

SIMEALI

IV Simpósio de Engenharia
de Alimentos

Biotecnologia de alimentos, tratamento
e aproveitamento de subprodutos

1
Volume



A Cadeia Produtiva de
Alimentos e os Desafios
dos Novos Tempos

.....

Claudia Regina Vieira
Érika Endo Alves
Neide Judith Faria de Oliveira
Roberta Torres Careli

ORGANIZAÇÃO:

ICA
INSTITUTO
DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

SIMEALI 4.0



SIMEALI

IV Simpósio de Engenharia
de Alimentos

Biotechnology of foods, treatment and utilization of by-products

1
Volume



A Cadeia Produtiva de Alimentos e os Desafios dos Novos Tempos

.....

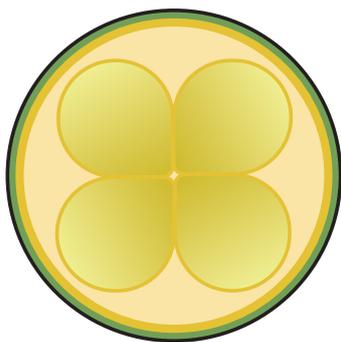
Claudia Regina Vieira
Érika Endo Alves
Neide Judith Faria de Oliveira
Roberta Torres Careli

ORGANIZAÇÃO:

ICA
INSTITUTO
DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

SIMEALI 4.0



SIMEALI

IV Simpósio de Engenharia
de Alimentos

MONTES CLAROS, 11 A 13 DE AGOSTO DE 2021

INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

EDITORES:

Claudia Regina Vieira

Érika Endo Alves

Neide Judith Faria de Oliveira

Roberta Torres Careli

ORGANIZAÇÃO:

ICA
INSTITUTO
DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

APOIO:



ISBN – 978-65-88389-07-2

Copyright © 2021 Claudia Regina Vieira, Érika Endo Alves,
Neide Judith Faria de Oliveira, Roberta Torres Careli.

Diagramadores: Claudia Regina Vieira e Priscylla Isis de Oliveira.

Fotografias: Claudia Regina Vieira

Direitos reservados dessa edição à
Claudia Regina Vieira, Érika Endo Alves,
Neide Judith Faria de Oliveira, Roberta Torres Careli.

Avenida Universitária, 1000
39 404 – 547 – Montes Claros, MG – Brasil
Tel: +55 38 2101 7710
Fax: +55 38 2101 7753
E-mail: organizacao.simeali@gmail.com
Web site: www.simeali.com

Todos os direitos reservados. A reprodução não autorizada dessa publicação,
no todo ou em parte, constitui violação do *copyright* (Lei nº 9.610/98).

Os conceitos emitidos neste e-book são de inteira responsabilidade dos autores.

1ª Edição - 2021

Vieira, Claudia Regina (org.).

V658b
2021 Biotecnologia de alimentos, tratamento e aproveitamento de subprodutos
[recurso eletrônico] / Claudia Regina Vieira, Érika Endo Alves, Neide Judith Faria
de Oliveira e Roberta Torres Careli (organizadoras). Montes Claros: ICA/UFMG,
2021.

205 p. : il.

Inclui referências.
ISBN: 978-65-88389-07-2

1. Alimentos -- Biotecnologia. 2. Alimentos -- Análise. 3. Bebidas
fermentadas. 4. Fermentação. I. Alves, Érika Endo (org.). II. Oliveira, Neide Judith
Faria de (org.). III. Careli, Roberta Torres (org.). III. Instituto de Ciências Agrárias
da UFMG. V. Título.

CDU: 57.08

Apresentação

O IV SIMEALI - SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS teve como objetivo a busca por avanços na área de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos, apresentando temas atuais relacionados à área, especialmente no que se refere à cadeia produtiva de alimentos, à Indústria 4.0 e aos desafios dos novos tempos.

O IV SIMEALI ocorreu entre os dias 11 e 13 de agosto de 2021, excepcionalmente no formato *online*, devido à pandemia da COVID-19, e contou com a participação da Comissão Organizadora, incluindo o Comitê científico, composta por trinta e quatro integrantes: quatorze docentes do ICA/UFMG; seis docentes/pesquisadores de diferentes instituições de Ensino e Pesquisa do Brasil (Embrapa Agroindústria de Alimentos, UERGS, UESB, USP e UFG); quatro servidores técnicos administrativos do ICA/UFMG; oito discentes de Graduação do ICA/UFMG e dois discentes de Pós-Graduação do ICA/UFMG.

Colaboraram com o Simpósio dezenove conferencistas de diferentes Instituições, na realização de seis palestras de temas variados – D.Sc. Fabiana Cunha Viana Leonelli (FZEA/USP), D.Sc. Fausto Makishi (ICA/UFMG), CEO Gabriel Alves Machado (FaçaAgora), Marta Duran Fernandez (Especialista em Tecnologia da Informação), D.Sc. Nilda de Fátima Ferreira Soares (UFV) e D.Sc. Uelinton Manoel Pinto (USP) – e na realização de treze minicursos: D.Sc. Alcinei Místico Azevedo (ICA/UFMG); D.Sc. Bárbara Santos (PADRONIZA); D.Sc. Christian Dias Cabacinha (ICA/UFMG); M.Sc. Deborah Lelis (UNIMONTES); D.Sc. Eduardo Spers (USP); D.Sc. Gabriela da Rocha Lemos Mendes (ICA/UFMG); Eng. Isabela Garcia (Nestlé); D.Sc. Junio Cota (ICA/UFMG); D.Sc. Mariana Zanatta; D.Sc. Rosires Deliza (Embrapa Agroindústria de Alimentos); M.Sc. Sabrina Ferreira (UNIMONTES); Eng. Verônica Rufato e Wilson Fogaça (Escola Yokoten).

Nesta edição, contamos com a participação de 366 congressistas inscritos, oriundos de diferentes localidades do Brasil e com a submissão de 105 trabalhos científicos, dos quais 92 foram aprovados e se encontram disponíveis neste *E-book*.

O processo de avaliação foi realizado via Plataforma Even3® e contou com a colaboração de 138 avaliadores de diferentes instituições de Ensino e Pesquisa do País, de subáreas diversificadas e afins às áreas de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos.

O presente *E-book* está dividido em seis volumes, correspondentes às áreas temáticas: Biotecnologia de alimentos, tratamento e aproveitamento de subprodutos; Controle de qualidade: análise sensorial, química de alimentos e análise de alimentos; Engenharia: desenvolvimento, modelagem, simulação, controle e automação de processos e operações; Nutrição: alimentos e saúde, alimentos funcionais, fortificação de alimentos, rotulagem obrigatória; Segurança dos alimentos: microbiologia de alimentos, higiene em indústria de alimentos e toxicologia de alimentos; Tecnologia de alimentos: embalagens de alimentos, desenvolvimento e processamento de alimentos.

Os capítulos possuem como tema central os desafios enfrentados pela cadeia produtora de alimentos e representam o compartilhamento do conhecimento entre pesquisadores, professores, profissionais e acadêmicos de Cursos Técnicos, Graduação e Pós-Graduação das áreas de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos, Nutrição, Ciências Agrárias e demais áreas afins da região Norte de Minas Gerais e demais regiões do Brasil.

Claudia Regina Vieira
Coordenadora do IV SIMEALI



Instituto de Ciências Agrárias
Foto: Cláudia Vieira
Novembro de 2021

Agradecimentos

Aos autores, por compartilharem os resultados de suas pesquisas e possibilitarem a publicação deste *E-book*.

Aos avaliadores, pelas correções, sugestões e contribuições valiosas para o aprimoramento dos trabalhos avaliados.

Aos apoiadores e patrocinadores, pela confiança depositada e pela concessão de recursos que viabilizaram a realização do IV SIMEALI.

À Organização, pelo trabalho árduo, comprometimento e dedicação na realização do evento.

A todos os inscritos no IV SIMEALI, razão principal de nossos esforços e dedicação para realizar o evento, mesmo que à distância.

Aos servidores do Setor de Informática do Instituto de Ciências Agrárias, em especial, ao servidor técnico administrativo Roberto Versiani Santos Júnior, pelo suporte providencial durante a realização do IV SIMEALI.

A todos que, de alguma uma forma, tornaram possível a realização do IV SIMEALI e, por conseguinte, a publicação deste *E-book*.

Nossos sinceros agradecimentos.

Claudia Regina Vieira
Coordenadora do IV SIMEALI

Érika Endo Alves
Subcoordenadora do IV SIMEALI

Instituto de Ciências Agrárias
Foto: Claudia Vieira
Novembro de 2021



Organização

Coordenação Geral

Claudia Regina Vieira – Docente (ICA/UFMG)

Érika Endo Alves – Docente (ICA/UFMG)

Comitê Científico

Alessandra Lopes de Oliveira - Docente (FZEA/USP)

Clarissa Damiani – Docente (UFG)

Cristiane Patrícia Oliveira – Docente (UESB)

Júnia Capua de Lima Novello - Docente (UERGS)

Maximiliano Soares Pinto – Docente (ICA/UFMG)

Neide Judith Faria de Oliveira – Docente (ICA/UFMG)

Roberta Torres Careli – Docente (ICA/UFMG)

Virgínia Martins da Matta – Pesquisadora (EMBRAPA Agroindústria de Alimentos)

Comissão Organizadora

Bruna Mara Aparecida de Carvalho Mesquita – Docente (ICA/UFMG)

Carla Adriana Ferreira Durães Pinheiro – Técnica (ICA/UFMG)

Caroline Liboreiro Paiva – Docente (ICA/UFMG)

Danielle Soares Malveira – Docente (FUNORTE)

Gabriela da Rocha Lemos Mendes – Docente (ICA/UFMG)

Hugo Calixto Fonseca – Técnico (ICA/UFMG)

Igor Viana Brandi – Docente (ICA/UFMG)

Janaína Teles de Faria – Docente (ICA/UFMG)

