.15, EC 3.2.1.67, EC 3.2.1.82)	Hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ no ácido poligalacturônico produzindo ácido galacturônico
Pectato liases (PGL) (EC 4.2.2.2, EC 4.2.2.9)	Clivagem de ligações glicosídicas no ácido poligalacturônico formando produtos insaturados
Pectina liases (PL) (EC 4.2.2.10)	Clivagem de ligações esterificadas na pectina

Regionalmente, a América do Norte lidera o mercado de pectinases devido ao seu mercado consolidado de indústrias de alimentos e bebidas e o aumento constante da demanda de consumidores por produtos processados e orgânicos. O comércio global de pectinases está em constante crescimento, com mercado avaliado em U\$ 18.3 bilhões, e um CAGR de 11,1% (Figura 10) (THE BUSINESS RESEARCH COMPANY, 2024). Os consumidores têm preferido alimentos com aparência natural e “*clean-label*”, que são produtos mais saudáveis e com maior transparência na comunicação da composição, utilizando ingredientes naturais e sem aditivos, e assim as pectinases têm sido amplamente utilizadas no processamento de alimentos e bebidas, tornando o processo mais sustentável (ZION MARKET RESEARCH, 2023).

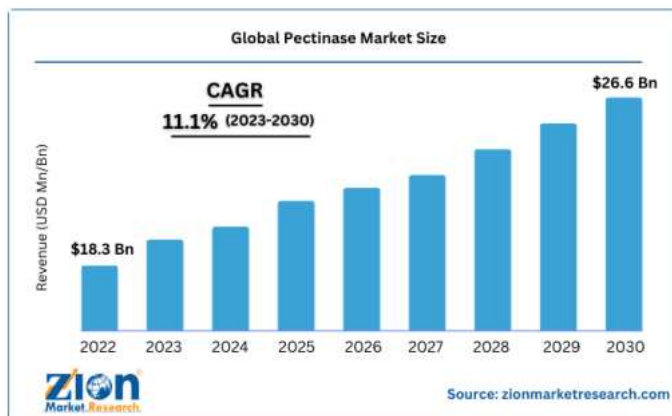


Figura 10 - Cenário do mercado mundial de comercialização de pectinases e prospecção de crescimento até 2030.

Dentre as principais empresas produtoras de pectinases estão: Novonosis (antes conhecida por Novozymes (Dinamarca), Basf SE (Alemanha), DuPont (EUA), Pectolase (Dinamarca) e Pectinex (Suíça). Essas companhias utilizam principalmente os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* (MORDOR INTELLIGENCE, 2024).

2.1.3. Xilanases

As xilanases são enzimas amplamente utilizadas nas indústrias de celulose e de papel, uma vez que a hidrólise da xilana auxilia na remoção de lignina do papel e na redução do uso de cloro como agente de branqueamento (SHOHAM, SCHWARTZ, *et al.*, 1992). Em 1986, foi demonstrado pela primeira vez a aplicação de xilanases para auxiliar na remoção de lignina em processos de branqueamento (VIIKARI, RANUA, *et al.*, 1986). O crescimento da produção mundial de xilanases acompanha o aumento da utilização de produtos à base de pasta de papel, como papel celofane, ésteres e éteres celulolíticos. Outra aplicação das xilanases envolve a conversão de materiais lignocelulósicos em produtos de fermentação e clarificação de sucos (assim como as pectinases) (WONG, TAN, *et al.*, 1988).

A xilana é o heteropolissacarídeo mais abundante da parede celular vegetal, que consistem em resíduos de grupos de acetil, 4-O-metil-D-glicuronosil e α -arabinofuranosil, os quais estão conectados às ligações terminais β -1,4 de xilopiranoses (Figura 11). Nas cadeias de xilana, também se encontram grupos de ramnose e ácido galacturônico, cuja função é manter

as partes terminais da cadeia resistentes às substâncias alcalinas, e grupos de arabinoxilana (KULKARNI, SHENDYE, *et al.*, 1999).

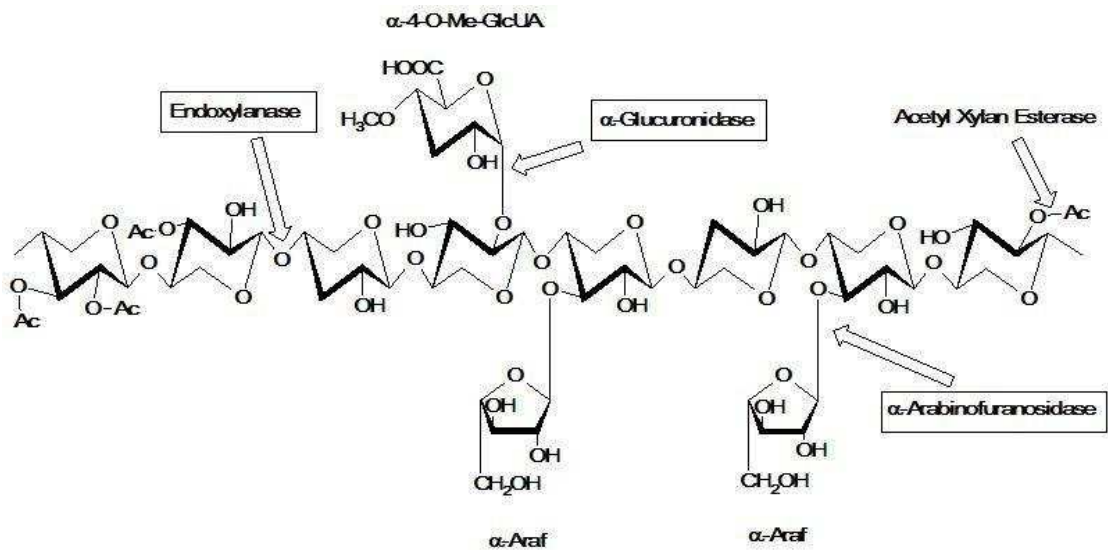


Figura 11 - Estrutura molecular da xilana e enzimas xilanolíticas envolvidas na sua degradação. Ac: grupo acetil; α -Araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcUA: ácido α -4-O-metilglucurônico. Retirado de (BEG, KAPOOR, *et al.*, 2001).

Por ser um heteropolissacarídeo, são necessárias diversas enzimas para a total hidrólise da cadeia da xilana. Todos os tipos de xilanases podem ser produzidas por microrganismos, como fungos filamentosos, muitos deles modificados geneticamente para terem grande expressão da enzima desejada. Na Tabela 3, estão listados os tipos de xilanases com sua respectiva função. Porém, além delas, também são necessárias outras enzimas, como esterases, para a completa hidrólise da cadeia complexa da xilana. As esterases são responsáveis por clivar ligações com ácido acético, ferúlico, p-cumárico (SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002).

Tabela 3 - Classificação de xilanases conforme seu mecanismo de ação na cadeia da Xilana (SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002).

Classificação de xilanases	Tipo de reação
1,4- β -D-xilanases (E.C. 3.2.1.8)	Despolimerização da xilana por hidrólise aleatória da cadeia principal
1,4- β -D-xilosidase (E.C. 3.2.1.37)	Hidrólise de pequenos oligossacarídeos de xilobiose
α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55)	Hidrólise das partes não-redutoras de grupos de arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas
α -D-glicuronidases (EC 3.2.1.1)	Hidrólise de ligações glicosídicas α -1,2 entre xilose e ácido galacturônico ou ligações 4-O-metil éter

O mercado global de xilanases foi avaliado em, aproximadamente, U\$ 990 milhões em 2023 e possui projeção de crescimento em CAGR de 7,28 % de 2024 até 2032 (Figura 12). O maior produtor de xilanases, atualmente, é a América do Norte devido à grande demanda de biocombustíveis, na qual as xilanases possuem o papel de hidrolisar biomassas agroindustriais com o intuito de obter produtos de fermentação, que incluem, por exemplo, o etanol. (MARKET RESEARCH FUTURE, 2023).



Figura 12 - Cenário mundial de produção de xilanases e prospecção de crescimento até 2032. Retirado de (MARKET RESEARCH FUTURE, 2023).

2.2. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são um grupo de microrganismos caracterizados pela sua estrutura filamentosa, que consiste em longas hifas que formam um complexo micelial. Tal morfologia os possibilita explorar o ambiente e acessar nutrientes, e seu formato depende da composição da parede celular (RIQUELME, MUNRO, *et al.*, 2020).

Em biotecnologia, esses fungos são muito utilizados na produção de enzimas, devido aos seus altos rendimentos, incluindo celulases, xilanases, pectinases e proteases e a habilidade de secretar essas enzimas que agem no meio extracelular, facilitando os processos de extração, concentração e purificação. Entre os fungos, gêneros de *Aspergillus* (ACUÑA-ARGÜELLES, GUTIÉRREZ-ROJAS, *et al.*, 1995), *Penicillium* (BORIN, SAID, *et al.*, 1996) e *Trichoderma* (CHANNE, SHEWALE, 1995) têm sido aplicadas para produção, principalmente, de xilanases e pectinases, com diferentes rendimentos de atividade entre si. Para isto, estes fungos podem utilizar diversos materiais como fonte de carbono, como resíduos agroindustriais, os convertendo em produtos de alto valor agregado através do processo de fermentação.

Os fungos filamentosos são muito utilizados na produção de pectinases em diferentes métodos de fermentação: em estado sólido ou submerso. Em um estudo focado em isolar e caracterizar a produção de pectinases, espécies de *Aspergillus* mostraram serem cepas efetivas, principalmente *Aspergillus niger*, onde uma produção enzimática significativa foi obtida a 30°C (MAT JALIL, ZAKARIA, *et al.*, 2023).

Um estudo mostrou a utilização de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono em fermentação em estado sólido, onde o *A. awamori* demonstrou valores significantes de atividade de xilanase (UMSZA-GUEZ, DÍAZ, *et al.*, 2011). Outro experimento utilizando fermentação em estado submerso e farelo de trigo como fonte de carbono mostrou termoestabilidade na produção enzimática, tornando o procedimento viável para aplicação industrial (TEIXEIRA, SIQUEIRA, *et al.*, 2010). Também vem sendo utilizado no estudo da produção de pectinases utilizando biomassas ricas em pectina, como bagaço de laranja, uva e maçã (DÍAZ, DE ORY, *et al.*, 2012).

2.2.1. *Aspergillus awamori*

O nome *Aspergillus awamori* se refere ao seu local de origem, que é associado à produção de awamori, bebida alcoólica típica de Okinawa, cidade localizada no Japão, onde ele é comumente utilizado em processos fermentativos. Esta nomenclatura relaciona a classificação taxonômica do fungo com a sua importância na produção tradicional de bebidas. Possui odor

característico de terra molhada e coloração amarela nos primeiros dias de crescimento, e ao atingir o crescimento completo seus esporos apresentam cor esverdeada. Ele, também, é classificado pela CWMI (*Common-wealth Mycological Institute*) como *Aspergillus niger* complexo, devido às suas semelhanças morfológicas. Tanto o fungo quanto suas enzimas são considerados pela FDA (*Food and Drug Administration*) como GRAS (*Generally recognized as safe*), indicando que sua aplicação industrial é segura e não apresenta riscos a humanos ou animais (LOTFY, SAYED, *et al.*, 2021).

O corpo frutífero do fungo *Aspergillus awamori* possui em sua ponta um conidióforo, onde estão localizados os esporos (identificados pelas pequenas esferas). Os esporos são as células reprodutivas dos fungos filamentosos, e são utilizados para sua propagação. As hifas são os corpos longos que conectam a rede de filamentos do fungo (Figura 13).

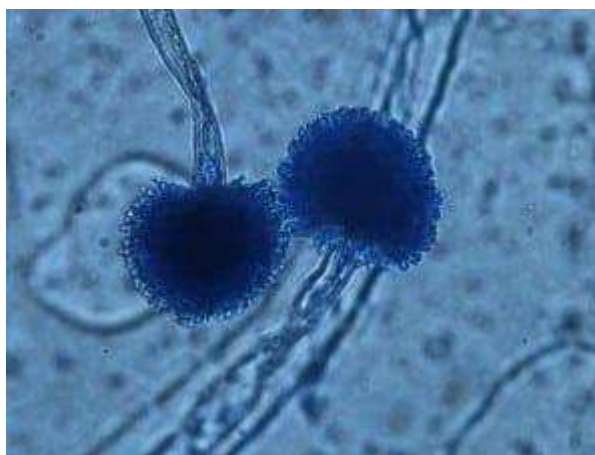


Figura 13 - Microscopia óptica do corpo frutífero do fungo *Aspergillus awamori* (LOTFY, SAYED, *et al.*, 2021).

O sistema metabólico do *Aspergillus awamori* é bem adaptado para produção de enzimas extracelulares, especialmente, amilases, celulasas, pectinases e xilanases, que são extremamente importantes no auxílio da hidrólise de carboidratos complexos. Ele pode regular genes específicos associados à produção enzimática em resposta à presença de substratos como amido, pectina e celulose. Isso permite ao fungo produzir as enzimas necessárias para o seu crescimento. Esses genes regulatórios controlam a expressão dessas enzimas devido à fatores externos como pH e disponibilidade de substrato. Como via de secreção, seu retículo endoplasmático e complexo de Golgi são adaptados para produzir e secretar grandes quantidades de enzimas, aumentando a eficiência do processo de aplicação industrial (LOTFY, SAYED, *et al.*, 2021). Além disso, possui grande adaptabilidade em diferentes condições de

fermentação, tanto em fase sólida quanto em fase submersa, aumentando sua aplicabilidade em diversos processos.

2.3. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é caracterizada pela presença de lignina, hemicelulose e celulose em sua estrutura, principais componentes da parede celular de plantas. A estrutura recalcitrante do complexo lignocelulósico é composta de 33% a 55% de celulose (polímero de glicose), 13% a 33% de hemicelulose (polímero, polissacarídeo) e 13% - 32% de lignina (polímero aromático), conferindo a este tipo de biomassa uma estrutura resistente a degradação (BALAT, 2011).

A celulose é o componente primário desta estrutura e consiste em cadeias de moléculas de glicose conectadas por ligações glicosídicas β -1,4 formando fibras fortes e cristalinas. As microfibras de celulose são envoltas por um polímero heterogêneo de hemicelulose, fonte de pentoses, hexoses, pequenas quantidades de ácido urônico e grupos hidroxila (VERMERRIS, 2008). Na cadeia de hemicelulose encontram-se polissacarídeos como xilana (maior componente), arabinana, galactana, manana e ácido galacturônico, quando há presença de pectina. A hemicelulose é mais amorfa que a celulose e mais fácil de degradar, o que confere flexibilidade ao complexo lignocelulósico. Ela age como um preenchimento entre as microfibras de celulose, as conectando com a lignina (GÍRIO, FONSECA, *et al.*, 2010). A lignina é uma macromolécula aromática complexa que contribui para a rigidez e impermeabilidade da parede celular (hidrofóbica). Sua estrutura consiste em unidades de álcoois p-coumarílico, coníferílico e sinalpílico unidos de forma aleatória e complexa, auxiliando na resistência à degradação enzimática (VOLYNETS, EIN-MOZAFFARI, *et al.*, 2017). Na Figura 14, é mostrado um modelo da estrutura do complexo lignocelulósico.

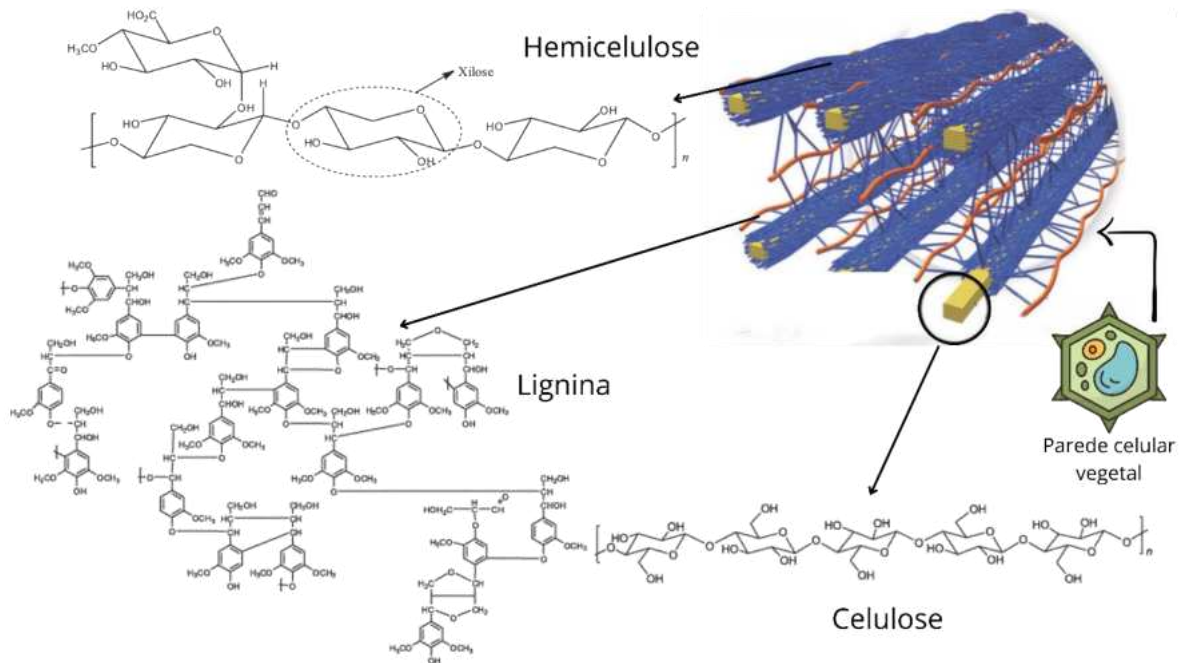


Figura 14 - Estrutura do complexo lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) presente na parede celular de plantas e vegetais. Adaptado de VOLYNETS, EIN-MOZAFFARI, et al., 2017.

Algumas biomassas lignocelulósicas contém pectina em grande proporção na sua parede celular vegetal, como resíduos agroindustriais da laranja, maracujá, caju e maçã. Para estes materiais, a pectina presente age como uma conexão entre os outros heteropolissacarídeos e polímeros presentes, na Figura 15 é mostrado como ela é posicionada estruturalmente na lamela média da parede celular vegetal.

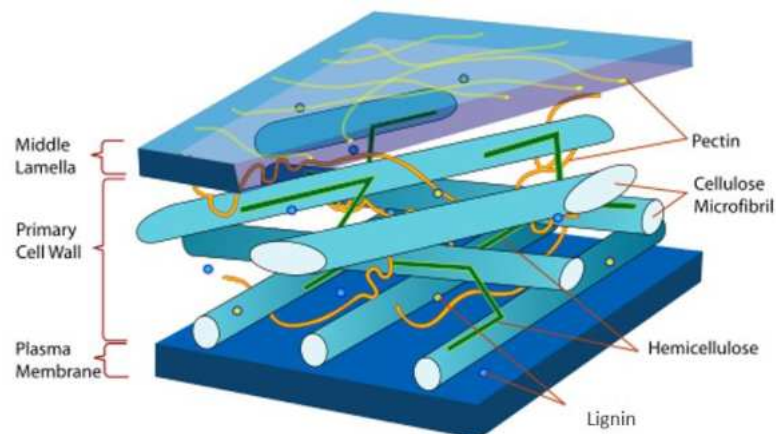


Figura 15 - Composição ilustrativa da parede celular vegetal em biomassas pécicas. Retirado de Carpita (2011).

Como explicado anteriormente, a pectina age como uma camada adesiva que une as paredes celulares primárias de células adjacentes, contribuindo para a flexibilidade estrutural e permitindo o crescimento celular e expansão dos tecidos.

Biomassas pécticas podem apresentar grande potencial para extração da pectina para aplicação industrial, como gelificantes, emulsificantes, espessantes e clarificação de bebidas.

2.4. Biomassa da Laranja

2.4.1. Características morfológicas e botânicas

Originária da Ásia, a *Citrus sinensis* é cultivada na China desde 2500 a.C. (PINEDA-LOZANO, FONSECA-BUSTOS, *et al.*, 2022). Também conhecida como laranja-doce, pertence à família das Rutáceas sendo a espécie de *Citrus* mais cultivada em todo o mundo (FLAMINI, CIONI, *et al.*, 2003). A laranjeira é classificada como uma árvore perene, por manter suas folhas durante todas as estações, e florida, com altura entre 9 e 10 metros com espinhos nos galhos. Suas folhas possuem formato elípticos, oblongos a ovais, com disposição alternada entre elas, e exalam uma essência característica de frutas cítricas (Figura 16) (GOLDHAMER, INTRIGLIOLO, *et al.*, 2012).



Figura 16 - Laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Retirado de MANISH, MAHESH, *et al.* 2013.

A parte mais externa da fruta, consiste em uma casca pigmentada e oleosa chamada de epicarpo ou flavedo. Entre os componentes presentes na laranja, há uma grande quantidade de óleos, especialmente o limoneno, que confere sua essência característica, além de ser uma fonte de pigmentos, como carotenoides, que contribuem para a cor alaranjada da fruta. O albedo, ou mesocarpo, é uma faixa esponjosa branca localizada logo após a casca, que é rica em fibras e pectina. Apesar de não possui sabor agradável, sua função é proteger os segmentos mais internos da fruta, contribuindo para sua integridade e valor nutricional. O endocarpo, também chamado de polpa, é onde está localizado o suco, os carpelos (segmentos de polpa) e as sementes. Na polpa estão os açúcares, vitaminas e ácidos que contribuem para o seu sabor. Nas sementes, está contido o material genético necessário para a propagação da planta (MARTINI, 2009). As partes descritas podem ser visualizadas na Figura 17.

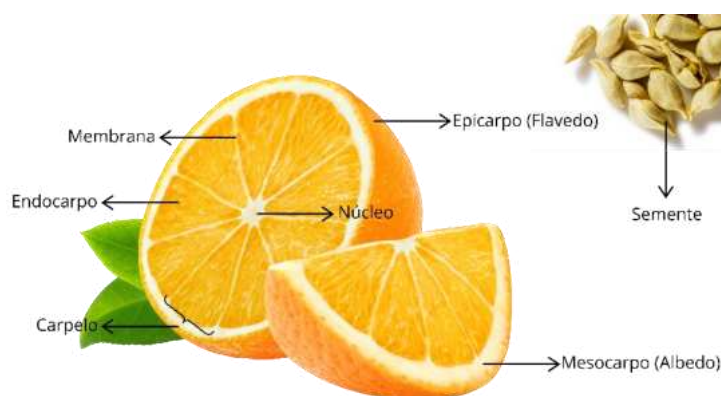


Figura 17 - Segmentos da fruta da laranja. Autoria própria.

