

BRUNNO MOREIRA SILVA

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASES MICROBIANAS
POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JULHO/2025

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a): Melissa Limoeiro Estrada Gutarra e coorientação de Mateus Gomes de Godoy.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

M838e Moreira Silva, Brunno
ESTUDO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASES MICROBIANAS
POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA / Brunno Moreira Silva. -
Rio de Janeiro, 2025.
63 f.

Orientadora: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra.
Coorientador: Mateus Gomes de Godoy.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2025.

1. Naringinase. 2. fermentação submersa. 3. Alfa-
ramnosidase. 4. beta-glicosidase. 5. Aspergillus
awamori. I. Limoeiro Estrada Gutarra, Melissa ,
orient. II. Gomes de Godoy, Mateus , coorient. III.
Título.

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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): Bruno Moreira Silva

DRE: 118175608

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)

Prof. Érika Cristina Gonçalves Aguiaras

Msc. Thiago Silva de Oliveira

Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: "ESTUDO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASES MICROBIANAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA"

Local: sala de PGII / IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 15 de julho de 2025 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 15 de julho de 2025.

NOTA:

Banca Examinadora:

8,0

Ana Maria M. de Almeida

Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)

8,0

Erika Cristina G. Aguiaras

Prof. Érika Cristina Gonçalves Aguiaras

8,0

Thiago Silva de Oliveira

Msc. Thiago Silva de Oliveira

Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Aluno(a):

Bruno Moreira Silva

Orientador(a)

(e coorientador):

Profa. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra e Prof. Mateus Gomes de Godoy

Coordenadora de

Profa. Marinella Silva Laport

TCC:

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho seria impossível sem o apoio e incentivo de pessoas que foram fundamentais ao longo desta jornada.

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, pela paciência, apoio constante e por sempre acreditarem em mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Melissa Gutarra, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Mateus Godoy, agradeço profundamente pela orientação, pelas valiosas contribuições científicas e pelo comprometimento ao longo de toda a pesquisa. Estendo também minha sincera gratidão à minha coorientadora, Me. Edna Souza, por todo o suporte técnico, atenção e pelas contribuições essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ainda aos demais integrantes do Laboratório de Microbiologia Industrial, pelo ambiente colaborativo, pelas trocas de conhecimento e pelo apoio nas etapas práticas deste estudo.

Aos amigos que fiz ao longo da graduação na UFRJ, meu muito obrigado pela companhia, pelas conversas, pelos momentos de descontração. A caminhada foi mais leve e significativa com vocês ao meu lado.

Aos órgãos de fomento, em especial ao CNPq, pelo incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento científico.

Ao Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por me acolher e por contribuir para minha formação. Foi nesses espaços que descobri minha vocação científica e me formei como um verdadeiro cientista.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui minha mais sincera gratidão.

“A dívida é o princípio da sabedoria.”

(Aristóteles)

RESUMO

BRUNNO MOREIRA SILVA

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASES MICROBIANAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Orientador: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Coorientador: Mateus Gomes de Godoy

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os frutos cítricos contêm flavonoides, como a naringina, responsável pelo sabor amargo juntamente com outros compostos. A hidrólise enzimática da naringina pela naringinase, um complexo enzimático com atividades de α -ramnosidase e β -glicosidase, reduz o amargor e possui aplicações industriais. Essa enzima é produzida por diversos organismos, como plantas, leveduras, fungos e bactérias. Desta forma, este estudo avaliou a produção de naringinase por fermentação submersa (FS), que permite o controle dos parâmetros de cultivo, usando *Aspergillus niger*, *A. awamori* e *A. terreus*, e utilizando a tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) como indutor e fonte de carbono. Os objetivos incluíram: Avaliar a produção de α -ramnosidase e β -glicosidase obtidos na FS em diferentes meios de cultivo utilizando a casca de tangerina Ponkan; Selecionar a cepa fúngica com base nos dados de atividade e na eficiência de hidrólise da naringina pelos extratos enzimáticos brutos; Estudar os efeitos das condições de cultivo na produção da enzima naringinase através da FS; Avaliar a eficiência de hidrólise da naringina pelos extratos enzimáticos produzidos nas melhores condições selecionadas. A quantificação das atividades enzimáticas da naringinase, obtida a partir do extrato bruto, permitiu avaliar sua eficiência na hidrólise da naringina. O processo foi monitorado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e os resultados obtidos possibilitaram a comparação entre as cepas fúngicas analisadas. Com base nos dados, o *A. awamori* foi selecionado para a etapa seguinte do estudo, onde a produção de naringinase em FS foi avaliada considerando variáveis como pH inicial, concentração de inóculo, velocidade de agitação e concentração de casca em dois tempos de cultivo (3 e 7 dias). Os resultados indicaram que a velocidade de agitação foi o fator mais significativo, impactando diretamente a atividade enzimática. A otimização das condições de cultivo permitiu estabelecer que a melhor resposta foi obtida com: pH inicial ajustado para 6, concentração de inóculo de $5,25 \times 10^6$ e/ml, agitação a 200 rpm e concentração de casca de 15 g/L. Nesta configuração, a enzima produzida alcançou uma eficiência de hidrólise de naringina de 88,28%, comprovando potencial biotecnológico da linhagem fúngica estudada.

Palavras-chaves: (Naringinase, *Aspergillus awamori*, fermentação submersa, α -ramnosidase, β -glicosidase, casca de tangerina Ponkan)

ABSTRACT**BRUNNO MOREIRA SILVA****STUDY OF MICROBIAL NARINGINASE PRODUCTION BY SUBMERGED
FERMENTATION****Orientador: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra****Coorientador: Mateus Gomes de Godoy**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Citrus fruits contain flavonoids, such as naringin, responsible for the bitter taste along with other compounds. The enzymatic hydrolysis of naringin by naringinase, an enzyme complex with α -rhamnosidase and β -glucosidase activities, reduces bitterness and has other industrial applications. This enzyme is produced by various organisms, such as plants, yeasts, fungi, and bacteria. Thus, this study evaluated the production of naringinase by submerged fermentation, which allows control of cultivation parameters, using *Aspergillus niger*, *A. awamori*, and *A. terreus*, and employing Ponkan tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) as an inducer and carbon source. The objectives included: Assessing the production of α -rhamnosidase and β -glucosidase obtained in submerged fermentation in different culture media using Ponkan tangerine peel; Selecting the fungal strain based on activity data and the efficiency of naringin hydrolysis by crude enzymatic extracts; Studying the effects of cultivation conditions on naringinase production through submerged fermentation; Evaluating the efficiency of naringin hydrolysis by the enzymatic extracts produced under the best-selected conditions. The quantification of naringinase enzymatic activities, obtained from the crude extract, allowed the evaluation of its efficiency in naringin hydrolysis. The process was monitored by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), and the results enabled the comparison among the analyzed fungal strains. Based on the data, *A. awamori* was selected for the next stage of the study, where naringinase production in submerged fermentation was evaluated considering variables such as initial pH, inoculum concentration, agitation speed, and peel concentration at two cultivation times (3 and 7 days). The results indicated that agitation speed was the most significant factor, directly impacting enzymatic activity. The optimization of cultivation conditions allowed the establishment of the best response, obtained with: initial pH adjusted to 6, inoculum concentration of 5.25×10^6 spores/ml, agitation at 200 rpm, and peel concentration of 15 g/L. Under this configuration, the produced enzyme achieved a naringin hydrolysis efficiency of 88.28%, proving the biotechnological potential of the studied fungal strain.

Key-words: (Naringinase, *Aspergillus awamori*, submerged fermentation, α -rhamnosidase, β -glucosidase, Ponkan tangerine peel)

RESUMO PARA LEIGOS

BRUNNO MOREIRA SILVA

ESTUDO DE UMA ENZIMA CHAMADA NARINGINASE QUE REDUZ O AMARGOR ORIUNDO DE FRUTAS CÍTRICAS

Orientador: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Coorientador: Mateus Gomes de Godoy

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os frutos cítricos, como laranjas e tangerinas, têm um gosto amargo devido a substâncias naturais presentes neles, especialmente a naringina. Para reduzir esse amargor, utiliza-se uma enzima chamada naringinase, que quebra a naringina em componentes menos amargos. Essa enzima é produzida por alguns microrganismos, como fungos e bactérias. Neste estudo, foram testadas três espécies de fungos (*Aspergillus niger*, *A. awamori* e *A. terreus*) para avaliar qual deles produzia a naringinase com maior eficiência. Esses fungos foram cultivados em meios líquidos com diferentes composições de nutrientes juntamente a casca de tangerina Ponkan, que serviu como fonte de alimento e induziu a produção da enzima. O processo foi realizado sob condições controladas, com ajustes de fatores como pH, agitação e quantidade de casca. Os resultados demonstraram que o *A. awamori* apresentou a melhor capacidade de produção da enzima em curto espaço de tempo. Em seguida, foram testadas diferentes condições de cultivo para otimizar ainda mais a produção. Verificou-se que a produção ideal da enzima ocorria quando o pH (nível de acidez) era ajustado para 6, um valor levemente ácido que proporcionava as condições perfeitas para o crescimento do fungo. Além disso, a agitação do meio de cultivo era mantida a 200 rotações por minuto, garantindo uma oxigenação adequada para o metabolismo do microrganismo. Outro fator crucial foi o uso de uma quantidade específica de casca de tangerina, medida para fornecer os nutrientes necessários. Nessas condições, a naringinase atuou com eficiência na quebra da naringina, reduzindo significativamente o amargor. Essa pesquisa é relevante por apresentar um método natural para diminuir o sabor amargo de sucos e outros produtos cítricos, sem a necessidade de aditivos químicos. Essa abordagem pode ser aplicada pela indústria de alimentos de forma mais sustentável.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Valores percentuais da produção de tangerina (2023) de acordo com a regiões demográficas brasileiras. Fonte: IBGE.....	2
Figura 2 - Fórmula estrutural da Naringina. Fonte: Chen, 2016	10
Figura 3 - Esquema do processo de hidrólise da naringina através da ação da naringinase (E.C. 3.2.1.40). Fonte: (Ribeiro, 2011)	11
Figura 4 - Curva padrão para calibração da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, usando naringina (Sigma – 91842).	23
Figura 5 – Curva padrão para calibração da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, usando naringenina (Sigma – 52186).	23
Figura 6 – Atividade de β -glicosidase (U/mL) produzida por <i>Aspergillus niger</i> cultivado com casca de tangerina Ponkan, ao longo de 240 horas de fermentação submersa.	24
Figura 7 - Atividade de β -glicosidase (U/ml) produzida por <i>Aspergillus awamori</i> cultivado com casca de tangerina Ponkan, ao longo de 240 horas de fermentação submersa.	25
Figura 8 - Atividade de β -glicosidase (U/ml) produzida por <i>Aspergillus terreus</i> cultivado com casca de tangerina Ponkan, ao longo de 240 horas de fermentação submersa.	26
Figura 9 - Utilização do extrato bruto do Ensaio L em hidrólise da naringina, seguindo as condições estabelecidas na metodologia.	36
Figura 10 - Utilização do extrato bruto do Ensaio M em hidrólise da naringina, seguindo as condições estabelecidas na metodologia.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela com a produção brasileira de Tangerina (2023), dividida por Estados.	3
Tabela 2 - Informações sobre os bioprodutos obtidos de resíduos de citros.	7
Tabela 3 - Atividade enzimática de naringinase produzida por diferentes microrganismos em processos fermentativos utilizando fontes indutoras diversas.	14
Tabela 4 - Composição do primeiro meio de cultivo (Mandels e Weber, 1969).	18
Tabela 5 - Composição do Segundo meio de cultivo.	18
Tabela 6 - Composição do terceiro meio de cultivo.	18
Tabela 7 - Gradiente de eluição empregado no sistema HPLC para quantificação e naringina e naringenina.	22
Tabela 8 – Quantificação da atividade α -ramnosidase e β -glicosidase dos pontos selecionados e valores de pH final da FS.....	28
Tabela 9 – Eficiência da hidrólise da naringina relativa aos pontos selecionados.	30
Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} e os respectivos valores obtidos para as variáveis resposta.	32
Tabela 11 - Efeito das variáveis sobre a atividade em 3 dias de cultivo.....	32
Tabela 12 - Efeito das variáveis sobre a atividade em 7 dias de cultivo.	33
Tabela 13 – Análise das variáveis marginalmente significativas em 3 dias de cultivo.	33
Tabela 14 - Análise das variáveis marginalmente significativas em 7 dias de cultivo.	34
Tabela 15 – Condições selecionadas após análise do planejamento experimental para avaliação das enzimas de <i>Aspergillus awamori</i> em fermentação submersa.....	35
Tabela 16 – Quantificação das atividades enzimáticas.....	35
Tabela 17 - Eficiência de conversão da naringina em naringenina (%) pelos extratos brutos de <i>Aspergillus awamori</i> obtidos em fermentação submersa utilizando meio Mandels nos ensaios L e M.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Indústria de cítricos.....	1
1.2 Caracterização da tangerina.....	4
1.3 Resíduos do processamento.....	6
1.4 Naringina	9
1.5 Naringinase	10
1.6 Sistemas de produção	12
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVO	16
3.1 Objetivo específico	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Obtenção e processamento da biomassa	17
4.2 Microrganismos	17
4.3 Obtenção da solução de esporos.....	17
4.4 Meios de cultivo da fermentação submersa	18
4.5 Fermentação submersa	19
4.6 Protocolo de obtenção da enzima	19
4.7 Quantificação da atividade enzimática e proteínas totais	19
4.7.1 Atividade de α -ramnosidase	20
4.7.2 Atividade da β -glicosidase	20
4.7.3 Proteínas Totais	21
4.7.4 Atividade específica.....	21
4.8 Hidrólise da naringina	22
4.9 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
5. RESULTADOS	24
5.1 Avaliação da produção de naringinase em espécies de <i>Aspergillus</i> em fermentação submersa.	24
5.2 Hidrólise Enzimática da Naringina	29

5.3	Estudo dos efeitos de variáveis sobre a produção de β -glicosidase por Fermentação Submersa pelo fungo <i>Aspergillus awamori</i>	31
5.4	Condições selecionadas após estudo das variáveis no planejamento fatorial fracionado na Fermentação Submersa.....	34
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÕES	43
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9.	ANEXOS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Indústria de cítricos

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2023, a produção de frutas cítricas no Brasil foi liderada pela laranja, com aproximadamente 17,6 milhões de toneladas, seguida pelo limão, com 1,724 milhão de toneladas, e pela tangerina, com 1,052 milhão de toneladas. A laranja se destaca como a principal fruta cítrica do país, tanto em volume de produção quanto em exportação (IBGE, 2023).

Apesar disso, a produção de tangerina no Brasil, embora significativa em termos nacionais, representa apenas uma pequena parcela da produção global. Conforme os dados mencionados pelo Departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA), a produção mundial de tangerina para a safra 2023/24 foi estimada em 38,2 milhões de toneladas, com um aumento de 1,2 milhão de toneladas em relação ao ciclo anterior. Esse crescimento é impulsionado principalmente por China e Turquia, que são os maiores produtores mundiais, beneficiando-se de condições climáticas favoráveis e da expansão da área cultivada (USDA, 2024).

No contexto brasileiro, a produção de tangerina está concentrada em poucas regiões, com destaque para o Sudeste. A produção está distribuída por 22 estados e o Distrito Federal, sendo que São Paulo é o maior produtor, responsável por cerca de 323.623 mil toneladas, o que representa 30,75% do total nacional (IBGE, 2023). A Figura 1 apresenta a distribuição regional da produção no Brasil, destacando a participação percentual de cada região. O Sudeste lidera com 60,93% da produção, seguido pelo Sul com 31,85%, enquanto as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte apresentam participações menores.

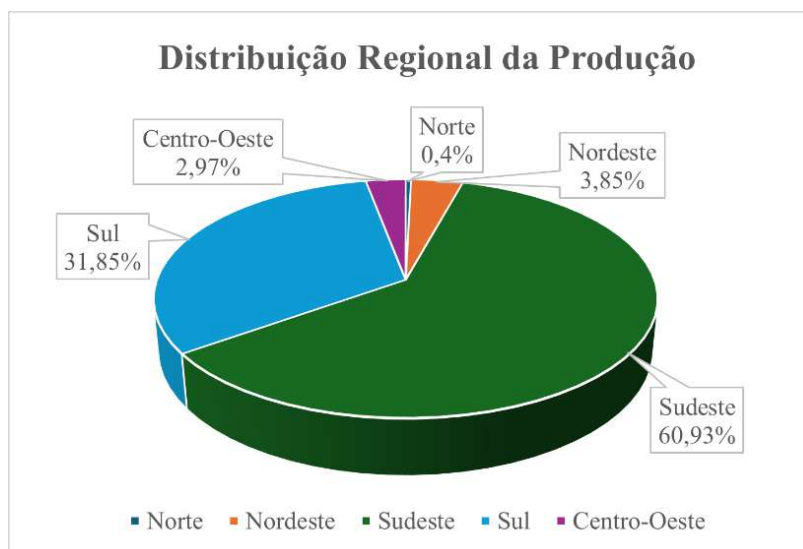


Figura 1 – Valores percentuais da produção de tangerina de acordo com a regiões demográficas brasileiras. Fonte: IBGE (2023).