Juliana Pinto de Lima – Docente (ICA/UFMG)

Mariuze Loyanny Pereira Oliveira – Técnica (ICA/UFMG)

Milton Nobel Cano Chauca – Docente (ICA/UFMG)

Sandro Braga Soares – Técnico (ICA/UFMG)

Sérgio Henrique Souza Santos – Docente (ICA/UFMG)

William James Nogueira Lima – Docente (ICA/UFMG)

Comitê Discente

Aline Lopes Nascimento – Mestrado em Alimentos e Nutrição (ICA/UFMG)

Ane Caroline Silva – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

Ana Flávia Dias Costa – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

Caroline Batista dos Santos – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

Fernanda Santos Barros – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

Isabela Parolis Martins – Mestrado em Produção Animal (ICA/UFMG)

Lucélio Alves Marques Costa – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

Maria Clara Orsine Lopes de Castro – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

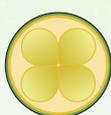
Maria Izabel de Jesus Viana – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

Maria Luiza de Freitas Paiva – Graduação em Engenharia de Alimentos (ICA/UFMG)

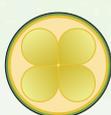
Sumário

Volume 1 - Biotecnologia de Alimentos; Tratamento e Aproveitamento de Subprodutos

Capítulo 1	11 - 23
Análise físico-química e sensorial de doce elaborado com casca do maracujá do mato (<i>Passiflora cincinnata</i>). <i>Isabela Rosa Rocha Machado; Beatriz Megume Rodrigues Matsuki; Marco Ferreira dos Santos; Cristiane Oliveira Correia; Igor Viana Brandi; Milton Nobel Cano Chauca.</i>	
Capítulo 2	24 - 39
Avaliação da formação de biofilme e produção de metabólitos de interesse por <i>Bacillus</i> spp. isoladas de leite UHT. <i>Nayara Aparecida da Silva Costa; Raiane Rodrigues da Silva; Isabella Maria Fernandes Botelho Moreira; Rosângela de Freitas; Antônio Fernandes de Carvalho, Solimar Gonçalves Machado.</i>	
Capítulo 3	40 - 51
Avaliação da cor e textura de doce elaborado com casca de maracujá (<i>Passiflora cincinnata</i>). <i>Beatriz Megume Rodrigues Matsuki; Isabela Rosa Rocha Machado; Marco Ferreira dos Santos; Cristiane Oliveira Correia; Igor Viana Brandi; Milton Nobel Cano Chauca.</i>	
Capítulo 4	52 - 64
Avaliação de diferentes processos de condução para produção de cachaça: Estudo aplicado em Santo Antônio da Patrulha – RS, cidade gaúcha da cachaça. <i>Marcos Vinicius Gust Gund; Ronan Ribeiro Costa Junior; Carlos Roberto de Menezes Peixoto; Fernanda Arnhold Pagnussatt.</i>	
Capítulo 5	65 - 78
Avaliação da estabilidade colorimétrica de pigmentos de <i>Sphagneticola trilobata</i> (Wedélia) extraídos com óleo de <i>Glycine max</i> (soja). <i>Thais Rodrigues de Souza; Maria Christina Sid Carvalho; Suely Pereira Freitas.</i>	
Capítulo 6	79 - 91
Biofortificação de brotos de feijão mungo com ferro e zinco. <i>Vanessa Cristina Silva; Paulo Sérgio Monteiro; Willian Rodrigues Macedo; Danúbia Aparecida Nobre.</i>	



Capítulo 7	92 - 105
Determinação da melhor umidade inicial no meio de cultivo em fermentação semissólida para produção das enzimas celulolíticas e xilanases utilizando farelo de trigo e bagaço de cana tratado termicamente como substratos indutores a partir da cepa <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30. <i>Maria Clara de Oliveira e Almeida; Euler Rodrigues dos Santos; Robson Antônio Vasconcelos; Igor Viana Brandi; William James Nogueira Lima.</i>	
Capítulo 8	106 - 118
Investigação de atividade lipolítica em fontes vegetais de lipase: uso de extrato bruto da polpa e caroço de <i>Mauritia Flexuosa</i> L. <i>Eva Maria Fonseca Gonçalves; Rayssa Souza dos Santos; Raphael Oliveira de Figueiredo; Bruna de Araújo Guimarães, Alison Silva de Almeida, João da Silva Carneiro.</i>	
Capítulo 9	119 - 131
Otimização da extração de β -caroteno em casca e bagaço de limão cravo (<i>Citrus limonia</i> Osbeck) liofilizados. <i>Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira; Larissa Carolina de Moraes; Sérgio Henrique Silva; Jaime Vilela de Resende.</i>	
Capítulo 10	132 - 146
Produção de nanofibras de celulose a partir de cascas de fruta-de-lobo (<i>Solanum lycocarpum</i> A. St.-Hill) por hidrólise química. <i>Amanda Lélis de Souza; Letícia Moraes Costa Teixeira; Maria Betânia de Freitas Marques; Guilherme Carneiro; Franciele Maria Pelissari.</i>	
Capítulo 11	147 - 162
Produção e purificação parcial de <i>L</i> -asparaginase a partir do <i>Aspergillus caespitosus</i> CCDCA 11593. <i>Natana Gontijo Rabelo; Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira; Maysa Lima Parente Fernandes; Angélica Cristina de Souza; Lizzy Ayra Alcantara Veríssimo; Disney Ribeiro Dias.</i>	
Capítulo 12	163 - 176
Propriedades funcionais e atributos de textura em bebida fermentada de soja contendo transglutaminase microbiana. <i>Silvana Pedroso de Góes-Favoni; Débora Calixto Bonfim; Ítalo Marcos Tamazzo de Oliveira; Cláudia Dorta; Elke Shigematsu; Amabriane Oliveira Shimite.</i>	



Capítulo 13

177 - 190

Revestimento comestível a partir de goma de cajueiro e óleo essencial de erva baleeira visando o controle de patógenos de pós-colheita da maçã.

Paulo Roberto Gagliardi; Valter Rubens Alcântara Sobrinho; Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Junior; Filipe de Oliveira Melo; Patrícia Beltrão Lessa Constant.

Capítulo 14

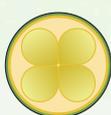
191 - 205

Utilização da torta residual de pequi para obtenção de compostos fenólicos microencapsulados por liofilização.

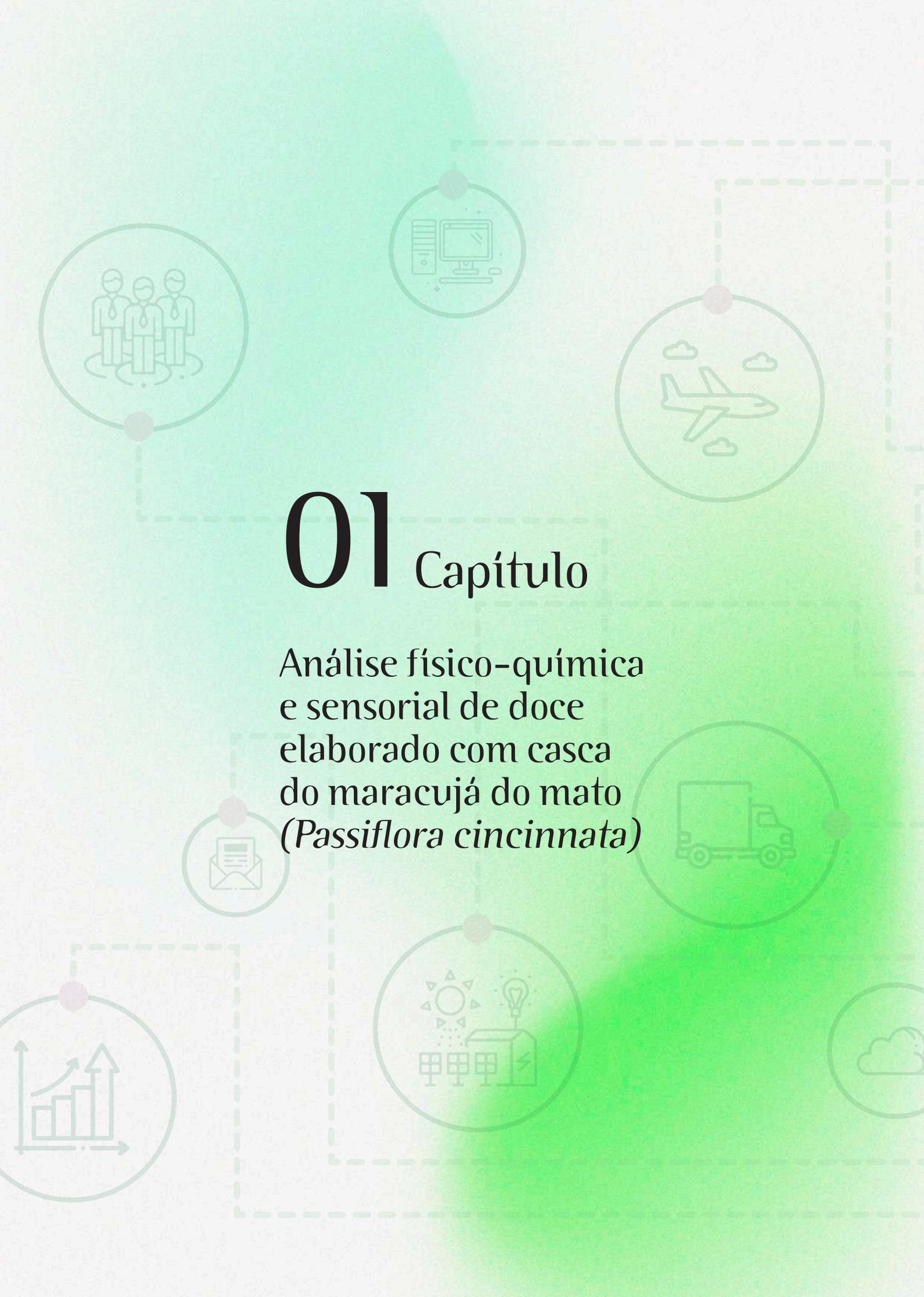
Natalie Stephanie Sawada Nunes; Cassia Roberta Malacrida.