Em relação à composição fitoquímica, são possíveis encontrar diversos compostos presentes em diferentes partes da laranja. Nas folhas e flores, por exemplo, estão os compostos voláteis (limoneno, pineno, acetaldeído, acetato de etila), esteróides (β -sitosterol) e ácidos graxos. Na casca, estão os flavonoides (hesperidina, hesperetina, limocitrol), peptídeos (citrusin-I, II e III) e cumarinas (scoparona, limetin, osthol). Na polpa, são encontrados carboidratos (glicose, frutose, sacarose, galactose), carbamatos (carbosulfano, dibutilamina, carbofurano), carotenoides (zeaxantina, zeinoxantina, luteína) e vitaminas (A, D, E, K, B1, B2, B3, B5, B6 e C) (DONGRE, DOIFODE, *et al.*, 2023).

2.4.2. Produção mundial e comercialização

A produção de laranja no Brasil é consideravelmente importante, tanto social quanto economicamente. O país é o líder global na exportação de laranja, sendo responsável por cerca de 70% do comércio, mobilizando em torno de US\$ 6,5 bilhões por ano. Em 2024, a produção chegou a 15,42 milhões de toneladas, com São Paulo e Minas Gerais sendo responsáveis pela produção de 12,52 milhões de toneladas (CASTRO, 2024). Além disso, a vasta colheita deste fruto contribui para a nutrição da população, estando diariamente presente na dieta dos brasileiros.

Cerca de 70% da produção brasileira de laranja é destinada para o processamento de suco, que, após o recebimento e pré-seleção dos frutos, são analisados para determinação do grau Brix e índice de acidez total. Em seguida, os frutos são estocados em silos de acordo com suas características e são lavados com água, vapor e escovas. Os frutos são selecionados e aqueles que apresentam infestação de pragas, cortes ou deformações são separados e enviados para indústria de rações. O suco é extraído utilizando máquinas de extração, onde são separados o bagaço e a polpa. O material extraído é armazenado e acrescentado água para a fabricação do suco, que segue para a etapa de ajuste de polpa que é mantida em torno de 4% (MARTINI, 2009).

2.4.3. Coproduto agroindustrial da laranja

Os resíduos agroindustriais da laranja são os materiais descartados, ou de baixo valor agregado, que resultam das sobras do cultivo e do processamento da fruta. Como a maior forma de comercialização da laranja é em suco concentrado congelado, após a extração cerca de 50 a 60% da fruta (9,5 milhões de tonelada) é considerado resíduo chamado de bagaço, que inclui as membranas, sementes e casca, como na Figura 18 (RIVAS-CANTU, JONES, *et al.*, 2013).



Figura 18 - Bagaço de laranja após a extração da polpa para produção de suco. Fonte: *Ellen Macarthur Foundation*.

Algumas indústrias reaproveitam este coproduto para produção de rações em forma de pellets de polpa, mas devido ao baixo valor agregado deste produto, o retorno financeiro não é muito vantajoso (RIVAS-CANTU, JONES, *et al.*, 2013). O bagaço da laranja é uma biomassa lignocelulósica rica em carboidratos solúveis e insolúveis, em especial, a pectina, presente em grande quantidade nesse resíduo. Sua composição mostra um grande potencial para obtenção de açúcares fermentáveis, como glicose e frutose, e ainda mais para produção de enzimas celulolíticas a partir de polissacarídeos e oligômeros presentes (MARTINI, 2009).

Considerando isto, é de suma importância a caracterização desta biomassa para o maior entendimento de como ela pode ser útil na obtenção de produtos de maior valor agregado. A caracterização do bagaço de laranja descrita por Rivas-Cantu, Jones, *et al.* (2013) mostrou que o polissacarídeo em maior quantidade é a pectina (Tabela 4), mostrando seu grande potencial para produção de pectinases.

Tabela 4 - Composição química do bagaço de laranja apresentada por Rivas *et al* (2013).

Material	Bagaço de laranja (g/100g de biomassa seca)
Extrativos	26,95%
Celulose	9,21%
Hemicelulose	10,50%
Lignina	0,84%
Pectina	42,50%
Cinzas	3,50%
Total	93,50%
Protocolo de caracterização	TAPPI T13m

Martini (2009), em seu trabalho, apresentou uma microscopia eletrônica de varredura do bagaço da laranja peletizado com granulometria de $0,045 < dp < 0,180$ mm. Na Figura 19, pode-se observar a superfície irregular da biomassa, e que, devido ao processo de moagem, há fissuras e grânulos por toda a sua extensão.

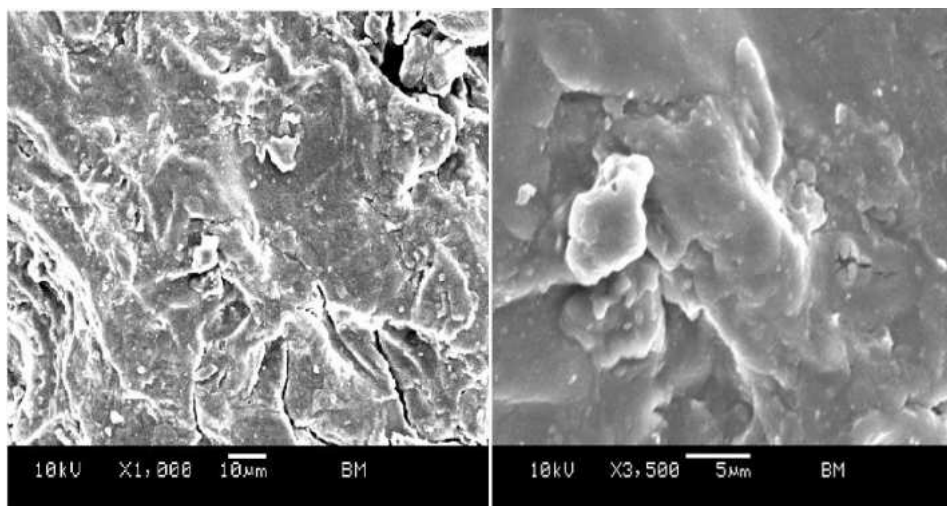


Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de laranja in natura, à esquerda com aumento de 1000x e à direita com aumento de 3500x, apresentado por Martini (2009).

Devido à esta matriz complexa, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica se torna necessário para quebrar a recalcitrância da parede celular das plantas. Este complexo limita a acessibilidade das enzimas em hidrolisar a celulose em açúcares fermentáveis. (VARGA, RÉCZEY, *et al.*, 2004).

2.5. Pré-tratamento

O pré-tratamento da biomassa é muito importante no processo de conversão do material vegetal em açúcares fermentáveis. Esta etapa possui o objetivo de romper a estrutura da lignina, solubilizar parte da pectina e hemicelulose e reduzir a cristalinidade da celulose, facilitando o acesso de microrganismos para produção enzimática (Figura 20) (VARGA, RÉCZEY, *et al.*, 2004).

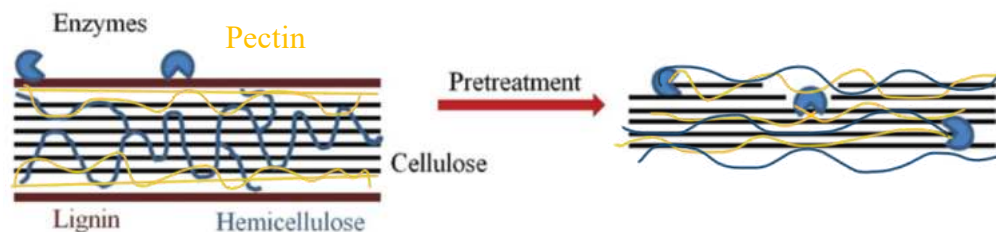


Figura 20 - Ilustração de como o pré-tratamento age na estrutura do complexo lignocelulósico, facilitando o acesso às enzimas. Retirado de Volynets, Ein-Mozaffari, et al. (2017).

Podem ser divididos em dois grupos: pré-tratamento mecânico e termoquímico. O objetivo do pré-tratamento mecânico é diminuir o tamanho das partículas para aumentar a acessibilidade de catalisadores químicos e biológicos à biomassa. Ele, sozinho, não é muito eficiente, mas é muito utilizado como uma etapa adicional para um posterior tratamento físico-químico (VOLYNETS, EIN-MOZAFFARI, *et al.*, 2017). Essa técnica, geralmente, utiliza equipamentos como moinho de facas, moinho de bolas e extrusora.

O pré-tratamento termoquímico é muito utilizado para aumentar a digestibilidade da biomassa ao aplicar calor, pressão e, às vezes, agentes químicos. O tratamento ácido pode ser realizado com equipamento de explosão a vapor, que envolve a pressurização da biomassa à alta temperatura seguida de uma rápida descompressão, causando a separação da lignina e solubilizando a hemicelulose (VARGA, RÉCZEY, *et al.*, 2004). Também, pode ser com ácido diluído (ácido sulfúrico, fosfórico ou ácidos orgânicos), que solubiliza a hemicelulose gerando rendimentos de digestão da celulose próximos de 100%. Porém há a possibilidade de formação de inibidores de atividade microbiana decorrentes da degradação de açúcares, como hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (FF) (BENJAMIN, CHENG, *et al.*, 2013). Em adição a isso, pode ser realizado o tratamento hidrotérmico, onde a água quente utilizada solubiliza a hemicelulose produzindo ácido acético, por exemplo, que promove uma autohidrólise, mas, assim como o tratamento com ácido diluído, pode ocorrer a formação dos inibidores citados (SAHA, YOSHIDA, *et al.*, 2013).

O tratamento alcalino envolve a adição de algum composto básico a temperaturas variáveis. Ao utilizar hidróxido de sódio, aplicam-se altas temperaturas e a reação é mais lenta, ocasionando a deslignificação da biomassa (MCINTOSH, VANCOV, 2011). Quando é utilizada amônia (NH₃) as temperaturas são amenas, removendo cerca de 50% da lignina, deixando a celulose e xilana na sua forma sólida (KANG, JEONG, *et al.*, 2012). Outra forma de tratamento alcalino é utilizando *Ammonia fiber expansion* (AFEX), na qual é adicionada à biomassa,

amônia anidra líquida a temperaturas amenas e alta pressão seguida de uma rápida descompressão, gerando a total desconstrução do complexo lignocelulósico (TEYMOURI, LAUREANO-PEREZ, *et al.*, 2005).

O pré-tratamento também pode ser oxidativo, onde são utilizados agentes oxidantes como, peróxido de hidrogênio e ozônio. A oxidação da lignina leva à clivagem dos compostos aromáticos, reduzindo a barreira formada pela lignina quando na forma íntegra (SCHMIDT, THOMSEN, 1998).

Desta forma, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica oferece vantagens ao converter os componentes estruturais em moléculas mais acessíveis tanto para microrganismos, como fungos e bactérias, quanto para hidrólise enzimática. Diversas biomassas podem passar por esse processo, como bagaço de cana-de-açúcar, café, grama, milho, sementes e bagaço de frutas cítricas.

2.5.1. Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico é uma técnica onde utilizam-se calor e pressão na presença de um solvente, para romper as fibras lignocelulósicas. Geralmente, esse solvente é a própria água, por isso este procedimento é considerado sustentável, devido à não utilização de compostos químicos para ser realizado. Também, pode ser chamado de autohidrólise, como mencionado anteriormente, pois pode ocorrer a formação de ácido acético no meio, sem a adição do tal, que auxilia no processo de quebra da estrutura complexa através da diminuição do pH (SAHA, YOSHIDA, *et al.*, 2013).

Em condições normais de temperatura e pressão, as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água formam uma rede que dificulta a solubilização de material orgânico. Ao aumentar a temperatura, a constante de ionização da água aumenta em cerca de trezentas vezes, fazendo com que as ligações de hidrogênio se enfraqueçam gradualmente, facilitando a transferência de calor e massa (TORRES-MAYANGA, LACHOS-PEREZ, *et al.*, 2019). A presença de grupos acetil na biomassa utilizada ocasiona a liberação de íons H_3O^+ (hidrônio), que diminuem o pH do meio e auxiliam na hidrólise e clivagem de ligações, porém em altas temperaturas também são gerados íons hidrônio provenientes da água (KUMAR, Sandeep, GUPTA, 2009).

A reação ocorre em um reator hidrotérmico onde há controle de pressão, temperatura e rotações por minuto. Todos esses parâmetros podem ser otimizados de acordo com o objetivo em que é empregado. O tanque do reator é composto de aço, para evitar sua degradação, além de possuir uma manta de resfriamento para controle da temperatura, uma tampa de vedação para que o ambiente interno seja totalmente controlado e diversas válvulas de segurança que tornam segura a sua utilização.

Após o tratamento hidrotérmico, são obtidas duas frações de amostra, uma líquida e outra sólida em suspensão. Na fração líquida (hidrolisado), está presente a hemicelulose, que gerou oligossacarídeos, monossacarídeos e produtos de degradação. Oligossacarídeos são intermediários entre os monossacarídeos e polissacarídeos. Na fração sólida, podem ser encontrados partes da celulose que não solubilizaram e lignina (DÁVILA, GULLÓN, *et al.*, 2021).

Ao utilizar temperaturas severas, acima de 150°C, pode ocorrer a formação de produtos de degradação como hidroximetilfurfural (HMF) e furfural a partir da desidratação de monossacarídeos em condições ácidas (YUE, HU, *et al.*, 2022). A formação de furfural é, principalmente, devido à desidratação de pentoses, como a xilose e arabinose. Em pHs ácidos, as pentoses perdem três moléculas de água, levando à formação de furfural (Figura 21).

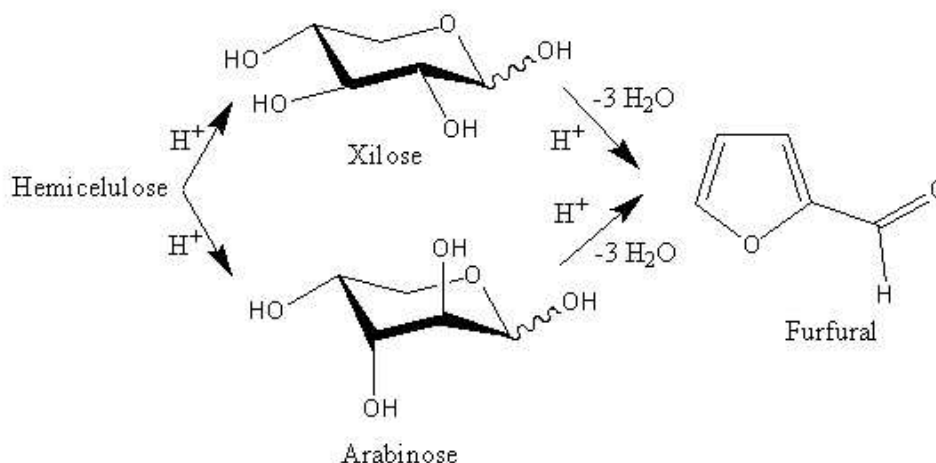


Figura 21 - Reação de degradação de pentoses (xilose e arabinose) provenientes da Hemicelulose, em furfural. Autoria própria.

Já o hidroximetilfurfural, é produzido a partir da degradação de hexoses, como a glicose. Assim como as pentoses, as hexoses, quando submetidas à alta temperatura e condições ácidas, perdem três moléculas de água para o meio formando a molécula de HMF.

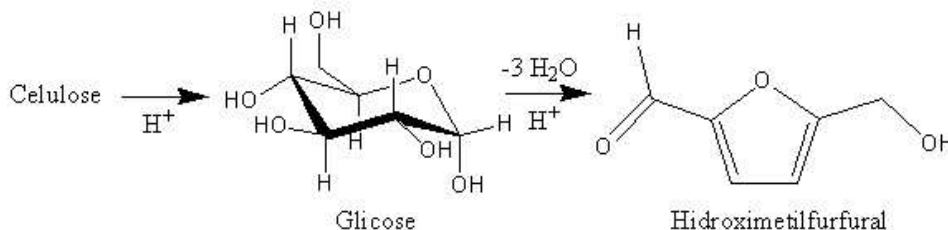


Figura 22 - Reação de degradação de hexoses (glicose) em hidroximetilfurfural. Autoria Própria.

Apesar da grande importância de HMF e furfural para produção de substâncias com alto valor agregado, como ácido 2,5-furanodicarboxílico, 2-metilfurano e ácido levulínico, que são precursores de produtos, como polietilenofuranoato e polietilenotereftalato, eles possuem ação inibidora de crescimento microbiano e fermentação (IWAKI, KAWAI, *et al.*, 2013), então é preciso controlar as condições do pré-tratamento para minimizar sua produção.

2.6. Bioprocesso em estado submerso

Em um bioprocesso, há diversos fatores que podem influenciar na produção, como a escolha do microrganismo, meio de cultura, modo de condução e condições operacionais (pH, temperatura, aeração e agitação). Assim, diferentes cepas possuem vias metabólicas diversas, que podem influenciar diretamente no produto desejado. Ao formular o meio de cultura, onde estarão os nutrientes e micronutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismo, é necessário observar a quantidade de açúcares, proteínas ou lipídios presentes. Quanto ao modo de condução, é interessante escolher qual o melhor design do reator, se será contínuo, em batelada ou batelada alimentada (WALL, RABEMANOLONTSOA, *et al.*, 2023)(IRAM, CEKMECELIOGLU, *et al.*, 2022).

O bioprocesso em estado submerso, ou cultivo ou fermentação submersa (FS) é uma técnica onde os microrganismos crescem em um meio de cultura líquido. Este processo pode ser conduzido em erlenmeyers (escala laboratorial) ou biorreatores (escala de bancada até escala industrial), onde os parâmetros como pH, temperatura e níveis de oxigenação podem ser controlados visando a maximização do crescimento microbiano e produtividade (COLLA, PRIMAZ, *et al.*, 2016). A FS é frequentemente utilizada para a produção de enzimas, antibióticos e outros compostos bioativos que são solúveis em água.

A FS é uma escolha eficiente para processos bioquímicos que necessitam condições controladas, devido à sua capacidade de produzir altos rendimentos de enzimas, antibióticos e compostos bioativos. Microrganismos, como fungos e bactérias se propagam em meios líquidos, que fornecem a eles uma agitação e aeração constante, fatores essenciais para otimização do crescimento e produção de metabólitos. Este ambiente facilita a regulação de pH, temperatura, nível de oxigênio e fornecimento de nutrientes. Além disso, este processo é compatível com configurações em larga escala industrial e sistemas de automação, facilitando o escalonamento e baixo custo do método ao produzir variedades de produtos bioquímicos, particularmente quando grandes volumes são requeridos para aplicações industriais e farmacêuticas (IRAM, CEKMECELIOGLU, *et al.*, 2022). Devido a isto, a escolha de utilizar a FS para conduzir um processo bioquímico oferece grandes vantagens nos diversos aspectos supracitados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho possui o objetivo de avaliar o uso da fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço da laranja (*Citrus sinensis*) na produção de hidrolases por *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1, como fonte de carbono, em um meio de cultura submerso.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a composição química do bagaço da laranja *in natura*;
- Avaliar o perfil e das frações líquidas resultantes do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja *in natura*;
- Avaliar a formação de HMF e furfural após o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja *in natura*;
- Avaliar a produção de hidrolases (pectinase e xilanase) a partir de *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 utilizando a fração líquida do pré-tratamento como fonte de carbono em meio de cultura submerso.

4. METODOLOGIA

4.1. Bagaço de laranja *in natura*

A amostra de bagaço de laranja foi fornecida pelo Instituto Senai de Inovação Biomassa/SENAI-MS. Antes de iniciar as análises, o bagaço foi moído em moinho de facas (Figura 23) modelo P19 – (Fritsch, EUA) e a peneira escolhida foi a de 1,5 mm. Após, utilizando um peneirador, foi escolhido o material que possuía granulometria entre 180,0 μm e 850,0 μm , para isto, foram utilizadas peneiras de 20# Mesh Tyler e 80# Mesh Tyler. As partículas com tais granulções escolhidas foram utilizadas em todas as etapas subsequentes.



Figura 23 - Moinho de facas modelo Pulverisette P-19 (Fritsch, Alemanha), localizado no Laboratório Bioetanol na UFRJ

4.2. Caracterização da biomassa *in natura*

A caracterização da biomassa de laranja *in natura* foi realizada em conjunto pela equipe do Laboratório Bioetanol, e a metodologia utilizada para determinação de cinzas, extrativos, carboidratos estruturais e lignina foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (SLUITER, 2005, 2011). Todas as etapas de caracterização foram realizadas em triplicata.

4.2.1. Determinação da massa de extrativos

Para iniciar a análise da massa de extrativos, foram utilizados 6,0 g de amostra de biomassa seca *in natura*, que continha cerca de 14% de umidade. Para esta etapa foi utilizado um extrator Soxhlet equipado com cartuchos de celulose. A amostra foi extraída, primeiramente, com água destilada por 24h e, na segunda etapa, foi utilizado etanol 96% (p/v), como solvente extrator, por 12h. Para quantificar a massa de extrativos, o cartucho com a amostra foi posto para secar em estufa a vácuo por 72h a 40°C, e a análise gravimétrica foi feita utilizando a equação 1 abaixo:

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

Onde %Ext representa o percentual de extrativos, $m_{filtro+am\ sem\ ext.}$ representa a massa do filtro de celulose com a massa de amostra sem extrativo que foi obtida ao final da secagem do conjunto (filtro mais amostra), m_{filtro} é a massa do filtro vazio, $m_{filtro+am}$ é a massa do filtro de celulose com a massa de amostra que foi adicionada e %umidade é o percentual de umidade presente na amostra.

4.2.2. Determinação da composição química do coproduto por HPLC

Para a determinação de carboidratos presentes na biomassa, após a extração, foi realizada uma hidrólise ácida seguindo as etapas a seguir. Em cada tubo de hidrólise foram adicionados cerca de 300,0 mg de biomassa seca e 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% (p/v). Cada tubo foi condicionado a uma temperatura de 30 °C durante 1 hora, etapa na qual as amostras foram hidrolisadas. Após a hidrólise, foram adicionados 84,0 mL de água ultrapura em cada tubo, levando a concentração de ácido sulfúrico no meio a 4% (p/v), em seguida os tubos foram selados, envoltos em papel alumínio e levados à autoclave por 1 hora a 121 °C (Figura 24).

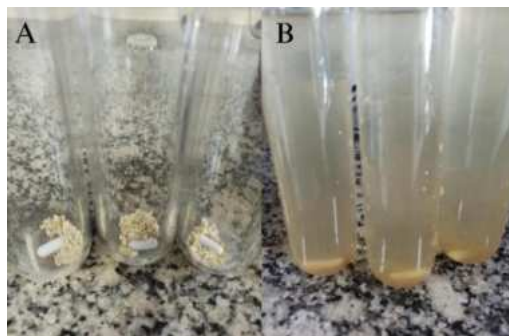


Figura 24 - Hidrólise ácida do bagaço de laranja in natura. Tubos de hidrólise com a biomassa antes (A) e depois (B) da hidrólise.