O Estado de São Paulo tornou-se o principal produtor de citros no Brasil devido a uma combinação de fatores econômicos, climáticos e estruturais. A decadência da cafeicultura, abriu espaço para a diversificação agrícola. O apoio governamental, as condições edafoclimáticas favoráveis, a infraestrutura herdada da cafeicultura (como as linhas ferroviárias) e a criação de instituições de pesquisa e ensino agrícola, como a Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), foram determinantes para o desenvolvimento da citricultura (Fernandes, 2010).

No entanto, a análise da distribuição da produção por estados na tabela 1 revela que, além de São Paulo, outros estados também contribuem significativamente, embora em menor escala. Estados como Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná apresentam uma participação relevante na produção, com áreas colhidas consideráveis e rendimentos que refletem a eficiência agrícola. Além disso, regiões como Espírito Santo e Goiás demonstram um desempenho notável em termos de produtividade, destacando-se mesmo com áreas menores cultivadas. Por outro lado, estados do Nordeste e da região Norte, embora com participações mais modestas, também contribuem para a diversificação da produção nacional, evidenciando a presença da atividade agrícola em diferentes contextos geográficos e climáticos.

Tabela 1 – Tabela com a produção brasileira de Tangerina (2023), dividida por Estados.

Estados	Área colhida (Hectares)	Produção (Toneladas)	Rendimento (Quilogramas por Hectare)
São Paulo	10.032	323.645	32.261
Minas Gerais	14.466	256.395	17.724
Rio Grande do Sul	12.315	169.495	13.763
Paraná	8.631	157.222	18.216
Espírito santo	1.376	31.641	22.995
Rio de Janeiro	1.490	29.279	19.650
Goiás	1.056	25.162	23.828
Paraíba	7.935	15.037	1.895
Bahia	1.427	13.998	9.809
Santa Catarina	766	8.429	11.004
Sergipe	486	6.514	13.403
Ceará	370	3.640	9.838
Mato Grosso do sul	257	2.894	11.261
Distrito Federal	116	2.312	19.931
Acre	140	1.715	12.250
Alagoas	117	1.392	11.897
Pará	121	1.007	8.322
Mato Grosso	79	914	11.570
Roraima	48	670	13.958
Rondonia	96	563	5.865
Amazonas	81	212	2.617
Tocantins	5	70	14.000
Pernambuco	4	16	4.000

Fonte: IBGE (2023).

A tabela apresentada ilustra a distribuição da produção de citros por estados brasileiros, destacando a área colhida, a produção em toneladas e o rendimento em quilogramas por hectare. Minas Gerais, por exemplo, possui a maior área colhida (14.466 hectares), com uma produção de 256.395 toneladas, mas com um rendimento de 17.724 kg/ha, o que sugere uma produtividade moderada em relação à extensão cultivada. Esse desempenho reflete a importância do estado como um dos principais polos agrícolas do país. O Rio Grande do Sul e o Paraná também se destacam, com produções de 169.495 e 157.222

toneladas, respectivamente. Esses números podem indicar desafios relacionados às condições climáticas, manejo agrícola ou adoção de tecnologias.

Além disso, estados como Espírito Santo, Goiás e Rio de Janeiro apresentam rendimentos elevados, superando 19.000 kg/ha, o que demonstra uma produtividade significativa em áreas menores. Espírito Santo, por exemplo, com apenas 1.376 hectares colhidos, alcança um rendimento de 22.995 kg/ha, destacando-se como um exemplo de eficiência agrícola. Por outro lado, estados como Paraíba e Bahia, apesar de terem áreas colhidas expressivas (7.935 e 1.427 hectares, respectivamente), apresentam rendimentos mais baixos (1.895 kg/ha e 9.809 kg/ha). Esses resultados podem estar associados a condições edafoclimáticas menos favoráveis, como solos menos propícios ou regimes de chuva irregulares, além de possíveis limitações na adoção de tecnologias.

Já estados com menor participação na produção, como Acre, Alagoas e Roraima, mostram rendimentos variados, indicando que a citricultura, mesmo em pequena escala, pode ser viável em diferentes regiões do país. O Acre, por exemplo, com apenas 140 hectares colhidos, alcança um rendimento de 12.250 kg/ha, enquanto Roraima, com 48 hectares, atinge 13.958 kg/ha. Esses dados evidenciam que, mesmo em áreas com condições geográficas específicas, a atividade pode ser economicamente viável. Por fim, estados como Amazonas e Rondônia, com rendimentos abaixo de 6.000 kg/ha, sugerem a necessidade de investimentos em pesquisa e desenvolvimento para superar desafios locais ou falta de infraestrutura. Essa diversidade de desempenhos reforça a complexidade da produção de citros no Brasil, que abrange desde grandes polos produtores até regiões com potencial ainda a ser explorado.

Desta forma, a tangerina tem conquistado importância no mercado brasileiro, tanto para consumo interno quanto para exportação. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a expansão da citricultura, especialmente de tangerinas, é vista como uma oportunidade para diversificar a produção agrícola e aumentar a competitividade no mercado internacional. Entre os principais mercados consumidores destacam-se a União Europeia, os Estados Unidos e a Rússia. (USDA, 2024).

1.2 Caracterização da tangerina

A tangerina (*Citrus reticulata*) pertence à família Rutaceae e é considerada uma das espécies mais antigas de frutas cítricas cultivadas, com provável origem na região do sul da

China e nordeste da Índia, onde seu cultivo remonta a mais de dois mil anos (Hussain *et al.*, 2021). A espécie foi posteriormente difundida para outras regiões da Ásia e, mais tarde, introduzida em diversos continentes por rotas comerciais (Saini *et al.*, 2022).

A tangerina apresenta ampla diversidade genética, sendo cultivada em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo. Muitas variedades comerciais conhecidas como “tangerinas” são, na verdade, híbridos entre *C. reticulata* e outras espécies cítricas, como *Citrus sinensis* e *Citrus maxima*. Essa complexidade genética contribui para a grande variedade de frutos com diferentes características quanto ao tamanho, sabor, teor de sementes, casca e valor nutricional (Saini *et al.*, 2022).

Morfologicamente, a tangerina possui casca fina, de fácil remoção, com coloração que varia do amarelo ao alaranjado, contendo glândulas oleosas que liberam um aroma característico (Hussain *et al.*, 2021). Entre a casca e a polpa, encontra-se o mesocarpo, uma camada branca, esponjosa e fibrosa, conhecida também como albedo. A parte interna do fruto, o endocarpo, é composta por gomos segmentados que contêm o suco e as sementes, protegidos por membranas finas. A quantidade de sementes pode variar conforme a variedade (Hussain *et al.*, 2021). A planta da tangerina é um arbusto ou pequena árvore, com folhas simples, brilhantes e coriáceas, além de flores brancas aromáticas que originam os frutos (Hussain *et al.*, 2021).

No Brasil, a variedade mais cultivada é a tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), caracterizada por casca fina e de fácil desprendimento, polpa suculenta e aroma marcante. Essa cultivar é amplamente valorizada para consumo *in natura* e destaca-se pelo elevado rendimento produtivo (Landau *et al.*, 2020). Outras variedades e híbridos como Murcott, Cravo, Clementina, Dancy, Montenegrina e Dekopon também são cultivados globalmente (Saini *et al.*, 2022). A safra da tangerina ocorre, principalmente, entre os meses de abril e setembro no Brasil, dependendo das condições climáticas e da variedade cultivada. Esse período coincide com o outono-inverno, época em que a fruta apresenta melhor qualidade e maior disponibilidade no mercado (CEAGESP, 2025).

1.3 Resíduos do processamento

A citricultura brasileira tem apresentado uma significativa expansão, especialmente na região Sudeste. Essa crescente produção, no entanto, impõe um desafio relevante à indústria de processamento: o manejo adequado dos resíduos gerados. O processamento de frutas cítricas resulta na formação de resíduos sólidos, líquidos e efluentes oriundos das destilarias. Entre esses resíduos, destacam-se cascas, sementes e polpa, que são particularmente ricos em compostos bioativos, como flavonoides e polifenóis. Esses componentes têm despertado interesse devido ao seu potencial aproveitamento na produção de enzimas, biocombustíveis e outros produtos de valor para diversas aplicações industriais (Sharma *et al.*, 2022).

Os resíduos sólidos, possuem elevado potencial para aproveitamento devido à presença de açúcares (sacarose, frutose, glicose), óleos essenciais, flavonoides, polifenóis, pectina, lipídios (ácidos palmítico e linolênico), proteínas, carotenoides, monoterpenos e vitaminas C e do complexo B (Sharma *et al.*, 2022). Diversas alternativas foram propostas para o reaproveitamento desses resíduos, incluindo a produção de rações animais fortificadas, uso como componentes ricos em fibras para produtos de confeitaria, extração de macro e micronutrientes, além da fabricação de fertilizantes orgânicos, biocombustíveis, enzimas e etanol. Esses produtos derivados do reaproveitamento são utilizados em diferentes setores industriais: na indústria farmacêutica, na indústria alimentícia e na indústria cosmética (Sharma *et al.*, 2022).

A polpa cítrica, caracterizada por elevados teores de água e açúcares solúveis, é altamente perecível e apresenta uma alta taxa de fermentabilidade. Essa característica gera problemas econômicos e ambientais significativos, uma vez que seu elevado conteúdo de matéria orgânica impede o descarte direto, podendo prejudicar a microbiota benéfica do solo (Sharma *et al.*, 2016). Além disso, a extração de óleos das cascas cítricas é uma etapa essencial antes do descarte, pois estes óleos apresentam atividade antimicrobiana que compromete a fermentação e a decomposição bacteriana, impactando negativamente o manejo de resíduos e contribuindo para a poluição ambiental (Sharma *et al.*, 2016).

Os métodos mais comuns para o tratamento de resíduos sólidos incluem compostagem, digestão anaeróbica, incineração, termólise e gaseificação (Sharma *et al.*, 2016).

Devido à riqueza de nutrientes e compostos bioativos, os resíduos sólidos podem ser utilizados para a produção de diversos produtos por meio de métodos físicos, químicos e biológicos, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Informações sobre os bioprodutos obtidos de resíduos de citros.

Resíduo	Método de Valorização	Bioproduto obtido a partir de resíduos cítricos
Resíduo de casca de citros	Fermentação via <i>Trichoderma sp.</i> , <i>E. coli</i>	Ácido mucico
Casca de laranja	Hidrodifusão por micro-ondas e gravidade (MHG) e processamento por destilação a vapor (SD)	Óleo essencial
Casca de laranja	Processamento assistido por ultrassom (UAP)	Polifenóis
Resíduos da casca de laranja da variedade <i>Citrus sinensis</i> cultivar Malta	Processamento assistido por ultrassom (UAP) e Processamento assistido por enzimas (EAP)	Polifenóis e flavonoides
Resíduo de casca de laranja	Hidrólise enzimática e fermentação	Bioetanol
Resíduo de casca de citros	Destilação a vapor	D-limoneno
Resíduo de casca de pomelo	Processamento por campo elétrico pulsado	Naringina
Hidrolisados de resíduos de casca de citros	Fermentação via <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bioetanol
Resíduo de limão persa	Processamento assistido por ultrassom (UAP)	Catequina, hesperidina e naringenina
Resíduo de casca de <i>Citrus reticulate</i> (kinnow)	Processamento assistido por ultrassom (UAP)	Luteína
Resíduo de casca de citros	Processamento à base de água, como processamento por pressão manual, processamento por micro-ondas e processamento por pressão manual e micro-ondas	Pectina
Resíduo de casca de pomelo	Processamento por micro-ondas sem solvente (SFMP)	Óleo essencial
Resíduo de casca de laranja	Ensilagem	Ácido láctico, ácido acético e etanol

Resíduo de casca de citros	Processamento por extração com água subcrítica (SCWEP)	Conteúdo total de fenóis e flavonas
Resíduo de casca de citros	Processamento à base de metanol e HPLC	Naringina, hesperidina, d-neohesperidina, diosmina

Fonte: Sharma *et al.*, 2022.

A tabela apresentada reúne diversos métodos de valorização para resíduos de cascas de frutas cítricas e os bioprodutos obtidos a partir desses resíduos. As técnicas descritas variam de processos tradicionais, como a fermentação e a hidrólise enzimática, a tecnologias mais avançadas, como processamento assistido por ultrassom (UAP) e extração com água subcrítica. A maioria das aplicações mencionadas na tabela está voltada para a obtenção de compostos fenólicos, como polifenóis, flavonoides e outros compostos bioativos de interesse na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Os resíduos líquidos gerados na indústria de processamento de frutas podem ser classificados em duas categorias principais. A primeira envolve os efluentes oriundos das etapas de processamento, como os gerados na produção de conservas, o excesso de água utilizada no resfriamento, as águas residuais provenientes da lavagem de frutas, das mesas de descasque e seccionamento, bem como da limpeza dos pisos das áreas de trabalho. A segunda categoria corresponde aos efluentes provenientes de destilarias, incluindo os resíduos resultantes da produção de ácido cítrico e pectina, o melaço cítrico e os subprodutos gerados nas plantas de extração de óleo da casca dos frutos (Sharma *et al.*, 2016). Esses efluentes, se não tratados adequadamente, podem representar riscos ambientais significativos devido à sua carga orgânica e potencial poluente. Esses resíduos líquidos são descartados de diferentes formas, como liberação direta de efluentes em lagos, despejo em reservatórios, descarte em pomares ou poços e gerenciamento por sistemas de esgoto municipais (Sharma *et al.*, 2016).

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas por meio da fermentação é uma abordagem sustentável e economicamente viável que tem ganhado destaque nas últimas décadas. Essa técnica permite a valorização de materiais que, de outra forma, seriam descartados, contribuindo para a redução do impacto ambiental e para a geração de produtos de alto valor agregado, como enzimas industriais. A fermentação é amplamente empregada para a produção de enzimas por microrganismos, que são capazes de crescer em substratos complexos, utilizando-os como fonte de carbono e energia, enquanto produzem enzimas de interesse industrial (Yafetto, 2022).

A fermentação permite a produção de uma ampla gama de enzimas, que são utilizadas em diversas indústrias, como alimentícia, têxtil, de detergentes, farmacêutica e de biocombustíveis. Algumas das enzimas mais comumente produzidas incluem celulasas, utilizadas na degradação de celulose e importantes para a produção de biocombustíveis e na indústria têxtil; amilases, que degradam amido e são amplamente utilizadas na indústria alimentícia e de bebidas; proteases, que quebram proteínas e são utilizadas em detergentes, curtumes e na indústria alimentícia; lipases, que degradam lipídios e são utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos e biodiesel; e lacases, enzimas oxidativas utilizadas na indústria têxtil e de papel, bem como na biorremediação (Yafetto, 2022).

A produção de enzimas por fermentação a partir de resíduos agroindustriais enfrenta alguns desafios, como a variabilidade na composição dos resíduos, a necessidade de otimização das condições de fermentação e a dificuldade de escalonamento para grandes volumes. Além disso, a purificação e recuperação das enzimas podem ser complexas e custosas. No entanto, pesquisas recentes têm focado na otimização dos processos de fermentação, incluindo a seleção de microrganismos mais eficientes, a melhoria das condições de fermentação e o desenvolvimento de biorreatores mais eficazes. A integração da fermentação com outras tecnologias, como a biotecnologia e a engenharia metabólica, também tem o potencial de aumentar a eficiência e a viabilidade econômica da produção de enzimas (Yafetto, 2022).

1.4 Naringina

Os frutos cítricos e seus sucos são boas fontes de flavonoides. Os flavonoides são caracterizados por uma estrutura básica de 15 átomos de carbono, composta por dois anéis fenólicos com pelo menos um grupo hidroxila. Eles podem ser divididos em seis classes, de acordo com sua estrutura química: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianidinas (Mulvihill e Huff, 2010). No entanto, na natureza, os flavonoides são mais comumente encontrados em sua forma de glicosídeos, como rutinosídeo, galactosídeo, glicosídeo e arabinosídeo (Rensheng, Yang e Weimin, 2012; Xiao *et al.*, 2016).