Instituto de Ciências Agrárias
Foto: Claudia Vieira
Novembro de 2021



SIMEALI
IV Simpósio de Engenharia
de Alimentos



01 Capítulo

Análise físico-química
e sensorial de doce
elaborado com casca
do maracujá do mato
(*Passiflora cincinnata*)

Capítulo 1

Análise físico-química e sensorial de doce elaborado com casca do maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*)

Isabela Rosa Rocha Machado^{*1}; Beatriz Megume Rodrigues Matsuki¹; Marco Ferreira dos Santos¹;
Cristiane Oliveira Correia¹; Igor Viana Brandi²; Milton Nobel Cano Chauca²

Resumo

O presente trabalho, objetivou o desenvolvimento de doces adicionados de farinha da casca do maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*) e sua avaliação físico-química. Os doces foram elaborados utilizando as formulações de 0, 10, 15, 20 e 25% de farinha da casca do maracujá e concentrados até atingir 55 °Brix exceto a formulação de 0% que foi 65 °Brix. Foram realizadas análises físico-químicas (umidade, pH, acidez titulável e cinzas) e sensorial. Os resultados do experimento foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 formulações e 3 repetições. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias. A partir dos valores obtidos para análise físico-química, os doces apresentaram umidade, acidez titulável, pH e cinzas, adequados. Em relação à análise sensorial, não houve diferença significativa entre as formulações. Porém, nota-se pelos valores encontrados, que as amostras F2, F3 e F4 tiveram média acima de 6, revelando boa aceitação. Conclui-se, então, que a utilização da farinha da casca do maracujá do mato para elaboração de doce é uma boa alternativa, pois apresenta pH, umidade, acidez e cinzas adequados, além de boa aceitabilidade sensorial, sendo uma boa alternativa de aproveitamento residual (casca) e geração de emprego e renda para as famílias agricultoras.

Palavras-chave: Farinha enriquecida. Produtos funcionais. Resíduo de fruta.

Introdução

O maracujá é um fruto cultivado em países de clima tropical e subtropical, produzido pelas plantas do gênero *Passiflora*, pertencente à família *Passifloraceae*. Calcula-se que o gênero

¹ Discentes, Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

² Professor, Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

*E-mail para correspondência: isabelarosar@gmail.com

Passiflora apresenta cerca de 500 espécies catalogadas, sendo 150 delas nativas do território brasileiro (BARROS *et al.*, 2018; FALEIRO; JESUS, 2016). O termo *cincinnata* vem do latim e significa que tem por natureza o cabelo anelado ou encrespado devido a corona de filamentos da flor, onde esses se enrolam quando a flor está completamente aberta (LESSA, 2011; WONDRACEK, 2009).

Além das espécies cultiváveis no Brasil, há também as espécies de maracujá silvestre, sendo aquelas que nascem e reproduzem de maneira espontânea na natureza. Dentre essas espécies destaca-se a *Passiflora cincinnata*, conhecida popularmente como maracujá do mato, maracujá do Cerrado, maracujá da caatinga ou maracujá mochila, maracujá tubarão, maracujá de vaqueiro, maracujá brabo, maracujá boi, maracujá da casca verde (FALEIRO; JESUS, 2016).

O maracujá do mato é um fruto nativo do semiárido, encontrado predominantemente em vegetações do tipo cerrado, campo sujo, campo limpo, capoeiras e em matas ciliares. É abundantemente encontrado nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais e contribui para a geração de emprego e renda dessas regiões, já que os frutos excedentes são comercializados em feiras livres e cooperativas, para fins industriais, alimentício ou farmacêutico (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2010).

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de maracujá. Em 2018 o país produziu cerca de 1 milhão de tonelada. A fruta é utilizada na produção de sucos e consumida “in natura”. Em menor escala, ela também é utilizada na elaboração de doces, bolos, geleias, cosméticos, medicamentos, etc (ABRAFRUTAS, 2019).

Várias espécies de maracujá, cultiváveis ou silvestres, apresentam relevância social e econômica devido ao seu potencial agrônomo na produção para o mercado das frutas “in natura”, na produção de matéria-prima para doces, sorvetes e substâncias bioativas com propriedades medicinais e fins ornamentais. São utilizadas em programas de melhoramento genético por serem espécies mais resistentes a doenças e pragas e de fácil adaptação às condições climáticas, além de contribuírem para a geração de trabalho e renda (FONSECA, 2017; OLIVEIRA, 2018).

Após a elaboração dos produtos oriundos da polpa do maracujá, restam as cascas e as sementes, resíduos que, quando não descartados, tornam-se subprodutos utilizados como fonte de adubo para as plantas ou como ração destinada aos animais (SOARES *et al.*, 2013). A casca do maracujá pode ainda ser utilizada como fonte para desenvolvimento de novos produtos como doces, geleias, barras de cereais, pães, biscoitos e massas alimentícias, dado que é rica em pectina, ferro, fibras, minerais e niacina, além de contribuir para agregar valor nutricional a outros alimentos (DIAS, 2016).

A farinha da casca do maracujá na alimentação humana também contribui para o controle ou prevenção de doenças relacionadas à anemia, colesterol, glicemia e para o crescimento e produção de hormônios, fortalecimento dos ossos, etc (PITA, 2012). Ademais, possui alto valor nutritivo, rica em fontes de potássio, ferro, fósforo, cálcio e vitaminas A, C e do complexo B, além das propriedades medicinais com efeitos relaxantes e calmante.

A casca do maracujá é um resíduo composto por duas camadas: o epicarpo e o mesocarpo, também denominado como “flavedo” ou “albedo”. O epicarpo representa a parte com coloração da casca do maracujá sendo rico em óleo, vitaminas e carotenóides. O mesocarpo representa a porção esponjosa e branca do maracujá sendo composto pela celulose, hemicelulose, lignina, glicídios solúveis e pectinas, além dos complexos fenólicos, niacina (vitamina B3), carboidrato, proteína, cálcio, ferro e fósforo (CÓRDOVA, 2005; DEUS, 2011; ROSA, 2015).

A casca do maracujá representa mais de 50% da composição mássica da fruta. Seus nutrientes e fibras solúveis (pectina e mucilagens) são aliados na prevenção ou tratamento de problemas gastrointestinais, anemia, fortalecimento dos ossos, controle da glicemia e lipêmico no sangue (COQUEIRO; GALANTE; PEREIRA, 2016; CÓRDOVA, 2005; PITA, 2012).

O maracujá do mato é um produto facilmente perecível e comercializado in natura ou na forma de polpas, sendo necessário novas formas de conservação. A produção de doces utilizando a polpa e farinha apresenta-se como uma alternativa viável, visto que o processo de fabricação é simples e de baixo custo e, quando realizado adequadamente, pode resultar em um produto de boa qualidade, com benefícios para a saúde dos consumidores.

O doce em pasta é um produto obtido a partir do processamento das partes comestíveis dos vegetais, adicionado açúcar, com ou sem adição de água, pectina, ajuste do pH e outros aditivos permitidos até a concentração adequada. Porém, pode ser acrescido de suco de frutas, mel de abelha, ervas e especiarias, como ingredientes opcionais na elaboração do produto (LOVATTO, 2016). As frutas agregam sabor, cor e aroma ao doce. Essa forma de conservação é muito utilizada no Brasil, principalmente na elaboração da bananada, goiabada, marmelada, pessegada, figada, etc (DA SILVA; FRIAS; GAVA, 2009).

Segundo Lovatto (2016) e Torrezan (2015), a pectina é a substância que dá a consistência gelatinosa e pode ser adicionada em quantidade que possibilite a compensação da deficiência dos ingredientes em substâncias pécticas dos vegetais básicos e acrescida no final do processo, evitando o efeito de ruptura das cadeias de galacturônico. O açúcar, além de adoçar, contribui para a formação do gel. E o ácido tem por finalidade promover o nível de acidez necessário para que ocorra a geleificação, realçando o aroma natural da fruta.



Segundo Lovatto (2016), o doce deve conter uma mistura de no mínimo 50 partes dos ingredientes vegetais das frutas mais 50 partes em peso dos açúcares, ou seja, proporção de 50:50 polpa:açúcar. As proporções fixadas por estes padrões, são baseadas em teor normal do Brix das frutas "in natura". A proporção mínima de cada ingrediente vegetal será de 20% sobre o total dos ingredientes vegetais, quando participar mais de um vegetal na composição do produto.

O processo e tempo de cocção dependerão de variáveis como o tamanho do recipiente utilizado no preparo, quantidade da mistura processada e temperatura, considerando que o tempo é um parâmetro relevante, visto que poderá influenciar em características sensoriais e tecnológicas do produto final (GAVA, 1977).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de doce adicionado da farinha da casca do maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*) e sua caracterização físico-química e sensorial.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Produtos Vegetais do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

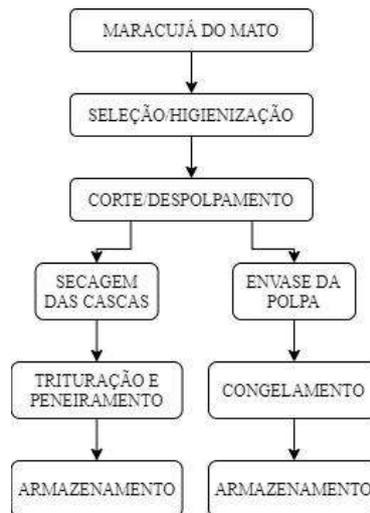
Matéria-prima

Os maracujás do mato foram adquiridos no mercado local de Montes Claros, em outubro de 2018 (época de safra do fruto na região), provenientes da região rural do município de Montes Claros. Os frutos foram selecionados, higienizados, cortados e despolidos mediante uso de uma despoldadeira industrial, envasados em sacos plásticos e congelados para uso posterior na elaboração dos doces.