Após o resfriamento, a suspensão foi filtrada a vácuo em cadinho de vidro sinterizado, e o sólido recolhido para posterior análise. O filtrado foi separado para determinação da concentração de monossacarídeos, para isto, foi neutralizado com carbonato de cálcio para pH entre 5,0 e 6,0, e centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos para que o sal adicionado se separasse da suspensão. E, então, o sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa PTFE 0,22 μm e foi realizada a análise em HPLC-RI (*High Performance Liquid Chromatography – Refractive Index*), modelo *ULTIMATE 3000*, Thermo Scientific – E.UA. equipado com detector *RefractorMax* (índice de refração), e *software Chromeleon 7.1* (Dionex Ltd., Canadá).

Foi utilizada uma coluna que possuía como pré-coluna uma *deashing* (4,6 mm I.D. x 30 mm, BioRad, EUA), outra pré-coluna Aminex Carbo P (4,6 mm I.D. x 30 mm, BioRead, EUA), e coluna Aminex HPX-87P (açúcares monoméricos) e Aminex HPX-87H (ácidos galacturônico e poligalacturônico) (7,8 mm I.D. x 30 mm, BioRad, EUA). Para as análises foi utilizada água purificada, grau Milli-Q tipo I (18 M Ω -cm de resistividade), filtrada em filtro PTFE 0,2 μm em fluxo de 0,6 mL por minuto. No forno, onde fica a coluna, foi utilizada uma temperatura de 80 °C, e a temperatura do Cooler foi de 45 °C. As amostras e o amostrador automático permaneceram em temperatura de 15 °C, e o detector a 45 °C, com tempo de corrida de 25 minutos.

Para a apresentação dos resultados, foi considerado o percentual de recuperação de uma solução padrão de açúcares antes e após a hidrólise ácida. Para calcular o percentual de cada açúcar considerando a biomassa livre de extrativos foi utilizada a equação 2. E, para calcular a concentração de açúcares poliméricos a partir da concentração de açúcares monoméricos correspondentes, foi utilizado o fator de conversão de 0,88 (132/150) para pentoses como xilose

e arabinose, e 0,90 (162/180) para hexoses como glicose, galactose e manose. Este fator é calculado baseado na perda de uma molécula de água em cada ligação.

$$\% \text{ açúcar} = \frac{C * 86,73 * \left(\frac{1g}{1000mg}\right)}{\text{Massa seca}} * 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde o número 86,73 se refere ao volume do filtrado em mL.

4.2.3. Determinação do teor de lignina solúvel

Para determinar o teor de lignina solúvel, foi utilizada a mesma fração para a determinação de açúcares antes da adição de carbonato de cálcio. A fração de lignina solúvel foi lida em espectrofotômetro a 240 nm. O teor de lignina solúvel foi calculado utilizando a equação 3.

$$\%LSA = \left(\frac{UV_{abs} * 86,73 * D}{\varepsilon * \text{massa seca} * \text{Caminho óptico (cm)}}\right) * 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde, UV_{abs} é a média da absorbância da amostra a 240 nm, 86,73 é o volume do filtrado em mL, D é a diluição da amostra, ε é a absorvidade da biomassa em comprimento de onda específico (MARKHAM, 1982) e o caminho óptico é igual a 1 cm.

4.2.4. Determinação do teor de cinzas totais

Para realizar a determinação do teor de cinzas totais seguiu-se a metodologia recomendada pelo NREL, citada anteriormente. E foi realizada a calcinação de 1,0 g de amostra seca *in natura* em um cadinho, previamente seco e tarado, por 6 horas a 575 °C em um forno mufla. As amostras foram quantificadas em triplicata e para realizar o cálculo do teor, foi utilizada a equação 4 abaixo:

$$\%Cinzas = \frac{m_{\text{cadinho+cinzas}} - m_{\text{cadinho}}}{m_{\text{amostra seca}}} * 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Onde $m_{\text{cadinho+cinzas}}$ refere-se a massa do cadinho seco que contém as cinzas após o processo de calcinação na mufla, m_{cadinho} refere-se a massa do cadinho vazio seco e $m_{\text{amostra seca}}$ refere-se a massa de amostra seca.

4.2.5. Determinação do teor de sólidos insolúveis

O sólido resultante da hidrólise ácida, fração correspondente à lignina insolúvel mais cinzas, foi utilizado para a determinação de sólidos insolúveis em ácido, realizado, também, em

triplicata. Então, para calcular o teor de lignina insolúvel foi necessário considerar o percentual de cinzas da amostra, determinado na etapa anterior, como mostra a equação 5 abaixo. Para isto, o resíduo foi colocado em um cadinho, previamente seco e tarado, foi levado ao forno por 24 horas a 105 °C até atingir peso constante. O cálculo do teor de lignina insolúvel foi realizado seguindo a equação 6.

$$\%Res\acute{u}duo\ s\acute{o}lido = \%Lignina\ insol\acute{u}vel + \%Cinzas\ Eq.5$$

$$\%Lignina\ insol\acute{u}vel = \left(\frac{m_{cadinho+res\acute{u}duo} - m_{cadinho}}{m_{amostra\ seca}} \right) * 100 - \%Cinzas\ Eq.6$$

Onde $m_{cadinho+res\acute{u}duo}$ refere-se a massa do cadinho seco que contém o resíduo após o processo de secagem no forno mufla, $m_{cadinho}$ refere-se a massa do cadinho vazio seco e $m_{amostra\ seca}$ refere-se a massa de amostra seca.

4.2.6. Análise elementar

Amostra do bagaço de laranja in natura foram enviadas ao Laboratório de Termoanálise e de Reologia (LABTeR), localizado na Escola de Química da UFRJ, para ser realizada a análise elementar, que forneceu os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio. Os equipamentos utilizados foram o analisador elementar Perkin-Elmer CNH 2400 e um espectrômetro de emissão em plasma induzido, ICP-AES, Spectro Cirrus CCD.

4.3. Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço da laranja

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em um Reator Parr modelo 4548B (Figura 25) utilizando o método descrito em Da Silva, Teixeira, et al. (2013). No copo inferior do instrumento, foram adicionados 40,0 g de massa seca de bagaço de laranja, previamente moído e peneirado, e a quantidade de água purificada suficiente para completar 1,0 L de água, levando em conta a quantidade de água pré-existente no material. Antes de ligar o reator, a suspensão de sólidos foi homogeneizada por 5 minutos com o auxílio de um bastão de vidro. O reator foi selado encaixando as laterais metálicas e apertando os parafusos com o auxílio de uma chave de boca nº 16.



Figura 25 - Reator Parr modelo 4848B, localizado no Laboratório Bioetanol na UFRJ

Antes de iniciar o pré-tratamento, foi ligada a rotação a 100 rpm no equipamento para auxiliar na homogeneização do material. Foi feita a retirada o ar atmosférico de dentro do reator realizando a inserção de CO₂ no meio até atingir a pressão de 10 bar.

No total, foram realizados quatro pré-tratamentos utilizando valores diferentes nos parâmetros de temperatura e tempo: 70 °C por 30 minutos, 100 °C por 60 minutos, 140 °C por 60 minutos e 180 °C por 60 minutos (SAADATINAVAZ, KARIMI, *et al.*, 2021). O tempo de pré-tratamento foi contabilizado a partir da estabilização da temperatura desejada. Ao fim do tempo, o aquecimento do reator foi desligado, e, ao atingir a temperatura de 40 °C, iniciou-se o alívio da pressão abrindo a válvula de escape de gases até zerar, para que fosse possível abrir o reator.

Após o pré-tratamento, a suspensão foi filtrada a vácuo a fim de separar as frações sólidas e líquidas. Para calcular o percentual de sólidos recuperados, a fração sólida foi lavada com 3 L de água purificada e posta para secar em temperatura ambiente durante uma semana.

Em seguida, a umidade de cada fração foi determinada utilizando uma balança de umidade e utilizou-se a equação 7 para calcular o resultado:

$$\% \text{ de sólidos recuperados} = \frac{m_{\text{sólidos,rec}}}{m_{\text{sólidos,0}}} * 100 \quad \text{Eq. 7}$$

Onde, $m_{\text{sólidos,rec}}$ é a massa de sólidos secos recuperados após o tratamento hidrotérmico e $m_{\text{sólidos,0}}$ é a massa de sólidos secos antes do tratamento hidrotérmico.

4.4. Caracterização da fração líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico

4.4.1. Medição de pH

O pH de cada fração líquida filtrada obtida após o pré-tratamento hidrotérmico foi determinado utilizando um pHmetro da Metler Toledo[®]. Antes do uso, o equipamento foi calibrado utilizando soluções tampão com pH 4,0, 7,0 e 9,0. Então, cada fração líquida foi posta em um bécher de 10,0 mL sob agitação e o sensor foi inserido para a determinação do pH.

4.4.2. Análises espectroscópicas

O espectro de varredura das frações líquidas diluídas foi obtido utilizando um espectrofotômetro modelo Hewlett Packard G1103A UV-Vis, com o auxílio do software ChemStation. A varredura foi feita entre os comprimentos de onda de 200 nm até 600 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

As frações líquidas foram liofilizadas para a caracterização em espectroscopia de infravermelho. Foi utilizado um espectrofotômetro de FT-IR da Perkin-Elmer modelo Spectrum 100 com acessório de *Smart Orbit*, acessório de reflectância de única-reflexão horizontal atenuada (ATR). Cada amostra foi analisada em números de onda de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .

4.4.3. Identificação e quantificação de pectina

A identificação de pectina na forma de ácido poligalacturônico foi realizada em HPLC com a coluna Aminex HPX-87H, e mesmos parâmetros cromatográficos utilizados na sessão 4.2.2. Cada fração líquida foi filtrada utilizando seringa e filtro PTFE de 0,22 μm para *vial* de 1,5 mL e enviada para análise.

Devido à falta do padrão de ácido poligalacturônico no momento desta análise, a quantificação de pectina foi determinada gravimetricamente ao adicionar etanol 96% na proporção de 2:1 em cada fração líquida e deixar a mistura em repouso por 1 hora para ocorrer a precipitação. Após isso, cada suspensão foi filtrada utilizando tecido de Nylon e o sólido recolhido foi posto para secar em estufa a $50^{\circ}\text{C} \pm 5$ até atingir peso constante (SILVA, B. A. M., 2021).

4.4.4. Determinação de produtos de degradação por HPLC

Para a determinação de hidroximetilfurfural e furfural, foi utilizada um sistema de colunas composto por uma pré-coluna Cátion H^+ e uma coluna analítica Aminex C18. O fluxo utilizado foi de 0,6 mL/minuto, onde a temperatura do amostrador automático foi 10°C , a temperatura da coluna foi 60°C e a temperatura do *Post-Column Cooler* foi 45°C . Foi utilizado um detector por arranjo de diodos condicionado a temperatura de 45°C . E o tempo de corrida foi 10 minutos.

O pH de cada fração líquida foi medido e registrado antes da análise, para caráter informativo. Cada amostra foi filtrada em filtro PTFE modificado com $0,2 \mu\text{m}$ para um *vial* de 1,5 mL, não ultrapassando a marca de 1,0 mL para que não ocorresse contaminação cruzada com a agulha de injeção do amostrador. Os *vials* foram selados e identificados para a análise.

4.4.5. Determinação de açúcares redutores antes e após hidrólise ácida das frações líquidas

O teor de açúcares redutores foi dosado nas frações líquidas resultantes do pré-tratamento e foi realizada a hidrólise ácida de cada uma das correntes para a determinação dos açúcares após a hidrólise. Em tubos de hidrólise foram adicionados 20,0 mL de cada fração líquida e a quantidade suficiente de ácido sulfúrico 72%, para reduzir a concentração a 4%. Os tubos foram embalados em papel alumínio e levados à autoclave por 1 horas a 121°C . Após o resfriamento das amostras, cada uma delas foi neutralizada utilizando carbonato de cálcio, seguido de decantação e centrifugação. O sobrenadante foi diluído para posterior análise seguindo o método de dosagem de açúcares redutores por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

A dosagem de açúcares redutores foi realizada a partir da reação equimolar de oxirredução entre os açúcares e o DNS, que apresenta uma cor amarelada, e ao ser reduzido passa a apresentar um tom avermelhado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), que ao ser lido em um espectrofotômetro a 540 nm, pôde-se relacionar a absorbância com a concentração molar

dos açúcares que foram oxidados. Inicialmente, foi preparado o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dissolvendo 10,0 g do sal em 200,0 mL de NaOH 2,0 N (16,0 g/200,0 mL). Em seguida, foram adicionados 300 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio) em 500,0 mL de água purificada. As soluções foram adicionadas uma à outra em um balão volumétrico de 1000,0 mL e avolumado com água purificada. A solução foi estocada em um frasco escuro e deixada em repouso por 10 dias para estabilização (MILLER, 1959).

Foi preparada uma curva de calibração de glicose (açúcar padrão para dosagem de açúcares redutores) a partir de uma solução estoque de 10 $\mu\text{mol/mL}$ para obter o fator de conversão. A curva de calibração foi preparada em triplicada conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Dados para a construção da curva de calibração para determinação do teor de açúcares redutores.

[Glicose] $\mu\text{mol/mL}$	DNS (mL)	H ₂ O (mL)	Solução padrão de glicose (mL)
Branco	0,5	0,5	0,0
2,0	0,5	0,4	0,1
4,0	0,5	0,3	0,2
6,0	0,5	0,2	0,3
8,0	0,5	0,1	0,4
10,0	0,5	0,0	0,5

A reação com DNS ocorreu em tubos de ensaio e as amostras foram analisadas antes e após a hidrólise ácida. Nos tubos foram adicionados 0,5 mL da amostra diluída e 0,5 mL de DNS, em seguida todos foram postos em banho de 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 6,5 mL de água purificada em cada tubo e os meios reacionais foram lidos a 540 nm em espectrofotômetro.

4.5. Manutenção e propagação de esporos de *Aspergillus awamori*

O fungo, *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 (*The Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew Surrey, UK*) é um mutante sequencial do *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (BON, WEBB, 1993) obtida pela *ARS Culture Collection*. Para a propagação das células, o cultivo foi feito em placas de Petri utilizando PDA (*Agar Potato Dextrose*), esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C, como meio sólido por 7 dias a 30 °C. Para obter a suspensão de esporos, as placas foram raspadas em solução de NaCl 0,9% esterilizada com o auxílio de

alças estéreis. Após, foi feita a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e a massa celular foi suspensa em solução de glicerol 20%, na proporção de 1:5 (células:glicerol). Foram utilizados tubos criogênicos estéreis para o armazenamento a -20 °C. Os esporos foram contados utilizando uma câmara de Neubauer através de microscopia óptica.

4.6. Bioprocesso submerso

O pré-inóculo permaneceu em incubação por 3 dias, com 1% (v/v) de suspensão de esporos contendo acima de 10^7 conídios/mL, condicionado a 30°C e sob agitação de 200 rpm. Em seguida, foram preparados cinco meios para a produção de enzimas utilizando diferentes fonte de carbono: bagaço de laranja in natura, fração líquida do pré-tratamento a 70°, 100°C, 140°C e 180°C. Cada inóculo continha 100,0 mL de meio de cultivo com 10% (v/v) de pré-inóculo, 3,0 g/L de NaNO₃, 0,003 g/L de K₂HPO₄, 10,0 g/L de extrato de levedura (TEIXEIRA, 2010). As frações líquidas foram utilizadas como meio condutor e fonte de carbono para a produção de enzimas, e no inóculo que possuía como fonte de carbono o bagaço de laranja in natura (30,0 g/L) foi utilizado tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. A produção de enzimas foi avaliada durante 7 dias em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100,0 mL do meio, nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 168 horas, sob as mesmas condições do pré-inóculo.

4.7. Dosagem da atividade enzimática

Foram retiradas alíquotas de cada meio de produção enzimática nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 168 horas para realizar as dosagens de atividade enzimática. A separação do extrato bruto enzimático do meio, da biomassa fúngica e do coproduto foi feita por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada meio foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas de pectinase e xilanase.

4.7.1. Dosagem da atividade de pectinase

A dosagem de atividade de pectinase foi realizada baseada na tese de COURI (1993). Foi preparada uma curva de calibração de ácido galacturônico a partir de uma solução estoque de 10 µmol/mL. A curva de calibração foi preparada em triplicada conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Dados para a construção da curva de calibração de ácido galacturônico para dosagem de atividade de pectinases

[Ácido galacturônico] ($\mu\text{mol/mL}$)	Solução padrão de ácido galacturônico (mL)	Água destilada (mL)	DNS (mL)
0	0	1	1
1	0,1	0,9	1
2	0,2	0,8	1
3	0,3	0,7	1
4	0,4	0,6	1
5	0,5	0,5	1
6	0,6	0,4	1
7	0,7	0,3	1
8	0,8	0,2	1
9	0,9	0,1	1
10	1	0	1

Cada tubo foi posto em banho-maria por 5 minutos para a reação ocorrer, e ao fim do tempo, eles foram resfriados em banho de gelo e foram adicionados 13 mL de água purificada. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm.

O ensaio enzimático foi realizado utilizando como substrato uma solução de ácido poligalacturônico 0,25% (m/v) em tampão acetato 0,2 M, pH 4,5. Os ensaios foram realizados adicionando 0,1 mL do extrato enzimático diluído a 4,0 mL da solução de substrato. A reação foi feita em banho a 35 °C durante 30 minutos. Para interromper a reação, são retirados 0,5 mL de cada tubo reacional e adicionados a 0,5 mL de DNS, e em seguida os tubos foram imersos em banho-maria por 5 minutos para o desenvolvimento da cor e adicionados 6,5 mL de água após resfriamento para posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Foram preparados os controles da enzima (sem adição de substrato) e do substrato (sem adição de enzima) para que fossem subtraídos da absorbância do meio reacional.

A concentração enzimática em UI/mL foi calculada utilizando a equação 8, abaixo:

$$[Enz](UI/mL) = \frac{Dil * Abs_T * F_{\frac{\mu mol}{mL}} * V_{T_{mL}}}{T_{min} * V_{enz(mL)}} \quad Eq. 8$$

Onde, Dil é a diluição do extrato enzimático, Ab_{ST} é a absorbância da mistura reacional subtraída do controle da enzima e do substrato, F é o fator da curva de calibração de ácido

galacturônico, V_T é o volume total de reação, T é o tempo de reação e V_{enz} é o volume do extrato enzimático.

4.7.2. Dosagem da atividade de xilanase

A dosagem de atividade de xilanase foi realizada baseada na tese de TEIXEIRA (2010). Foi preparada uma curva de calibração de xilose a partir de uma solução estoque de 10 $\mu\text{mol/mL}$. A curva de calibração foi preparada em triplicada conforme a Tabela 7.

Tabela 7 – Dados para a construção da curva de calibração de xilose para a dosagem da atividade de xilanases.

[Xilose] $\mu\text{mol/mL}$	Solução padrão de xilose (mL)	Água destilada (mL)	DNS (mL)
0,0	0,0	0,5	0,5
2,0	0,1	0,4	0,5
4,0	0,2	0,3	0,5
6,0	0,3	0,2	0,5
8,0	0,4	0,1	0,5
10,0	0,5	0,0	0,5

Cada tubo foi posto em banho-maria por 5 minutos para a reação ocorrer, e ao fim do tempo, eles foram resfriados em banho de gelo e foram adicionados 6,5 mL de água purificada. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm.

O ensaio enzimático utilizou uma solução de Xilana de *Beechwood* 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. A análise consistiu em adicionar 0,1 mL do substrato em tubos contendo 0,05 mL da enzima diluída e incubá-los em banho a 50 °C por 5 minutos. Após a reação, foram adicionados 0,3 mL de DNS em cada tubo e postos em banho-maria por 5 minutos para o desenvolvimento da cor. Em seguida, os tubos foram postos para resfriar e adicionados a eles 1,5 mL de água purificada para serem lidos em espectrofotômetro a 540 nm. Também foram preparados os controles da enzima (sem adição de substrato) e do substrato (sem adição de enzima).

A concentração da atividade enzimática de xilanase também foi calculada a partir da equação 8, citada anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do bagaço de laranja *in natura*

O coproduto de laranja *in natura* fornecido pelo Instituto Senai já estava previamente cortado em pedaços menores e incluía partes da laranja, como a casca, albedo, membrana e sementes. Primeiramente, todo o bagaço foi levado ao moinho de facas para a redução da granulometria utilizando uma peneira de 1,5 mm. Em seguida, toda a amostra foi peneirada utilizando um sistema de peneiras para realizar o fracionamento das partículas e coletar o material com diâmetro de partícula entre 180,0 μm e 850,0 μm , como pode ser observado na Figura 26 (HAMES, RUIZ, *et al.*, 2008).



Figura 26 - Amostra de bagaço de laranja *in natura* antes de passar pelo moinho de facas, à esquerda, e moída e peneirada, à direita.

Na Tabela 8, mostra-se os resultados obtidos a partir do trabalho de caracterização realizado, mostrando que após a hidrólise ácida, foi possível determinar a composição química de açúcares presentes na amostra, como glicose, xilose, arabinose, galactose, manose e, principalmente, ácido poligalacturônico. A estrutura complexa da pectina, composta por cadeias de ácido galacturônico confere rigidez e elasticidade ao exterior da fruta devido à rede pectínica que funciona como uma forte ligação entre as células vegetais, contribuindo para sua integridade. O alto teor de ácido poligalacturônico encontrado no conteúdo hidrolisado se deve à maior fração deste polissacarídeo estar concentrada no epicarpo (casca) e mesocarpo (albedo), principais constituintes do bagaço após a extração do suco (MARTINI, 2009).

Tabela 8 - Composição química do bagaço de laranja *in natura*, expressa em percentual de massa seca.

Componente	% (m/m)
Glicose anidra	16,89 ± 0,09
Xilose anidra	2,17 ± 0,02
Galactose anidra	3,80 ± 0,14
Arabinose anidra	7,73 ± 0,02
Manose anidra	0,64 ± 0,20
Ácido Poligalacturônico	51,5 ± 1,18
Lignina solúvel	2,75 ± 0,13
Lignina insolúvel	5,77 ± 0,55
Cinzas	2,84 ± 0,21
Acetil	ND*
Extrativos	9,27 ± 1,50
Total	103,89 ± 4,04

*ND= não detectado

Nos cromatogramas da Figura 27 e Figura 28 , pode ser observada a presença de um pico relacionado ao ácido galacturônico e outro relacionado ao ácido poligalacturônico no bagaço de laranja. Isto ocorreu por causa da hidrólise parcial da pectina devido ao ácido sulfúrico utilizado na metodologia, nas condições sugeridas pelos protocolos da NREL, não ter sido efetivo para a hidrólise total da pectina presente no coproduto utilizado. Então, a quantificação de pectina total na amostra foi considerada como a soma da fração hidrolisada em ácido galacturônico e a não hidrolisada representada pelo ácido poligalacturônico.