A maioria dos flavonoides em frutos cítricos são flavanonas: hesperidina e narirutina predominam nas laranjas, narirutina e naringina nas toranjas (grapefruits) e ericitrina nos limões. (He *et al.*, 2007).

A naringina ($C_{27}H_{32}O_{14}$) é um dos compostos responsáveis pelo amargor característico destas frutas, cuja concentração varia conforme a maturidade do fruto, sendo mais alta em frutas imaturas. Essa variação torna a maturidade um fator essencial a ser considerado durante o processamento de sucos, especialmente em sucos de grapefruit, onde a amargura é particularmente intensa. Outro componente amargo significativo nas frutas cítricas é a limonina, que se concentra principalmente no albedo e nas paredes dos segmentos.

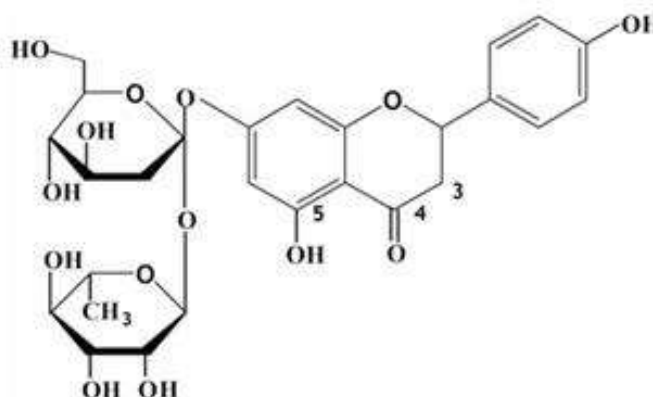


Figura 2 - Fórmula estrutural da Naringina. Fonte: Chen e Wang, 2016.

A naringina oferece diversos benefícios para a saúde devido às suas propriedades biológicas e medicinais. Dentre os principais efeitos da naringina mencionados através de estudos, destacam-se suas propriedades antioxidantes, que neutralizam radicais livres e protegem as células contra o estresse oxidativo, além do efeito anti-inflamatório, ajudando a reduzir inflamações e combatendo doenças inflamatórias crônicas. Ela ainda possui propriedades antiulcerosas e digestivas, sendo tradicionalmente usada para melhorar a digestão e aliviar sintomas como gases e inchaço. Esses benefícios tornam a naringina uma substância promissora tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia, sendo utilizada como um ingrediente funcional em produtos que visam a promoção da saúde e a prevenção de doenças (Shilpa *et al.*, 2023).

1.5 Naringinase

A naringinase é uma enzima complexa com atividade dupla de α -ramnosidase (EC 3.2.1.40) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21). Essa enzima é utilizada na desglicosilação de compostos com potencial de aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. A

naringinase é particularmente importante no processamento de frutas cítricas, onde reduz seu sabor amargo. Um dos componentes da naringinase, a α -ramnosidase, catalisa a hidrólise da naringina em ramnose e prunina. Em seguida, a β -glicosidase atua, convertendo a prunina em glicose e naringenina (um composto sem sabor amargo) (Boczniewicz e Garncarek, 2022).

Esta enzima tem ampla ocorrência na natureza e já foi relatada em plantas, leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Muitos glicosídeos naturais, incluindo naringina, rutina, quercitrina, hesperidina, diosmina e glicosídeos terfenílicos, que contêm α -ramnose e β -glicose terminais, podem atuar como substratos para a naringinase (Ribeiro, 2011).

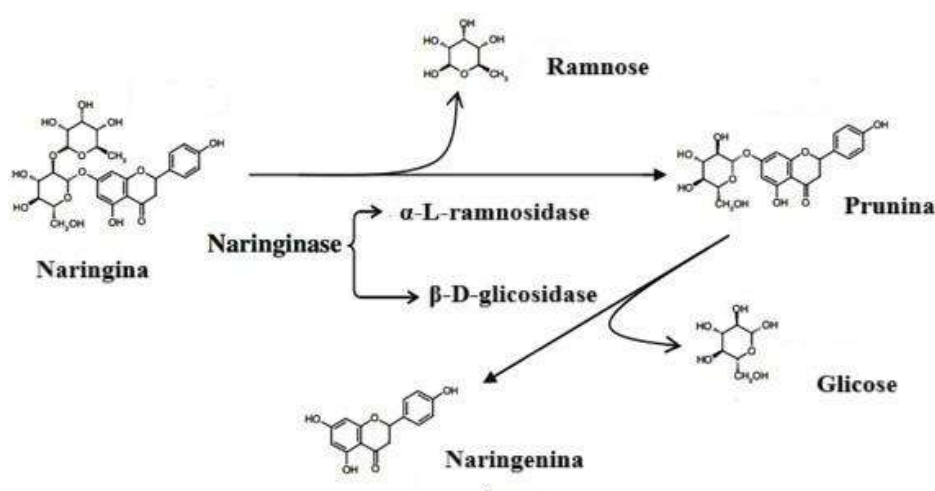


Figura 3 - Esquema do processo de hidrólise da naringina através da ação da naringinase (E.C. 3.2.1.40). Fonte: (Ribeiro, 2011)

As naringinases catalisam a hidrólise da naringina, resultando na produção de ramnose, um intermediário quiral valioso amplamente utilizado na síntese orgânica, fabricação de produtos farmacêuticos e como agente protetor de plantas. Além disso, a naringinase pode ser empregada na produção de prunina, um flavonoide derivado da naringina. A prunina possui diversas atividades biológicas, incluindo ação antiviral contra vírus de DNA e RNA, como HSV-1, poliovírus e RSV, propriedades anti-inflamatórias e potencial como adoçante seguro para diabéticos. Estudos *in vitro* e em modelos animais também destacam os efeitos protetores da prunina e de outros flavonoides naturais, como a naringina, na prevenção de úlceras gástricas e no fortalecimento da mucosa gástrica (Puri e Banerjee, 2000).

Outro subproduto obtido é a naringenina, insípida, que reduz o amargor de sucos cítricos, preservando suas características sensoriais e aumentando seu valor comercial (Ribeiro, 2011). A naringenina tem vários efeitos, tais como antidiabético, anticancerígeno, antimicrobianos, antiobesidade, gastroprotetores, imunomoduladores, cardioprotetores, neuroprotetores (Uçar e Goktas, 2023).

A avaliação da atividade da naringinase pode ser realizada por meio de diversos procedimentos, incluindo determinações espectrofotométricas e cromatográficas de alta eficiência (HPLC) (Ni, 2013). A utilização de substratos específicos para discriminar as duas atividades enzimáticas expressas pela naringinase é fundamental, pois permite acompanhar e medir ambas as atividades de forma fácil, evitando a necessidade de separação e purificação de subunidades proteicas. Os substratos p-nitrofenil α -L-rhamnopiranosídeo e p-nitrofenil β -D-glicosídeo são usados para as atividades de α -L-rhamnosidase e β -D-glucosidase, respectivamente e medidos através do método espectrofotométrico (Ribeiro, 2011).

A naringinase, com sua atividade de ramnosidase, tem demonstrado grande versatilidade em aplicações industriais e biotecnológicas. Na modificação de antibióticos glicopeptídicos, como as cloropoliesporinas, a enzima transforma as variantes A, B e C em derivados deglicosilados com alta eficácia antimicrobiana, melhorando a atividade de antibióticos. Além disso, sua atividade, combinada com a arabinosidase, tem sido utilizada no aprimoramento do aroma na produção de vinhos. Nesse contexto, as enzimas foram imobilizadas em suportes sólidos para viabilizar um processo contínuo, otimizando as características aromáticas do produto. Outra aplicação importante da naringinase é na hidrólise enzimática de sementes de feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), resultando na produção de sapogeninas e diosgenina, um precursor essencial para a síntese de medicamentos esteroides, com possibilidade de reutilização da enzima imobilizada sem perda de eficiência (Puri e Banerjee, 2000).

1.6 Sistemas de produção

As características nutricionais e adaptativas dos fungos filamentosos têm impulsionado a exploração de seu vasto potencial, especialmente devido à sua capacidade de crescer em substratos simples e de baixo custo, além de sua habilidade de expressar e excretar proteínas. Com os avanços no entendimento da fisiologia, bioquímica e genética desses fungos, tornou-se possível aproveitar seu imenso potencial para a produção de enzimas de

interesse industrial (Cortez, Castro e Andrade, 2016). Embora esses fungos prefiram a fermentação em estado sólido (FES), adaptando-se bem a ambientes de baixa umidade, esse método apresenta limitações para a produção industrial em larga escala, especialmente devido às dificuldades na escalabilidade do processo.

Nesse contexto, a fermentação submersa (FS) surge como uma alternativa mais viável para a produção, especialmente em biorreatores automatizados e escaláveis. A FS permite ajustes na composição nutricional e nos fatores físicos, como a disponibilidade de carbono, nitrogênio, minerais, vitaminas, controle de pH, temperatura, agitação e oxigenação. No entanto, um dos principais desafios da FS é a baixa atividade enzimática dos fungos, o que ainda exige intensas pesquisas para melhorar o processo (Nazir *et al.*, 2023).

Para garantir o crescimento celular eficiente durante a FS, o meio de cultivo utilizado deve fornecer todos os nutrientes essenciais, que são necessários tanto para a produção de energia quanto para a manutenção das funções celulares. Os nutrientes mais utilizados incluem carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), enxofre (S), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), são os elementos mais utilizados no processo (Cortez, Castro e Andrade, 2016).

A flexibilidade da FS, com modelos adaptáveis, amplia suas aplicações nas indústrias de alimentos, bioenergia e biotecnologia. Para garantir a viabilidade econômica, é essencial utilizar componentes acessíveis no meio de cultivo, assegurando tanto o sucesso financeiro quanto o cumprimento dos padrões de qualidade do produto.

A produção de naringinase, seja por fermentação em estado sólido ou submersa, é um tema abordado em diversos estudos, nos quais são apresentados os microrganismos utilizados, os meios de cultivo, as fontes indutoras da enzima e os parâmetros experimentais adotados. A diversidade de substrato faz com que os autores utilizem diferentes fontes de carbono para obter a enzima, assim como utilizem diferentes métodos de quantificação da enzima (Souza, 2022).

A tabela 3 resume alguns desses artigos, ilustrando a diversidade e as particularidades das abordagens empregadas.

Tabela 3 - Atividade enzimática de naringinase produzida por diferentes microrganismos em processos fermentativos utilizando fontes indutoras diversas.

Microrganismo	Fonte indutora da enzima	Fermentação	Atividade Enzimática	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de cítricos	FS	568 (U/ml) - Naringinase	Borkar, Chakraborty e Gokhale, 2021
<i>Bacillus subtilis</i>	Casca de Laranja	FS	4,82 (U/ml) - Naringinase	Selim <i>et al.</i> , 2023
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Naringina (Comercial)	FES	385 (U/ml) - Naringinase	Shanmugaprakash <i>et al.</i> , 2015
<i>Neurospora sp.</i>	Casca de Laranja	FS	389 (U/ml) - Naringinase	Salunkhe <i>et al.</i> , 2024
<i>Aspergillus niger</i>	Tangerina Ougan	FS	20,81 (U/ml) - α -ramnosidase	Zhang <i>et al.</i> , 2024
<i>Aspergillus terreus</i>	Tangerina Ponkan e Naringina (Sigma)	FES	150,14 (U/g) - α -ramnosidase	Souza, 2022
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 11568	Naringina (Sigma)	FS	380,35 (U/mg) - α -ramnosidase	Zhu <i>et al.</i> , 2017

Nesse contexto, a condução de pesquisas voltadas ao aprimoramento de processos e à utilização de matérias-primas de baixo custo configura-se como uma estratégia promissora para o avanço da biotecnologia industrial. Tal enfoque justifica-se pela necessidade de desenvolver processos mais eficientes, economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis, atendendo às exigências da indústria por soluções inovadoras e competitivas.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas cítricas, com destaque para a produção de tangerina, que ocupou o segundo lugar no ranking nacional em 2023, com 1.052.000 toneladas produzidas, sendo o estado de São Paulo responsável por 30,75% desse total (IBGE, 2023). Esse alto volume de produção gera uma quantidade significativa de resíduos agroindustriais, já que até 50% da massa da fruta é descartada na forma de cascas, sementes e polpas após o processamento (Sharma *et al.*, 2016).

Esses resíduos, embora ricos em nutrientes como açúcares, fibras, óleos essenciais, pectina e flavonoides (Sharma *et al.*, 2022), são altamente perecíveis e fermentáveis, o que os torna um passivo ambiental relevante. Seu descarte inadequado pode impactar negativamente o meio ambiente, afetando a microbiota do solo e promovendo a poluição de corpos hídricos (Sharma *et al.*, 2016). Diante desse cenário, o reaproveitamento desses resíduos se insere na lógica da economia circular, que busca transformar subprodutos em insumos para novos processos industriais.

No caso da casca da tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), estudos mostram que ela possui alto teor de compostos bioativos, como naringina, hesperidina e narirutina, que podem atuar como substratos e indutores naturais para a produção de enzimas como a naringinase (Sharma *et al.*, 2022). A utilização dessa biomassa na fermentação microbiana representa, assim, uma estratégia promissora tanto para a valorização de resíduos quanto para a produção de compostos de interesse industrial.

A naringinase é uma enzima com atividades de α -ramnosidase (EC 3.2.1.40) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), cuja aplicação inclui a remoção do amargor de sucos cítricos, a modificação de glicosídeos bioativos, o aumento da biodisponibilidade de flavonoides e a produção de naringenina, um composto de interesse nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Uçar e Goktas, 2023). No entanto, o custo da naringinase comercial é elevado, em função da utilização de substratos sintéticos e processos de purificação para a sua obtenção (Puri e Banerjee, 2000), o que limita sua aplicação em larga escala.

Nesse contexto, a produção de naringinase a partir de resíduos agroindustriais, como a casca de tangerina, por meio de fermentação submersa utilizando microrganismos como *Aspergillus spp.*, apresenta-se como uma alternativa economicamente viável e ambientalmente sustentável. A substituição de insumos caros por substratos abundantes e de

baixo custo pode reduzir o custo de produção da enzima, ao mesmo tempo em que promove o reaproveitamento de resíduos e a mitigação de impactos ambientais (Yafetto, 2022).

Portanto, este estudo justifica-se pela necessidade de desenvolvimento de processos biotecnológicos sustentáveis, com base na valorização de resíduos agrícolas e na produção de enzimas de alto valor agregado. A aplicação desse modelo pode contribuir para a inovação na indústria enzimática, a redução de custos industriais e a promoção de práticas alinhadas aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), especialmente os ODS 9 (Indústria, inovação e infraestrutura) e 12 (Consumo e produção responsáveis) das Nações Unidas.

3. OBJETIVO

Analisar a produção da enzima naringinase por fungos filamentosos cultivados em fermentação submersa utilizando casca de tangerina Ponkan como principal fonte de carbono e indutor da síntese de naringinases.

3.1 Objetivo específico

- Avaliar a produção de α -ramnosidase e β -glicosidase obtidos na fermentação submersa em diferentes meios de cultivo utilizando a casca de tangerina Ponkan.
- Selecionar a cepa fúngica com base nos dados de atividade e na eficiência de hidrólise da naringina pelos extratos enzimáticos brutos.
- Estudar os efeitos das condições de cultivo na produção da enzima naringinase através da fermentação submersa.
- Avaliar a eficiência de hidrólise da naringina pelos extratos enzimáticos produzidos nas melhores condições selecionadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e processamento da biomassa

A casca da tangerina Ponkan utilizada nos experimentos foi obtida por meio da aquisição da fruta no CEASA/RJ, durante o período de safra, que ocorre de março a setembro. As compras foram realizadas, preferencialmente, nos meses correspondentes à primeira metade desse período, devido a sua maior disponibilidade e qualidade.

A biomassa passou pelo processo de secagem em forno industrial por 12 horas a uma temperatura constante de 50°C, até atingir 40% de umidade. Após o procedimento, ela foi processada em um moinho de facas com peneiras de retenção metálicas, projetadas para permitir a passagem de partículas com tamanho inferior a 2 mm aos quais foram utilizadas. Em seguida, o material foi armazenado em recipiente fechado hermeticamente em congelador a uma temperatura de – 18°C.

4.2 Microrganismos

Para este estudo, foram utilizados fungos filamentosos pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Industrial da Escola de Química, localizada no Centro de Tecnologia da UFRJ. Foram empregados os seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* IOC 3915 e *Aspergillus terreus*. As amostras dos fungos utilizadas foram mantidas em tubos contendo meio ágar batata dextrose (PDA), refrigerados a uma temperatura máxima de 5 °C, com renovação do meio de cultivo a cada 3 meses.