Para obtenção da farinha, as cascas obtidas do despoldamento foram desidratadas em secador de bandejas a 65 °C até atingir a umidade de 10% (aproximadamente 24 horas). Após o resfriamento, as cascas foram trituradas em liquidificador, peneiradas e armazenadas em potes de vidros até sua utilização na formulação dos doces. A Figura 1 representa as etapas do processamento para obtenção da polpa e farinha para elaboração do doce de maracujá do mato.



Figura 1 - Fluxograma do processo para obtenção da polpa e farinha para elaboração dos doces

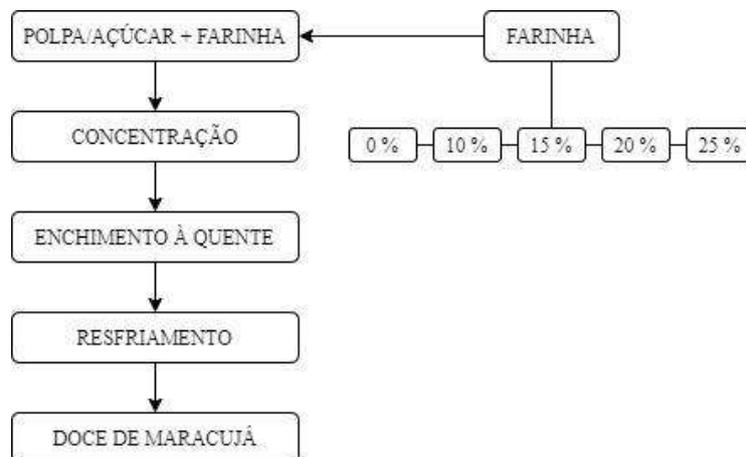


Fonte: Dos autores, 2019.

Elaboração do doce

Na elaboração do doce foi utilizada uma relação polpa: açúcar de 50:50 e cinco formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) nas concentrações de 0%, 10%, 15%, 20% e 25% de farinha. A formulação F1 foi adicionada 0,5% de pectina e não sofreu adição de farinha. Os ingredientes foram pesados e adicionados em uma panela de aço inoxidável sob aquecimento e agitação manual, concentrados até o Brix desejado na concentração final, sendo 65 °Brix para a formulação 0% e 55 °Brix para as demais formulações adicionadas de farinha e após isso, foram acondicionados em embalagens plásticas e armazenados para posteriores análises.

Figura 2 - Fluxograma da elaboração do doce de maracujá do mato



Fonte: Dos autores, 2019.

Para a determinação das concentrações de farinha na elaboração do doce, foram realizados testes preliminares nas concentrações de 3,6%, 5,0%, 7,0%, 8,6%, 10,7%, 14,3%, 17,9%; 21,4%; 25,0%, 28,6%. O doce elaborado na concentração de 28,6%, resultou em um produto com textura muito firme e aparência comprometida, pela qual se optou por utilizar concentrações abaixo deste valor e em concentrações variadas, desde que não comprometesse a aparência e textura do doce. Logo, foram escolhidas as concentrações 0%, 10%, 15%, 20% e 25%. A Figura 2 representa o fluxograma das etapas de processamento para elaboração do doce de maracujá do mato.

Análises físico-químicas

Foram realizadas análises de umidade e cinzas seguindo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). A acidez titulável foi determinada por titulação com solução de NaOH com concentração de 0,1 mol/l em presença de fenolftaleína até apresentar coloração rosa. O pH foi mensurado com um pH-metro. O Brix (sólidos solúveis) foi determinado com um refratômetro tipo ABBE (escala 0-95%). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Análise sensorial

O teste de aceitação foi realizado de acordo com Minim (2013). Foi utilizada a escala hedônica de 9 pontos, sendo 9 para “Gostei extremamente” e 1 para “Desgostei extremamente”. A Figura 3 representa o modelo de ficha aplicada na análise sensorial de teste de aceitação.

Na análise sensorial, participaram 66 provadores não treinados, sendo 46 do sexo feminino e 20 do sexo masculino, com idades entre 17 e 43 anos (média de 26 anos), presentes no âmbito do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram oferecidas 5 amostras contendo 7 g cada (apresentadas previamente codificadas), e servidas em sequência alternada, acompanhadas da ficha de avaliação e água para alternar de uma amostra para outra. Os testes foram realizados em cabines individuais no Laboratório de Análise Sensorial.

Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco formulações e 3 repetições. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de



consequentemente resulta em menor teor de umidade. Resultados encontrados neste trabalho se diferiram dos valores 23,60% e 24,54% obtidos por Nascimento *et al.* (2003) nas formulações de doces em massa de casca de maracujá-amarelo desenvolvidas com uma proporção de polpa:açúcar de 50:50 e 73 °Brix, sendo essa concentração final de Brix, maior comparando com a concentração utilizada no presente trabalho.

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos doces formulados com casca de maracujá

Concentrações de farinha	Umidade (%)	pH	Acidez titulável	Cinzas (%)
F1	29,01 ^a	3,23 ^a	37,37 ^b	0,47 ^a
F2	34,27 ^b	3,41 ^b	28,45 ^a	0,46 ^a
F3	36,27 ^{bc}	3,46 ^c	27,33 ^a	0,53 ^{ab}
F4	36,65 ^{bc}	3,55 ^d	27,50 ^a	0,73 ^{ab}
F5	38,76 ^c	3,61 ^e	28,07 ^a	0,80 ^b

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: F1: formulação com 0% de farinha da casca do maracujá; F2: 10% de farinha; F3: 15% de farinha; F4: 20% de farinha; F5: 25% de farinha.

Nota: Médias seguidas pelas letras na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

Para o resultado de pH, os valores encontrados neste trabalho são considerados adequados para doce de frutas, dado que possibilitará uma boa gelificação do doce, resultando em um produto de boa consistência. O doce sem adição de farinha apresentou menor valor de pH, sendo observado que o aumento da concentração de farinha no doce, resultou no aumento dos valores de pH, podendo ter como possibilidade da farinha conter algum grau de acidez e interferindo no teor final de pH. Resultados similares foram encontrados por Dias (2016), sobre a produção de doce em massa de maracujá-amarelo em diferentes concentrações de Brix e quantidades de suco adicionado, encontraram valores de pH de 4,06. Bezerra, Carneiro e Guedes (2009), ao avaliarem doce de goiaba elaborado com o albedo do maracujá-amarelo, detectaram valores de pH (4,09 e 4,01).

Acidez titulável apresentou maior valor na formulação F1, e as demais formulações acrescidas de farinha mantiveram o teor de acidez titulável. Os valores de acidez titulável das cinco formulações de doces variaram entre 28,07 a 37,37. Resultados encontrados por Martins *et al.* (2007) para análise de pH de doce em massa de umbu verde e maduro, encontraram valores entre 33,00 e 44,00 mostrados superiores aos do presente trabalho. Pita (2012) relata que altos teores de ácidos na polpa revelam uma característica importante no que diz respeito ao processamento, sendo interessante que os frutos tenham acidez elevada, diminuindo assim a adição de acidificantes na elaboração do produto.



Na análise de cinzas, a formulação sem adição de farinha apresentou menor teor de cinzas e as demais formulações foram aumentando o teor conforme a proporção de farinha adicionada, podendo ser essa a explicação da quantidade de sólidos totais presentes nos doces. Oliveira *et al.* (2002) analisando teor de cinzas em doce em calda utilizando a casca do maracujá-amarelo, encontraram valores de 0,92 a 1,61, sendo esses superiores ao encontrado neste trabalho.

Análise sensorial

A Tabela 2 apresenta o resultado da análise sensorial. Observa-se que não houve diferença significativa entre a aceitação das formulações, sendo estas classificadas entre gostei ligeiramente a gostei moderadamente.

Apesar de todas as formulações terem apresentado resultados estatísticos próximos, pode-se perceber que as formulações F2, F3 e F4 revelaram as mais aceitas, visto que apresentaram médias acima de 6, sendo estas superiores em relação às demais formulações. Cardoso *et al.* (2013) avaliando a aceitação de doce elaborado com aproveitamento de albedo de maracujá-amarelo, encontraram médias de 7 pontos (gostei moderadamente), para os atributos dos doces analisados, sendo esse resultado similar ao presente trabalho.

Tabela 2 - Teste de aceitação dos doces formulados com casca de maracujá

Concentrações de farinha da casca do maracujá	Teste de aceitação
F1	5,83 ^a
F2	7,00 ^a
F3	7,00 ^a
F4	6,21 ^a
F5	5,77 ^a

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: F1: formulação com 0% de farinha da casca do maracujá; F2: 10% de farinha; F3: 15% de farinha; F4: 20% de farinha; F5: 25% de farinha.

Nota: Médias seguidas pelas letras na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

Conclusão

A partir do trabalho realizado foi possível verificar que a utilização da farinha da casca do maracujá do mato para elaboração de doce é uma alternativa viável, pois apresentaram parâmetros físico-químicos adequados e boa aceitação, além de ter alto valor nutricional e baixo custo, sendo

uma alternativa de aproveitamento residual (casca), geração de emprego e renda, tendo em vista o seu potencial de mercado.

Referências

ABRAFRUTAS – Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados. Brasil é atualmente o maior produtor mundial de maracujá. **EMPRAPA**, 2019. Brasília – DF. Disponível em: <https://mais500p500r.sct.embrapa.br/view/publicacao.php?publicacaooid=90000036>. Acesso em: 4 maio 2019.

BARROS, D. N. Caracterização físico-química do maracujá amarelo comercializado em diferentes estabelecimentos comerciais. **Revista Brasileira de Agrotecnologia (Brasil)**. v. 8, n. 2., 2018.