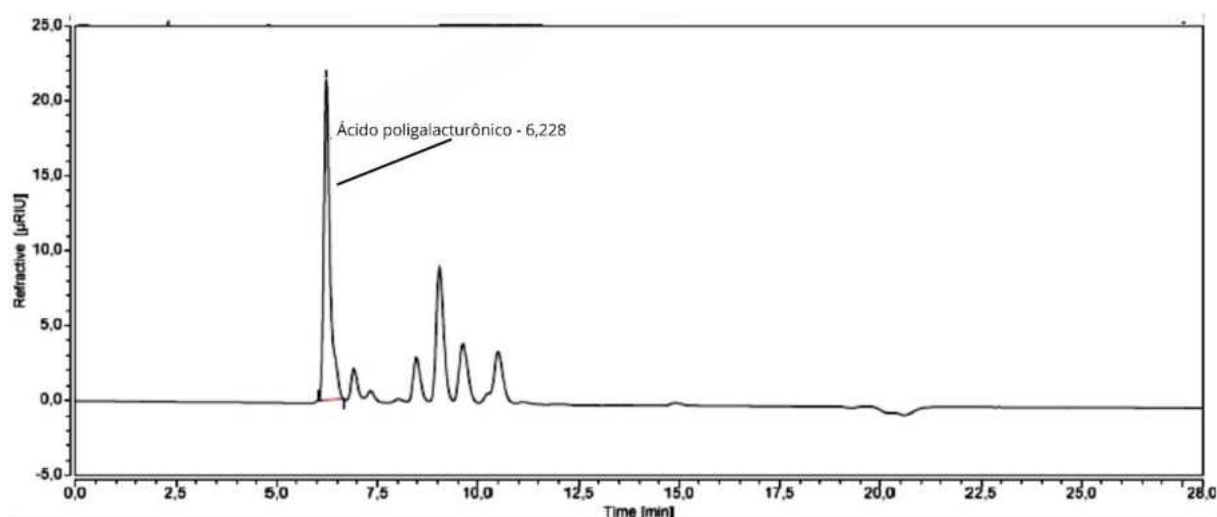


Figura 27 - Cromatograma obtido na quantificação de ácido poligalacturônico na amostra de bagaço de laranja in natura hidrolisado.

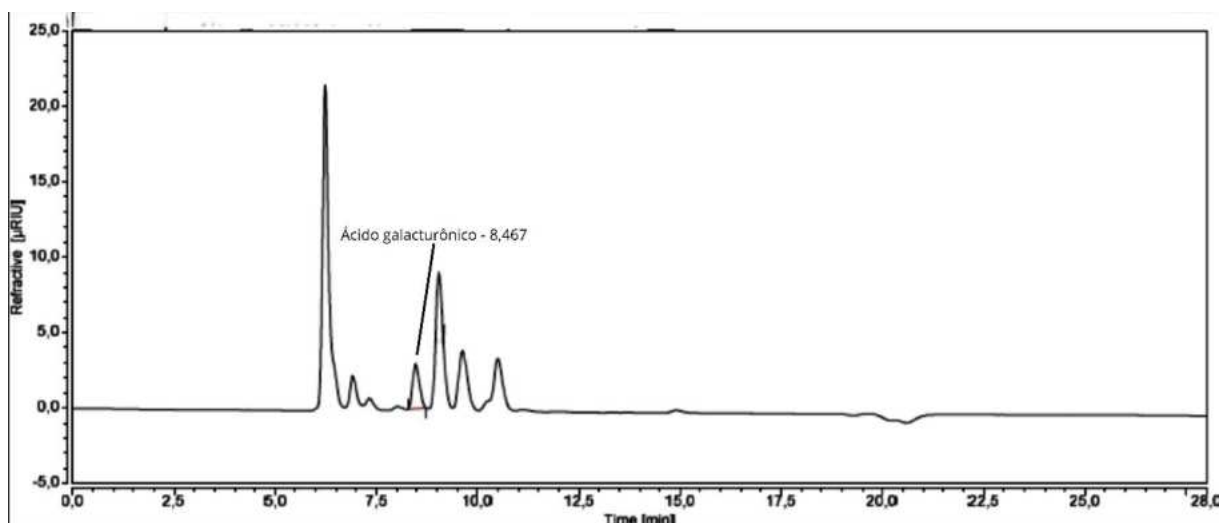


Figura 28 - Cromatograma obtido na quantificação de ácido galacturônico na amostra de bagaço de laranja in natura hidrolisado.

Para obter a composição lignocelulósica da biomassa estudada, mostrada na Tabela 9, utilizou-se o fator de conversão, citado na sessão 4.2.2, a fim de converter a porcentagem de açúcares monoméricos em seus respectivos polissacarídeos. A composição de celulose é a mesma da glicose, e os outros açúcares (xilose, arabinose, galactose e manose) são componentes da hemicelulose.

Tabela 9 - Composição da estrutura lignocelulósica presente no bagaço de laranja in natura.

Componente	% (m/m)
Extrativos	9,27 ± 1,50
Celulose + Amido	15,22 ± 0,08
Hemicelulose	12,68 ± 0,24
Lignina	8,52 ± 0,43
Pectina	51,50 ± 1,18
Cinzas	2,84 ± 0,21
Total	100,03 ± 3,64

Os valores obtidos para hemicelulose, celulose e lignina estão próximos ao que foi mostrado no trabalho de Orozco (2014) de 14,46%, 11,93% e 2,17%, respectivamente. Os teores desses carboidratos estruturais foram determinados em amostras livres de extrativos.

Houve diferença em relação aos resultados encontrados por Retore, et al. (2010), no qual para hemicelulose e celulose foram reportados teores de 7,65% e 21,08%, respectivamente. Isto pode ser à aplicação de metodologias de quantificação diferentes, onde o trabalho referenciado calculou o teor de hemicelulose pela diferença entre o teor de fibra de detergente neutro e o teor de fibra em detergente ácido, e a celulose foi quantificada por colorimetria. Em Martini (2009), o teor de pectina encontrado foi de 42,50% em percentual de massa seca, corroborando com o resultado obtido no presente trabalho, no qual obteve-se a pectina como maior constituinte percentual da biomassa estudada.

O teor de extrativos obtido, 9,27%, se refere às ceras, gorduras, açúcares não estruturais e impurezas minerais inorgânicas que podem estar presentes na amostra. Em Rivas et al. (2008) o bagaço de laranja *in natura* apresentou teor de extrativos em etanol de 25% e Moraes (2018) obteve 19,3% de extrativos.

Em relação à diferença entre os resultados obtidos deste trabalho e a literatura, a composição de um mesmo tipo de biomassa pode variar devido a diversos fatores. A variabilidade genética confere à mesma espécie diferentes arranjos genéticos resultando em composições químicas variadas (MARTINI, 2009). As condições ambientais, como a qualidade do solo e disponibilidade de água, afeta o conteúdo de nutrientes e a composição estrutural da biomassa. Ao crescer em solos ricos em nutrientes, a planta pode desenvolver maiores quantidades de certos compostos, como vitaminas e carboidratos. Exposição ao ar, umidade e microrganismos também causa impacto estrutural à biomassa, podendo levar à sua degradação (Z. CYPRIANO, L. DA SILVA, *et al.*, 2017).

A análise elementar do bagaço de laranja *in natura* forneceu a contribuição, em porcentagem, de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre presentes na amostra, com relação C/N igual a 47:1. Os resultados, mostrados na Tabela 10, aproximam-se dos encontrados por Martini (2009), que afirmou que a relação C/N está na faixa correspondente às biomassas em geral relatadas na literatura, que varia de 40:1 até 90:1.

Tabela 10 - Análise elementar do bagaço de laranja *in natura*.

Elementos	Valores (%)	
	Presente trabalho	Martini (2009)
Carbono	37,64 ± 0,15	40,60
Hidrogênio	6,14 ± 0,04	5,60
Nitrogênio	0,88 ± 0,03	1,20
Oxigênio	55,21 ± 0,21	52,40
Enxofre	0,12 ± 0,01	0,10

Portanto, ao avaliar os dados obtidos na caracterização, supõe-se que o bagaço de laranja *in natura* pode ser um bom indutor para produção de pectinases, devido ao alto teor de ácido poligalacturônico em cadeia presente na biomassa.

5.2. Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja *in natura* foi realizado nas seguintes condições: 70°C por 30 minutos, 100°C, 140°C e 160°C por 60 minutos. A escolha das condições a partir de 100°C foi baseada no trabalho realizado por Saadatinavaz, Karmini, et al. (2021) que obtiveram boas recuperações de glucana, solubilização de açúcares da hemicelulose e remoção da lignina ao realizar o pré-tratamento em resíduos de laranja. Foi reportado que durante o processo houve a solubilização de até 68,2% da biomassa, onde mais da metade dos açúcares da hemicelulose e oligômeros foram transferidos para a fração líquida resultante do pré-tratamento.

Os perfis de temperatura e pressão mostrados na Figura 29 apresentaram as mesmas características durante os pré-tratamentos, onde a temperatura e pressão se mantiveram constante durante o tempo de processo, 30 minutos para 70°C e 60 minutos para as demais temperaturas. Foi utilizada uma baixa carga de sólido, cerca de 4%, para possibilitar a homogeneização da suspensão e para que não houvesse acúmulo de sólidos nas paredes do reator, já que o material se apresentou altamente higroscópico.

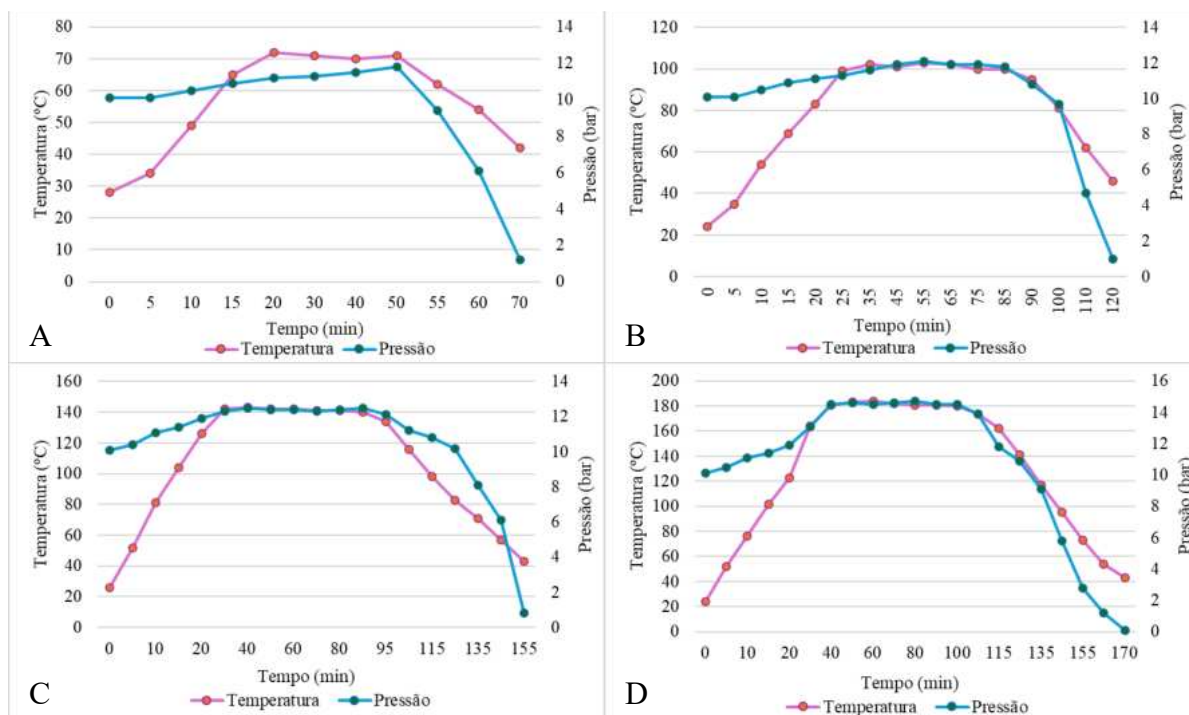


Figura 29 - Perfil de temperatura (eixo primário) e pressão (eixo secundário) ao longo do tempo para pré-tratamento hidrotérmico, nas condições de (A) 70°C por 30 minutos, (B) 100°C, (C) 140°C e (D) 180°C por 60 minutos, do bagaço de laranja *in natura*.

Após a separação por filtração das frações sólidas e líquidas, o sólido foi seco à temperatura ambiente. As massas de recuperação de sólido e umidade estão explicitadas na Tabela 11. A recuperação de sólidos obtida foi similar ao resultado encontrado por Saadatinavaz, Karmini, et al. (2021), nas mesmas condições utilizadas. No trabalho citado, eles obtiveram recuperações, em percentual de biomassa seca, de $42,7 \pm 2,1$, $38,6 \pm 2,1$ e $33,9 \pm 1,8$, para as condições de 100°C, 140°C e 180°C, respectivamente, indicando a reprodutibilidade do método de pré-tratamento utilizado. Observa-se que quanto maior a temperatura utilizada, menor é a porcentagem de sólidos recuperados. Isto se deve à solubilização de compostos estruturais da biomassa que passaram a estar presentes na fração líquida resultante do pré-tratamento, como parte da pectina e hemicelulose que são solúveis em água quente. Além disso, compostos acetilados presentes na biomassa auxiliam na hidrólise de compostos inicialmente insolúveis em água ao diminuir o pH do meio junto com a atmosfera rica em CO₂ dentro do reator (SAADATINAVAZ, KARIMI, *et al.*, 2021).

Tabela 11 - Recuperação de sólidos de bagaço de laranja após o pré-tratamento hidrotérmico.

Fração Sólida	Massa úmida (g)	Umidade % (m/m)	Massa seca (g)	Recuperação de sólidos % (g/100 g de biomassa seca)
70 °C, 30 min	20,09	10,64 ± 0,53	17,95	52,18
100 °C, 60 min	16,59	6,65 ± 0,24	15,49	45,03
140 °C, 60 min	12,71	2,78 ± 0,09	12,36	35,93
180 °C, 60 min	12,79	6,13 ± 0,42	12,01	34,91

No estudo de Saadatinavaz, Karmini, et al. (2021), foi reportado que a hidrólise enzimática do bagaço de laranja pré-tratado hidrotérmicamente teve aumento de concentração de glicose e xilose de até 83,5%, na qual foram obtidos 23,3 g/L de glicose e 2,4 g/L de xilose nas condições de pré-tratamento de 140°C por 120 minutos. Ao realizar a hidrólise enzimática do bagaço de laranja não tratado foram encontrados apenas 12,7 g/L de glicose e 1,8 g/L de xilose, mostrando o quão eficiente e necessário é o pré-tratamento da biomassa para maiores rendimentos de açúcares. Também foi relatado que com o aumento da temperatura e tempo de pré-tratamento, 180°C por 120 minutos, houve um decréscimo no rendimento de açúcares devido à possível degradação e redeposição de lignina (YAN, LI, *et al.*, 2015).

As imagens das frações sólidas obtidas após filtração e secagem são apresentadas na Figura 30 e as frações líquidas são mostradas na Figura 31. Pode ser observado que conforme houve o aumento na temperatura de pré-tratamento, diferentes aspectos foram obtidos tanto para as frações sólidas, quanto para as líquidas. Isto se deve à possível reação de Maillard e caramelização que ocorreram durante o pré-tratamento.

A reação de Maillard é conhecida por ser um processo não-enzimático que ocorre entre as carbonilas de açúcares redutores e grupos aminos, como aminoácidos, e é responsável pelo desenvolvimento de cor, sabor e aroma no processamento de alimentos. Outro processo concomitante à reação de Maillard é a caramelização que ocorre na ausência de aminoácidos e auxilia no processo não-enzimático que geram produtos responsáveis pela cor amarronzada. Temperaturas acima de 100°C, já são suficientes para realizar a hidrólise de alguns polissacarídeos, como a sacarose em glicose e frutose, que é o primeiro passo para iniciar a caramelização e promover a reação de Maillard (ELIODÓRIO, PENNACCHI, *et al.*, 2023).



Figura 30 - Frações sólidas úmidas do bagaço de laranja pré-tratado hidrotermicamente a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D), à esquerda. Frações sólidas secas do bagaço de laranja pré-tratado hidrotermicamente a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D), à direita.

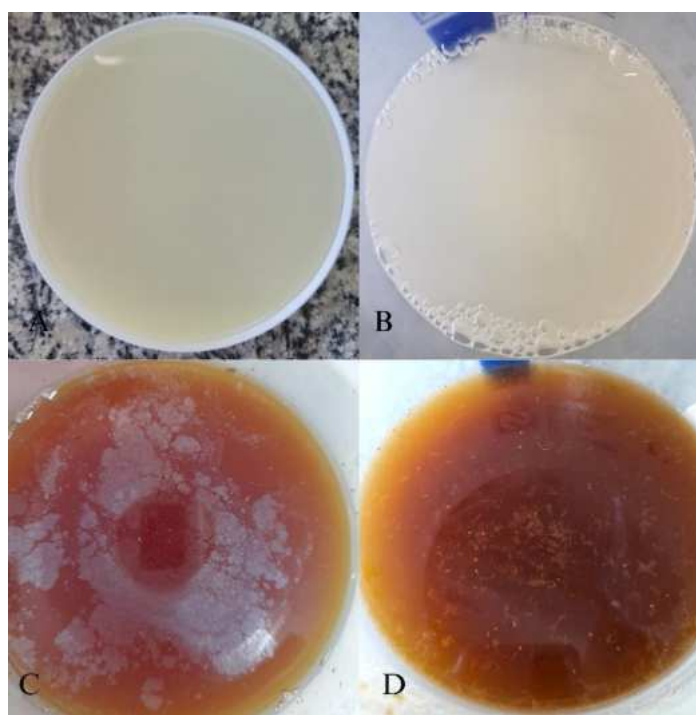


Figura 31 - Frações líquidas do bagaço de laranja pré-tratado hidrotermicamente a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D).

Orozco, et al. (2014) reportou a presença de 7,59% de proteína ao realizar a caracterização do bagaço de laranja. Proteínas são macromoléculas compostas por sequências

de aminoácidos que são componentes essenciais para a reação de Maillard, que ocorre entre o açúcar redutor e aminoácidos. Logo, ao utilizar temperaturas de pré-tratamento de 140°C e 180°C, é possível que tenha ocorrido esta reação, além da caramelização, devido à composição desta biomassa.

Os produtos da reação de Maillard são moléculas de baixo peso molecular e são responsáveis por algumas características organolépticas citadas anteriormente. Este processo é desejado quando se pretende que o alimento tenha uma cor marrom e um aroma especial. No entanto, em temperaturas muito altas, pode ser formada a acrilamida, um provável composto carcinogênico. Para isto ser evitado, são utilizadas temperaturas mais brandas, asparaginases e injeção de CO₂ no meio (ELIODÓRIO, PENNACCHI, *et al.*, 2023).

5.2.2. Caracterização das frações líquidas

Antes de iniciar o pré-tratamento, o pH de cada suspensão de sólidos da biomassa foi medido. Esta etapa é necessária para minimizar a formação de compostos de inibição de atividade microbiana (hidroximetilfurfural e furfural) durante o processo. O ideal é que antes do pré-tratamento o pH esteja acima de 5,0, sendo feito um ajuste de pH com uma solução de NaOH 0,01M se o meio estiver com pH abaixo disto. Após a separação por filtração a vácuo das suspensões obtidas no pré-tratamento, o pH de cada fração líquida foi medido novamente (Tabela 12).

Tabela 12 - Registro de pH da suspensão de sólidos antes e depois de cada pré-tratamento, e concentração de açúcares redutores em cada fração líquida antes e após a hidrólise ácida.

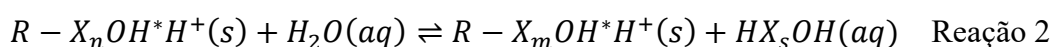
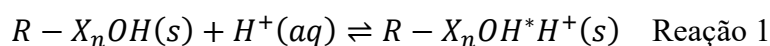
Fração Líquida	pH antes do PTH	pH após o PTH	Açúcares Redutores (g/L)	Açúcares Redutores (g/L) após Hidrólise Ácida
70 °C, 30 min	5,42	4,21	0,07 ± 0,00	8,41 ± 0,67
100 °C, 60 min	5,49	3,92	0,52 ± 0,05	13,04 ± 0,85
140 °C, 60 min	5,52	3,85	6,23 ± 0,24	19,26 ± 0,97
180 °C, 60 min	5,34	3,76	4,92 ± 0,16	15,43 ± 1,01

Na Tabela 12, também estão explicitados os resultados obtidos a partir da dosagem de açúcares redutores antes e após a hidrólise ácida de cada fração líquida com ácido sulfúrico 4% que teve como objetivo converter os polissacarídeos presentes em seus monossacarídeos. Observa-se que quanto maior a temperatura empregada no pré-tratamento, maior a

concentração de açúcares redutores antes e após a hidrólise ácida. Entretanto, ao utilizar 180°C houve uma diminuição na quantidade de açúcares, consequência da possível degradação durante o pré-tratamento que pode ter levado a formação de hidroximetilfurfural e furfural. Não foram encontrados dados na literatura em relação à fração líquida de pré-tratamento hidrotérmico para comparação.

Esses açúcares redutores são majoritariamente oriundos da solubilização seguida da quebra das cadeias da hemicelulose, que possui arabinose, xilose, galactose e manose em sua composição. Este processo segue os seguintes passos:

Solubilização da hemicelulose



Onde R corresponde à celulose ou lignina conectada à biomassa, X_n e X_nOH representam os n-xilooligômeros no interior e nos extremos da cadeia. A Reação 1 representa a absorção de íons hidrogênio na superfície da biomassa e a Reação 2, a clivagem de xilooligômeros da biomassa.

O aumento na concentração de açúcares redutores após a hidrólise ácida nas frações líquidas de cada pré-tratamento pode indicar que estas seriam uma boa fonte de carbono para produção de enzimas referentes aos polissacarídeos presentes. Cerca de 20% a 40% do conteúdo total de pectina é solúvel em água quente (FREITAS, COIMBRA, *et al.*, 2021), e devido à majoritária presença de ácido poligalacturônico no bagaço de laranja *in natura*, supõe-se que boa parte da pectina tenha sido solubilizada e esteja presente nas frações líquidas.