4.3 Obtenção da solução de esporos

Para a obtenção do inóculo, o fungo foi cultivado em 60 ml de meio ágar batata dextrose. O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 500 ml, mantidos por 7 dias a uma temperatura de 30 °C em estufa. Após o crescimento, os esporos foram suspensos através do uso de alças e utilizando 40 ml de solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, acrescida de 0,1% de Tween 80 em relação ao volume utilizado. Posteriormente, a contagem dos esporos foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico, e o volume necessário para alcançar a concentração desejada de inóculo foi calculado. As concentrações de inóculo utilizadas neste estudo foram 5×10^5 e/ml, $5,25 \times 10^6$ e/ml e 1×10^7 e/ml.

4.4 Meios de cultivo da fermentação submersa

Durante o estudo, foram utilizados três diferentes meios de cultivo na fermentação submersa, com suas respectivas descrições nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Composição do primeiro meio de cultivo (Mandels e Weber, 1969).

Componente	Concentração (g/L)
Ureia – $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	0,3
Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4
Fosfato monopotássio - KH_2PO_4	2
Cloreto de cálcio - CaCl_2	0,4
Sulfato de magnésio - MgSO_4	0,3
Peptona	0,75
Extrato de levedura	0,25
Sulfato de manganês – MnSO_4	0,0016
Sulfato ferroso – FeSO_4	0,005
Sulfato de zinco - ZnSO_4	0,0014
Cloreto de cobalto – CoCl_2	0,0037

Tabela 5 - Composição do Segundo meio de cultivo (meio mínimo).

Componente	Concentração (g/L)
Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
Sulfato de magnésio - MgSO_4	0,5
Cloreto de potássio - KCl	0,5
Fosfato dipotássio - K_2HPO_4	1,0

Tabela 6 - Composição do terceiro meio de cultivo.

Componente	Descrição
Água (H_2O)	Valor do meio base 200 ml

Nos experimentos conduzidos, a casca de tangerina Ponkan foi empregada como fonte de carbono em concentrações distintas, conforme o meio de cultivo e a fase do estudo. Na fase de escolha do fungo e do meio de cultivo, a concentração testada foi de 5 g/L em meio Mandels, permitindo uma avaliação preliminar da capacidade do fungo em metabolizar o resíduo cítrico em um meio nutritivo.

Os meios mínimo e água foram utilizados com adição de 10 g/L da casca, com o objetivo de investigar o potencial do resíduo em condições mais restritivas, ou seja, com baixa ou nenhuma oferta de nutrientes adicionais. Posteriormente, na etapa de estudo de parâmetros, o meio Mandels foi suplementado com concentrações maiores do resíduo (10 g/L e 15 g/L) para determinar sua influência sobre o rendimento enzimático em determinadas condições.

4.5 Fermentação submersa

O processo fermentativo foi conduzido em frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 500 ml, contendo um volume de 200 ml de meio de cultivo acrescido de uma concentração específica de casca de tangerina Ponkan e inóculo. O processo ocorreu ao longo de 7 dias a uma temperatura constante de 30°C, com agitação pré-determinada que variou de acordo com o experimento, sendo testados os valores de 120 rpm, 160 rpm e 200 rpm.

4.6 Protocolo de obtenção da enzima

Após o processo de fermentação, o extrato bruto contendo a enzima foi coletado e transferido para tubos Falcon de 50 ml. Cada amostra foi então centrifugada a 6000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para a análise da atividade enzimática e da concentração de proteínas totais. As amostras analisadas foram posteriormente armazenadas em um congelador a -18 °C.

4.7 Quantificação da atividade enzimática e proteínas totais

A quantificação enzimática foi realizada para determinar as atividades de β -glicosidase e α -ramnosidase, bem como a concentração de proteínas totais nos extratos enzimáticos obtidos durante as fermentações. A dosagem das enzimas é sempre feita através da medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Uma unidade internacional (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 μ mol de produto por minuto em condições específicas para cada caso. A atividade específica de uma enzima, por sua vez, é definida como a medida da atividade enzimática por unidade de massa de proteína, sendo obtida através da razão entre a atividade enzimática e a concentração de

proteínas totais da amostra de fermentação. As metodologias utilizadas para cada ensaio são descritas a seguir.

4.7.1 Atividade de α -ramnosidase

Para determinar a atividade da α -ramnosidase, foi seguido o método estabelecido por Romero et al. (1985). Inicialmente, foi combinado 0,5 ml de uma solução contendo 3,5 mM de p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosídeo (Sigma – N7763) com 0,5 ml de tampão acetato de sódio 0,1M a pH 3,5 e adicionados 0,005 ml do extrato enzimático. A mistura resultante foi incubada a 57°C por 2 minutos para promover a reação enzimática. Posteriormente, a reação foi interrompida adicionando 0,05 ml da mistura em 3 ml de solução 0,5M de NaOH e medindo as absorbâncias a 400 nm. Para corrigir eventuais interferências, um branco foi preparado, substituindo os volumes de enzima e substrato por tampão acetato de sódio. Adicionalmente, para o controle da enzima e substrato, os volumes são substituídos pelos do tampão acetato de sódio. Uma curva padrão com diferentes concentrações de p-nitrofenol (Sigma) foi realizada (Souza, 2022).

A atividade enzimática foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$Ativ. (U/ml) = \frac{\alpha * Abs * Vr * D}{Tr * Ve}$$

Onde:

- Ativ. = Valor da atividade enzimática obtida
- Abs. = Valor de absorbância da amostra.
- α : Coeficiente angular da curva padrão ($\mu\text{mol/ml}$).
- Vr: Volume total da mistura reacional.
- Tr: Tempo de incubação da reação.
- Ve: Volume de extrato enzimático utilizado na reação.
- D: Fator de diluição da amostra.

4.7.2 Atividade da β -glicosidase

Para quantificar a atividade da β -glicosidase, foi seguido o método descrito por Tan, Mayers e Saddler (1987). Este método envolve o uso de uma solução 0,1% (m/v) de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo previamente preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M

com pH 4,8 como substrato. A reação foi realizada misturando 0,4 ml da solução de pNPG (Sigma – N7006) com 0,1 ml do extrato enzimático a 50°C por 15 minutos. Após o período de incubação, a reação é interrompida com 1 ml de solução de 10% de bicarbonato de sódio e as absorbâncias são medidas a 410 nm. Um branco foi preparado para ajuste do zero do aparelho, no qual os volumes de enzima e substrato são substituídos pelo tampão acetato de sódio e para o controle de enzima e substrato, seus respectivos volumes são substituídos pelo tampão acetato de sódio. Uma curva padrão com diferentes concentrações de p-nitrofenol (Sigma) foi realizada (Souza,2022).

O cálculo da atividade enzimática foi realizado conforme descrito no item anterior.

4.7.3 Proteínas Totais

Para a quantificação das proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford (1976). Este procedimento consisti na mistura de 1 ml da solução corante de Coomassie Brilliant Blue com 0,1 ml da amostra. A reação é conduzida por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as absorbâncias são medidas a 595 nm em espectrofotômetro. Este método é amplamente reconhecido pela sua eficácia na determinação da concentração de proteínas em soluções. Os valores de absorbâncias serão convertidos em mg de proteína utilizando uma curva padrão de albumina (Souza, 2022).

A foi quantificação das proteínas totais foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$C = 1,9333 * Abs * D$$

Onde:

- C = Concentração de proteínas Totais (mg/ml)
- 1,9333 = Coeficiente angular (mg/ml)
- Abs. = Valor de absorbância da amostra.
- D: Fator de diluição da amostra.

4.7.4 Atividade específica

A atividade específica foi determinada pela razão entre a atividade média da β -glicosidase ou α -ramnosidase (expressas em U/ml) e a concentração média de proteínas totais, sendo expressa em unidades por miligrama de proteína total (U/mg).

4.8 Hidrólise da naringina

O experimento foi executado em frascos Erlenmeyer de 100 ml, providos de tampa de rosca. A reação foi conduzida empregando 0,5% de naringina (Sigma) como substrato e o sobrenadante do cultivo, contendo uma atividade de α -ramnosidase de 100 unidades por grama, tendo o volume final de 40 ml. As reações foram realizadas sob agitação constante de 200 rpm em uma incubadora rotatória, mantida a uma temperatura de 50°C por um período de 24 horas (Souza, 2022).

4.9 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os níveis de naringina e naringenina nas amostras dos ensaios de hidrólise utilizando os extratos enzimáticos brutos da fermentação submersa obtida através dos fungos filamentosos selecionados foram determinados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um detector de arranjo de diodos (DAD) com comprimento de onda de 280 nm. e uma coluna C18 de fase reversa (5 μ m x 250nm x 4,6 mm), de acordo com a metodologia proposta por Ribeiro e Ribeiro (2008). As amostras foram eluídas com acetonitrila (solvente A) e água ultrapura (solvente B), de acordo com o gradiente descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Gradiente de eluição empregado no sistema CLAE para quantificação e naringina e naringenina.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0 - 8	23	77
8 - 15	65	35
15 - 20	70	30
20 - 21	23	77
21 -22	23	77

A precisão do método foi estabelecida por meio da construção de uma curva de calibração utilizando amostras padrão de naringina (Figura 4) e naringenina (Figura 5), conforme descrito por Souza (2022). A eficiência (%) foi então determinada como a razão entre a quantidade de naringenina formada detectada no cromatograma e a quantidade de naringina detectada (convertida em concentração de naringenina) somada à concentração de

naringenina detectadas no cromatograma, multiplicada por 100 para expressar o resultado em percentual.

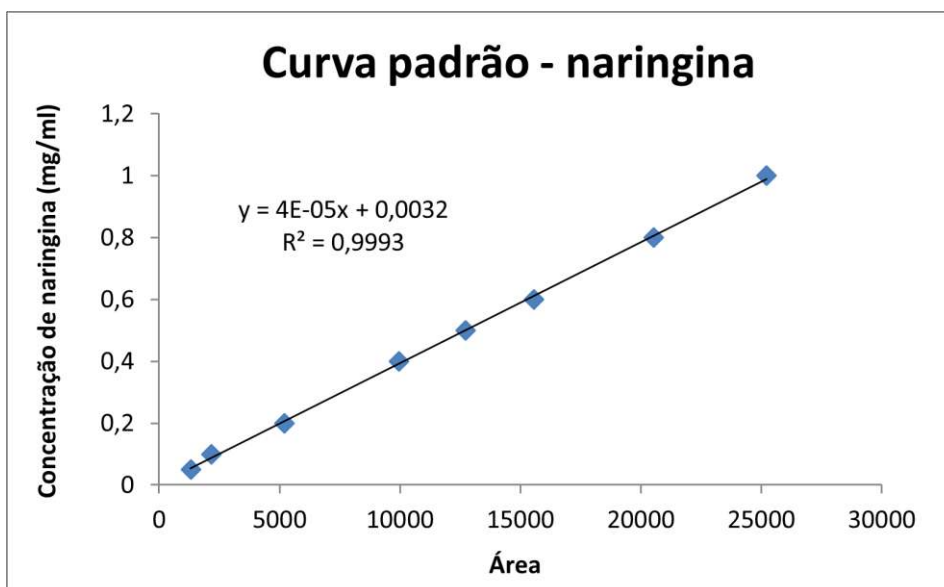


Figura 4 - Curva padrão para calibração da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, usando naringina (Sigma – 91842).

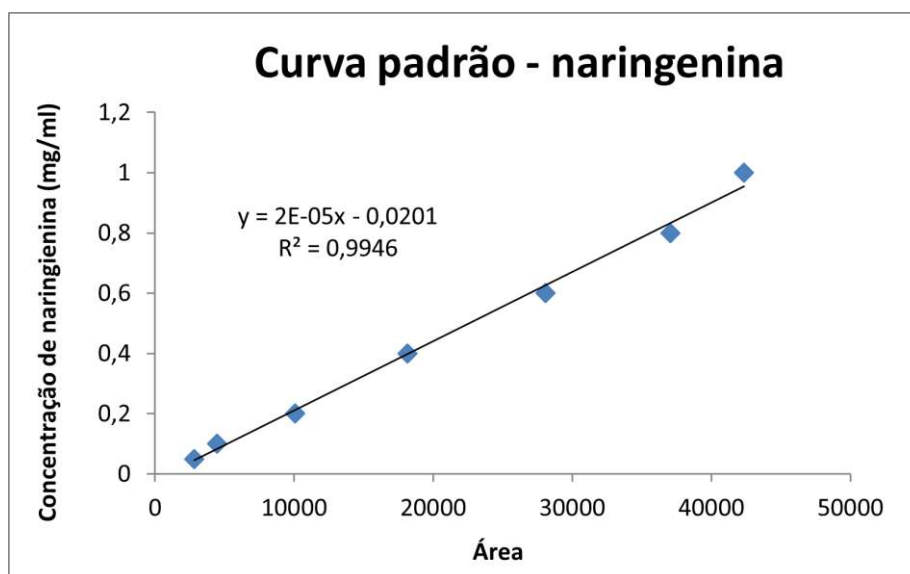


Figura 5 – Curva padrão para calibração da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, usando naringenina (Sigma – 52186).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da produção de naringinase em espécies de *Aspergillus* em fermentação submersa.

A primeira etapa do estudo teve como objetivo avaliar a atividade enzimática da naringinase através da quantificação da atividade β -glicosidase em três espécies de fungos do gênero *Aspergillus*: *A. awamori*, *A. niger*, *A. terreus*, durante 10 dias.

Os perfis de atividade β -glicosídica produzida ao longo do tempo pelo fungo *A. niger* nos três meios utilizados em fermentação submersa estão apresentados (Figura 6).

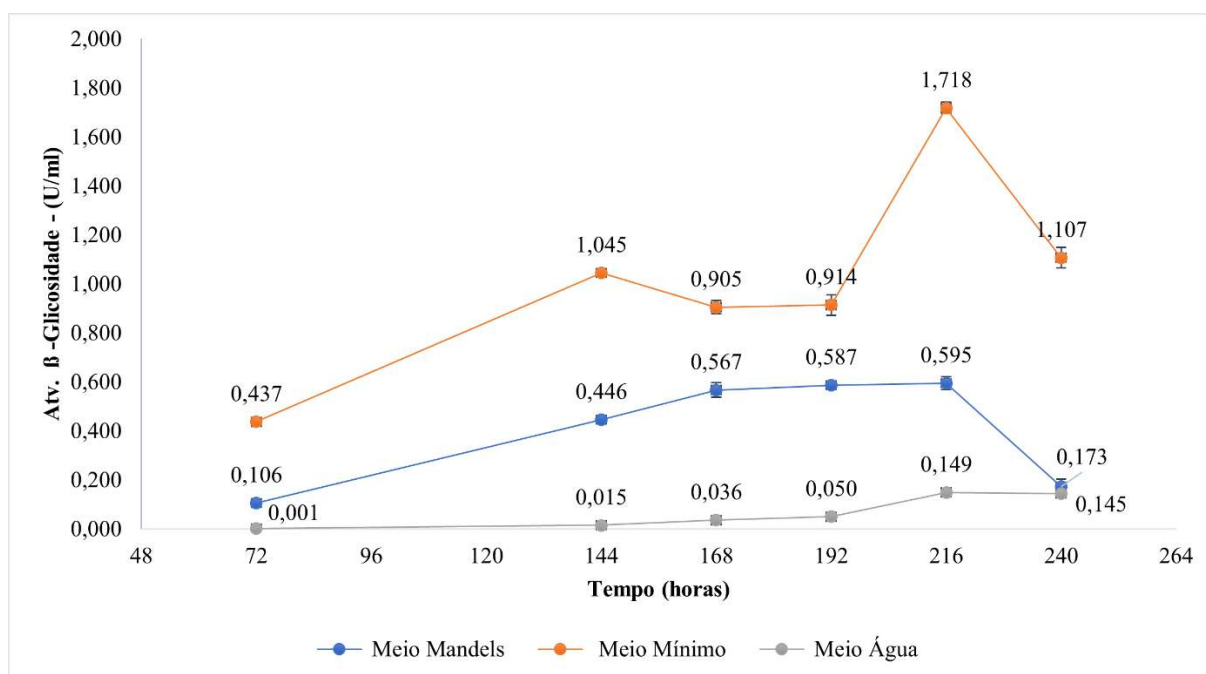


Figura 6 – Atividade de β -glicosidase (U/mL) produzida por *Aspergillus niger* cultivado com casca de tangerina Ponkan, ao longo de 240 horas de fermentação submersa.