CARDOSO, J. R. *et al.* Avaliação da aceitação de doce elaborado com aproveitamento de albedo de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 2, p. 123-128, 2013.

CARNEIRO, L. C.; BEZERRA, A. M. de M.; GUEDES, J. A. de M. Fabricação de doce de goiaba com aproveitamento do albedo do maracujá amarelo. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte Natal, Brasil. **HOLOS**, vol. 4, p. 26-32, 2009.

COQUEIRO, A. Y.; PEREIRA, J. R. R.; GALANTE, F. Farinha da casca do fruto de *Passiflora edulis f. flavicarpa Deg* (maracujá-amarelo): do potencial terapêutico aos efeitos adversos. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.2, p. 563-569, 2016.

CÓRDOVA, K. R. V. *et al.* Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Flavicarpa Degener*) obtidas por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [S.l.], 2005.

DEUS, G. I. **Efeitos da Temperatura de Secagem nos Teores de Cianogênicos Totais e Fibra Alimentar de Casca de Maracujá**. 2011. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Goiânia, 2011.

DIAS, L. G. **Aproveitamento da casca do maracujá em formulações de bebidas lácteas saborizadas com boca boa (*Buchenavia tomentosa*) e pêra do cerrado (*Eugenia klotzschiana Berg*)**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2016.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. M. **Importância socioeconômica e cultural do maracujá. Maracujá: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. IV. Coleção. Brasília - DF: Embrapa Cerrados. p. 15-22, 2016.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects Split plot type designs. **Revista Brasileira De Biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.



FONSECA, K. G. **Validação de descritores, caracterização e diversidade genética de cultivares de espécies comerciais e silvestres de maracujazeiro**. 2017. 195 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2017.

GAVA, A. J.; DA SILVA, C. A.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Ed. Nobel, 2009.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Ed. Nobel, 1977.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: 1ª Edição Digital, 2008.

JESUS, O. N. de; FALEIRO, F. G. **Classificação botânica e biodiversidade. Maracujá: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. IV. Coleção. Brasília - DF: Embrapa Cerrados. p. 23-32, 2016.

JÚNIOR, M. X. O. *et al.* Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata Mast.*). **Revista Brasileira Fruticultura Jaboticabal** - SP, v. 32, n. 2, p. 584-590, 2010.

LOVATTO, M. T. Agroindustrialização de frutas I. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Politécnico, **Rede e-Tec Brasil**, p. 98, 2016.

MARTINS, M. L. A. *et al.* Características de doces em massa de umbu verde e maduro e aceitação pelos consumidores. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1329-1333, 2007.

MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: 3º Ed. UFV, 2013.

NASCIMENTO, M. R. F.; DELIZA, R.; BORGES, S. V. Características sensoriales, microbiológicas y físico-químicas de dulces em masa de cáscara de maracujá amarillo. **Revista Alimentaria**, v. 347, p. 97-100, 2003.

OLIVEIRA, J. S. **Recursos genéticos de *Passiflora spp.*: Diversidade genética, caracterização morfoagronômica, molecular, germinação e armazenamento de sementes**. 2018. 206 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2018.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 22, p. 259–262, 2002.

PITA, J. S. L. **Caracterização físico-química e nutricional as polpa e farinha da casca de maracujazeiros do mato e amarelo**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetininga, 2012.

R Development Core Team (2019). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 2 maio 2019.



ROSA, P. C. **Propriedades termofísicas da casca do maracujá**. 2015. 34 f. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

SOARES, R. M. *et al.* **Aproveitamento da casca do maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata*) para a produção de doce diet**. II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq - PAIC/FAPEAM. Manaus, 2013.

TORREZAN, R. **Doce em massa**. Brasília - DF. Embrapa, 2015. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1023820/1/AGFAMILIARDoceemmassaed012015.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2019.

WONDRACEK, D. C. **Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujás do cerrado com base no perfil de carotenoides**. 2009. 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2009.



02 Capítulo

Avaliação da formação de biofilme e produção de metabólitos de interesse por *Bacillus* spp. isoladas de leite UHT

Capítulo 2

Avaliação da formação de biofilme e produção de metabólitos de interesse por *Bacillus* spp. isoladas de leite UHT

Nayara Aparecida da Silva Costa*¹; Raiane Rodrigues da Silva¹; Isabella Maria Fernandes Botelho Moreira²; Rosângela de Freitas³; Antônio Fernandes de Carvalho³, Solimar Gonçalves Machado³

Resumo

Bacillus spp. são comumente relacionadas à deterioração e termorresistência na indústria de laticínios. Apesar de serem um problema para a indústria de lácteos, estudos recentes mostram que este gênero tem grande potencial biotecnológico. Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por este gênero podem ser utilizados para modificar a reologia de alguns produtos, enquanto os antioxidantes podem atuar na conservação de alguns alimentos, uma vez que podem retardar a oxidação lipídica. Além disso, os antimicrobianos produzidos por *Bacillus* spp. podem ser utilizados para inibir alguns micro-organismos deterioradores e patogênicos. Esse trabalho objetivou avaliar o potencial biotecnológico de 12 estirpes de *Bacillus* isoladas de leite *Ultra-High Temperature* (UHT) pertencentes às espécies: *Bacillus amyloliquefaciens* [11 (v1) e IPS4 (v1)], *Bacillus cereus* [MOI 14 e 10 (3)], *Bacillus licheniformis* [79 (v1) e 7 (3)], *Bacillus proteolyticus* [PAI 15 (v3) e PAI 4 (1)], *Bacillus velezensis* [4 (2) e 86 (v1)] e *Bacillus subtilis* [24 (2) e 17 (v3)]. A formação de biofilme foi avaliada pela metodologia do cristal violeta em microplacas após 24 h de incubação a 37 °C em repouso ou sob agitação média. Para determinação da produção de EPS, as cepas foram inoculadas em meios de cultura líquido e sólido formulados. Posteriormente, foram incubadas a 37 °C por 24 h. As estirpes que apresentaram aspecto viscoso em meio líquido e colônias gomosas em meio sólido foram consideradas produtoras de EPS. Para determinação de atividade antimicrobiana, as cepas de *Bacillus* foram testadas pelo método de difusão em ágar contra *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Listeria innocua* ATCC 33090 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As cepas que formaram halo de inibição foram consideradas positivas para atividade antimicrobiana. A atividade antioxidante das estirpes de *Bacillus* foi avaliada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Todas as cepas avaliadas foram capazes de formar biofilme tanto

¹Graduanda, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

² Pós-graduanda, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

³ Professor(a) Doutor (a), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

* E-mail para correspondência: nayara.a.costa@ufv.br

sob agitação quanto em repouso. As estirpes *B. proteolyticus* 4 (2) e *B. amyloliquefaciens* 10 (3) se destacaram quando submetidas à agitação enquanto as cepas *B. velezensis* 24 (2) e 17 (v3), *B. cereus* 7 (3) e *B. licheniformis* PAI 4 (1) se destacaram quando foram incubadas em repouso. As estirpes *B. cereus* MOI 14 e 10 (3), *B. amyloliquefaciens* IPS4 (v1) e 11 (v1), *B. velezensis* 24 (2), *B. licheniformis* PAI 4 (1) e *B. proteolyticus* 86 (v1) apresentaram produção de EPS. Apenas a cepa *B. amyloliquefaciens* 11 (v1) formou halos de inibição contra *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *L. innocua* ATCC 33090. Todas as cepas apresentaram atividade antioxidante, apesar das cepas *B. amyloliquefaciens* IPS4 (v1) e *B. proteolyticus* 86 (v1) possuírem atividade antioxidante inferior às demais. Por fim, concluiu-se que a cepa *B. amyloliquefaciens* 11 (v1) possui maior potencial biotecnológico. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a possibilidade de aplicação industrial.

Palavras-chave: Biotecnologia. Laticínios. Microbiologia.

Introdução

O leite é um alimento de grande importância na alimentação humana devido ao seu elevado valor nutritivo, sendo fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas. Assim, o leite é considerado um excelente substrato para o crescimento de diversos grupos de microrganismos, desejáveis e indesejáveis (SOUZA, 2012). No entanto, a contaminação microbiana por microrganismos indesejáveis pode prejudicar a qualidade do leite, interferir na industrialização, reduzir o tempo de prateleira do leite fluido e derivados lácteos e colocar em risco a saúde do consumidor. As fontes de contaminação do leite podem estar associadas ao estado de saúde e higiene dos animais, ao ambiente do estábulo e da sala de ordenha e aos procedimentos usados para limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração e utensílios que entram em contato com o leite (BRITO; BRITO, 2001).

A fim de evitar as consequências da contaminação microbiana, a legislação brasileira permite, além da pasteurização rápida, realizada a temperaturas entre 72 e 75 °C por 15 a 20 segundos, e a pasteurização lenta, entre 62 e 65 °C durante 30 minutos (RIISPOA, 1997), o processo UAT (ultra alta temperatura), leite homogeneizado submetido a temperatura de 130 a 150 °C por 2 a 4 segundos, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (MAPA, 1996).



No entanto, apesar desses procedimentos, dependendo do binômio tempo-temperatura utilizados no tratamento térmico, a inativação microbiana pode variar. A microbiota contaminante do leite é diversa o que explica a existência de grupos microbianos com resistência ao calor diferentes (PEREIRA, 2019).

No universo lácteo, as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* representam um grande problema para a indústria visto que são formadoras de esporos e podem resistir aos tratamentos térmicos mais drásticos comumente utilizados em laticínios (MOSTERT; LUCK; HURMAN, 1979; ZACARCHENCO, 1999).