5.2.3. Identificação e quantificação de pectina

No momento da caracterização não se tinha disponível o padrão analítico de ácido poligalacturônico para realizar a quantificação do mesmo em cada fração líquida. Porém, foi possível identificar a presença desta molécula através do pico relacionado a ela no cromatograma obtido em HPLC (Figura 32, Figura 33, Figura 34 e Figura 35). Pode-se afirmar que este pico é referente ao ácido poligalacturônico, pois foram utilizados os mesmos parâmetros cromatográficos e mesma coluna na caracterização do bagaço de laranja *in natura*,

quando ainda se tinha disponível o padrão analítico deste composto que apresentou o mesmo tempo de retenção que o encontrado nesta etapa.

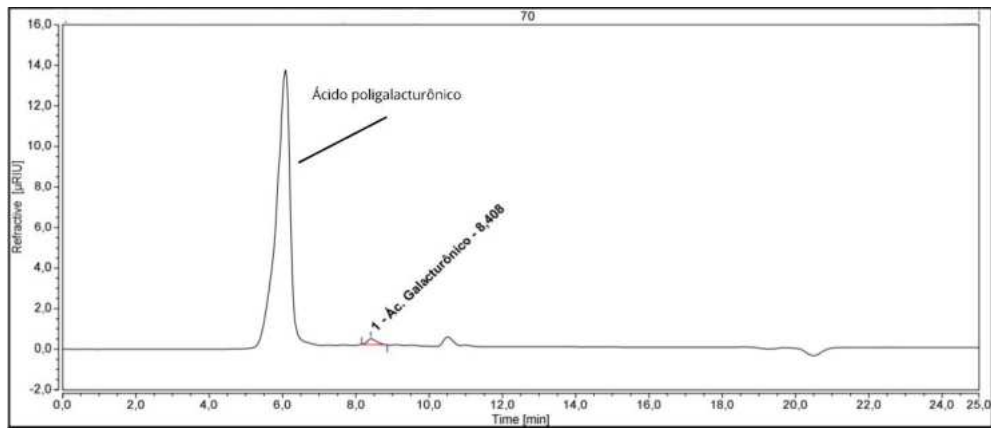


Figura 32 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 70°C por 30 minutos.

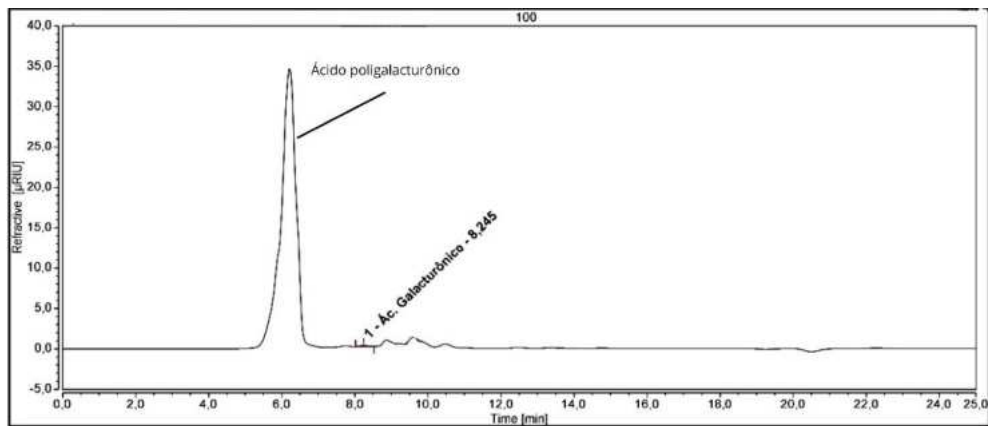


Figura 33 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 100°C por 60 minutos.

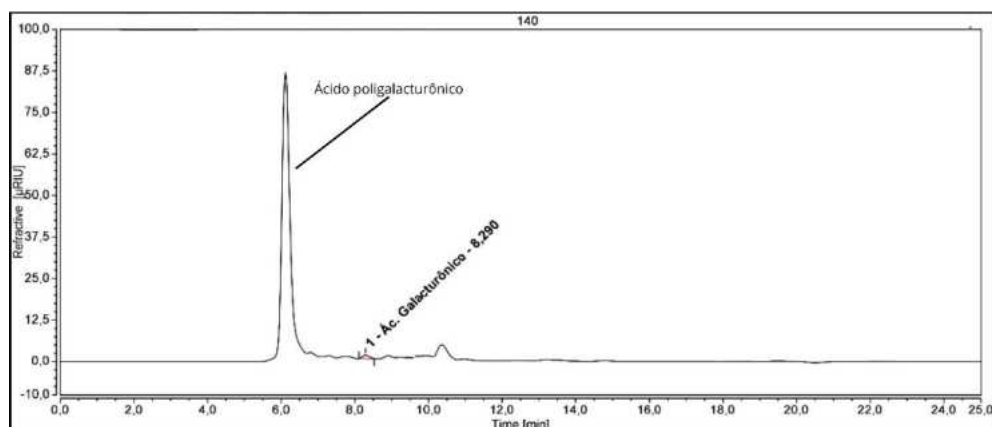


Figura 34 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 140°C por 60 minutos.

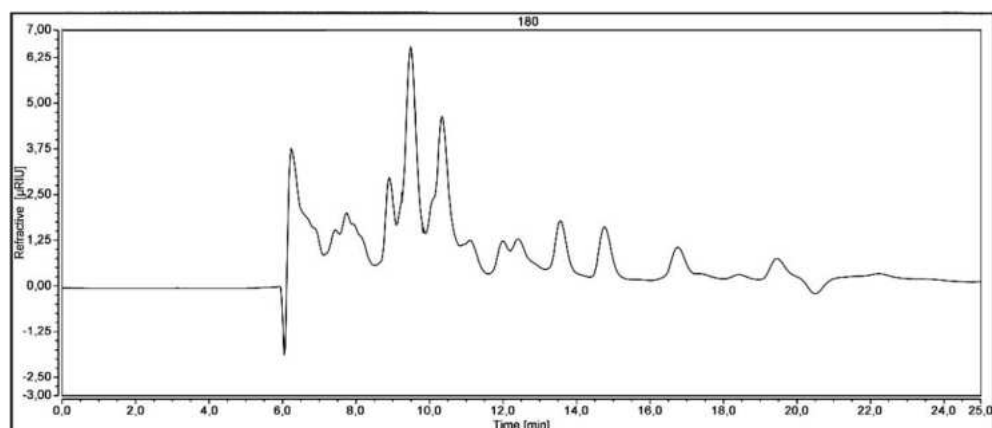


Figura 35 - Cromatograma de identificação de ácido poligalacturônico na fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico a 180°C por 60 minutos.

Observa-se que nos cromatogramas obtidos foi possível identificar a possível presença de ácido poligalacturônico nas frações líquidas. Esta identificação pôde ser feita por conta do perfil cromatográfico obtido na caracterização do bagaço de laranja *in natura* que permitiu observar a semelhança entre os tempos de retenção do pico de interesse, e por não haver outros picos que possam interferir e serem referentes a outros polissacarídeos.

O detector utilizado foi índice de refração, que é diretamente proporcional a concentração do analito na amostra. Com isso, observa-se que nas frações líquidas do PTH (pré-tratamento hidrotérmico) de 100°C e 140°C (Figura 33 e Figura 34) foi obtido índice de refração, para o pico relacionado ao ácido poligalacturônico, maior que no bagaço de laranja *in natura*, podendo indicar uma maior concentração deste polissacarídeo nas frações líquidas

resultantes. Na fração líquida do PTH de 70°C (Figura 32) foi obtido índice de refração menor que no bagaço *in natura*. No cromatograma da fração líquida do PTH a 180°C não foi possível identificar a presença de ácido poligalacturônico, mostrando que a degradação dos açúcares pode ter ocorrido devido à alta temperatura.

Como alternativa à determinação de pectina por HPLC, foi realizada a quantificação gravimétrica deste composto. Para poder quantificá-la, alguns estudos na literatura realizaram a extração da pectina, em diferentes biomassas, em aparelho Soxhlet por uma hora a $94^{\circ}\text{C} \pm 5$ utilizando água e ácido (SILVA, B. A. M., 2021)(MARTINI, 2009). Neste trabalho, esta etapa não foi realizada pois a extração foi feita no momento do PTH. A precipitação da pectina ocorre em altas concentrações de etanol no meio, por isso foi adicionado etanol 96% na proporção 2:1 (60,0 mL de etanol em 30,0 mL de amostra) e a mistura foi mantida em repouso por uma hora (Figura 36).



Figura 36 - Precipitação da pectina presente nas frações líquidas do PTH por adição de etanol 96%.

O resultado da precipitação está explicitado na Figura 37. Primeiramente, é possível observar a formação de gel nas frações líquidas do PTH de 70°C e 100°C, enquanto no de 140°C formou-se um precipitado não agrupado, indicando mudanças na estrutura da pectina precipitada. Não foi observado precipitado na fração líquida do PTH de 180°C, corroborando com o resultado encontrado no cromatograma (Figura 35), onde não teve indicativo da presença de pectina no meio.

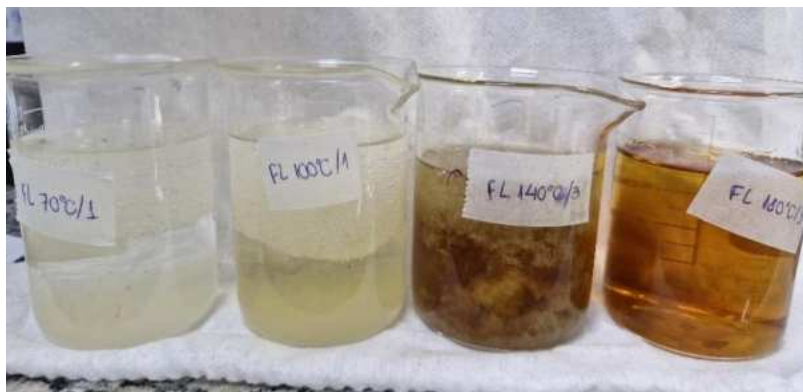


Figura 37 - Precipitação da pectina presente nas frações líquidas do PTH com adição de etanol 96% após uma hora de repouso.

Após a filtração em tecido de Nylon, o sólido obtido foi posto para secar em estufa a $50^{\circ}\text{C} \pm 5$ até peso constante. A massa das placas de Petri utilizadas foi determinada antes de adicionar o material a ela. Após a secagem da pectina, sua concentração em cada fração líquida foi calculada e os resultados estão contidos na Tabela 13.

Tabela 13 – Massa (g), concentração (g/L) e recuperação percentual (m/m) de pectina presente nas frações líquidas resultantes do PTH.

Fração Líquida	Massa de pectina (g)	Concentração de pectina (g/L)	Recuperação de pectina % (g/100 g de biomassa seca)
70°C, 30 minutos	$0,0832 \pm 0,0053$	$2,7722 \pm 0,1767$	$8,06 \pm 0,51$
100°C, 60 minutos	$0,2361 \pm 0,0107$	$7,8599 \pm 0,3434$	$22,88 \pm 1,04$
140°C, 60 minutos	$0,1996 \pm 0,0486$	$6,6522 \pm 1,6187$	$19,34 \pm 4,71$
180°C, 60 minutos	$0,0089 \pm 0,0020$	$0,2989 \pm 0,0675$	$0,87 \pm 0,19$

Na Figura 1Figura 38, são mostradas as pectinas extraídas presente em cada fração líquida após o PTH. Observa-se que as pectinas extraídas no PTH a 70°C e 100°C formaram uma película, característica da pectina, mostrando que sua capacidade de gelificação não foi muito afetada com a temperatura utilizada. Já na fração líquida do PTH a 140°C foi observado um pó brilhante amarronzado ao invés de uma suspensão coloidal e formação de película, isto indica que pode ter ocorrido a desesterificação fazendo com que a pectina tenha perdido a capacidade de gelificação.

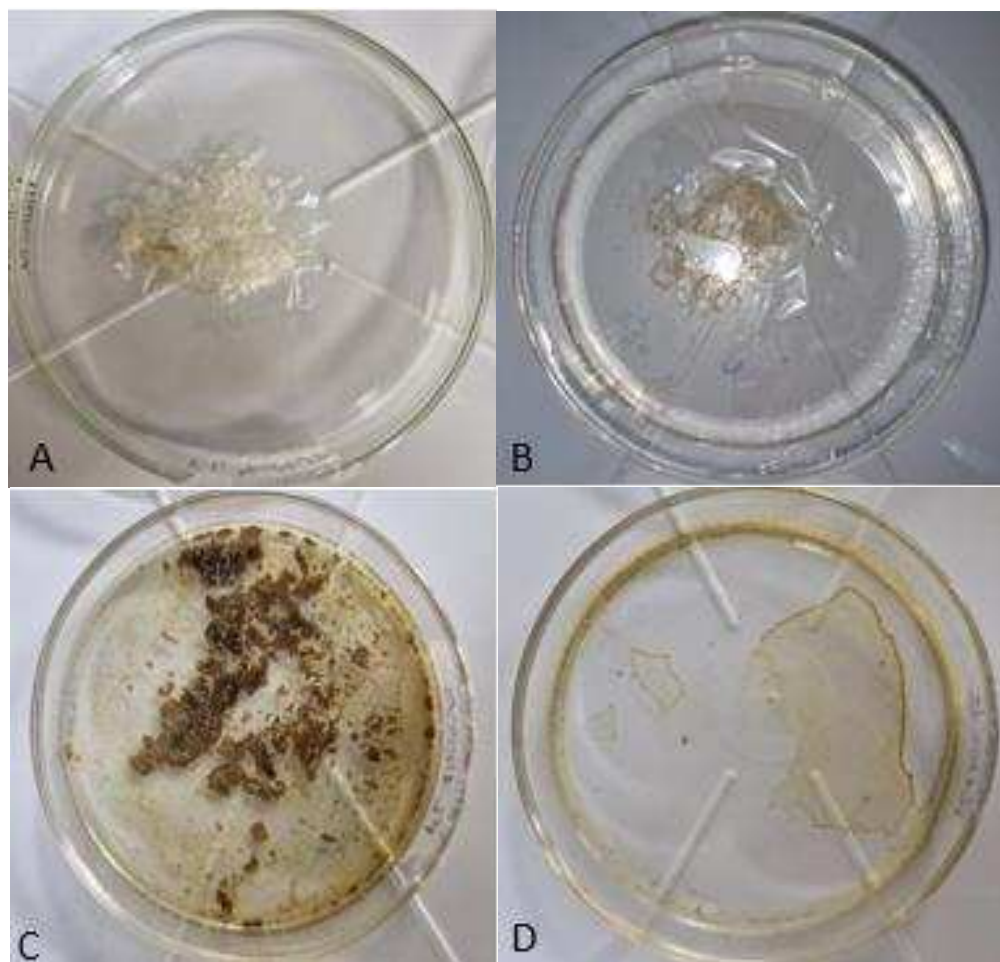


Figura 38 - Pectina extraída e seca em estufa a peso constante de cada fração líquida após o PTH a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D). Autoria própria.

Ao analisar os resultados de recuperação de pectina, observa-se que a melhor condição de PTH, para este objetivo, poderia ser a de 100°C por 60 minutos. Apesar do cromatograma da Figura 34 indicar uma maior concentração de pectina, a recuperação mostrou o mesmo, por conta da temperatura utilizada neste PTH (140°C) ter mudado a estrutura da pectina. Em temperaturas acima de 120°C pode ocorrer a degradação térmica que leva a despolimerização e desesterificação, afetando suas propriedades funcionais de gelificação e solubilidade. Na desesterificação ocorre a perda de grupos metil-éster, diminuindo o teor de metoxil, que impacta diretamente na formação de gel e aumenta sua solubilidade em água. Esta propriedade da pectina é muito explorada na indústria de alimentos para fabricação de geleias e gelatinas, fazendo com que a degradação térmica seja evitada nesses processos (EINHORN-STOLL, KASTNER, *et al.*, 2019). O mesmo pôde ser observado com a recuperação de pectina na fração

do PTH a 180°C, que pode ser referente a sólidos insolúveis da fração líquida que permaneceram mesmo após a filtração antes da quantificação.

Martini (2009) realizou a determinação de pectina de bagaço de laranja *in natura* extraindo com água e ácido precipitando com etanol, e obteve $8,60 \pm 0,41\%$ de recuperação, em percentual de biomassa seca. Campos (2012) realizou a extração de pectina com água, ácido acético e hidróxido de sódio e precipitou a pectina na forma de pectato de cálcio ao adicionar cloreto de cálcio no meio, e obteve um rendimento de 3,23% de pectato, em percentual de biomassa seca. Com base no que foi encontrado na literatura, o PTH a 100°C por 60 minutos demonstrou ser um método mais eficiente que os convencionais para a extração da pectina, já que houve uma recuperação de $22,88 \pm 1,04\%$, em percentual de biomassa seca, sem a possível degradação do composto.

A extração de pectina sem o uso de reagentes químicos apresenta-se como uma alternativa sustentável e alinhada aos princípios da economia verde, promovendo a obtenção de um biopolímero natural com menor impacto ambiental. Essa abordagem valoriza resíduos agroindustriais, como cascas de frutas, ao mesmo tempo em que elimina o risco de contaminação química no produto, ampliando sua segurança para aplicações posteriores. Na pós-colheita, por exemplo, a pectina extraída de forma sustentável desempenha um papel promissor no biocontrole de doenças, funcionando como uma barreira física ou atuando na formulação de biofilmes e revestimentos naturais que prolongam a vida útil dos alimentos e reduzem a necessidade de fungicidas sintéticos (ABDUKERIM, LI, *et al.*, 2024).

5.2.4. Espectros de FTIR das frações líquidas liofilizadas

Para realizar a espectroscopia de infravermelho nas frações líquidas resultantes do PTH foi necessário liofilizar as amostras, pois como elas estavam em fase aquosa, apareceriam apenas bandas intensas relacionadas à água (estiramento de ligações O-H), que não possibilitariam identificar outras bandas referentes aos compostos presentes. Este procedimento auxilia na identificação de grupos funcionais das moléculas presentes na amostra através da vibração das ligações. Os espectros estão dispostos em *overlay* na Figura 39 e na Tabela 14, estão descritas as bandas observadas para cada fração líquida.

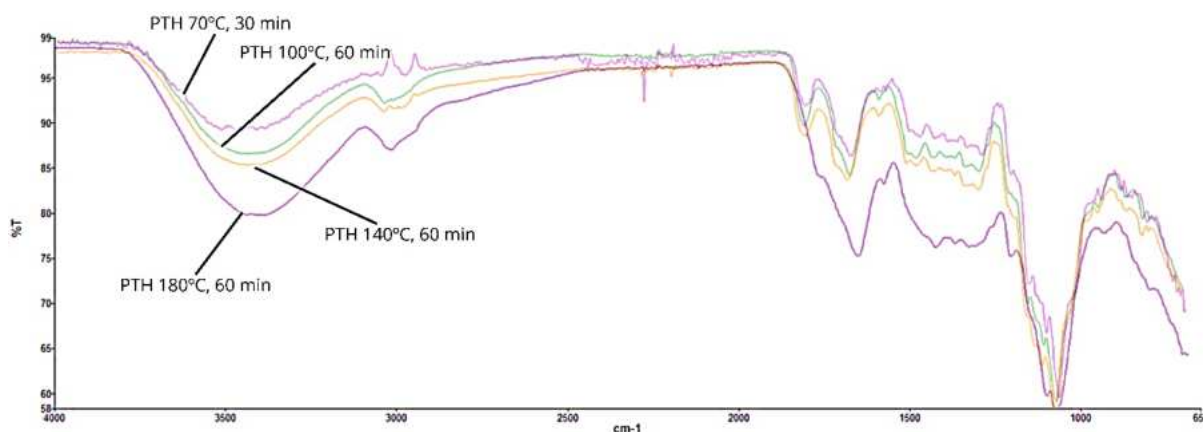


Figura 39 - Espectro de infravermelho das frações líquidas, liofilizadas, resultantes do PTH do bagaço de laranja in natura a 70°C, 100°C, 140°C e 180°C.

Tabela 14 - Bandas obtidas em espectroscopia de infravermelho entre 4000 e 600 cm^{-1} para cada PTH.

Grupos funcionais	Bandas em cada fração líquida (cm^{-1})			
	70°C, 30 min	100°C, 60 minutos	140°C, 60 minutos	180°C, 60 minutos
Estiramento O-H	3298	3331	3332	3282
Estiramento C-H	ND	2922	2919	2918
Estiramento C=O	1734	1734	1729	ND
Estiramento C=C	1604	1605	1607	1590
Vibração CH_2 e CH_3	1232	1233	1231	1369
Vibração C-O-H ou C-O-R	1012	1011	1012	1023

*ND= não detectado

As bandas em 3298, 3331, 3332, e 3282 cm^{-1} são referentes ao estiramento de ligações -O-H presentes em álcoois e componentes da pectina na biomassa. Em 2922, 2919 e 2918 cm^{-1} são observadas bandas correspondentes ao estiramento assimétrico de ligações -C-H presentes em estruturas alifáticas (alcanos), que não foram identificadas no espectro do PTH de 70°C, devido a ruídos na linha de base que podem ser explicados pela heterogeneidade do material liofilizado. As absorvâncias em 1734 e 1729 cm^{-1} fazem parte da região característica do estiramento de ligações -C=O em aldeídos, que foi observada de forma muito fraca no espectro do PTH de 180°C, ao ponto de não ser identificada, devido à intensa banda à direita. Os picos em 1604, 1605, 1607 e 1590 cm^{-1} são referentes ao estiramento de ligações -C=C de alcenos e compostos aromáticos. Foram identificadas bandas em 1232, 1233, 1231 e 1369 cm^{-1} correspondentes às vibrações e deformação, no plano, de ligações - CH_2 e - CH_3 presentes em

cadeias alifáticas que formam a estrutura básica de biomassas celulósicas. Bandas em 1012, 1011, 1012 e 1026 cm^{-1} são características da vibração de ligações $-\text{C}-\text{O}-\text{H}$ ou $-\text{C}-\text{O}-\text{R}$ em álcoois e ésteres (presente na pectina).

Além dos espectros de FTIR obtidos serem semelhantes entre si, também estão de acordo com o encontrado na literatura para bagaço de laranja *in natura*, o qual apresentou as mesmas bandas características de alguns grupos funcionais, explicitado na Figura 40 (SÁNCHEZ OROZCO, BALDERAS HERNÁNDEZ, *et al.*, 2014), indicando que biomassas lignocelulósicas possuem perfil de grupos funcionais parecidos ao encontrado no presente trabalho.