Observou-se que o meio mínimo promoveu a maior produção da enzima, atingindo o pico de 1,718 U/ml em 216 horas de cultivo. Este comportamento sugere que, apesar da simplicidade da formulação, o meio mínimo forneceu os nutrientes essenciais em proporções adequadas, favorecendo a expressão da β -glicosidase.

O meio Mandels, proporcionou a obtenção da enzima com um alcance de atividade inferior em comparação ao meio mínimo, com valores de 0,567 a 0,595 U/ml entre 168 e 216 horas. A produção neste meio mostrou-se mais estável e gradual ao longo do tempo, embora a

atividade tenha diminuído abruptamente na última coleta (0,173 U/ml em 240 h), indicando possível inativação enzimática.

No meio com água, as atividades enzimáticas obtidas foram bastante reduzidas, com valores máximos de apenas 0,149 U/ml em 216 horas. A produção foi praticamente nula até 144 h, revelando que a casca de tangerina, utilizada como única fonte de carbono e nutrientes, foi possivelmente insuficiente para sustentar um metabolismo mais ativo do microrganismo sob estas condições.

A seguir, são apresentados os perfis de atividade β -glicosídica produzida ao longo do tempo pelo fungo *A. awamori* nos três meios utilizados em fermentação submersa (Figura 7).

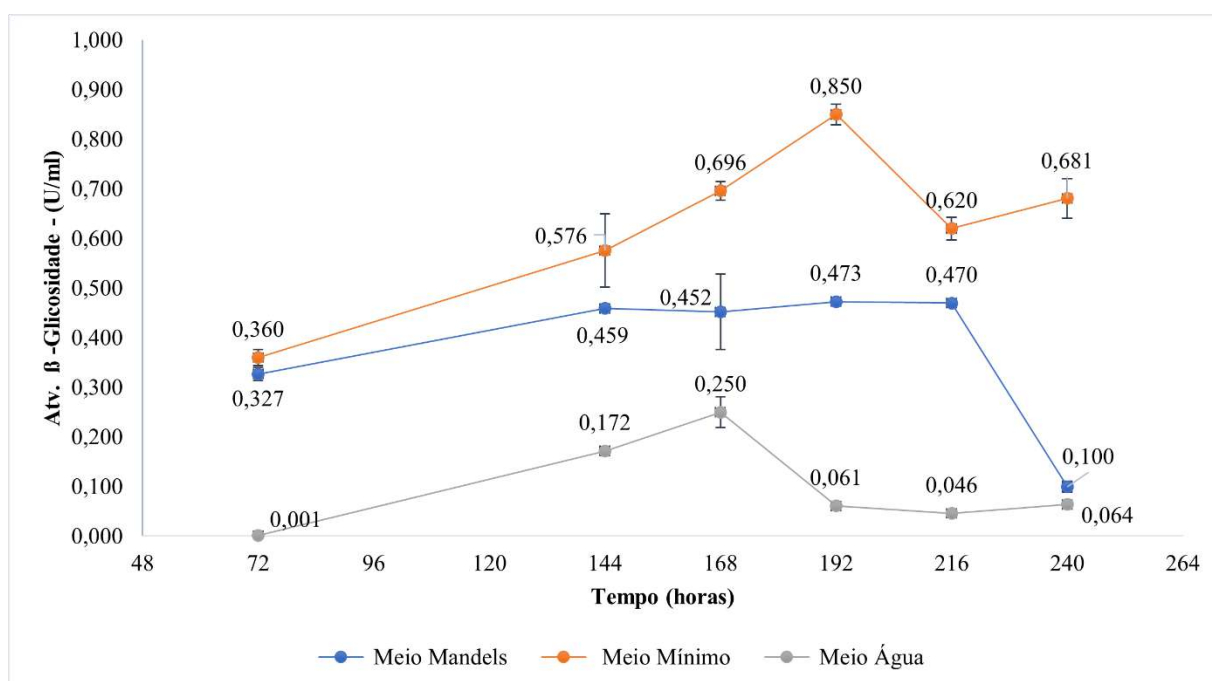


Figura 7 - Atividade de β -glicosidase (U/ml) produzida por *Aspergillus awamori* cultivado com casca de tangerina Ponkan, ao longo de 240 horas de fermentação submersa.

O meio mínimo destacou-se como o mais eficiente para a produção da enzima, apresentando um aumento progressivo da atividade até atingir o valor máximo de 0,850 U/ml em 192 horas. No entanto, quando comparado aos valores de atividade da β -glicosidase obtidos durante a fermentação submersa com *A. niger*, esse valor foi significativamente menor. A principal vantagem observada foi a redução no tempo necessário para alcançar a atividade máxima. Esse perfil indica que a composição nutricional desse meio foi adequada para estimular a síntese da β -glicosidase por *A. awamori*, possivelmente por conter nutrientes

em concentrações balanceadas, suficientes para o crescimento celular e, ao mesmo tempo, capazes de induzir a produção da enzima.

Por outro lado, o meio Mandels apresentou uma produção mais estável e moderada, com valores variando de 0,459 a 0,470 U/ml entre 96 e 216 horas, seguido por uma queda abrupta da atividade para 0,100 U/ml em 240 horas.

O meio Água, proporcionou resultados com as menores atividades enzimáticas ao longo de todo o período analisado, com pico de apenas 0,250 U/ml em 168 horas. Indicando que, embora a casca de tangerina contenha compostos que possam ser aproveitados pelo fungo, sua composição isolada não é o suficiente para sustentar uma produção enzimática significativa, reforçando a importância da suplementação nutricional para maximizar o rendimento da β -glicosidase.

De forma geral, os dados obtidos indicam que a composição do meio de cultivo exerce influência sobre a produção de β -glicosidase por *A. awamori*, sendo o meio mínimo o mais promissor entre os testados. Além disso, o tempo de cultivo também se mostrou um fator importante, com a maior atividade enzimática sendo observada em 192 horas no meio mínimo, sugerindo esse ponto como ideal para a obtenção do extrato enzimático.

A seguir, são apresentados os perfis de atividade β -glicosídica produzida ao longo do tempo pelo fungo *A. terreus* no meio Mandels em fermentação submersa (Figura 8).

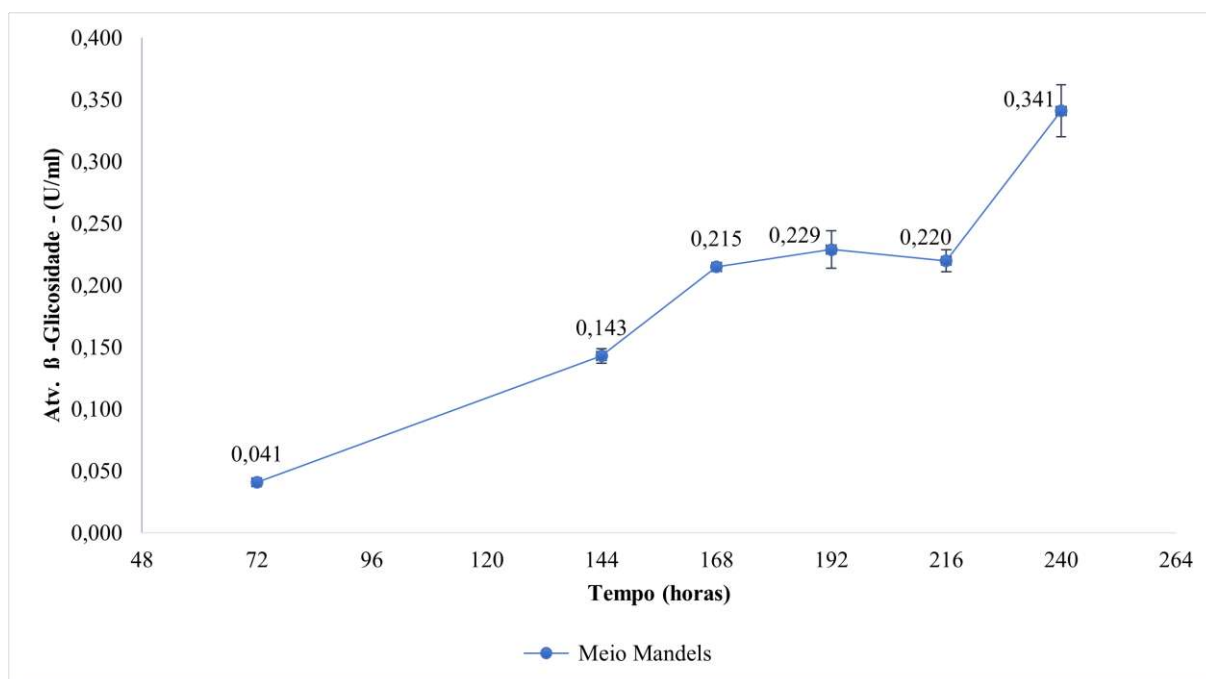


Figura 8 - Atividade de β -glicosidase (U/ml) produzida por *Aspergillus terreus* cultivado com casca de tangerina Ponkan, ao longo de 240 horas de fermentação submersa.

Observa-se um aumento progressivo da atividade de β -glicosidase no meio Mandels ao longo do tempo, indicando que esse meio foi eficaz para induzir o crescimento de *A. terreus* e para a síntese enzimática. A atividade enzimática atingiu o valor máximo de 0,341 U/ml em 240 horas. Esse comportamento sugere que a produção de β -glicosidase é contínua, sendo potencialmente dependente da fase tardia do crescimento micelial.

Em decorrência de dificuldades no cultivo de *Aspergillus terreus*, que apresentou crescimento abaixo do esperado em meio de cultivo PDA, não foi possível obter a concentração adequada de esporos, inviabilizando a condução das fermentações em meio mínimo e em água.

Após o estudo do perfil de produção foram selecionados os meios de cultivo e tempo de fermentação submersa que apresentaram as maiores atividades de β -glicosidase para cada fungo estudado (tabela 8), com o objetivo de quantificar a atividade de α -ramnosidase e utilizá-las em processos de hidrólise da naringina previamente descritas na metodologia com posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Essa seleção permitiu uma caracterização mais detalhada dos extratos enzimáticos brutos, além de viabilizar a comparação da produção da enzima entre as diferentes linhagens fúngicas estudadas.

Tabela 8 – Quantificação da atividade α -ramnosidase e β -glicosidase dos pontos selecionados e valores de pH final da FS.

Microrganismo	Meio de cultivo	Atividade de β -glicosidase (U/ml)	Atividade de β -glicosidase específica (U/mg)	Atividade de α -ramnosidase (U/ml)	Atividade de α -ramnosidase específica (U/mg)	Tempo (horas)	pH final
<i>A. niger</i>	Mandels	0,567 \pm 0,030	1,458	23,335 \pm 5,240	59,987	168	6,51
	Mínimo	1,718 \pm 0,023	2,121	7,917 \pm 0,092	17,711	216	6,55
	Água	0,149 \pm 0,003	0,723	7,293 \pm 0,055	35,402	216	5,30
<i>A. awamori</i>	Mandels	0,459 \pm 0,004	0,973	15,210 \pm 1,103	32,224	144	6,31
	Mínimo	0,850 \pm 0,021	2,121	6,500 \pm 0,184	16,209	192	6,72
	Água	0,250 \pm 0,031	3,492	6,110 \pm 0,001	63,645	168	6,72
<i>A. terreus</i>	Mandels	0,341 \pm 0,021	1,954	23,467 \pm 0,092	134,097	240	6,59
	Mínimo	*	*	*	*	*	*
	Água	*	*	*	*	*	*

* Não foi possível realizar a Fermentação submersa devido a problemas no cultivo do fungo *A. terreus*.

Para *Aspergillus niger*, observou-se a maior atividade de β -glicosidase no meio mínimo, 1,718 \pm 0,023 U/ml, com atividade específica de 2,121 U/mg, enquanto a maior atividade de α -ramnosidase foi detectada no meio Mandels com 23,335 \pm 5,240 U/ml, acompanhada de uma atividade específica de 59,987 U/mg. Esses resultados sugerem que o meio mínimo favorece a produção da β -glicosidase, enquanto o meio Mandels estimula a síntese de α -ramnosidase.

No caso de *Aspergillus awamori*, a tendência foi semelhante. A maior atividade de β -glicosidase foi registrada no meio mínimo, 0,850 \pm 0,021 U/ml, enquanto a α -ramnosidase alcançou o maior valor no meio Mandels com 15,210 \pm 1,103 U/ml. Esse resultado indica o potencial de *A. awamori* para aplicações em processos sustentáveis, com produção enzimática relevante mesmo em meio de baixo custo e ausência de nutrientes suplementares.

Para *Aspergillus terreus*, o crescimento só foi possível no meio Mandels, sendo inviável nos demais meios devido a dificuldades no cultivo. Ainda assim, os resultados obtidos foram expressivos: a atividade de β -glicosidase foi de $0,341 \pm 0,021$ U/ml, e a de α -ramnosidase foi de $23,467 \pm 0,092$ U/ml. Destaca-se a alta atividade específica de α -ramnosidase de 134,097 U/mg, o maior valor registrado entre todas as condições avaliadas, o que sugere uma elevada capacidade de secreção de α -ramnosidase em relação à secreção de outras proteínas.

No meio contendo apenas água, as atividades enzimáticas apresentadas foram reduzidas, como esperado. No entanto, a produção de α -ramnosidase manteve-se considerável, indicando uma certa capacidade do fungo de expressar enzimas mesmo sob condições nutricionalmente limitadas. A enzima produzida pelo *Aspergillus awamori* nesse meio apresentou atividade específica de β -glicosidase de 3,492 U/mg e de α -ramnosidase de 63,645 U/mg, evidenciando que, apesar da limitação nutricional, o fungo manteve a produção da enzima específica.

Em síntese, os resultados demonstram que o meio de cultivo e a espécie fúngica influenciam o perfil enzimático obtido. O meio Mandels foi o mais eficaz para a produção de α -ramnosidase, especialmente por *A. terreus* e *A. niger*, enquanto o meio mínimo se destacou para a β -glicosidase.

Ao se analisar os valores de pH inicial e final nos diferentes meios de cultivo, observa-se a capacidade metabólica dos fungos em alterar a acidez do meio, promovendo uma elevação do pH e tornando o ambiente mais favorável ao seu crescimento. No início da fermentação, os valores de pH eram de 4,22 no meio Mandels, 4,95 no meio mínimo e 6,87 no meio contendo apenas água. A tendência de aproximação dos valores ao pH neutro ao final do cultivo evidencia a adaptação e atividade metabólica dos microrganismos.

5.2 Hidrólise Enzimática da Naringina

Extratos brutos dos pontos analisados na Tabela 8 foram empregados na hidrólise da naringina (Sigma-Aldrich), seguindo a metodologia previamente descrita, e posteriormente avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O extrato bruto de *Aspergillus niger* cultivado no meio Mandels foi selecionado para os testes de hidrólise por apresentar alta atividade de α -ramnosidase em comparação com as demais amostras. O extrato de *Aspergillus terreus* no meio Mandels também foi escolhido por apresentar atividade de α -ramnosidase equivalente à observada no extrato de *A. niger* cultivado no mesmo meio. Já os extratos brutos

de *Aspergillus awamori*, obtidos nos meios Mandels, mínimo e água, foram incluídos nos testes de hidrólise devido ao menor tempo necessário para sua obtenção e por apresentarem níveis moderados de atividade de β -glicosidase e α -ramnosidase em comparação aos extratos de *A. niger* e *A. terreus*. A eficiência da hidrólise da naringinase está descrita na (Tabela 9).

Tabela 9 – Eficiência da hidrólise da naringina relativa aos pontos selecionados.

Microrganismo	Meio de cultivo	Eficiência da naringinase (%)
<i>A. niger</i>	Mandels	20,47
<i>A. awamori</i>	Mandels	17,98
	Mínimo	11,85
	Água	0,00
<i>A. terreus</i>	Mandels	3,34

Apesar de *Aspergillus awamori* ter apresentado bom desempenho na produção de β -glicosidase e α -ramnosidase, visto na (Tabela 8), sua eficiência na hidrólise da naringina foi inferior à obtida com *A. niger* no meio Mandels. Especificamente, *A. niger* apresentou a maior eficiência de naringinase, com 20,47%, enquanto *A. awamori* obteve no máximo 17,98% no mesmo meio.

Nos demais meios testados com o extrato *A. awamori*, a eficiência foi menor: 11,85% no meio mínimo e 0% no meio água. Esse resultado sugere que a presença das enzimas não garante, por si só, a eficiência do processo de hidrólise, indicando que fatores como a presença de inibidores e especificidade da enzima por outros flavonoides possa interferir no processo.