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias em forma de bastonete, móveis e com formação de endósporo altamente resistente ao calor (SANHUEZA; MELO, 2007). *Bacillus subtilis* é uma das bactérias mais frequentemente encontradas no leite, pois pode resistir ao processo de pasteurização. Esta espécie está associada com a produção de viscosidade e coagulação do leite cru ou pasteurizado (JAY, 2005). A coagulação de leite cru está relacionada à intensa atividade metabólica deste gênero, pois estas bactérias produzem enzimas que degradam muitos substratos orgânicos, incluindo as proteínas do leite (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Além da atividade hidrolítica de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, os prejuízos causados na indústria de alimentos também podem estar relacionados à capacidade de formação de biofilme destas bactérias. Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de células microbianas aderidas a uma superfície e embebidas em matriz polimérica (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008). A formação de biofilmes microbianos nas superfícies de equipamentos da linha de produção de uma indústria de alimentos e até mesmo na superfície dos alimentos é motivo de preocupação. Biofilmes têm se mostrado uma das maiores causas de contaminação cruzada dos produtos alimentícios e de transmissão de doenças (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; SHI; ZHU, 2009). Em uma planta comercial na indústria de laticínios, *Bacillus cereus* representou mais do que 12% da microbiota constituinte dos biofilmes (SHARMA; ANAND, 2002). Ademais, Ostrov *et al.* (2017) determinaram que espécies de *Bacillus* isoladas de ambiente lácteo tem maior facilidade em formar biofilme.

Apesar do problema na indústria de lácteos, Souza (2012) relata a utilização de bactérias do gênero *Bacillus* na produção de proteases e amilases. Ainda cima, o gênero *Bacillus* é a maior fonte industrial de enzimas e *Bacillus amyloliquefaciens* é uma das espécies mais amplamente utilizadas para a produção de alfa-amilase e proteases (ABATE; CASTRO; SIÑERIZ, 1999).

Além da produção de enzimas, *Bacillus spp.* também são conhecidos por produzirem metabólitos antimicrobianos. Zheng e Slavik (1999) caracterizaram parcialmente uma bacteriocina

produzida por *B. subtilis*. Considerando esta característica, a utilização de bactérias do gênero *Bacillus* como biocontroladores de fitopatógenos e patógenos humanos têm sido bastante pesquisada recentemente, haja vista que várias espécies desse gênero são responsáveis pela produção não só de bacteriocinas, mas também de antibióticos peptídicos antifúngicos e antibacterianos (SCHULZ; BONELLI; BATISTA, 2005). No entanto, poucos estudos relataram características desses metabólitos produzidas por *Bacillus* de origem láctea (CHOPRA e MATHUR, 1984; CHOPRA; MATHUR, 1985; CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2004).

Elshaghabee (2017) constatou além da atividade antimicrobiana das bactérias do gênero *Bacillus*, propriedades de exclusão competitiva, antioxidantes, imunomoduladoras e fermentativas. Cepas de *Bacillus* produtoras de bacteriocinas possuem potencial de aplicabilidade como probióticos, devido à sua atividade inibitória contra patógenos intestinais, e também como contraceptivos naturais, tal como exemplo da bacteriocina subtilisina A, que apresenta atividade espermicida contra espermatozoides de humanos e animais de criação (ABRIOUEL *et al.*, 2011). Cutting (2011) definiu *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* como uma das bactérias com maior potencial probiótico. O autor ainda afirma que bactérias desse gênero possuem vantagens em relação a outros microrganismos não esporulados, tais como *Lactobacillus* spp.

Ademais, estudos realizados com as espécies *B. subtilis* (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997) e *Bacillus polymyxa* (HAN; CLARKE, 1990) comprovaram a produção de levana, polímero de frutose sintetizado através de reações de transfructosilação por muitas espécies de bactérias que tem aplicações na indústria de alimentos e em diversas áreas da saúde. O estudo realizado com cepa de *B. cereus* GU812900 revelou a produção de um exopolissacarídeo (EPS) composto principalmente de açúcares naturais, proteínas, fosfatos e sulfatos. A produção de EPS é vantajosa, pois na indústria de alimentos, os biopolímeros microbianos podem ser utilizados como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes e gelificantes (PEREIRA *et al.*, 2019).

Em vista do enorme potencial biotecnológico apresentado por bactérias do gênero *Bacillus* e da escassez de estudos relacionados à *Bacillus* spp. de origem láctea, realizou-se no estudo uma triagem de cepas de leite UHT para avaliação do potencial biotecnológico.

Material e Métodos

Foram avaliados 12 isolados do gênero *Bacillus* pertencentes às espécies: *B. amyloliquefaciens* [11 (v1) e IPS4 (v1)], *B. cereus* [MOI 14 e 10 (3)], *B. licheniformis* [79 (v1) e 7 (3)], *Bacillus proteolyticus* [PAI 15 (v3) e PAI 4 (1)], *Bacillus velezensis* [4 (2) e 86 (v1)] e *B. subtilis*

[24 (2) e 17 (v3)], próprias à coleção de culturas do Laboratório de Pesquisa em Leite e Derivados (INOVALEITE - UFV) isolados e identificados por Moreira (2019).

As culturas armazenadas a -60 °C em ultrafreezer (Grosseron, SaintHerblain, França) foram inoculadas em caldo BHI na concentração de 1% (v/v) seguido de incubação por 48 h na temperatura de 37 °C. Todos os experimentos a seguir foram realizados a partir de culturas ativas.

Para avaliar a influência da agitação na formação de biofilme, foram preparadas duas microplacas. As culturas ativadas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,85% (m/v)) até a diluição 10^{-4} . Foram adicionados aos poços das microplacas, 0,2 mL de caldo BHI e 0,02 mL de cada cultura ativa diluída em triplicata. Para o branco, foram adicionados 0,22 mL de caldo BHI em cada poço. As placas foram incubadas em espectrofotômetro de placas (Multiskan Go, Thermo Fisher, Finlândia) à 37 °C, por 24 horas. Uma delas foi incubada em repouso enquanto a outra foi incubada sob agitação média. Após incubação, conforme detalhado por André (2015), as placas foram retiradas do equipamento e o meio de cultura foi descartado. As placas foram lavadas com água destilada por três vezes consecutivas. Em seguida, foram adicionados aos poços 0,2 mL de cristal violeta 0,1% (m/v). As placas contendo cristal violeta foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Seguidamente, as placas foram secas em estufa a 105 °C por 15 minutos. Para a remoção do cristal violeta, foram adicionados 0,2 mL de álcool 95% em cada poço. As placas foram levadas ao espectrofotômetro para medida de absorbância a 590 nm. Foram realizadas duas repetições deste ensaio. Os valores de absorbância a 590 nm foram utilizados para classificar as estirpes em não aderentes, fracamente aderentes, moderadamente aderentes e fortemente aderentes conforme metodologia descrita por Elegbeleye e Buys (2020).

A determinação da produção de EPS se deu em meio líquido e em meio sólido, conforme Reyes-Gavilán e Ruas-Madiedo (2005). Para a análise em meio líquido, foi inoculado 1 mL de cada cepa em tubos com 9 mL de meio de cultura. O meio de cultura era composto de 0,2 g de KHPO_4 ; 1,5 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,0 mg de FeCl_3 ; 0,5 g de extrato de levedura; 20 g de sacarose. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foi introduzida nos tubos uma alça de platina previamente esterilizada para verificação de viscosidade característica da produção de EPS. Para o meio sólido, 1 mL de cada cepa foi adicionado em placas de petri contendo o meio de cultura anteriormente descrito acrescido de 1,5% de ágar. Após incubação a 37 °C por 24 horas, foi verificado o aspecto das colônias com auxílio de um *swab*. Colônias formadoras de fio viscoso no teste em meio líquido foram consideradas positivas, enquanto para o teste em meio sólido, considerou-se positivas as colônias de aspecto gomoso.

Para o ensaio de antimicrobianos, realizou-se as ativações dos microrganismos-alvo *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Listeria innocua* ATCC 33090 e *Escherichia coli* ATCC 25922 em caldo BHI (1%) a 37 °C por 24 horas. Para controle positivo, foram utilizados vancomicina para *S. aureus* e ampicilina para *E. coli* (NCCLS, 2003). As ativações de cada cepa foram transferidas, com auxílio de seringas estéreis, para microtubos. Os microtubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada cepa foi filtrado em membrana de microporos (0,22 µm) e os filtrados foram armazenados a -20 °C. Em seguida, conforme a metodologia de difusão em ágar utilizada por Tagg e McGiven (1971), o ágar SNA (*Soft Nutrient Agar*), feito a partir de ágar bacteriológico e ágar nutriente, com adição de 1% (v/v) do microrganismo alvo foi vertido em placas de Petri. Após solidificar, foram feitos furos de aproximadamente 8 mm de diâmetro com o auxílio de tubos de Durham previamente esterilizados. Posteriormente, adicionou-se ao furo aproximadamente 50 µL do sobrenadante livre de células da estirpe de *Bacillus* a ser testada. Depois de 24 horas de incubação a 37 °C, os halos de inibição foram medidos.

Na análise de antioxidantes, o método utilizado foi descrito por Yen e Chen (1995). Foram adicionados 0,5 mL da cultura ativada, juntamente com 3 mL da solução de DPPH (0,1 mmol/L, em etanol) em um tubo de ensaio esterilizado. Incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz. A absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro (Global Trade Tecnology, China). Ácido ascórbico (200 ppm) foi utilizado como controle positivo e a atividade de eliminação dos radicais livres foi calculada a partir da inibição, de acordo com a Equação 1:

$$\%(Inibição) = \frac{(A_{branco} - A_{amostra})}{A_{amostra}} \times 100 \quad (Eq. 1)$$

Onde A= absorbância, A_{branco}= absorbância do branco (solução de DPPH com etanol) e A_{amostra}= absorbância da amostra.