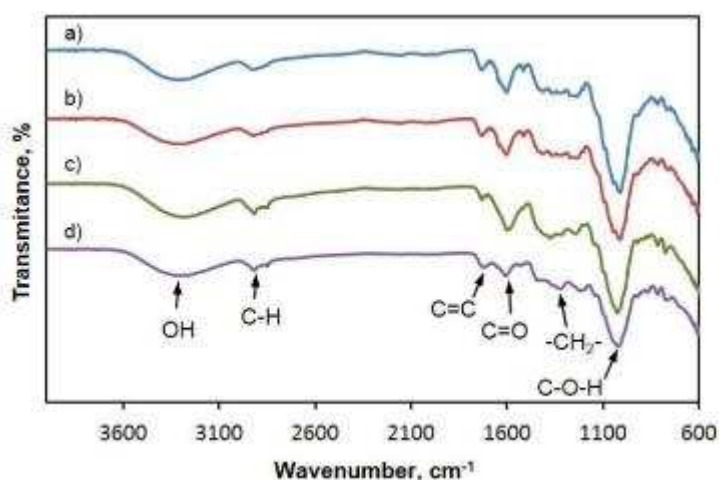


Figura 40 - Espectro de FTIR do bagaço de laranja *in natura* (a), casca de laranja (b), casca de banana (c) e casca de manga (d) (SÁNCHEZ OROZCO, BALDERAS HERNÁNDEZ, *et al.*, 2014).

5.2.5. Espectros de varredura na faixa do UV-Vis

A técnica de espectroscopia na região do UV-Vis envolve a absorção de luz na região, do espectro eletromagnético, do ultravioleta e luz visível. Diferentes compostos possuem absorção única no espectro, e podem ser identificados com esta ferramenta analítica, que é muito utilizada para quantificação e identificação de compostos orgânicos que contenham sistemas conjugados ou complexos metálicos (ATKINS, 2008).

As amostras precisaram ser diluídas para que a absorbância máxima de cada permanesse abaixo de 1,0. As frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C foram diluídas 20x,

a do PTH a 140°C foi diluída 50x e a de 180°C foi diluída 150x. Observa-se que houve picos de absorvância entre 260 e 300 nm (Figura 41), uma região característica de diversos compostos fenólicos, como os flavonoides (hesperinida, naringina), que possuem absorvância máxima em 283 nm (KUNTIC, PEJIC, *et al.*, 2012), e ácidos fenólicos, como ácido ferúlico e ácido p-cumárico, com absorvância em 287 nm e 286 nm, respectivamente (HOLSER, 2012). Ácidos amino aromáticos, reportados presentes no bagaço da laranja, também possuem absorvância máxima na mesma região, como a tirosina (275 nm), triptofano (280 nm) e fenilalanina (258 nm) (HAZRA, SAMANTA, *et al.*, 2014).

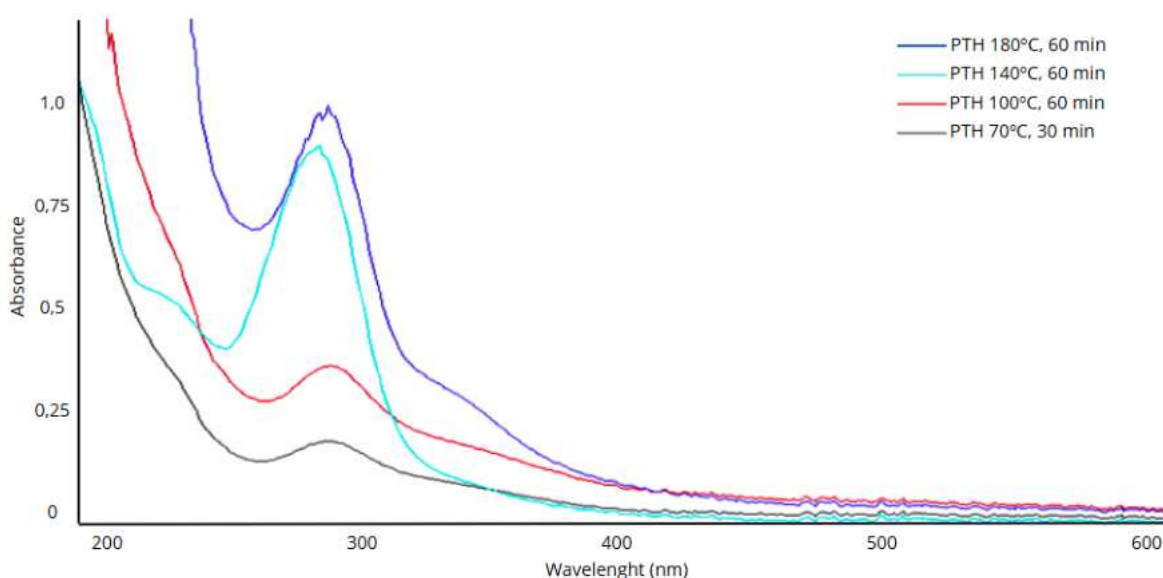


Figura 41 - Espectro de varredura na faixa do UV-Vis (200 - 600 nm) das frações líquidas diluídas obtidas nos PTH de 70°C, 100°C, 140°C e 180°C.

Além disso, outros compostos como hidroximetilfurfural e furfural também possuem absorvância máxima em 277 nm e 284 nm, respectivamente. Quando eles estão presentes na mesma solução, suas absorvâncias individuais se juntam em um único pico com máxima absorvância entre 277 e 284 nm. Porém, foi reportado que apenas cerca de 70% do pico de absorvância corresponde aos furanos (CHI, ZHANG, *et al.*, 2009).

Martini (2009) obteve um perfil espectroscópico de UV-Vis semelhante para uma solução alcoólica da fração líquida obtida na pirólise de bagaço de laranja peletizado, com uma única absorvância em 275 nm. E considerou a presença de furfurais, e ácidos voláteis, cetonas e cresóis.

Por ser uma matriz complexa, com vários interferentes presentes como os compostos fenólicos, ácidos orgânicos citados e lignina, cuja absorvância máxima é em 280 nm, para quantificar estes compostos separadamente por espectroscopia de UV-Vis é necessário aplicar técnicas de separação e *dual-wavelength*, (CHI, ZHANG, *et al.*, 2009). Entretanto, a alta absorvância obtida para as frações líquidas dos PTHs a 140°C e 180°C indica a possível formação destes produtos de degradação em grande quantidade, já que foi necessário realizar diluições maiores.

5.2.6. Quantificação de produtos de degradação

O pré-tratamento utilizando água em altas temperaturas, como autohidrólise e explosão a vapor, é utilizado para solubilizar cadeias de hemicelulose em seus açúcares monoméricos e oligômeros, que podem ser utilizados para fermentação e obtenção de produtos como biocombustíveis. Em temperaturas altas e condições ácidas, são formados produtos de degradação de açúcares como o furfural, a partir de pentoses, e HMF, a partir de hexoses. Como eles são formados a partir de carboidratos, eles interferem nas análises de açúcares de qualquer biomassa lignocelulósica. A quantificação destes compostos é importante para a otimização das condições de pré-tratamento e diminuir a formação destes produtos de degradação (CHI, ZHANG, *et al.*, 2009).

A quantificação de HMF e furfural foi realizada por HPLC e os resultados estão descritos na Tabela 15. Observa-se que quanto maior a temperatura de PTH utilizada, maior a formação dos produtos de degradação e que houve uma maior produção de furfural do que HMF. Isto se deve à alta solubilização da hemicelulose que está presente na fração líquida, onde os principais açúcares presentes na cadeia são pentoses que dão origem ao furfural.

Tabela 15 - Quantificação dos produtos de degradação, HMF e furfural, formados durante o PTH do bagaço de laranja in natura.

Composto	Produtos de degradação nas frações líquidas (mg/L)			
	70 °C, 30 min	100 °C, 60 min	140 °C, 60 min	180 °C, 60 min
HMF	ND	0,55 ± 0,00	11,06 ± 0,10	262,27 ± 2,61
Furfural	1,13 ± 0,00	5,19 ± 0,01	73,03 ± 1,80	673,51 ± 33,07

*ND= não detectado

Lorenzo-Santiago, et al. (2023) estudaram o efeito do tratamento térmico em agave para formação de HMF e furfural em temperaturas de 110°C até 130°C e obteve concentrações de HMF de $39,41 \pm 1,2$ mg/L (110°C) até $127,0 \pm 9,71$ mg/L (130°C) e furfural de $0,17 \pm 10,1$ mg/L (110°C) até $3,07 \pm 0,3$ mg/L (130°C) no agave tratado. Esses resultados não são referentes à fase aquosa obtida no tratamento, e sim no sólido obtido após o processo. A maior produção de HMF obtida por eles indica que a maior parte das hexoses se manteve na parte sólida com uma pequena parte degradada. Também mostraram que quanto maior foi a produção de HMF e furfural, maior a eliminação de açúcares como frutose, xilose e glicose.

Apesar de possuírem utilidade industrial como produção de bioplásticos, desenvolvimento de biocombustíveis, produção de resinas e solventes, serem utilizados como precursores para pesticidas e biopesticidas, o HMF e furfural são reportados na literatura como inibidores de atividade microbiana, e, portanto, afetam na fermentação de açúcares e produção de enzimas.

5.3. Propagação de *Aspergillus awamori*

A propagação do *Aspergillus awamori* foi realizada em placas contendo PDA e a evolução do crescimento foi acompanhada durante 7 dias (Figura 42). Em Naher et al. (2021), foi demonstrado nos primeiros estágios de crescimento que o *A. awamori* possui tonalidade amarelada e após alguns dias apresentou a cor marrom ou verde escuro. O mesmo resultado foi obtido no presente trabalho, mostrando o crescimento saudável do fungo. Também não foi observado o crescimento de outros microrganismos, demonstrando que não houve contaminação durante o preparo das placas.

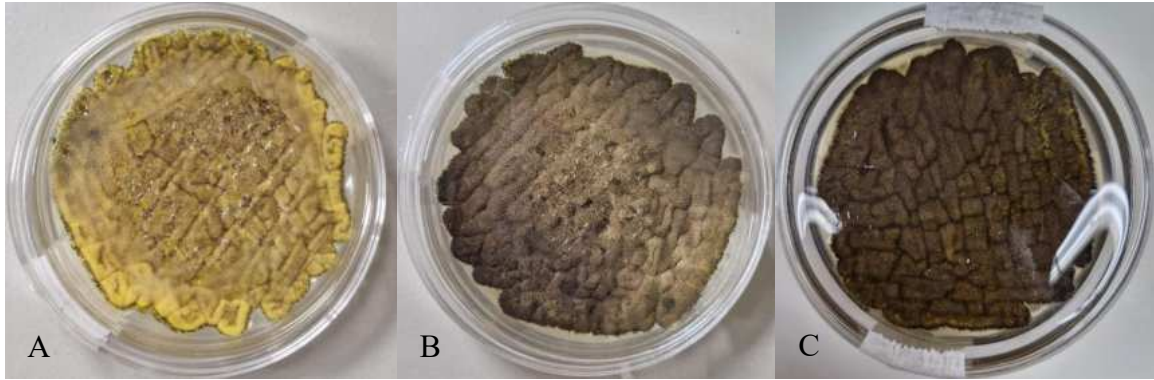


Figura 42 - Evolução do crescimento e formação de esporos do fungo filamentoso *Aspergillus awamori* em placas de PDA em 3 dias (A), 5 dias (B) e 7 dias (C).

Na Figura 43 é possível observar o corpo frutífero do *A. awamori* cultivado. Sua estrutura morfológica consiste em longos conidióforos, onde estão localizados as fialidas com os conídios (esporos), que possuem aspecto circular e são os responsáveis pela reprodução assexuada desta espécie (NAHER, FATIN, *et al.*, 2021).

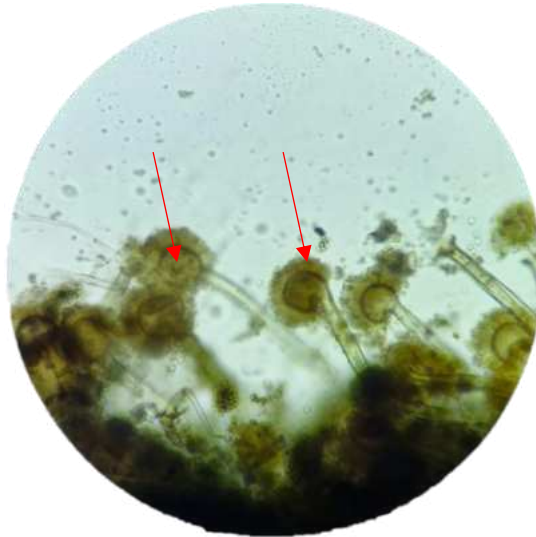


Figura 43 - Microscopia óptica da estrutura morfológica do *Aspergillus awamori* cultivado em PDA, aumento de 400x.

Ao utilizar a câmara de Neubauer, foi obtido um valor de $6,75 \times 10^8$ esporos por mL. A contagem foi realizada a partir de uma diluição de 100x da suspensão de esporos em glicerol. Foi utilizada a região central da câmara para realizar a contagem, onde a área central possui $1,0 \text{ mm}^2$ e profundidade de $0,1 \text{ mm}$, conferindo um volume de $0,1 \text{ mm}^3$. O resultado é calculado pela média da contagem de 5 espaços destacados em vermelho na Figura 44A.

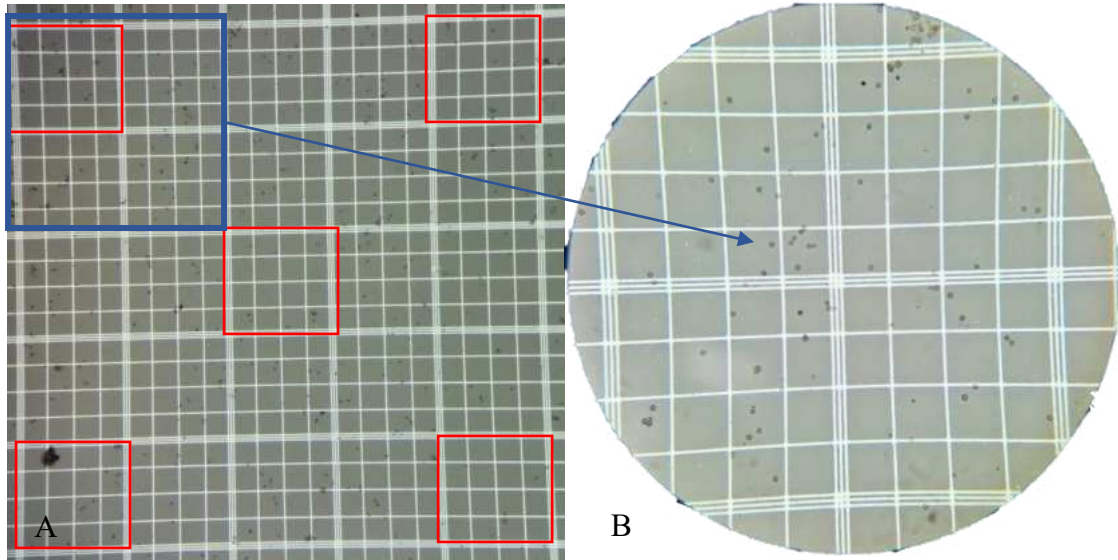


Figura 44 - Contagem em câmara de Neubauer, aumento de 100x (A) e 400x (B).

O processo de contagem de esporos auxilia no preparo do meio de cultivo, já que normalmente é utilizada uma proporção de 1% (v/v) de volume de esporos para volume de meio em um bioprocessamento submerso. O resultado mostra que a manutenção e propagação do fungo foi bem-sucedida, já que foi possível obter bons rendimentos de esporos e identificar a estrutura do corpo frutífero do microrganismo.

5.4. Produção enzimática

A fim de avaliar a indução de produção de enzimas utilizando como fonte de carboidratos as frações líquidas resultantes dos PTHs e o bagaço de laranja *in natura*, foram realizadas a produção de pectinases e xilanases com o *Aspergillus awamori*, como experimento preliminar para selecionar qual PTH melhor responde à produção. A escolha do fungo se baseou em recentes pesquisas realizadas no Laboratório Bioetanol que o utilizam para produção de celulases e amilases em fase submersa utilizando milho extrudado e amido de milho, e, também, em trabalhos publicados na literatura que utilizaram o *A. awamori* para produção de xilanases e pectinases em estado sólido e submerso (DÍAZ, DE ORY, *et al.*, 2012). Na Figura 45 é apresentada uma comparação entre a produção extracelular de pectinases utilizando as frações líquidas e o bagaço de laranja *in natura*, e na Figura 46, a mesma comparação para a produção extracelular de xilanases.

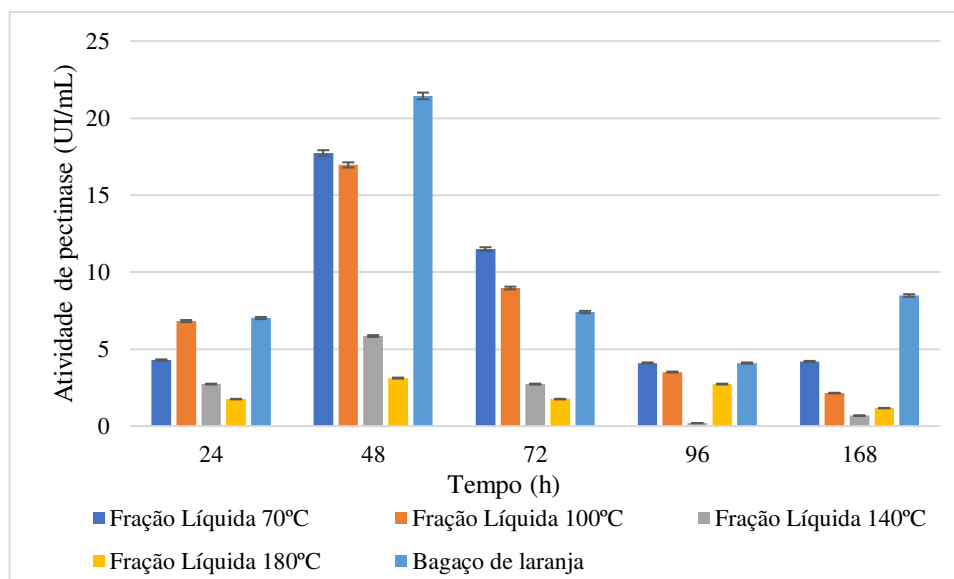


Figura 45 - Atividade de pectinases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus awamori*, utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C, 100°C, 140°C e 180°C e bagaço de laranja *in natura* como fontes de carbono.

Ao analisar os resultados para a produção de pectinases, observa-se que no segundo dia de produção enzimática foi o ponto máximo de produção de pectinases em todos os meios utilizados e que as frações líquidas dos PTH a 70°C e 100°C apresentaram resultados semelhantes ao bagaço de laranja *in natura*. Alguns autores obtiveram o ponto máximo de produção de pectinases no terceiro dia utilizando bagaço de laranja e uva em FS (DÍAZ, DE ORY, *et al.*, 2012), no primeiro dia utilizando apenas bagaço de uva (BOTELLA, DE ORY, *et al.*, 2005) e no quinto dia utilizando pó de casca de laranja pré-tratado com hidróxido de sódio (ADEDEJI, EZEKIEL, 2020).

Observou-se uma baixa produção de pectinases nas frações líquidas dos PTHs a 140°C e 180°C. Na caracterização dessas frações líquidas, foram encontrados teores altos de açúcares redutores, que podem ter origem da hidrólise dos polissacarídeos presentes na biomassa. Foi relatado que a produção de pectinases é induzida na presença de carboidratos complexos e oligômeros. A pectina age como fonte de carbono indutora, ativando as vias metabólicas do fungo necessárias para a produção de enzimas (PRAVEEN KUMAR DASARI, 2020). Além disso, os teores de HMF e furfural encontrados podem ter influenciado na atividade do *A. awamori*. Um estudo demonstrou os efeitos de diferentes concentrações de HMF e furfural na produção de enzimas por *Aspergillus niger*, que confirmou a ação negativa que estes compostos têm no metabolismo celular e rendimentos de produção de microrganismos. Baseado nos

resultados que tiveram, a produção de enzimas foi inibida na presença destes produtos, com o furfural apresentando maior capacidade inibitória que o HMF, pois ao serem utilizados na mesma concentração o furfural apresentou coeficiente de inibição igual 69,076% e o HMF apresentou um coeficiente igual a 32,413% (GÜRLER, COBAN, *et al.*, 2023). Acrescentando a isso, a presença de compostos fenólicos também pode influenciar na produção de enzimas. Zopelário (2024) demonstrou em seu estudo o efeito dos compostos fenólicos presentes na semente de açaí, que ao serem removidos houve um aumento de 180% na produção de mananases por *Aspergillus niger* 1234.

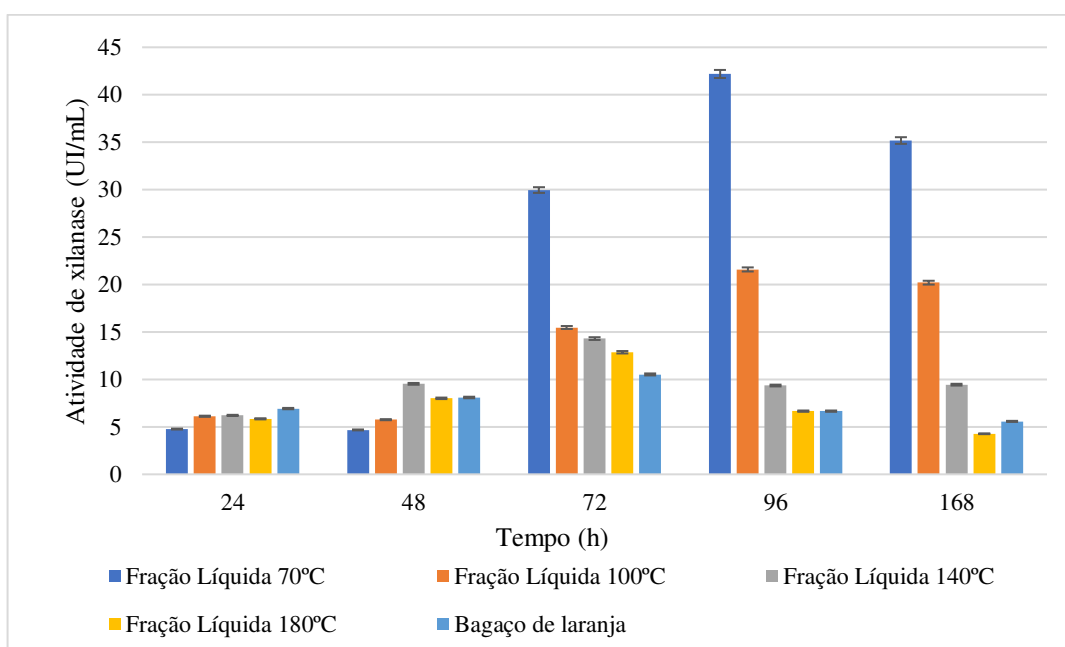


Figura 46 - Atividade de xilanases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus awamori*, utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C, 100°C, 140°C e 180°C e bagaço de laranja *in natura* como fontes de carbono.