No caso de *A. terreus*, embora tenha apresentado uma boa atividade de α -ramnosidase no meio Mandels, a eficiência de hidrólise foi apenas 3,34%. Isso reforça a ideia de que talvez não houvesse a presença da β -glicosidase em níveis adequados para a conversão completa da naringina, e que haja a presença de inibidores como glicose, cellobiose e produtos de transglicosilação, e que também possa apresentar especificidade para outro flavonoide (Bohlin *et al.*, 2010). As condições da hidrólise também não estão otimizadas, e as condições escolhidas para esta primeira avaliação podem ter efeitos diferentes sobre as enzimas produzidas por cada cepa fúngica.

Desta forma, a escolha do *Aspergillus awamori* como microrganismo produtor de naringinase baseou-se em diversos fatores relevantes observados durante os experimentos. Primeiramente, destacou-se pelo menor tempo necessário para alcançar sua máxima atividade enzimática em comparação aos demais fungos avaliados, o que representa uma vantagem em processos fermentativos. Além disso, trata-se de uma espécie menos explorada na literatura científica em relação ao amplamente estudado *A. niger*, o que abre espaço para novas descobertas. O fungo *A. awamori* também apresentou níveis moderados de atividade de β -glicosidase e α -ramnosidase, além de uma eficiência satisfatória na hidrólise da naringina, revelando-se um candidato promissor para futuros estudos de otimização de parâmetros com vistas ao aprimoramento de sua produção enzimática e hidrólise.

A seleção do meio de cultivo Mandels foi fundamentada na sua capacidade de manter a atividade da β -glicosidase relativamente estável por um período de quatro dias e promover maior síntese de α -ramnosidase. Além disso a eficiência hidrólise da naringina pelo extrato enzimático do *A. awamori* produzido no meio Mandels foi maior que nos outros meios com este fungo.

Por fim, o tempo de cultivo adotado foi de 168 horas (ou 7 dias), tendo em vista que, nesse intervalo, a atividade enzimática da naringinase em meio Mandels já havia atingido ou se encontrava próxima de seu pico máximo. Tal escolha visa garantir o aproveitamento ideal da enzima, possibilitando sua aplicação eficiente em processos biotecnológicos e estudos científicos.

5.3 Estudo dos efeitos de variáveis sobre a produção de β -glicosidase por Fermentação Submersa pelo fungo *Aspergillus awamori*

Após a análise dos meios alternativos, foram conduzidos ensaios experimentais delineados conforme a matriz de planejamento fatorial fracionário, com o objetivo de estudar os efeitos dos parâmetros sobre a produção da atividade β -glicosídica. As variáveis independentes investigadas incluíram: pH inicial do meio de cultivo, concentração de esporos do inóculo, velocidade de agitação e concentração de casca no meio Mandels, utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus awamori*.

A matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} e os valores das respostas de atividade de β -glicosidase após 3 e 7 dias de cultivo estão apresentados na (Tabela 10).

Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} e os respectivos valores obtidos para as variáveis resposta.

Ensaios	pH inicial	Inóculo (e/ml)	Agitação (Rpm)	Concentração de Casca (g/L)	Dia 3 - Atividade de β -glicosidase (U/ml)	Dia 7 - Atividade de β -glicosidase (U/ml)
A	-1 (5)	-1 ($5,00 \times 10^5$)	-1 (120)	-1 (5)	0,006	0,120
B	+1 (7)	-1 ($5,00 \times 10^5$)	-1 (120)	+1 (15)	0,014	0,179
C	-1 (5)	+1 ($1,00 \times 10^7$)	-1 (120)	+1 (15)	0,027	0,238
D	+1 (7)	+1 ($1,00 \times 10^7$)	-1 (120)	-1 (5)	0,008	0,009
E	-1 (5)	-1 ($5,00 \times 10^5$)	+1 (200)	+1 (15)	0,340	0,564
F	+1 (7)	-1 ($5,00 \times 10^5$)	+1 (200)	-1 (5)	0,234	0,284
G	-1 (5)	+1 ($1,00 \times 10^7$)	+1 (200)	-1 (5)	0,186	0,253
H	+1 (7)	+1 ($1,00 \times 10^7$)	+1 (200)	+1 (15)	0,215	0,977
I	0 (6)	0 ($5,25 \times 10^6$)	0 (160)	0 (10)	0,184	0,576
J	0 (6)	0 ($5,25 \times 10^6$)	0 (160)	0 (10)	0,163	0,505

Para análise dos efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de β -glicosidase nos tempos de 3 e 7 horas foi utilizado a significância de 10%, indicado para planejamentos de seleção de variáveis. Os efeitos estão apresentados nas (Tabelas 11 e 12) para os tempos de 3 e 7 dias, respectivamente.

Tabela 11 - Efeito das variáveis sobre a atividade em 3 dias de cultivo.

	Efeito	Erro padrão	t (6)	p
Média	0,141727	0,013274	10,67704	0,000040
(1) pH	-0,022000	0,031130	-0,70671	0,506253
(2) Inóculo	-0,039500	0,031130	-1,26886	0,251492
(3) Agitação	0,230000	0,031130	7,38829	0,000315
(4) Conc. casca	0,040500	0,031130	1,30098	0,240990

* $R^2 = 0,90682$

Tabela 12 - Efeito das variáveis sobre a atividade em 7 dias de cultivo.

	Efeito	Erro padrão	t (6)	p
Média	0,370500	0,064734	5,723463	0,002278
(1) pH	0,068500	0,144749	0,473234	0,655986
(2) Inóculo	0,082500	0,144749	0,569954	0,593363
(3) Agitação	0,383000	0,144749	2,645967	0,045647
(4) Conc. casca	0,323000	0,144749	2,231455	0,076026

*R² = 0,71476

Observa-se que em 3 dias a variável agitação foi estatisticamente significativa com efeito positivo. Em 7 dias, a variável agitação demonstra ser a variável com maior efeito. Seu efeito positivo indica que o aumento da agitação promove maior atividade enzimática, possivelmente devido à melhor dispersão de nutrientes e oxigenação. A concentração de casca também possui um efeito positivo relevante, sugerindo que o aumento da quantidade de substratos e do indutor favorece a atividade enzimática.

A seguir, foram removidas do modelo as variáveis que não apresentaram significância estatística ($p > 0,10$), com o objetivo de identificar possíveis variáveis com efeitos marginalmente significativos, considerando-se como tal aquelas com valor de p entre 0,05 e 0,10. Além disso, foi realizada a análise da curvatura para avaliar a presença de uma possível região de máximo ou mínimo dentro das faixas experimentais das variáveis estudadas. As (Tabelas 13 e 14) apresentam essa análise para os cultivos com 3 e 7 dias, respectivamente.

Tabela 13 – Análise considerando as variáveis marginalmente significativas em 3 dias de cultivo.

	Efeito	Erro padrão	t (6)	p
Média	0,128750	0,012630	10,19375	0,000052
Curvatura	0,095167	0,048370	1,96746	0,096690
(2) Inóculo	-0,039500	0,025261	-1,56370	0,168920
(3) Agitação	0,230000	0,025261	9,10509	0,000099
(4) Conc. casca	0,040500	0,025261	1,60329	0,159992

*R² = 0,93864

Tabela 14 – Análise considerando as variáveis marginalmente significativas em 7 dias de cultivo.

	Efeito	Erro padrão	t (6)	p
Média	0,328000	0,057783	5,676366	0,001288
Curvatura	0,425000	0,258415	1,644639	0,151148
(3) Agitação	0,383000	0,115567	3,314098	0,016122
(4) Conc. casca	0,323000	0,115567	2,794918	0,031373

*R² = 0,78182

No cultivo em 3 dias (Tabela 13) a curvatura foi significativa indicando uma região de máximo dentro das faixas estudadas. Já para 7 dias de cultivo a curvatura não foi significativa.

5.4 Condições selecionadas após estudo das variáveis no planejamento fatorial fracionado na Fermentação Submersa.

Após as análises do planejamento experimental foram selecionados quatro novos experimentos, levando em consideração o efeito positivo das variáveis agitação e concentração de casca e o efeito positivo da curvatura. Os experimentos L, M, N e O foram nomeados sequencialmente para dar continuidade à ordem alfabética dos ensaios anteriores. Nos experimentos L e M, as variáveis que apresentaram efeito significativo e positivo após 7 dias de cultivo foram ajustadas para a condição codificada +1 (alta agitação e alta concentração de casca). As variáveis que não demonstraram efeito significativo foram fixadas em +1 no experimento L e em 0 (nível médio) no experimento M. O experimento N foi conduzido com todas as variáveis em seus valores médios (codificados como 0). Já no experimento O, as variáveis significativas foram mantidas nos valores médios (0), enquanto as não significativas foram ajustadas para a condição codificada +1. A (Tabela 15) apresenta o delineamento completo desses experimentos.

Tabela 15 – Condições selecionadas após análise do planejamento experimental para avaliação das enzimas de *Aspergillus awamori* em fermentação submersa.

Ensaio	pH inicial	Inóculo (c/ml)	Agitação (rpm)	Concentração de Casca (g/l)
L	+1 (7)	+1 ($1,00 \times 10^7$)	+1 (200)	+1 (15)
M	0 (6)	0 ($5,25 \times 10^6$)	+1 (200)	+1 (15)
N	0 (6)	0 ($5,25 \times 10^6$)	0 (160)	0 (10)
O	+1 (7)	+1 ($1,00 \times 10^7$)	0 (160)	0 (10)

Os ensaios L, M, N e O foram conduzidos sob as condições estabelecidas, e os resultados das atividades enzimáticas, atividades específicas, pH final e concentração de proteínas são apresentados na (Tabela 16).

Tabela 16 – Quantificação das atividades enzimáticas.

Ensaio	pH Final	Atividade β -glicosidase (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade α -ramnosidase (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)	Proteínas totais (mg/ml)
L	6,36	$0,441 \pm 0,021$	1,349	$316,110 \pm 15,420$	790,27	$0,327 \pm 0,001$
M	6,66	$0,447 \pm 0,009$	1,960	$284,050 \pm 19,400$	992,26	$0,228 \pm 0,001$
N	6,46	$0,340 \pm 0,005$	1,659	$278,280 \pm 14,510$	1357,91	$0,205 \pm 0,001$
O	6,35	$0,319 \pm 0,072$	1,098	$268,660 \pm 17,230$	727,43	$0,290 \pm 0,001$

A fim de verificar a eficiência das reações de hidrólise da naringina, foram selecionados os ensaios L e M., que apresentaram os melhores valores entre as atividades de α -ramnosidase (U/ml) e β -glicosidase (U/ml). A eficiência do processo foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e os resultados estão apresentados na (Tabela 17) e os cromatogramas ilustrados nas (Figuras 9 e 10).

Tabela 17 - Eficiência de conversão da naringina em naringenina (%) pelos extratos brutos de *Aspergillus awamori* obtidos em fermentação submersa utilizando meio Mandels nos ensaios L e M.

Microrganismo	Meio de cultivo	Ensaio	Eficiência da naringinase (%)
<i>A. awamori</i>	Mandels	L	52,18
		M	88,28

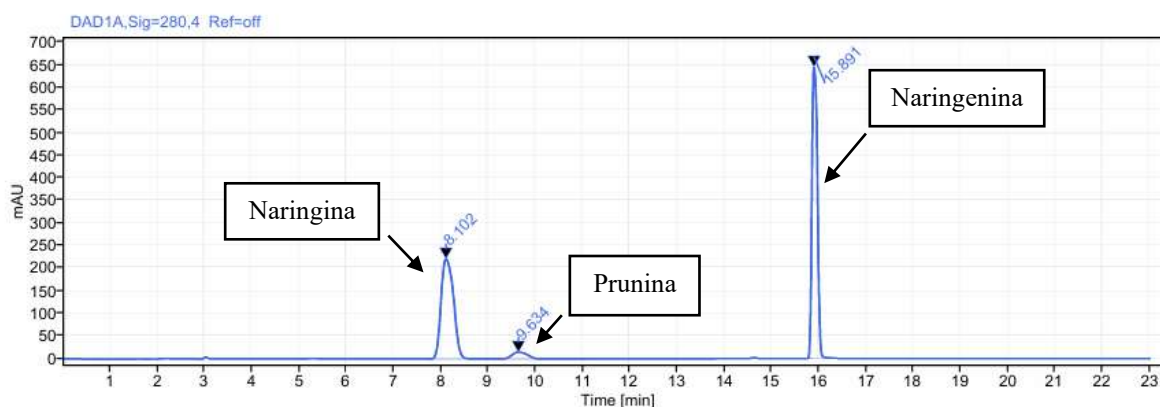


Figura 9 - Utilização do extrato bruto do Ensaio L em hidrólise da naringina, seguindo as condições estabelecidas na metodologia.

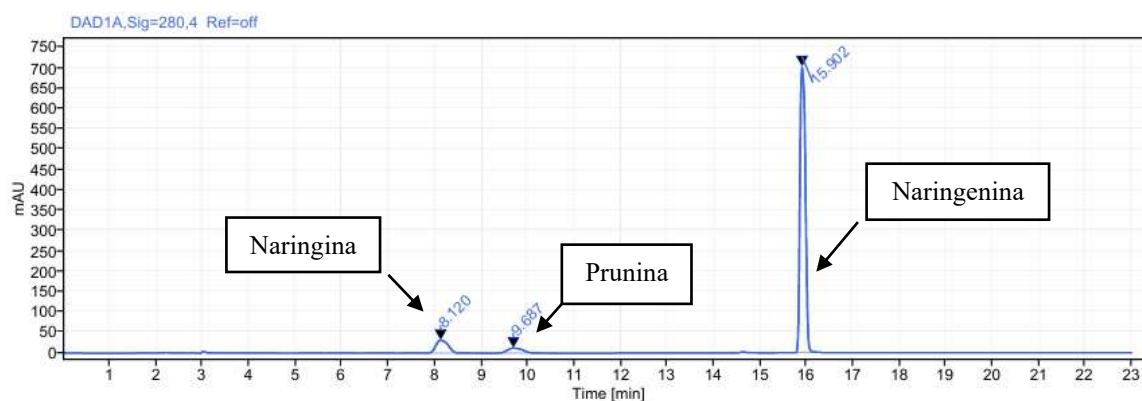


Figura 10 - Utilização do extrato bruto do Ensaio M em hidrólise da naringina, seguindo as condições estabelecidas na metodologia.

A hidrólise da naringina utilizando o extrato enzimático obtido no ensaio L (Figura 9) apresentou eficiência de 52,18%, resultando em uma concentração de naringenina de 0,084 mg/ml, conforme evidenciado pelo cromatograma. A hidrólise da naringina utilizando o extrato enzimático obtido no ensaio M (Figura 10) apresentou eficiência de 88,28%, resultando em uma concentração de naringenina de 0,093 mg/ml, conforme evidenciado pelo cromatograma.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliadas três espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* (*A. niger*, *A. awamori* e *A. terreus*) previamente selecionadas com base nos dados apresentados por Souza (2022). Na etapa de triagem quantitativa por fermentação submersa, realizada conforme descrita por Souza, os fungos apresentaram níveis distintos de atividade β -glicosidase, com valores de 0,21 U/ml para *Aspergillus niger*, 0,20 U/ml para *A. awamori* e 0,39 U/ml para *A. terreus*. A produção enzimática foi conduzida utilizando o meio proposto por Mandels e Weber (1969), modificado com a adição de naringina (sigma) como indutor específico da expressão da naringinase. Ainda segundo os dados do estudo de Souza, os valores de atividade α -ramnosidase obtidos foram de 109,98 U/ml para *A. awamori*, 102,08 U/ml para *A. terreus* e 63,71 U/ml para *A. niger*, sendo *A. awamori* a espécie que apresentou o melhor desempenho nessa etapa.

A fim de avaliar alternativas mais sustentáveis, este estudo avaliou as espécies fúngicas utilizando a casca da tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) como fonte natural de substratos e indutor da enzima estudada durante a fermentação. A composição dessa variedade de casca revela altos teores de compostos fenólicos e flavonoides, como naringina, narirutina e hesperidina, o que a torna promissora para indução de enzimas como a naringinase (Sharma *et al.*, 2016).

De maneira geral, os resíduos cítricos (cascas, sementes e bagaço) possuem potencial como fontes de compostos bioativos, sobretudo os flavonoides, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e terapêuticas. Entretanto, a liberação desses compostos está diretamente condicionada à estrutura da parede celular vegetal. Conforme relatado por Maqbool *et al.* (2023), essa estrutura é composta por uma matriz complexa de fibras insolúveis (celulose, hemicelulose e lignina) e frações solúveis como a pectina, o que dificulta a extração eficiente dos metabólitos intracelulares. Diante dessa barreira estrutural, estratégias físico-químicas vêm sendo propostas para promover a desestruturação da parede celular, como extração assistida por ultrassom, micro-ondas, tratamentos hidrotérmicos, processos enzimáticos e uso de água subcrítica (Maqbool *et al.*, 2023). Essas técnicas têm demonstrado eficácia na liberação de flavonoides, aumentando sua concentração e biodisponibilidade, aspecto fundamental para aplicações industriais em alimentos funcionais, cosméticos e fármacos.