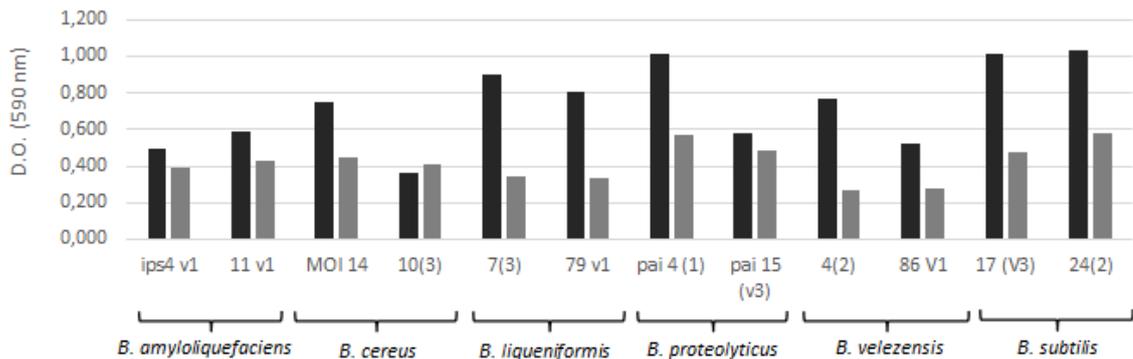
Resultados e Discussão

As Figuras 1 e 2 exibem a capacidade de formação de biofilme pelas culturas de *Bacillus*.

Conforme mostrado nas Figuras 1 e 2, todas as cepas testadas com exceção de *B. cereus* 10 (3) foram capazes de formar biofilme em repouso. No entanto, a capacidade de formação de biofilme das mesmas culturas cultivadas sob agitação foi inferior. No ensaio em repouso, as estirpes *B. licheniformis* 7(3), *B. proteolyticus* PAI 4(1) e *B. subtilis* 24(2) e 17 (v3) se destacaram com uma capacidade de formação de biofilme intermediária. Já no ensaio sob agitação, as estirpes de *B.*

velezensis 4(2) e *B. cereus* 10(3) apresentaram maior capacidade de formação de biofilme. A capacidade de formação de biofilme de *Bacillus* spp. isolados de ambiente lácteo já haviam sido destacados por Ostrov *et al.* (2019) que evidenciou as diferenças genéticas entre espécies lácteas e espécies não-lácteas como fator determinante para formação robusta de biofilme.

Figura 1 - Capacidade de formação de biofilme de estirpes de *Bacillus* cultivadas em repouso e sob agitação



Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: Culturas ativadas em repouso: cinza escuro; Culturas ativadas sob agitação: cinza claro.

Figura 2 - Classificação de estirpes de *Bacillus* quanto à capacidade de formação de biofilme quando incubadas em repouso e sob agitação

Espécies	Estirpes	Repouso	Agitação
<i>B. amyloliquefaciens</i>	ips4 v1	■	■
	11 v1	■	■
<i>B. cereus</i>	MOI 14	■	■
	10(3)	■	■
<i>B. licheniformis</i>	7(3)	■	■
	79 v1	■	■
<i>B. proteolyticus</i>	pai 4 (1)	■	■
	pai 15 (v3)	■	■
<i>B. velezensis</i>	4(2)	■	■
	86 V1	■	■
<i>B. subtilis</i>	17 (V3)	■	■
	24(2)	■	■

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: Não aderente: ■; Fracamente aderente: ■; Moderadamente aderente: ■.

Apesar dos resultados obtidos indicarem formação de biofilme pelos isolados de *Bacillus*, a grande diferença entre os testes sem agitação e com agitação pode estar relacionada à metodologia que não utilizou culturas com concentração de células padronizadas. Hussain e Oh (2017) fizeram

uso do método colorimétrico. No entanto, estes autores padronizaram o inóculo para 3×10^8 UFC/ mL. Esse fator pode ter sido determinante para diferença entre os resultados obtidos.

Além da capacidade de formação de biofilme, as estirpes de *Bacillus* foram avaliadas quanto à produção de EPS (Figuras 3 e 4).

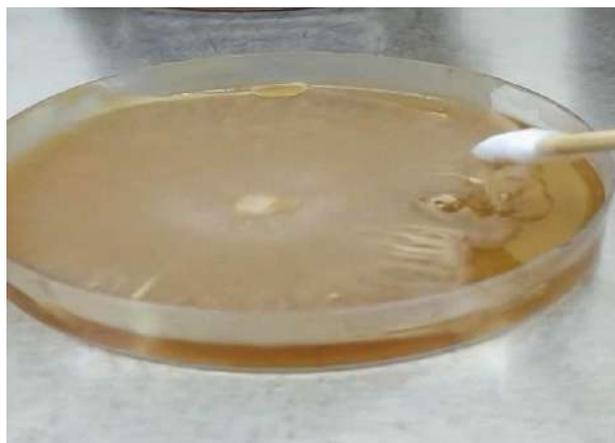
Figura 3 - Classificação das estirpes de *Bacillus* quanto à produção de EPS

Espécies	Estirpes	Produção de EPS
<i>B. amyloliquefaciens</i>	ips4 v1	■
	11 v1	■
<i>B. cereus</i>	MOI 14	■
	10 (3)	■
<i>B. licheniformis</i>	7 (3)	■
	79 v1	■
<i>B. proteolyticus</i>	pai 4 (1)	■
	pai 15 (v3)	■
<i>B. velezensis</i>	4 (2)	■
	86 v1	■
<i>B. subtilis</i>	17 v3	■
	24 (2)	■

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: Produziu EPS: ■; Não produziu EPS: ■

Figura 4 - Formação de colônias brancas e gomosas por *B. amyloliquefaciens* IPS4 (v1) características da produção de EPS



Fonte: Dos autores, 2020.

Os resultados do teste de difusão em ágar mostraram que nenhuma cepa teve ação antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*. Apenas a cepa 11 (v1) apresentou atividade antimicrobiana contra *L. innocua* e *S. Enteritidis*. A média dos halos de inibição de 11 (v1) contra *L. innocua* foi de 0,7 mm, enquanto a média de inibição da mesma cepa contra *S. Enteritidis* foi de 0,9 mm. A Figura 5 exibe os halos de inibição.

Figura 5 - Atividade antimicrobiana de *B. amyloliquefaciens* 11 (v1) contra patógenos



Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: A: Atividade de inibição de *S. Enteritidis*; B: Atividade de inibição de *L. innocua*.

A cepa 11 (v1) formou halos claros, como pode ser visto na Figura 5, representando baixa inibição contra *S. Enteritidis*, um resultado positivo. Yoshida *et al.* (2001) verificou que uma linhagem pertencente à *B. amyloliquefaciens* tinha atividade antifúngica e inibidora de algumas bactérias fitopatogênicas. Stein (2005) determinou que o potencial de uma certa linhagem de *B. subtilis* para a síntese de antimicrobianos é comparável com *B. amyloliquefaciens*, sendo 7,5% do genoma dedicado à produção de antimicrobianos.

Os microrganismos utilizam considerável energia para o desenvolvimento de mecanismos antimicrobianos e síntese de peptídeos de defesa, porém ainda não está claro como o desenvolvimento destes compostos afetam as comunidades microbianas (RILEY; WERTZ, 2002). Deste modo, os peptídeos antimicrobianos podem ter uma relação direta com a defesa e prevenção de invasão por outras espécies de microrganismos dentro do nicho ocupado ou limitando o avanço de células vizinhas. A mediação do sistema quorum-sensing tem um papel adicional na possível explicação destes mecanismos para bactérias Gram-positivas (MILLER; BASSLER, 2001). No entanto, há poucos relatos sobre o efeito da competição microbiana na ativação da síntese de bacteriocinas por bactérias do gênero *Bacillus* (PEREZ, 2014).

Os resultados da análise de determinação da atividade antioxidante dos isolados podem ser vistos na Tabela 1.

A aplicação de bactérias probióticas com atividade antioxidante nos alimentos aumenta a sua atividade biológica e sua qualidade, bem como o seu *shelf-life* (NEDELICHEVA *et al.*, 2010). O DPPH tem sido amplamente utilizado como um gerador de radical livre (COTELLE *et al.*, 1996) sendo um reagente útil para investigar a atividade de captura de radicais livres dos compostos (DUAN *et al.*, 2006). O ensaio do poder redutor é baseado na capacidade de um composto para reduzir o Fe³⁺ para a forma Fe²⁺ (POWNALL; UDENIGWE; ALUKO, 2010). Dessa forma, a capacidade redutora dos *Bacillus* indica que estes podem atuar como doadores de elétrons, reduzindo os intermediários oxidados nos processos de peroxidação lipídica (ZHU; ZHOU; QIAN, 2006).

Tabela 1 - Resultados do teste com DPPH

Espécie	Amostra	Média de absorvância (517 nm)	% Inibição DPPH
	Branco	1.950	-
	Controle	1.816	7
<i>B.cereus</i>	MOI 14 (3)	1.576	24
<i>B. cereus</i>	11 v1	1.609	21
<i>B. subtilis</i>	4 (2)	1.743	12
<i>B. subtilis</i>	24 (2)	1.602	22
<i>B. proteolyticus</i>	17 v3	1.656	18
<i>B. proteolyticus</i>	86 v1	1.879	4
<i>B.amyloliquefaciens</i>	10 (3)	1.669	17
<i>B.amyloliquefaciens</i>	PAI 15 (v3)	1.611	21
<i>B.velezensis</i>	79 v1	1.680	16
<i>B. velezensis</i>	PAI 4 (1)	1.602	22
<i>B. licheniformis</i>	IPS4 v1	1.884	4
<i>B. licheniformis</i>	7 (3)	1.608	21

Fonte: Dos autores, 2020.

Elshaghabee (2017) relatou em seu estudo que diversas cepas de *Bacillus* foram selecionadas quanto às suas potenciais funcionalidades probióticas, em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*. Além de qualificar os valores de referência obrigatórios para um candidato a probiótico; *Bacillus* spp.

oferece maior tolerância ao ácido e melhor estabilidade durante o processamento térmico e armazenamento em baixa temperatura (BADER; ALBIN; STAHL, 2012).