Os resultados observados para a produção de xilanases indicam que o ponto de maior produção ocorreu no quarto dia, e, novamente, as frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C apresentaram os melhores resultados. Em seu trabalho, Siedenberg, *et al.* (1998) encontrou ponto máximo de atividade no quarto dia e Díaz, *et al.* (2012) obteve maior atividade de xilanases no quinto dia de produção.

A produção de xilanases utilizando as frações líquidas do PTH a 140°C e 180°C também pode ter sido afetada pela presença de HMF e furfural no meio. Com isso, para realizar a comparação estatística de produção enzimática, foram escolhidas as frações líquidas do PTH a

70°C e 100°C, e o bagaço de laranja *in natura*. Os resultados da produção enzimática utilizando estas fontes de carbono estão na Figura 47 e na Figura 48.

Para estas produções foi realizada ANOVA em dois fatores seguida do teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação estatística entre as atividades enzimáticas encontradas utilizando diferentes fontes de carbono, a fim de afirmar ou não se os resultados são significativamente diferentes entre si.

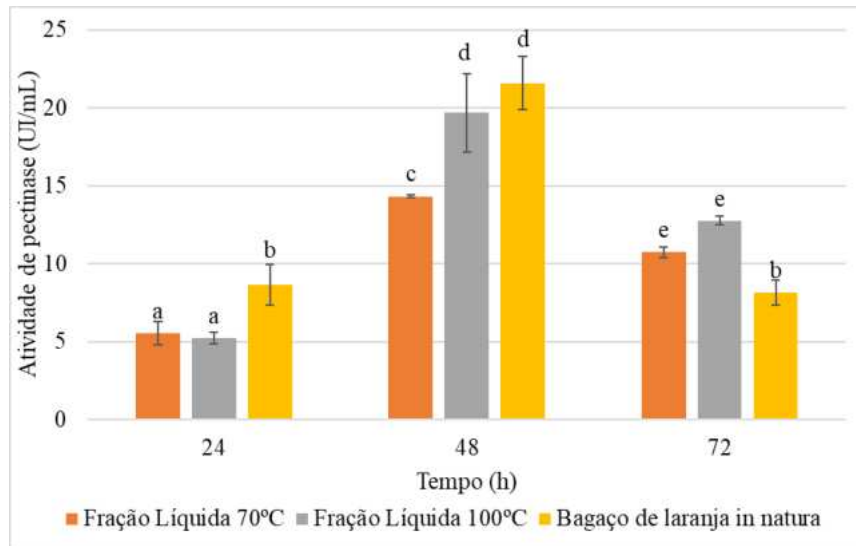


Figura 47 - Atividade de pectinases em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus awamori*, utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C e bagaço de laranja *in natura* como fontes de carbono. Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

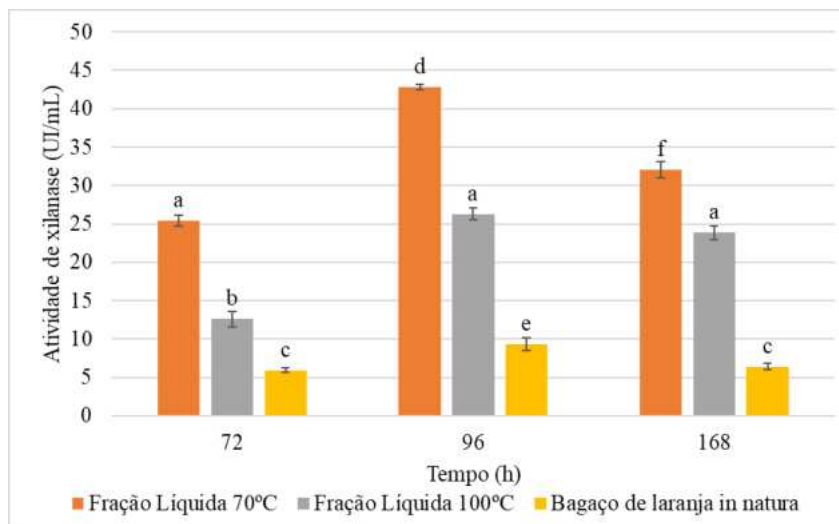


Figura 48 - Atividade de xilanasas em UI/mL produzidas a partir do *Aspergillus awamori*, utilizando as frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C e bagaço de laranja *in natura* como fontes de carbono. Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Pelo perfil apresentado na Figura 47, a produção de pectinases é eficiente até o segundo dia, pois o terceiro dia apresentou resultados de atividade estatisticamente menor. Isto é de grande vantagem para aplicação industrial devido à efetividade do tempo e custo. A fração líquida do PTH a 100°C apresentou pico de atividade de pectinase de $19,69 \pm 2,51$ UI/mL, enquanto ao utilizar o bagaço de laranja *in natura* foi obtida atividade de pectinase de $21,57 \pm 1,71$ UI/mL, que pelo teste Tukey ($p < 0,05$) não diferem entre si significativamente.

A produção na fração líquida pode não ter sido mais alta do que utilizando o bagaço de laranja *in natura* devido à quantidade de pectina presente no meio. A 100°C foi extraída uma quantidade de $22,88 \pm 1,04$ % (m/m), enquanto no bagaço de laranja há cerca de 51% (m/m) de pectina. Apesar do PTH possuir o objetivo de tornar os carboidratos mais acessíveis para ação microbiana, parte da pectina permaneceu na fração sólida, referente a parte não solúvel deste composto que corresponde a cerca de 60% do total (FREITAS, COIMBRA, *et al.*, 2021). A reação entre a concentração de pectina e a produção de pectinase é influenciada pelos mecanismos metabólicos e regulatórios do microrganismo. Estudos mostram que a produção de pectinase aumenta com concentrações mais elevadas de pectina, uma vez que ela atua como indutor (EL ENSHASY, ELSAYED, *et al.*, 2018). Isto pode ser observado pela atividade obtida para a fração líquida do PTH a 70°C que apresentou atividade máxima igual a $14,32 \pm 0,09$ UI/mL, significativamente menor que a atividade na fração líquida do PTH de 100°C. No

entanto, concentrações excessivas de pectina podem levar a efeitos inibitórios, provavelmente devido à elevada viscosidade ou excesso de substrato, o que dificulta a transferência de oxigênio e nutrientes em FS (TEIXEIRA, M. F. S., LIMA FILHO, et al., 2000).

Parâmetros como pH, temperatura e tempo de produção foram escolhidos baseados nos estudos de Praveen (2020), o qual observou que valores maiores de atividade enzimática de pectinases em FS foram obtidos em pH 5,0, temperatura a 30°C e em 72h de produção. Para manter o pH, foi utilizado tampão acetato 0,1 M em pH 5,0.

Ao avaliar dados de produção e atividade das pectinases publicados na literatura, aqueles que utilizaram fungos do gênero *Aspergillus* foram compilados na Tabela 16. Foram encontradas diversas metodologias de produção enzimática, incluindo a técnica de dosagem de atividade. Além disso, diferentes fontes de carbono, valores de pH, composição de micronutrientes, tempos de produção e modo de condução variam conforme o objetivo do estudo. Porém, apesar das divergências observadas, ao considerar apenas os resultados, pode-se afirmar que os valores obtidos no presente trabalho estão dentro da variação dos dados contidos na literatura. Principalmente ao comparar os resultados obtidos por Anuradha, et al. (2014) e Adedeji (2019) que utilizaram pectina cítrica e casca de laranja como fonte de carbono com diferentes cepas de *Aspergillus awamori* e obtiveram resultados próximos entre si e ao presente trabalho.

Tabela 16 - Comparação da atividade enzimática de pectinases, em UI/mL, por fungos do gênero *Aspergillus*, com fontes de carbono e pH diferentes.

Microorganismo	Fonte de carbono	pH	Atividade enzimática (UI/mL)	Fonte
<i>Aspergillus terreus</i> FP6	Limão doce	6,0	92,00	Mukhopadhyay, 2024
<i>Aspergillus niger</i> LFP-1	Pectina citrus	4,5	7,41 ± 0,24	Mat Jalil, 2023
<i>Aspergillus niger</i> FSDE16	Maracujá	5,0	17,20 ± 3,02	Patrício, 2024
<i>Aspergillus awamori</i> CICC 2040	Casca de laranja	4,0	25,17 ± 0,03	Adedeji, 2019
<i>Aspergillus awamori</i> MTCC 9166	Pectina ctirus	5,5	17,60	Anuradha, 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Pectina citrus	5,0	3,52	Okonji, 2019

A determinação da atividade de xilanases permite observar a disponibilidade de carboidratos provenientes da solubilização da hemicelulose durante o PTH, que possui variedades de arabinanas em sua composição. Na caracterização do bagaço de laranja *in natura*, foi observado que o maior componente da hemicelulose presente é a arabinana (Tabela 8) com possíveis ramificações de xilana e galactana, porém não se tinha disponível os substratos para

dosagem de arabinofuranosidases, o p-nitrofenil- α -arabinofuranosídeo (pNP-Ara) ou p-nitrofenil- β -L-arabinofuranosídeo (pNP- β -Ara) (ZHENG, LIU, *et al.*, 2018). Como alternativa, foi determinada a atividade de xilanases, processo rotineiro no Laboratório Bioetanol da UFRJ.

Observa-se que as atividades de xilanases obtidas para os PTHs a 70°C e 100°C, $48,78 \pm 0,36$ UI/mL e $26,28 \pm 0,77$ UI/mL, respectivamente, foram significativamente maiores que a atividade obtida utilizando bagaço de laranja *in natura* como fonte de carbono, $9,28 \pm 0,83$ UI/mL. Isto indica que o PTH foi efetivo para a remoção da hemicelulose da biomassa e a hidrólise de seus polissacarídeos em oligômeros, facilitando o acesso do microrganismo a estes compostos e levando ao aumento da atividade enzimática.

Pelo perfil apresentado, a produção de xilanases se torna eficiente no quarto dia, após o pico de produção de pectinases. Isto pode ser explicado pela composição da parede celular vegetal de biomassas ricas em pectina. Como citado anteriormente, a pectina age como conexão entre as camadas da parede celular, envolvendo a hemicelulose e a celulose. Pode-se apontar que o *A. awamori* age primeiramente nas cadeias de pectina que estão localizadas na lamela média da parede celular, para assim romper a estrutura e tornar os polissacarídeos da hemicelulose mais disponíveis. Entende-se que as cadeias de xilana se tornam mais acessíveis após a ruptura da pectina por ação enzimática, assim o ponto máximo de produção de xilanases ocorreria após a produção de pectinases, também nos hidrolisados pois a cadeia de pectina contém oligômeros de xilose.

Em seu trabalho, Botella, et al. (2005) também realizaram a produção simultânea de pectinases e xilanases em fermentação em estado sólido, e observaram que o pico de produção de xilanases ocorreu cerca de 12 horas depois do pico de produção de pectinases. Microrganismos, como fungos, priorizam a quebra da pectina para acessar os componentes da parede celular mais efetivamente. Seus sistemas regulatórios reconhecem a presença da pectina e isto induz a produção de pectinases antes da produção de xilanases (XIAO, ANDERSON, 2013). Ao hidrolisar a pectina, ocorre a liberação de açúcares monoméricos, como ácido galacturônico, galactose, arabinose e xilose, que tornam o ambiente mais propício ao crescimento e à subsequente ação de xilanases e celulases (BENATTI, POLIZELI, 2023).

Um estudo realizado por Paredes, et al. (2015) demonstrou a produção de xilanases por *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 utilizando a fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar a 170°C por 40 minutos. Neste trabalho citado obteve-se atividade de xilanases igual a $12,87 \pm 0,30$ UI/mL em um meio contendo 5,0 g/L de xilana. Eles explicam

que um fator crítico para a baixa atividade encontrada se deve à concentração de furfural (0,8 g/L) presente oriundo da degradação de açúcares durante o pré-tratamento. Também relatam que o *A. awamori* metaboliza este inibidor e o utiliza como fonte de carbono para crescimento ao invés da xilana, resultando em pouco crescimento celular e baixa produção enzimática. No presente trabalho, resultados próximos a este foram encontrados ao utilizar as frações líquidas dos PTHs do bagaço de laranja *in natura* a 140°C e 180°C, nos estudos preliminares, onde nestas fontes de carbono foram encontradas atividades de 14,30 UI/mL e 12,86 UI/mL de xilanases, e $73,03 \pm 1,80$ mg/L e $673,51 \pm 33,07$ mg/L de furfural, respectivamente. As concentrações mais altas de xilanases encontradas para as frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C, mesmo em menores concentrações de xilana, pode ser devido à presença de apenas 1,13 mg/L e 5,19 mg/L de furfural no meio, levando à possível baixa atividade inibitória deste composto.

Ademais, foi observada a formação de *pellets* nos meios contendo as frações líquidas de 70°C, 100°C, 140°C e 180°C (Figura 49), o que não ocorreu no meio contendo o bagaço de laranja *in natura* (Figura 50) no qual o *A. awamori* cresceu em sua forma filamentosa e se dispersou no meio. Formados em bioprocessos submersos, os *pellets* são massas esféricas de aglomerados de hifas que podem variar de tamanho de acordo com fatores ambientais, como velocidade de agitação, pH, disponibilidade de micronutrientes e concentração de esporos (ZHOU, DU, *et al.*, 2000). Alguns benefícios da formação de *pellets* foram reportados na literatura, como a eliminação da formação micelial dos fungos, aumento no fator de aeração, diminuição da viscosidade do meio facilitando a transferência de massa e mais facilidade na separação da massa celular do meio (ZHOU, DU, *et al.*, 2000). Na Tabela 17, estão descritos os tamanhos dos *pellets* formados nos diferentes meios de cultura.

Tabela 17 - Tamanho dos pellets de *A. awamori* em cada fração líquida.

Fração Líquida, PTH	Tamanho dos pellets (mm)
70°C, 30 minutos	1,0
100°C, 60 minutos	2,5
140°C, 60 minutos	5,5
180°C, 60 minutos	4,5

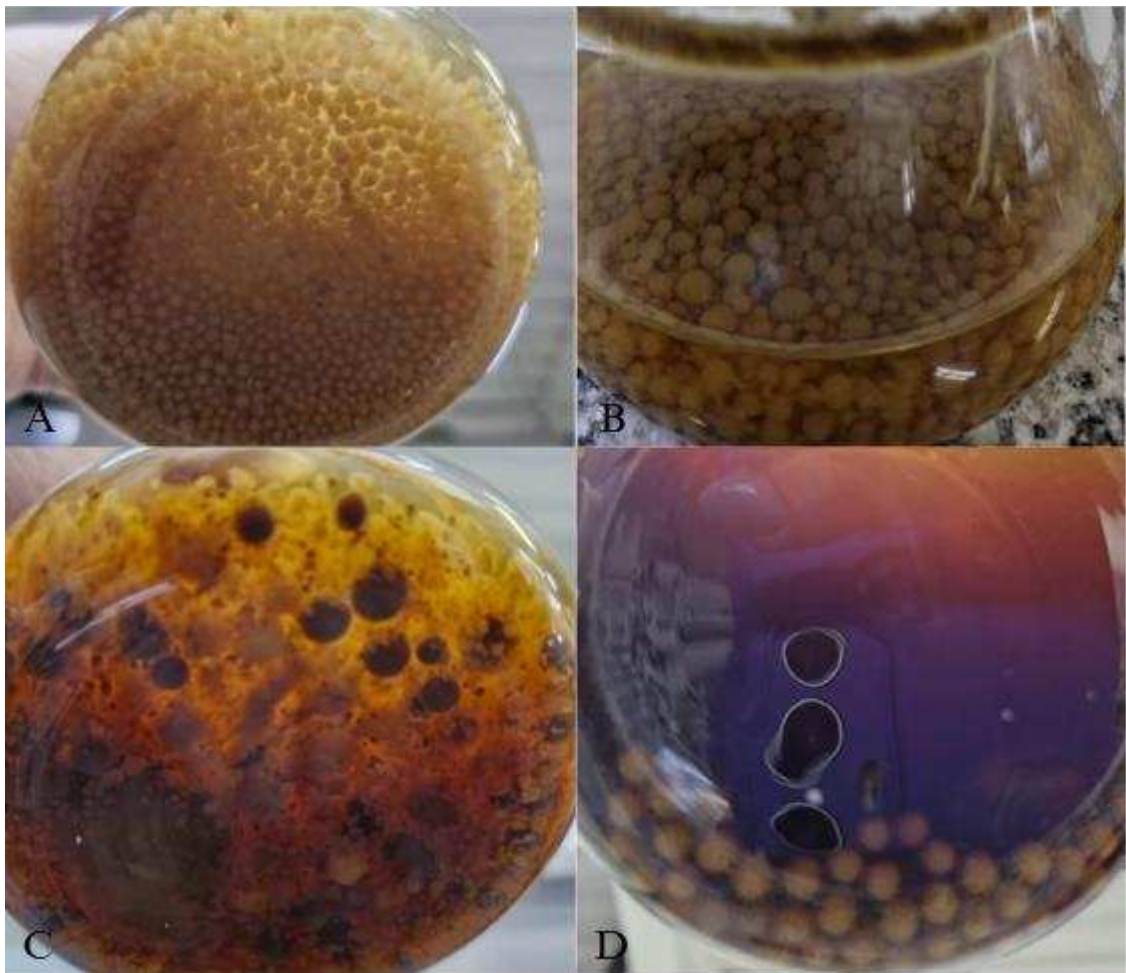
Figura 49 - Formação de pellets de *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 em inóculos com a fração líquida do PTH a 70°C (A), 100°C (B), 140°C (C) e 180°C (D) como fonte de carbono.



Figura 50 - Morfologia do *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 em inóculo contendo o bagaço de laranja *in natura*.

Foi reportado na literatura o efeito de parâmetros como pH, velocidade de agitação, temperatura e concentração de esporos na formação de pellets durante a produção de pectinases por *Aspergillus awamori* MTCC 9166. Neste estudo foram obtidos tamanhos de *pellets* variando de 0,5 mm até 1,8 mm, com o melhor resultado sendo encontrado ao utilizar pH 5,5, temperatura de 28°C, agitação de 200 rpm e 10^6 esporos por mL, no qual os *pellets* apresentaram tamanho de 0,9 mm. Tamanhos maiores, próximos de 1,8 mm, causaram uma diminuição da produção enzimática (ANURADHA, NAGA PADMA, *et al.*, 2014), levando Anuradha, *et al.* (2014) a concluir que a formação de pellets menores foi benéfica para uma boa produção de pectinases.

Nair, *et al.* (2018) relataram que a formação de *pellets* de *Neurospora intermedia* em meios contendo baixas concentrações de inibidores, como ácido acético, HMF e furfural resultante do pré-tratamento ácido de farelo de trigo, resultou em um aumento de 45% na produção de etanol ao comparar com a forma filamentosa do fungo. Eles explicaram que a baixa viscosidade do meio, devido à formação de pellets pequenos, aumentou a tolerância aos inibidores.

Apesar das vantagens citadas na formação de *pellets* durante a fermentação, tamanhos maiores podem levar à densa acumulação de hifas no centro das esferas, levando a uma lenta difusão do oxigênio, o que pode acarretar na lise celular e à perda da estrutura interior dos *pellets*. Isto pode afetar seu formato, que deixa de ser uniforme, e diminuir as taxas de crescimento, que leva a uma redução da formação do produto associado ao crescimento celular (MEYER, CAIRNS, *et al.*, 2021).

Esta discussão está de acordo com o encontrado neste trabalho, onde os menores tamanhos de *pellets* foram obtidos nos meios contendo as frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C, e neles foram encontradas as maiores concentrações de pectinases e xilanases. Já nos meios contendo as frações líquidas dos PTHs a 140°C e 180°C foram observados menos *pellets* e de tamanhos maiores, e conseqüentemente menores concentrações de atividade enzimática.

Então, ao considerar os resultados experimentais obtidos neste trabalho e aos dados encontrados na literatura, aponta-se que o bagaço de laranja *in natura* pode ser uma boa fonte para produção de pectinases, e que os PTH realizados tiveram grande efeito na estrutura do coproduto utilizado, levando a uma boa recuperação de pectina e mantendo as propriedades dos compostos presentes na biomassa. Também pode-se dizer que a presença de HMF e furfural afetaram a produção enzimática, e não afetou de forma significativa quando em baixas concentrações e negativamente quando em altas. Portanto, este estudo funciona como uma iniciativa em pesquisas mais avançadas para comprovar as hipóteses citadas e otimizar o processo de pré-tratamento e produção de enzimas.

6. CONCLUSÃO

As frações líquidas dos PTHs a 70°C e 100°C se mostraram promissoras, como fonte de carbono, para a produção de pectinases e xilanases por *Aspergillus awamori*. Uma vez que a baixa formação de HMF e furfural nestas correntes não afetou negativamente na atividade microbiana, na qual foram encontradas atividade de pectinase de $19,69 \pm 2,51$ UI/mL na fração líquida do PTH a 100°C (sem diferença significativa ao comparar com o bagaço de laranja *in natura*) e de xilanase de $48,78 \pm 0,36$ UI/mL na fração líquida do PTH a 70°C (com diferença significativa em comparação com o bagaço de laranja *in natura*). Já nas frações líquidas dos PTHs a 140°C e 180°C, onde foram encontradas maiores concentrações dos produtos de degradação, foram obtidas concentrações de atividade enzimática mais baixas, indicando a ação inibitória destes compostos. Além disso, o PTH se mostrou eficiente na extração de pectina do bagaço de laranja *in natura*, o qual foi recuperado 166% a mais do que o reportado na literatura. Portanto, os resultados obtidos são promissores, uma vez que a fração do PTH poderia ser utilizado tanto para a extração efetiva da pectina, quanto para produção de pectinases, podendo viabilizar economicamente este processo.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a composição química das frações sólidas provenientes do pré-tratamento hidrotérmico para posterior hidrólise utilizando enzimas comerciais e *Labmade*;
- Otimização do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja in natura, com o objetivo de recuperar açúcares e diminuir a formação de inibidores;
- Otimização da produção enzimática avaliando parâmetros como temperatura, pH, fonte de carbono, nitrogênio, micronutrientes e medição da massa micelial;
- Avaliar a produção de pectinases utilizando as frações líquida e sólida combinadas, como fonte de carbono em fermentação submersa;
- Otimizar a extração da pectina do bagaço de laranja *in natura* utilizando o PTH.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUKERIM, R., LI, L., LI, J.-H., *et al.* "Coating seeds with biocontrol bacteria-loaded sodium alginate/pectin hydrogel enhances the survival of bacteria and control efficacy against soil-borne vegetable diseases", **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 279, p. 135317, nov. 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135317. .