Além da extração, a composição nutricional desses resíduos também os torna atraentes como substratos para processos fermentativos. A casca de tangerina, por exemplo, é descrita como rica em fibras, vitamina C, açúcares, óleos essenciais e pectina (Maqbool *et al.*, 2023). Esses componentes não apenas favorecem o crescimento microbiano, mas também podem atuar como fontes naturais de carbono e energia, substituindo nutrientes sintéticos em meios de cultivo.

Nesse contexto, a valorização de resíduos como a casca de tangerina, seja pela extração de compostos bioativos ou pelo seu uso como substrato fermentativo, desponta como uma abordagem viável e sustentável. Compreender a influência da estrutura vegetal na liberação desses compostos é essencial para o desenvolvimento de processos eficientes e ambientalmente responsáveis voltados à obtenção de metabólitos de alto valor agregado.

No presente estudo, ao empregar a casca de tangerina Ponkan em meio Mendel como fonte natural de indutores, os valores máximos de atividade β -glicosidase observados foram 0,567 U/ml (168 h) para *A. niger*, 0,459 U/ml (144 h) para *A. awamori* e 0,341 U/ml (240 h) para *A. terreus*. Esses valores foram superiores aos relatados por Souza (2022), exceto para *A. terreus*. Quanto à atividade α -ramnosidase, os valores obtidos — 20,33 U/ml (*A. niger*), 15,21 U/ml (*A. awamori*) e 23,44 U/ml (*A. terreus*) foram inferiores. Tal redução pode estar relacionada à menor concentração de flavonoides glicosilados na casca da tangerina Ponkan, o que limita a indução da α -ramnosidase (Abatte *et al.*, 2012). Outro fator relevante é a matriz complexa do substrato, que influencia a disponibilidade real das moléculas ao microrganismo.

Adicionalmente, o tempo necessário para atingir a atividade enzimática máxima variou entre as cepas: *A. terreus* exigiu um tempo mais prolongado, enquanto *A. awamori* e *A. niger* atingiram seus picos em menor tempo. O pH final dos cultivos variou entre 6,0 e 7,0 ficando de acordo com os dados de Souza (2022), o que indica estabilidade das condições fermentativas.

Os dados obtidos também estão em consonância com os achados de Puri e Banerjee (2000), que destacou *A. niger* como o mais eficiente entre 96 isolados testados para a produção de naringinase em cultivo submerso, especialmente com indutores como a naringina. Esse estudo também demonstrou a estabilidade térmica da enzima, que manteve 80% de sua atividade após 4 horas a 60 °C, sustentando a robustez catalítica da naringinase em condições industriais.

Corroborando esses achados, as metodologias analíticas empregadas neste trabalho, como as descritas por Romero *et al.* (1985) e Tan, Mayers e Saddler (1987), que utilizam temperaturas inferiores ao limiar de estabilidade térmica da enzima (57 °C e 50 °C, respectivamente), mostraram-se adequadas e seguras para a quantificação das atividades enzimáticas.

A composição do meio de cultivo é um dos fatores determinantes para o sucesso de processos fermentativos, impactando diretamente no crescimento microbiano, na expressão de atividades enzimáticas e na síntese de metabólitos. A formulação adequada do meio permite não apenas o atendimento das necessidades nutricionais do microrganismo, mas também a modulação de vias metabólicas específicas, que podem favorecer a produção de metabólitos primários ou secundários de interesse biotecnológico (Singh *et al.*, 2017).

Os principais componentes do meio de cultivo incluem fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, micronutrientes, vitaminas e, em alguns casos, precursores metabólicos. O carbono, sendo a principal fonte de energia e de blocos estruturais para as células microbianas, exerce papel fundamental não apenas no crescimento, mas também na regulação do metabolismo secundário (Singh *et al.*, 2017). Fontes de carbono de rápida assimilação, como a glicose, podem provocar repressão catabólica de certos metabólitos, enquanto fontes de assimilação lenta, como a lactose, são mais adequadas à produção de compostos como antibióticos (Singh *et al.*, 2017). De modo similar, a fonte e a concentração de nitrogênio influenciam substancialmente a biossíntese de metabólitos, sendo que fontes orgânicas (ex.: aminoácidos e peptona) e inorgânicas (ex.: nitrato e amônio) apresentam efeitos variáveis conforme o microrganismo e o produto-alvo. O fósforo, essencial para a formação de fosfolípidios e ácidos nucleicos, também requer atenção, visto que concentrações elevadas desse nutriente podem suprimir a produção de metabólitos secundários (Singh *et al.*, 2017).

Nesse contexto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a composição do meio de cultivo influencia a expressão das atividades enzimáticas associadas à produção de naringinase. Observou-se que o meio mínimo favoreceu a produção de β -glicosidase em *Aspergillus niger* e *A. awamori*, sugerindo que concentrações reduzidas, porém balanceadas, de nutrientes podem induzir vias metabólicas específicas para a biossíntese dessa enzima. Por outro lado, o meio Mandels promoveu maior produção de α -ramnosidase em todas as espécies avaliadas, com destaque para *A. terreus*. No entanto, as

dificuldades observadas no cultivo desta espécie inviabilizaram sua continuidade como microrganismo candidato à produção eficiente de naringinase.

Além dos aspectos bioquímicos, a formulação do meio de cultivo deve também considerar o custo dos insumos, especialmente em processos de escala industrial. O uso de matérias-primas de baixo custo, como resíduos agroindustriais, tem se mostrado uma estratégia promissora para substituição de fontes comerciais de carbono e nitrogênio, contribuindo para a sustentabilidade e viabilidade econômica do processo (Singh *et al.*, 2017). Dessa forma, o meio de cultivo constitui uma etapa essencial no desenvolvimento de processos fermentativos eficientes.

Os resultados obtidos evidenciam que a composição do meio de cultivo influencia diretamente a atividade β -glicosídica dos isolados avaliados. Observou-se que o meio mínimo proporcionou uma maior eficiência na indução da produção enzimática ao longo do tempo, em comparação com os demais meios testados. Essa maior atividade pode estar relacionada à ausência de compostos repressivos que poderiam inibir a expressão da enzima, bem como à presença de nutrientes essenciais em concentrações adequadas para o crescimento fúngico e a ativação das vias metabólicas envolvidas na síntese da β -glicosidase. Além disso, a maior disponibilidade de componentes da parede celular e de resíduos intracelulares pode ter favorecido a indução enzimática, ao fornecer substratos que estimulam a hidrólise e a expressão de enzimas relacionadas, como a β -glicosidase (Jeong *et al.*, 2021).

Por outro lado, o meio Mandels apresentou uma produção mais estável e moderada, com valores de atividade β -glicosídica variando de 0,327 a 0,473 U/ml entre 72 e 216 horas, seguido por uma queda abrupta para 0,100 U/ml em 240 horas. A estabilidade observada até 216 horas sugere que os componentes complexos presentes neste meio como peptona, extrato de levedura e sais minerais sustentaram o metabolismo fúngico durante a maior parte do processo fermentativo, reduzindo efeitos de degradação da enzima por proteases. No entanto, esses mesmos componentes não favoreceram um pico de produção enzimática, como verificado no meio mínimo. A redução acentuada da atividade ao final do cultivo pode estar associada ao esgotamento de nutrientes essenciais ou ao acúmulo de metabólitos inibitórios, que comprometem a viabilidade celular e a atividade enzimática.

Em comparação aos demais meios testados, o meio contendo apenas água apresentou os menores valores de atividade β -glicosídica ao longo do experimento. Apenas em 168 horas, durante a fermentação submersa com *Aspergillus awamori*, foi observada sua melhor resposta

enzimática, com atividade de 0,250 U/ml. Esse desempenho inferior pode estar relacionado à ausência de nutrientes essenciais para o crescimento fúngico e à indução da síntese enzimática,

Os extratos enzimáticos brutos escolhidos a partir das condições estudadas foram utilizados na hidrólise da naringina pura, e os produtos foram analisados por CLAE. A eficiência da hidrólise foi de 20,47% para *A. niger*, 17,98% para *A. awamori* e 3,34% para *A. terreus*. Nenhum dos cromatogramas revelou o intermediário prunina, sugerindo sua rápida conversão ou ausência detectável, o que pode indicar a efetividade do sistema enzimático completo, como evidenciado nas figuras em anexo 1,2 e 5. No estudo realizado por Souza (2022) foi realizado uma hidrólise ácida (2M de HCl e 0,5% de naringina com a reação ocorrendo a 80°C por 2 horas) sendo possível visualizar os picos de naringina, prunina e naringenina.

Com base nos resultados obtidos, a escolha de *Aspergillus awamori* como microrganismo produtor de naringinase foi justificada por sua capacidade de atingir rapidamente a atividade máxima e por apresentar desempenho consistente. Apesar de menos estudado na literatura, *A. awamori* demonstrou um perfil enzimático promissor, e eficiência de hidrólise comparável ao *A. niger* com os extratos produzidos em meio mínimo e meio Mandel o que pode ser visto através das tabelas 8 e 9.

Visando aprimorar as condições fermentativas, foi empregada a metodologia de planejamento fatorial fracionário, permitindo avaliar a influência simultânea de variáveis operacionais de forma eficiente. Essa abordagem possibilitou a identificação dos principais fatores que afetam a produção de β -glicosidase. Ao longo dos dez ensaios realizados, as variáveis investigadas incluíram pH inicial, concentração de inóculo, velocidade de agitação e concentração de casca. A análise estatística revelou que a velocidade de agitação foi o fator mais significativo, com efeito positivo nos tempos de 3 e 7 dias, provavelmente devido à melhora na dispersão de nutrientes e oxigenação do meio. Em complemento, a concentração de casca de tangerina apresentou efeito positivo significativo em 7 dias, e a variação na concentração de inóculo não apresentou efeito significativo sobre a atividade β -glicosídica dentro da faixa estudada. Esse resultado sugere que, nas condições avaliadas, diferentes concentrações de inóculo não influenciam de forma expressiva a produção enzimática em 3 e 7 dias, permitindo uma maior flexibilidade na escolha dessa variável sem prejuízos ao desempenho do processo.

O pH dentro da faixa avaliada (pH 5 a 7), não exerce um efeito relevante sobre a produção de β -glicosidase por *Aspergillus awamori* neste sistema. Tal comportamento pode estar associado à adaptabilidade fisiológica do microrganismo, que apresenta capacidade de crescimento e produção enzimática em uma ampla faixa de pH, particularmente em condições levemente ácidas a neutras.

A presença de curvatura no modelo de 3 dias de cultivo indica que existe uma condição ideal, ou ponto ótimo, dentro da faixa estudada das variáveis, onde a atividade de β -glicosidase tende a ser máxima. Isso sugere que os melhores resultados podem ser obtidos ajustando as variáveis para valores intermediários, próximos aos pontos centrais do experimento. Por outro lado, aos 7 dias de cultivo, o modelo apresentou comportamento linear, indicando que a atividade de β -glicosidase varia de forma proporcional ao aumento ou à redução dos níveis das variáveis, sem evidência de um ponto ótimo dentro das faixas estudadas.

Por fim, os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial fracionado permitiram identificar as melhores condições experimentais para a produção enzimática. A escolha desses parâmetros buscou explorar as faixas de variáveis que demonstraram maior potencial na triagem inicial, servindo como ponto de partida para a etapas posterior.

Os ensaios L, M, N e O foram conduzidos a partir dos efeitos encontrados, incorporando variações pontuais dos fatores: pH inicial, concentração de inóculo, agitação e concentração de casca de tangerina Ponkan.

Destacaram-se os ensaios L e M, que apresentaram os maiores valores de atividade enzimática para ambas as enzimas. Os ensaios L e M, atingiram 0,441 e 0,447 U/ml de β -glicosidase e 316,11 e 284,05 U/ml de α -ramnosidase, respectivamente. Esse desempenho pode ser atribuído à combinação de alta agitação (200 rpm) e maior concentração de casca (15 g/L), que eram as condições comuns destes dois ensaios (L e M), condições que provavelmente favoreceram tanto o crescimento do microrganismo quanto a expressão das enzimas de interesse.

Com base nesses resultados, os extratos brutos provenientes dos ensaios L e M foram utilizados nas reações de hidrólise da naringina, permitindo uma avaliação direta da eficiência biocatalítica do sistema. As análises realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) demonstraram eficiência de hidrólise consideravelmente superior no extrato do

ensaio M (88,28%) em comparação ao do ensaio L (52,18%). Este resultado corrobora os dados de atividade enzimática, indicando uma correlação positiva entre a atividade das enzimas e a conversão da naringina em seus produtos hidrolisados.

Assim, as condições testadas no ensaio M mostraram-se mais adequadas para a produção de naringinase por *Aspergillus awamori* em fermentação submersa, representando um ponto de partida promissor para estudos subsequentes.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a viabilidade da produção de naringinase por fungos filamentosos utilizando a fermentação submersa com casca de tangerina Ponkan como substrato indutor. A partir dos objetivos específicos propostos, foi possível alcançar os seguintes resultados:

- A produção de α -ramnosidase e β -glicosidase foi influenciada pela composição do meio de cultivo. O meio Mandels favoreceu a produção de α -ramnosidase, especialmente por *Aspergillus terreus*, enquanto o meio mínimo induziu a produção de β -glicosidase por *A. niger* e *A. awamori*, evidenciando o papel dos nutrientes na regulação metabólica das vias biossintéticas enzimáticas.
- A cepa mais promissora foi *Aspergillus awamori*, que apresentou atividade de β -glicosidase máxima em tempo menor e manteve o desempenho mesmo em condições nutricionalmente limitadas. Apesar do *A. niger* apresentar melhor rendimento na hidrólise, o menor tempo de cultivo de *A. awamori* tornou essa cepa mais atrativa em termos de produtividade e economia de tempo.
- As condições de cultivo influenciaram significativamente a produção enzimática. As melhores condições determinadas foram: agitação de 200 rpm, concentração de inóculo de $5,25 \times 10^6$ esporos/ml, pH inicial 6 e 15 g/L de casca de tangerina. Esses parâmetros proporcionaram um ambiente ideal para o desenvolvimento fúngico e a produção de naringinase.
- A eficiência de hidrólise da naringina pelos extratos enzimáticos foi confirmada por análise por CLAE, validando a funcionalidade biocatalítica dos extratos obtidos. A casca de tangerina mostrou-se um substrato eficaz e sustentável, alinhando-se aos

princípios da economia circular ao promover o reaproveitamento de resíduos agroindustriais.

Dessa forma, o estudo reforça que a seleção da cepa, a caracterização dos extratos enzimáticos e o entendimento das variáveis de cultivo são etapas fundamentais para o desenvolvimento de processos fermentativos otimizados e com potencial aplicação industrial.

Como perspectivas futuras, destaca-se a implementação de biorreatores com controle automatizado, a imobilização das enzimas para reuso, e o aprofundamento dos estudos com meio mínimo visando à maximização da produção enzimática.

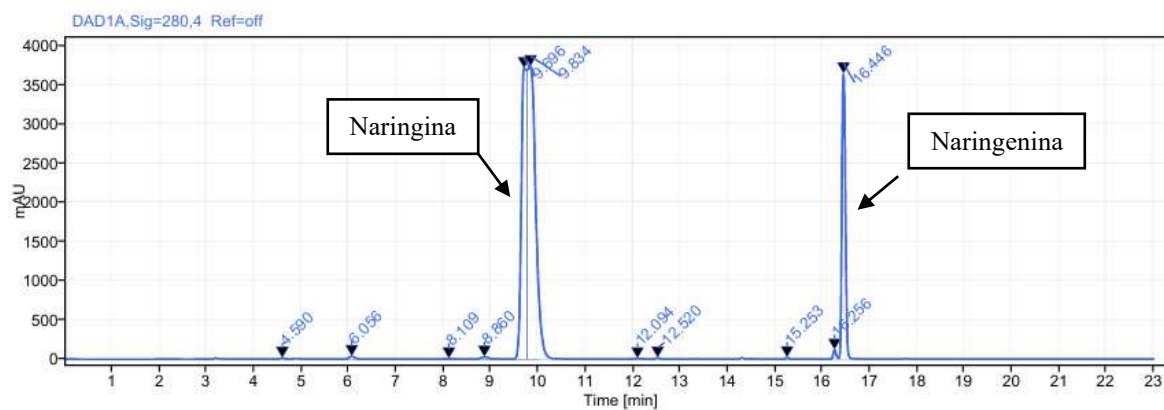
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbate, E., Palmieri, R., Todaro, A., Blanco, R. M., Spagna, G. (2012). Production of a α -l-rhamnosidase from *aspergillus terreus* using citrus solid waste as inducer for application in juice industry. The italian association of chemical engineering. 27.
- Boczniewicz, Joanna B., Garncarek, Z. (2022). Naringinase biosynthesis by *Aspergillus niger* on an optimized medium containing red grapefruit albedo. Molecules. 27, 8763.
- Bohlin, C., Olsen, S. N., Morant, M. D., Patkar, S., Borch, k., Westh, P. (2010). A comparative study of activity and apparent inhibition of fungal β -glucosidases. Biotechnology and Bioengineering. 107, 6, 943–952.
- Borkar, V., Chakraborty, S., Gokhale, J. S. (2021). Fermentative production of naringinase from *Aspergillus niger van tieghem mtcc 2425* using citrus wastes: process optimization, partial purification, and characterization. Biochemistry and Biotechnology. 193, 1321–1337.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72, 1-2, 248-254.
- Cao, H., Chen, X., Jassbi, A. R., Xiao, J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. Biotechnology Advances 33, 214–223.
- CEAGESP (2025). Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. Hortipedia, tangerina. Disponível em <https://ceagesp.gov.br/hortiescolha/hortipedia/tangerina/>. Acesso em 29/07/2025.
- Cortez, D. V., Castro, H. F., Andrade, G. S.S. (2016). Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. Quim. Nova. 40, 1, 85-96.
- Chen, H., Wang, L. (2017). Enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. Technologies for biochemical conversion of biomass. 10, 65-99.
- Fernandes, B. C. (2010). Desenvolvimento histórico da citricultura. Trabalho de conclusão de curso. UNESP. Faculdade de Ciências e Letras.
- He, F. J., Nowson, C. A., Lucas, M., MacGregor, G. A. (2007). Increased consumption of fruit and vegetables is related to a risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. J. Hum. Hypertens. 21, 717–728.
- Housseiny, M. M., Aboelmagd, H. I. (2018). Nano-encapsulation of naringinase produced by *Trichoderma longibrachiatum* atcc18648 on thermally stable biopolymers for citrus juice debittering. Journal of Microbiology. 57, 6, 521–531.
- Houssain, S. Z., Nasser, B., Qadri, T., Fatima, T, Bhat, T. A (2021). Fruits grown in highland regions of the himalayas. Springer Nature Switzerland AG. 18, 229-244.
- IBGE (2023). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA. Tabela 1613: Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>. Acesso em 29/07/2025.

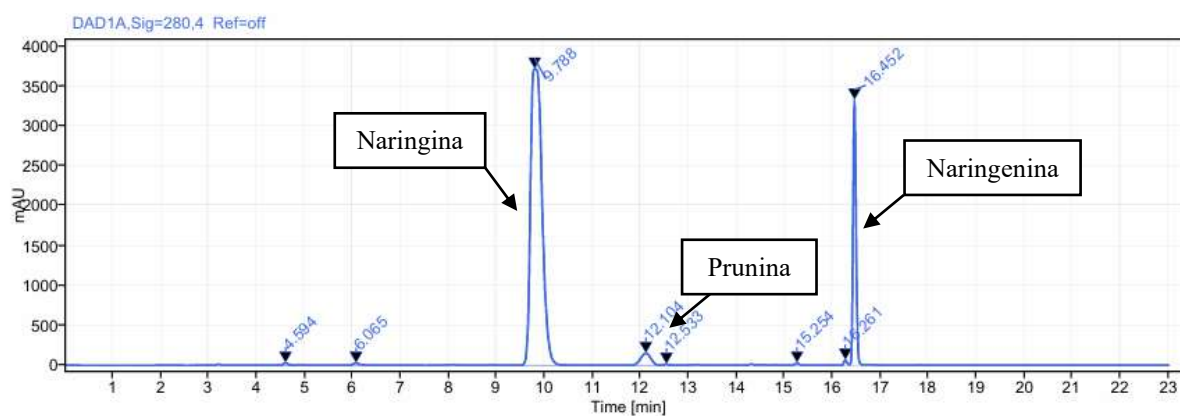
- Jeong, D., Park, H., Jang, B. K., Ju, Y., Shin, M. H., Kim, S. R. (2021) Recent advances in the biological valorization of citrus peel waste into fuels and chemicals. *Bioresource Technology*, 323, 124603.
- Landau, E. C., Silva, G. A., Moura, L., Hirsch, A., Guimarães, D. P. (2020). Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas. *EMBRAPA*. 4, 1775 – 2171.
- Luo, J., Li, Q., Liu, X., Sun, X., Tian, J., Fei, X., Shi, F., Zhang, N. (2019). The study of the characteristics and hydrolysis properties of naringinase immobilized by porous silica material. *The Royal Society of Chemistry*. 9, 4514.
- Mandels, M., Weber, J. (1969). The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*. 95, 391-414.
- MAPA (2017). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agenda estratégica – Citricultura. Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/agendas/arquivos/citricultura.pdf/view>. Acesso em 29/07/2025.
- Maqbool, Z., Khalid, W., Atiq, H. T., Koraqi, H., Javaid, Z., Alhag, S. K., Al-Shuraym, L. A., Bader, D. M. D., Almarzuq, M., Afif, M., AL-Farga, A. (2023). Citrus waste as source of bioactive compounds: extraction and utilization in health and food industry. *Molecules*. 28, 1636.
- Mulvihill, E. E.; Huff, M. W. (2010). Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. *Can. J. Cardiol*. 26, 17–21.
- Nascimento, R. P., Coelho, M. A. Z., Ribeiro, B. D., Pereira, K. S. (2017). *Microbiologia industrial: bioprocessos*. Elsevier. 1, 8.
- Nazir, M., Iram, A., Cekmecelioglu, D., Demirci, A. (2023). Approaches for producing fungal cellulases through submerged fermentation. *Front. Biosci*. 16, 5.
- Ni, H., Xiao, A., Wang, Y. Q., Chen, F., Cai, H. N., Sun, W. J. (2013). Development and evaluation of an HPLC method for accurate determination of enzyme activities of naringinase complex. *American Chemical Society*. 61, 10026–10032.
- Puri, M., Banerjee, U. C. (2000). Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Elsevier. Biotechnology Advances*. 18, 207–217.
- Rensheng, X., Yang, Y., Weimin, Z. (2012). *Introduction to natural products chemistry*. Science Press. CRC Press. 1–6.
- Riaz, S., Maan, A. A., Butt, M. S., Khan, M. K. I. (2024). Valorization of agricultural residues in the development of biodegradable active packaging films. *Industrial Crops & Products*. 215, 118587.
- Ribeiro, M. H. (2011). Naringinases: occurrence, characteristics, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90, 1883–1895.
- Ribeiro, D. S., Henrique, S. M., Oliveira, L. S., Macedo, G. A., Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 45, 635–641.
- Ribeiro, I. A., Ribeiro, M. H. L. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*. 19, 4, 432-438.
- Romero, C., Manjón, A., Bastida, J., Iborra, J. L. (1985). A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical biochemistry*. 149, 2, 566-571.
- Saini, R. K., Ranjit, Arina, Sharma, K., Prasad, P., Shang, X., Gowda, K. G. M., Keum, Y. S. (2022). Bioactive compounds of citrus fruits: a review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes. *MDPI*. 11, 239.
- Salunkhe, J. D., Pulidindi, I. N., Patil, V. S., Patil, S. V. (2024). *Neurospora sp.* mediated synthesis of naringenin for the production of bioactive nanomaterials. *MDPI. Bioengineering*. 11, 510.
- Satari, B., Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Elsevier. Resources, Conservation e Recycling*. 129. 153-167.
- Selim, M. S., Elsoud, M. M. A., Sanad, M. N. M. E., Elattal, N. A., Rifaat, H. M., Mohamed, S. S. (2023). Enzymatic debittering of citrus juices: optimization, modeling, and characterization of naringinase production from marine *Bacillus subtilis* strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 53, 102853.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Elsevier. Food Research International*. 132, 109114.

- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in Microbiology*. 7, 2087.
- Souza, E. F. (2022). Produção de naringinase por fermentação em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Shanmugaprakasha, M., Kumar, V. V., Hemalatha, M., Melbia, V., Karthik, P. (2011). Solid state fermentation for the production of debittering enzyme naringinase using *Aspergillus niger* mtcc 1344. *Eng. Life Sci.* 11, 3, 322-325.
- Shanmugaprakasha, M., Vinothkumarb, V., Ragupathya, J., Amala, D. R. (2015). Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from *Aspergillus brasiliensis* mtcc 1344. *International Journal of Biological Macromolecules*. 80, 418–423.
- Sharma, K., Mahato, N., Cho, M. H., Lee, Y. R. (2016). Converting citrus wastes into value-added products: economic and environmently friendly approaches. Elsevier. *Nutrition*. 34, 29-46.
- Sharma, P., Vishvakarma, R., Gautam, K., Vimal, A., Gaur, V. K., Farooqui, A., Varjani, S., Yonus, K. (2022). Valorization of citrus peel waste for the sustainable production of value-added products. Elsevier. *Bioresource Technology*. 351, 127064.
- Shilpa, V. S., Shams, R., Dash, K. K., Pandey, V. K., Dar, A. H., Mukarram, S. A., Harsanyi, E., Kovacs, B. (2023). Phytochemical properties, extraction, and pharmacological benefits of naringin: a review. *MDPI. Molecules*. 28, 5623.
- Tan, L. U. L., Mayers, P., Saddler, J. N. (2011) Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 33, 8, 689-692.
- Teva, A., Moraes, A. M. L., Ribeiro, F. C., Fernandez, J. C. C., Nogueira, J. M. R., Carneiro, L. A. D., Miguel, L. F. S., Oliveira, M. B. S. C., Stephens, P. R. S., Paes, R. A., Silva, V. L., Holanda, V. L. (2009). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. *Micologia*. 4, 4, 399.
- Uçar, K., Goktas, Z. (2023). Biological activities of naringenin: A narrative review based on *in vitro* and *in vivo* studies. Elsevier. *Nutrition Research*. 119, 43–55.
- USDA (2024). Departamento de Agricultura dos EUA. Citrus: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service. Disponível em <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade-07252024>. Acesso em 29/07/2025.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., Miron, A. (2016). Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1, 29–45.
- Yafetto, L. (2022). Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, e09173.
- Zhang, F., Wang, X., Pan, L., Wang, Z. (2024). Homologous expression of *Aspergillus niger* α -l-rhamnosidase and its application in enzymatic debittering of Ougan juice. *Biotechnol Lett.* 46, 1187–1198.
- Zhu, Y., Jia, H., Xi, M., Xu, L., Wu, S., Li, X. (2017). Purification and characterization of a naringinase from a newly isolated strain of *Bacillus amyloliquefaciens* 11568 suitable for the transformation of flavonoids. *Food Chemistry*. 214, 39–46.

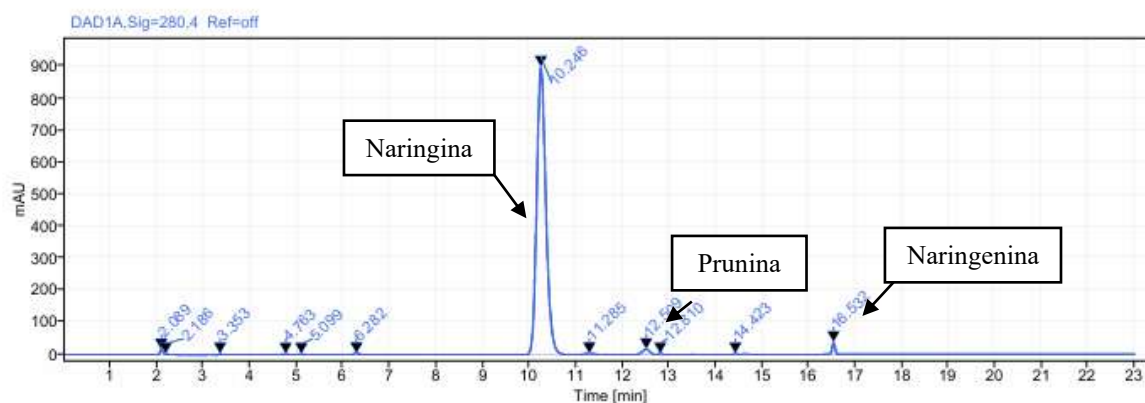
9. ANEXOS



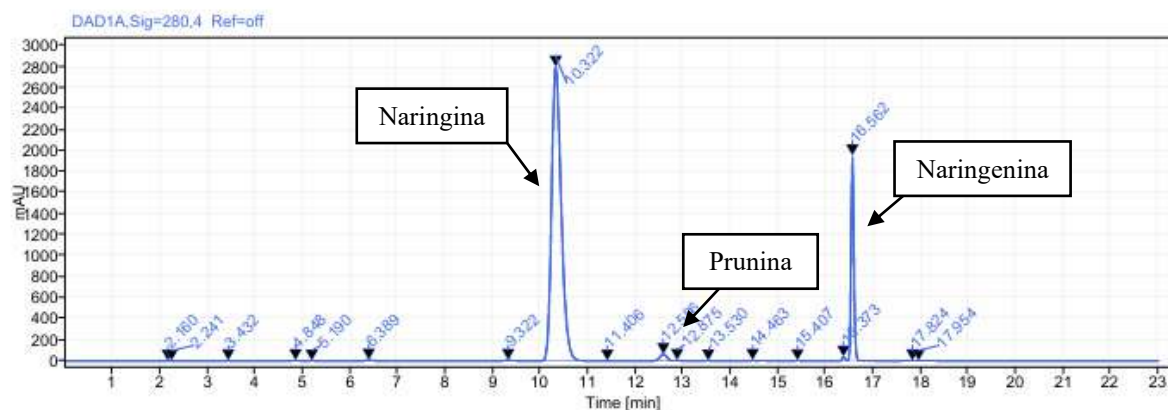
Anexo 1 - Cromatograma da hidrólise enzimática após 24 horas. Utilização do extrato de *A. niger* (168 h) em meio Mandels com atividade de α -ramnosidase de 100 U/g.



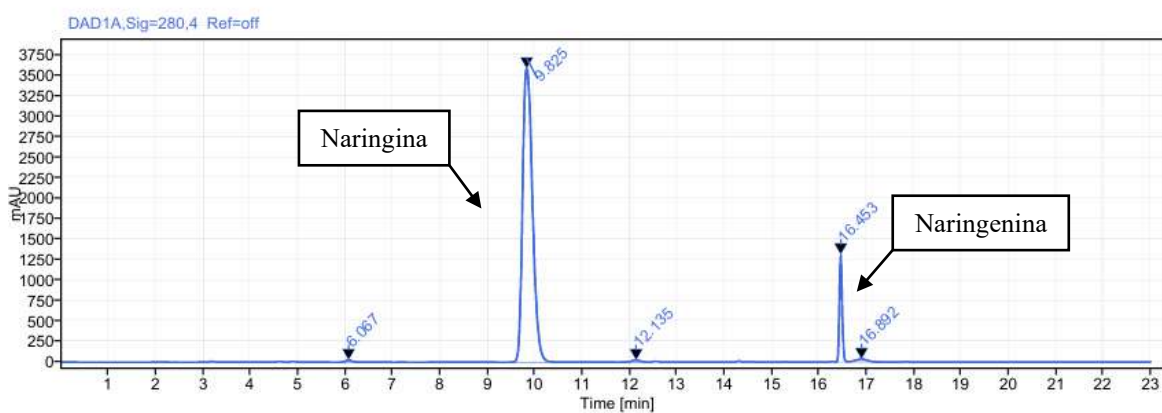
Anexo 2 - Cromatograma da hidrólise enzimática após 24 horas. Utilização do extrato de *A. awamori* (144 h) em meio Mandels com atividade de α -ramnosidase de 100 U/g.



Anexo 3 - Cromatograma da hidrólise enzimática após 24 horas. Utilização do extrato de *A. awamori* em meio água (168 h) com atividade de α -ramnosidase de 100 U/g.



Anexo 4 - Cromatograma da hidrólise enzimática após 24 horas. Utilização do extrato de *A. awamori* em meio mínimo (192h) com atividade de α -ramnosidase de 100 U/g.



Anexo 5 - Cromatograma da hidrólise enzimática após 24 horas. Utilização do extrato de *A. terreus* (240 h) em meio Mandels com atividade de α -ramnosidase de 100 U/g.