ADEDEJI, O. E., EZEKIEL, O. O. "Chemical composition and physicochemical properties of mango juice extracted using polygalacturonase produced by *Aspergillus awamori* CICC 2040 on pretreated orange peel", **LWT**, v. 132, p. 109891, out. 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109891. .

ADEDEJI, O. E., EZEKIEL, O. O. "Pretreatment of selected peels for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: Purification and application in mango juice extraction", **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100306, set. 2019. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.100306. .

ALMAS TAJ AWAN. **Orange bagasse as biomass for 2G-ethanol production**. . Campinas, [s.n.], 2013.

ANURADHA, K., NAGA PADMA, P., VENKATESHWAR, S., *et al.* "Effect of physical factors on pellet morphology of *Aspergillus awamori* MTCC 9166 and polygalacturonase production", **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 271–274, out. 2014. DOI: 10.1016/j.bcab.2014.07.007. .

ATKINS, P. W. **Shriver & Atkins química inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre, Bookman, 2008.

BALAT, M. "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review", **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, fev. 2011. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.08.013. .

BEG, Q. K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., *et al.* "Microbial xylanases and their industrial applications: a review", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 326–338, 1 ago. 2001. DOI: 10.1007/s002530100704. .

BENATTI, A. L. T., POLIZELI, M. de L. T. de M. "Lignocellulolytic Biocatalysts: The Main Players Involved in Multiple Biotechnological Processes for Biomass Valorization", **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 162, 8 jan. 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11010162. .

BENJAMIN, Y., CHENG, H., GÖRGENS, J. F. "Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis", **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 7–18, nov. 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.067. .

BHAT, M. K. "Cellulases and related enzymes in biotechnology", **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355–383, 2000. .

BON, E., WEBB, C. "Glucoamylase Production and Nitrogen Nutrition in *Aspergillus awamori*", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39/40, 1993. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02919002>.

BORIN, M. de F., SAID, S., FONSECA, M. J. V. "Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular Endopolygalacturonase from *Penicillium frequentans*", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1616–1620, 1 jan. 1996. DOI: 10.1021/jf9506491. .

BOTELLA, C., DE ORY, I., WEBB, C., *et al.* "Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace", **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2–3, p. 100–106, 15 nov. 2005. DOI: 10.1016/j.bej.2005.04.020. .

CAMPOS, R. S. **Extração aquosa de pectina a partir do bagaço da laranja**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso – Fundação Educacional do Município de Assis, Assis, SP, 2012.

CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A., PAZ, I. C. "Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives", **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754–4766, jul. 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.10.097. .

CASTRO, C. **Citrus Semi-annual** . . Brasília, Brazil, [s.n.], 19 jun. 2024.

CHANNE, P. S., SHEWALE, J. G. "Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: Effect of culture conditions", **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 1, p. 111–117, fev. 1995. DOI: 10.1007/BF02816534. .

CHI, C., ZHANG, Z., CHANG, H., *et al.* "Determination of Furfural and Hydroxymethylfurfural Formed From Biomass Under Acidic Conditions", **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 29, n. 4, p. 265–276, 30 nov. 2009. DOI: 10.1080/02773810903096025. .

COLLA, L. M., PRIMAZ, A. L., BENEDETTI, S., *et al.* "Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461–467, abr. 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.01.028. .

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 1993. Tese de doutorado – UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

DA SILVA, A. S., TEIXEIRA, R. S. S., MOUTTA, R. O., *et al.* "Biomass Pretreatments for Ethanol Production, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Dr. Anuj Chandel (Ed.)", **Sugarcane and Woody**, 2013. DOI: 10.5772/1490. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/2965>.

DÁVILA, I., GULLÓN, P., LABIDI, J. "Influence of the heating mechanism during the aqueous processing of vine shoots for the obtaining of hemicellulosic oligosaccharides", **Waste Management**, v. 120, p. 146–155, fev. 2021. DOI: 10.1016/j.wasman.2020.11.014. .

DE SOUSA PAREDES, R., DA ROCHA OLIVIERI DE BARROS, R., INOUE, H., *et al.* "Production of xylanase, α -l-arabinofuranosidase, β -xylosidase, and β -glucosidase by *Aspergillus awamori* using the liquid stream from hot-compressed water treatment of sugarcane bagasse", **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 5, n. 3, p. 299–307, 12 set. 2015. DOI: 10.1007/s13399-015-0159-5. .

DÍAZ, A. B., DE ORY, I., CARO, I., *et al.* "Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace", **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 72–78, jan. 2012. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.12.003. .

DONGRE, P., DOIFODE, C., CHOUDHARY, S., *et al.* "Botanical description, chemical composition, traditional uses and pharmacology of *Citrus sinensis*: An updated review", **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, v. 8, p. 100272, set. 2023. DOI: 10.1016/j.prmcm.2023.100272. .

EINHORN-STOLL, U., KASTNER, H., URBISCH, A., *et al.* "Thermal degradation of citrus pectin in low-moisture environment - Influence of acidic and alkaline pre-treatment", **Food Hydrocolloids**, v. 86, p. 104–115, jan. 2019. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.02.030. .

EL ENSHASY, H. A., ELSAYED, E. A., SUHAIMI, N., *et al.* "Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system", **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 71, 9 dez. 2018. DOI: 10.1186/s12896-018-0481-7. .

ELIODÓRIO, K. P., PENNACCHI, C., DE GÓIS E CUNHA, G. C., *et al.* "Effects of caramelization and Maillard reaction products on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*", **Fungal Biology**, v. 127, n. 12, p. 1534–1543, dez. 2023. DOI: 10.1016/j.funbio.2023.06.009. .

FLAMINI, G., CIONI, P. L., MORELLI, I. "Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen", **Journal of Chromatography A**, v. 998, n. 1–2, p. 229–233, maio 2003. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00641-1. .

FREITAS, C. M. P., COIMBRA, J. S. R., SOUZA, V. G. L., *et al.* "Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review", **Coatings**, v. 11, n. 8, p. 922, 1 ago. 2021. DOI: 10.3390/coatings11080922. .

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., *et al.* "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review", **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, jul. 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088. .

GOLDHAMER, D. A., INTRIGLIOLO, D. S., CASTEL, J. R., *et al.*, "Crop Yield response to Water: FAO Irrigation and Drainage Paper 66". In: PASQUALE STEDUTO, P., THEODORE, C., HSIAO, T. C., *et al.* (Org.), **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 1. ed. Rome, Italy, [s.n.], 2012. v. 49. p. 300–315.

GÜRLER, H. N., COBAN, H. B., TURHAN, I. "Investigation of the inhibitory effects of furfural and hydroxymethylfurfural on the production of *Aspergillus niger* inulinase and modeling of the process", **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 5, p. 4291–4303, 15 abr. 2023. DOI: 10.1007/s13399-022-02440-1. .

HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., *et al.* **Preparation of Samples for Compositional Analysis: Laboratory Analytical Procedure (LAP)** . 2008. NREL. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42620.pdf>.

HAZRA, C., SAMANTA, T., MAHALINGAM, V. "A resonance energy transfer approach for the selective detection of aromatic amino acids", **J. Mater. Chem. C**, v. 2, n. 47, p. 10157–10163, 2014. DOI: 10.1039/C4TC01954G. .

HOLSER, R. A. "Principal Component Analysis of Phenolic Acid Spectra", **ISRN Spectroscopy**, v. 2012, p. 1–5, 18 out. 2012. DOI: 10.5402/2012/493203. .

IBGE. **Produção de Laranja**. 2023. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/laranja/br>.

ILLANES, A., CAUERHFF, A., WILSON, L., *et al.* "Recent trends in biocatalysis engineering", **Bioresour Technol**, v. 115, p. 48–57, 2012. .

IRAM, A., CEKMECELIOGLU, D., DEMIRCI, A. "Optimization of the fermentation parameters to maximize the production of cellulases and xylanases using DDGS as the main feedstock in stirred tank bioreactors", **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 45, p. 102514, out. 2022. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102514. .

IWAKI, A., KAWAI, T., YAMAMOTO, Y., *et al.* "Biomass Conversion Inhibitors Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural Induce Formation of Messenger RNP Granules and Attenuate Translation Activity in *Saccharomyces cerevisiae*", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1661–1667, mar. 2013. DOI: 10.1128/AEM.02797-12. .

KANG, K. E., JEONG, G.-T., SUNWOO, C., *et al.* "Pretreatment of rapeseed straw by soaking in aqueous ammonia", **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1–2, p. 77–84, 15 jan. 2012. DOI: 10.1007/s00449-011-0606-z. .

KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S., *et al.* "Applications of pectinases in the commercial sector: a review", **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215–227, 10 ago. 2001. .

KIRK, T. K., JEFFRIES, T. W., "Roles for Microbial Enzymes in Pulp and Paper Processing". **American Chemical Society**, Washington, DC, [s.n.], 1996. p. 2–14. DOI: 10.1021/bk-1996-0655.ch001.

KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. "Molecular and biotechnological aspects of xylanases", **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, jul. 1999. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x. .

KUMAR, S. "Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement", **Advances in Applied Science Research**, v. 6, p. 114–124, 2015. .

KUMAR, Sandeep, GUPTA, R. B. "Biocrude Production from Switchgrass Using Subcritical Water", **Energy & Fuels**, v. 23, n. 10, p. 5151–5159, 15 out. 2009. DOI: 10.1021/ef900379p. .

KUNTIC, V., PEJIC, N., MICIC, S. "Direct Spectrophotometric Determination of Hesperidin in Pharmaceutical Preparations", **Acta Chimica Slovenica**, v. 59, p. 436–441, 2012. .

LEI, X. G., STAHL, C. H. "Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy", **Journal of Applied Animal Research**, v. 17, p. 97–112, 2000. .

LORENZO-SANTIAGO, M. A., RODRÍGUEZ-CAMPOS, J., RENDÓN-VILLALOBOS, R., *et al.* "Thermal Treatment to Obtain 5-Hydroxymethyl Furfural (5-HMF), Furfural and Phenolic Compounds from Vinasse Waste from Agave", **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1063, 20 jan. 2023. DOI: 10.3390/molecules28031063. .

LOTFY, M. M., SAYED, A. M., ABOULMAGD, A. M., *et al.* "Metabolomic profiling, biological evaluation of *Aspergillus awamori*, the river Nile-derived fungus using epigenetic and OSMAC approaches", **RSC Advances**, v. 11, n. 12, p. 6709–6719, 2021. DOI: 10.1039/D0RA07578G. .

MAIJALA, P., KLEEN, M., WESTIN, C., *et al.* "Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 169–177, 2008. .

MANISH, K., MAHESH, A. R., SOMASHEKHAR, M. "Evaluation of Antitubercular Activity of Methanolic Extract of Citrus Sinensis", **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 2, p. 8, 14 jul. 2013. .

MARANGONI, A. G. **Enzyme Kinetics: A Modern Approach**. 2. ed. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Alejandro-Marangoni/publication/230186489_Enzyme_Kinetics_A_Modern_Approach/links/5ea250db92851c87d1b0f076/Enzyme-Kinetics-A-Modern-Approach.pdf.

MARKET RESEARCH FUTURE. **Global Xylanase Market Overview** . 2023. Market Research Future. Disponível em: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/xylanase-market-27965>.

MARKHAM, K. R. "Techniques of flavonoid identification", **Academic Press**, v. 22, n. 5, p. 113, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80259-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80259-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942283802593>. Acesso em: 19 out. 2024.

MARTINI, P. R. R. **Conversão pirolítica de bagaço residual da indústria de suco de laranja e caracterização química dos produtos**. 2009. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

MAT JALIL, M. T., ZAKARIA, N. A., SALIKIN, N. H., *et al.* "Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation", **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2023. DOI: 10.1186/s43141-023-00510-z. .

MCINTOSH, S., VANCOV, T. "Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw", **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3094–3103, jul. 2011. DOI: 10.1016/j.biombioe.2011.04.018. .

MEYER, V., CAIRNS, T., BARTHEL, L., *et al.* "Understanding and controlling filamentous growth of fungal cell factories: novel tools and opportunities for targeted morphology engineering", **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 8, 23 dez. 2021. DOI: 10.1186/s40694-021-00115-6. .

MILLER, G. L. " Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.", **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959. .

MONFORT, A., BLASCO, A., SANZ, P., *et al.* "Expression of LIP1 and LIP2 genes from *Geotrichum* species in baker's yeast strains and their application to the bread-making process.", **J Agric Food Chem**, v. 47, p. 803–808, 1999. .

MORAES, J. C., CRESTANI, C. E. **Caracterização química do bagaço de laranja. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. São Paulo, [s.n.] , 2018

MORDOR INTELLIGENCE. **Industrial Enzymes Companies (2024 - 2029)**. 2024. Top Companies in Industrial Enzymes Market.

NAHER, L., FATIN, S. N., SHEIKH, M. A. H., *et al.* "Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw", **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 868, 16 out. 2021. DOI: 10.3390/jof7100868. .

NAIR, R. B., OSADOLOR, O. A., RAVULA, V. K., *et al.* "Lignocellulose integration to 1G-ethanol process using filamentous fungi: fermentation prospects of edible strain of *Neurospora intermedia*", **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 49, 17 dez. 2018. DOI: 10.1186/s12896-018-0444-z. .

NEIDLEMAN SL. "Applications of biocatalysis to biotechnology", **Biotechnol Gen Eng**, v. 1, p. 1–38, 1984. .

OKAFOR, N. " Biocatalysis: Immobilized enzymes and immobilized cells.", **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**, n. ISBN978-1-57808-434– 0, p. 398, 2007. .

PEDROLI, D. B., MONTEIRO, A. C., GOMES, E., *et al.* **Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. The Open Biotechnology Journal.** [S.l: s.n.], 2009.

PINEDA-LOZANO, J. E., FONSECA-BUSTOS, V., MARTINEZ-MORENO, A. G., *et al.* "The biological effect of orange (*Citrus sinensis* L.) by-products on metabolic biomarkers: A systematic review", **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 2 nov. 2022. DOI: 10.3389/fsufs.2022.1003144. .

PRAVEEN KUMAR DASARI. "Parametric optimizations for pectinase production by *Aspergillus awamori*", **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 093–098, 30 ago. 2020. DOI: 10.30574/gscbps.2020.12.2.0247. .

QURESHI, M. A., KHARE, A. K., PERVEZ, A. "Enzymes used in dairy industries", **Int J Appl Res**, v. 10, p. 523–527, 2015. .

RATHORE, A. S., MISHRA, S., NIKITA, S., *et al.* "Bioprocess Control: Current Progress and Future Perspectives", **Life**, v. 11, n. 6, p. 557, 13 jun. 2021. DOI: 10.3390/life11060557. .

RESEARCH AND MARKETS. **Enzymes Global Market Report 2024**. fev. 2024. Research and Markets.

RETORE, M., SILVA, L. P., TOLEDO, G. S. P., *et al.* "Efeito da fibra de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos ", **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1232–1240, 2010. .

RIFFALDI, R., LEVI-MINZI, R., CARDELLI, R., *et al.* " Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oilcontaminated soil", **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 170, p. 3–15, 2006. .

RIQUELME, M., MUNRO, C., GOW, N. "The fungal cell wall: Biology, biosynthesis and biotechnology", **The Cell Surface**, v. 6, p. 100037, dez. 2020. DOI: 10.1016/j.tcs.2020.100037. .

RIVAS-CANTU, R. C., JONES, K. D., MILLS, P. L. "A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: technical advances and analysis of engineering challenges", **Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy**, v. 31, n. 4, p. 413–420, 25 abr. 2013. DOI: 10.1177/0734242X13479432. .

ROBINSON, P. K. "Enzymes: principles and biotechnological applications", **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 15 nov. 2015. DOI: 10.1042/BSE0590001. Disponível em: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/doi/10.1042/bse0590001/88345/Enzymes-principles-and-biotechnological>.

SAADATINAVAZ, F., KARIMI, K., DENAYER, J. F. M. "Hydrothermal pretreatment: An efficient process for improvement of biobutanol, biohydrogen, and biogas production from orange waste via a biorefinery approach", **Bioresource Technology**, v. 341, 1 dez. 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125834. .

SAHA, B. C., YOSHIDA, T., COTTA, M. A., *et al.* "Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production", **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 367–372, jan. 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.11.025. .

SÁNCHEZ OROZCO, R., BALDERAS HERNÁNDEZ, P., ROA MORALES, G., *et al.* "Characterization of Lignocellulosic Fruit Waste as an Alternative Feedstock for Bioethanol Production", **BioResources**, v. 9, n. 2, 6 fev. 2014. DOI: 10.15376/biores.9.2.1873-1885. .

SANTOS, R. M. dos, NÄÄS, I. de A., MOLLO NETO, M., *et al.* "An overview on the Brazilian orange juice production chain", **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 218–225, mar. 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000100025. .

SCHMIDT, A. S., THOMSEN, A. B. "Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw", **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p. 139–151, maio 1998. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00164-8. .

SHOHAM, Y., SCHWARTZ, Z., KHASIN, A., *et al.* "Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6", **Biodegradation**, v. 3, n. 2–3, p. 207–218, 1992. DOI: 10.1007/BF00129084. .

SIEDENBERG, D., GERLACH, S. R., SCHÜGERL, K., *et al.* "Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures", **Process Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 429–433, mar. 1998. DOI: 10.1016/S0032-9592(97)00090-3. .

SILVA, B. A. M. **Extração e caracterização de pectina do mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliensis*)**. 2021. Trabalho de conclusão de curso – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2021.

SINGH, R., KUMAR, M., MITTAL, A., *et al.* "Microbial enzymes: industrial progress in 21st century", **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 1 dez. 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8. .

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

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

SUBRAMANIYAN, S., PREMA, P. "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application", **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33–64, 29 jan. 2002. DOI: 10.1080/07388550290789450. .

TEIXEIRA, M. F. S., LIMA FILHO, J. L., DURÁN, N. "Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, out. 2000. DOI: 10.1590/S1517-83822000000400009. .

TEIXEIRA, R. S. S. **Produção, purificação e caracterização química e bioquímica de xilanases de *Aspergillus awamori***. 2010. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

TEIXEIRA, R. S. S., SIQUEIRA, F. G., SOUZA, M. V. de, *et al.* "Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*", **Journal of**

Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 37, n. 10, p. 1041–1051, 15 out. 2010. DOI: 10.1007/s10295-010-0751-4. .

TEYMOURI, F., LAUREANO-PEREZ, L., ALIZADEH, H., *et al.* "Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover", **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 2014–2018, dez. 2005. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.01.016. .

THE BUSINESS RESEARCH COMPANY. **Pectinases Global Market Report 2024**. dez. 2024. The Business Research Company. Disponível em: <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/pectinases-global-market-report>. Acesso em: 21 out. 2024.

TORRES-MAYANGA, P. C., LACHOS-PEREZ, D., MUDHOO, A., *et al.* "Production of biofuel precursors and value-added chemicals from hydrolysates resulting from hydrothermal processing of biomass: A review", **Biomass and Bioenergy**, v. 130, p. 105397, nov. 2019. DOI: 10.1016/j.biombioe.2019.105397. .

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

UMSZA-GUEZ, M. A., DÍAZ, A. B., ORY, I. de, *et al.* "Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1585–1597, dez. 2011. DOI: 10.1590/S1517-83822011000400046. .

VARGA, E., RÉCZEY, K., ZACCHI, G. "Optimization of Steam Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzymatic Digestibility", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 114, n. 1–3, p. 509–524, 2004. DOI: 10.1385/ABAB:114:1-3:509. .

VERMERRIS, W. **Genetic Improvement of Bioenergy Crops**. New York, NY, Springer New York, 2008. v. 1.

VIKARI, L., RANUA, M., KANTELINEN, A., *et al.* "Bleaching with Enzymes", **Proceedings of the 3rd International Conference on Biotechnology**, p. 67–69, 1986. .

VINCKEN, J. P., SCHOLS, H. A., OOMEN, R. J. F. J., *et al.* "If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I: implications for cell wall architecture.", **Plant Physiology**, v. 132, p. 1781–1789, 2003. .

VOLYNETS, B., EIN-MOZAFFARI, F., DAHMAN, Y. "Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing", **Green Processing and Synthesis**, v. 6, n. 1, p. 1–22, 1 fev. 2017. DOI: 10.1515/gps-2016-0017. .

VROMAN, I., TIGHZERT, L. "Biodegradable Polymers", **Materials**, v. 2, p. 307–344, 2009. .

WALL, A. A. J., RABEMANOLONTSOA, H., VENUS, J. "Bioprocessing and Fermentation Technology for Biomass Conversion", **Applied Sciences**, v. 14, n. 1, p. 5, 19 dez. 2023. DOI: 10.3390/app14010005. .

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. Nova York, Marcel Dekker INC., 1994. v. 61. Disponível em: https://api.pageplace.de/preview/DT0400.9781351421881_A35878638/preview-9781351421881_A35878638.pdf.

WILLATS, W. G. T., KNOX, P., MIKKELSEN, J. D. "Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel", **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97–104, 2006. .

WONG, K. K., TAN, L. U., SADDLER, J. N. "Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications", **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 305–317, set. 1988. DOI: 10.1128/mr.52.3.305-317.1988. .

XIAO, C., ANDERSON, C. T. "Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels", **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00067. .

YAN, Z., LI, J., LI, S., *et al.* "Impact of lignin removal on the enzymatic hydrolysis of fermented sweet sorghum bagasse", **Applied Energy**, v. 160, p. 641–647, dez. 2015. DOI: 10.1016/j.apenergy.2015.02.070. .

YUE, P., HU, Y., TIAN, R., *et al.* "Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides: A review", **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126075, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126075. .

Z. CYPRIANO, D., L. DA SILVA, L., M. BOHÓRQUEZ, M. A., *et al.* "Orange Biomass By-products", **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 176–191, 2017. DOI: 10.21577/1984-6835.20170014. .

ZHENG, F., LIU, J., BASIT, A., *et al.* "Insight to Improve α -L-Arabinofuranosidase Productivity in *Pichia pastoris* and Its Application on Corn Stover Degradation", **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 14 dez. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03016. .

ZHOU, Y., DU, J., TSAO, G. T. "Mycelial Pellet Formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1–9, p. 779–790, 2000. DOI: 10.1385/ABAB:84-86:1-9:779. .

ZION MARKET RESEARCH. **Pectinase Market Size, Share, Trends, Growth 2030**. abr. 2023. Zion Market Research. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/report/pectinase-market>.

ZOPELÁRIO, E. S. F. **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***. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.