Conclusão

O trabalho demonstrou que as estirpes de *Bacillus* isoladas de leite UHT possuem potencial biotecnológico, visto que foram capazes de formar biofilme sob agitação e em repouso, produziram EPS e apresentaram atividade antimicrobiana e antioxidante, além de atividade amilolítica e proteolítica. Dentre as estirpes analisadas, *B. amyloliquefaciens* 11 (v1) se mostrou mais promissora quanto ao potencial biotecnológico. No entanto, são necessários mais estudos para afirmar a utilização industrial dessas espécies.

Referências

ABATE, C. M; CASTRO, G.R; SIÑERIZ, F. Production of amyolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.21, n.31 p.249-252, 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005477505683>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

ABRIOUEL, H. *et al.* Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, p.201-232, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/35/1/201/513063>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

ANDRE, C. M. **Adhesion, formation and composition of biofilm by *Staphylococcus aureus* on polystyrene in the presence of nisin**. 2015. 49f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/6504>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

BADER, J.; ALBIN, A.; STAHL, U. Bactérias formadoras de esporos e sua utilização como probióticos. **Beneficial Microbes**, v.3, p.67-75, 2012.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Qualidade do Leite: PRODUÇÃO DE LEITE E SOCIEDADE: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**. Belo Horizonte: Ed. FEPMVZ, 2001.

CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 495-504, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222374058_Characteristics_of_proteinases_and_lipases_produced_by_seven_Bacillus_sp_isolated_from_milk_powder_production_lines. Acesso em: 18 de jul. 2021.



CHOPRA, A. K.; MATHUR, D. K. Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v.57, n.2, p.263-271, 1984. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01390.x>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

CHOPRA, A. K.; MATHUR, D. K. Purification and characterization of heat-stable proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67. **Journal of Dairy Science**, v.68, p. 3202-3211, 1985. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030285812285>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

COTELLE, N. *et al.* Antioxidant properties of hydroxyl flavones. **Free Radical Biology Medicine**, v.0, p.35-43, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0891584995020144>. Acesso em: 18 de jul. 2021.

CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, p.214-220, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002010000493?via%3Dihub>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

DUAN, X. J. *et al.* Evaluation of antioxidante property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, v.95, p.37-43, 2006.

ELEGBELEYE, J.A; BUYS, E.M. Molecular characterization and biofilm formation potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* in extended shelf-life milk processing line. **Journal of Dairy Science**, v.103, n.6, p.4991-5002, 2020.

ELSHAGHABEE, F. M. F. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in microbiology**, v.8, p.1490, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01490/full>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v.32, p.237-243, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959296000581>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.

GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, p.1049-1056, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002007108002049>. Acesso em: 18 de jul. 2021

HALL- STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.95-108, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro821>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 393-396, 1990.

HUSSAIN, M.S; OH, D. H. Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: Effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. **Food Control**, v.77, p.270-280, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713517300609>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.55, p.165-199, 2001. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.micro.55.1.165>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de mar.1996. Seção 1, p.3978-3986.

MOREIRA, I. M. F. B. **Microbiological quality of Brazilian UHT milk and genetic biodiversity of sporulated bacteria**. 2015. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/26910>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

MOSTERT, J.F; LUCK, H.; HURMAN, R.A. Isolation, identification e practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. **South Africa Journal Of Dairy Technology**, v.11, n.3, p.15-132, 1979.

NCCLS. Norma M7-A6 (ISBN 1-5638-486-4). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição**, Wayne: NCCLS, 2003.

NEDELICHEVA, P. *et al.* Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NBIMCC 2415 with, antioxidante activity as a starter culture in the production of dried fermented meat products. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.24, p. 1624-1630, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/240311818_Probiotic_Strain_Lactobacillus_Plantarum_NBIMCC_2415_with_Antioxidant_Activity_as_a_Starter_Culture_in_the_Production_of_Dried_Fermented_Meat_Products. Acesso em: 19 de jul. 2021.

OSTROV, I. *et al.* Adaptation of *Bacillus* species to dairy associated environment facilitates their biofilm forming ability. **Food Microbiology**, v.82, p.316-34, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018310438>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

PEREIRA, G. V. M. *et al.* Bioactive Polysaccharides Produced by Microorganisms: Production and Applications. In: SARAN, S.; BABU, V.; CHAUBEY, A. **High Value Fermentation Products**. Curitiba: Scrivener Publishing Llc, 2019. p. 231-252.

PEREZ, K. J. **Caracterização de lipopeptídeos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *Bacillus* spp. isolados de Puba**. 2014. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-APCP8N>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, p. 361-365, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002099902915?via%3Dihub>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

POWNALL, T. L.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Amino acid composition and antioxidante properties of pea seed (*Pisum sativum L.*) enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4712-4718, 2010.

REYES-GAVILÁN, C. G.; RUAS-MADIEDO, P. Métodos de triagem, isolamento e caracterização de exopolissacarídeos produzidos por bactérias de ácido láctico. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.843-856, 2005.

RIISPOA. Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25/06/62, nº 1.236, de 02/09/94, nº 1.812, de 08/02/96 e nº 2.244, de 04/06/97. **Diário Oficial da União, Brasília**, 05 jun. 1997. Seção I, p. 11555-11558.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 117-137, 2002. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

SANHUEZA, R.M.V.; MELO, I.S. **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Ed. EMBRAPA, 2007.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimento e Nutrição**, v.16, n.4, p. 403-411, 2005.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry- a case. **Food Control**, v. 13, p.469-477, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713501000688>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224409000557>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v.56, n.4, p.845-857, 2005. Disponível: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

SOUZA, E.F. **Aplicação de proteases e amilases produzidas por *Bacillus sp.* SMIA-2 na remoção de manchas de tecidos**. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2012.

TAGG, J.R.; MCGIVE, A.R. Assay System for Bacteriocins. **Journal of Applied Microbiology**, v.21 p.943, 1971. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC377313/>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

YEN, G.C; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal Agric Food Chem**, v. 43, p.27–32, 1995.

YOSHIDA, S. *et al.* Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. **Biological Control**, San Diego, v.91, n.2, 2005. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2001.91.2.181>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

ZACARCHENCO, P.B. **Otimização da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans* e sua ocorrência em leite UHT.** 1999. 94f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000. Disponível: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255115>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

ZHENG, G.; SLAVIK, M. F. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, n.5, p.363-367, 1999. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2672.1999.00545.x>. Acesso em: 19 de jul. 2021.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v.41, p.1296-1302, 2006.



03 Capítulo

Avaliação da cor e textura
de doce elaborado com
casca de maracujá
(*Passiflora cincinnata*)

Capítulo 3

Avaliação da cor e textura de doce elaborado com casca de maracujá (*Passiflora cincinnata*)

Beatriz Megume Rodrigues Matsuki¹; Isabela Rosa Rocha Machado¹; Marco Ferreira dos Santos¹;
Cristiane Oliveira Correia¹; Igor Viana Brandi²; Milton Nobel Cano Chauca²

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de doces adicionados de farinha da casca do maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*) e sua avaliação de cor e textura. Os doces foram elaborados utilizando as formulações de 0%, 10%, 15%, 20% e 25% de farinha da casca do maracujá e concentrados até atingir 55 °Brix exceto a formulação de 0% que foi 65 °Brix. Foram realizadas análises instrumentais da cor e textura. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) através do programa R-STUDIO, com 5 formulações e 3 repetições. Os resultados indicaram que os doces apresentaram textura macia (na faixa de 1,0 a 5,0 N). As formulações F2, F3 e F4, resultaram em textura mais macia, quando comparados com produtos existentes no mercado, sendo que a formulação F5 obteve o maior valor de força de corte (5,28 N) o que significa textura mais firme. Para a análise de cor, o parâmetro L* resultou em tonalidade clara conforme a adição da farinha nas formulações, enquanto a* e b* apresentaram cor verde e vermelho, respectivamente. Concluiu-se que os doces elaborados utilizando farinha da casca do maracujá do mato apresentaram textura e cor adequada, sendo uma boa alternativa para agregar maior valor ao produto.

Palavras-chave: Farinha enriquecida. Maracujá do mato. Produtos funcionais. Resíduo de fruta.

Introdução

O maracujá é um fruto cultivado em países de clima tropical e subtropical, produzido pelas plantas do gênero *Passiflora*, pertencente à família *Passifloraceae*. Calcula-se que o gênero

¹ Discentes, Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

² Professor, Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

*E-mail para correspondência: bmatsuki@gmail.com

Passiflora apresenta cerca de 500 espécies catalogadas, sendo 150 delas nativas do território brasileiro (BARROS *et al.*, 2018; JESUS; FALEIRO, 2016).

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de maracujá. Em 2018 o país produziu cerca de 1 milhão de toneladas. A fruta é utilizada na produção de sucos e consumida “in natura”. Em menor escala, ela também é utilizada na elaboração de doces, bolos, geleias, cosméticos, medicamentos, etc (ABRAFRUTAS, 2019).

Além das espécies cultiváveis no Brasil, há também as espécies de maracujá silvestre, que são aquelas que nascem e reproduzem de maneira espontânea na natureza. Dentre essas espécies destaca-se a *Passiflora cincinnata*, conhecida popularmente como maracujá do mato, maracujá do Cerrado, maracujá da caatinga ou maracujá mochila, maracujá tubarão, maracujá de vaqueiro, maracujá brabo, maracujá boi, maracujá da casca verde (FALEIRO; JESUS, 2016). Nativo dos biomas Caatinga e Cerrado, o maracujá do mato é abundantemente encontrado nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais e contribui para a geração de emprego e renda dessas regiões, já que os frutos excedentes são comercializados em feiras livres e cooperativas, para fins industriais, alimentício ou farmacêutico.

Após a elaboração dos produtos oriundos da polpa do maracujá, restam as cascas e as sementes, resíduos que, quando não descartados, tornam-se subprodutos utilizados como fonte de adubo para as plantas ou como ração destinada aos animais (SOARES *et al.*, 2013). A casca do maracujá pode ainda ser utilizada como fonte para desenvolvimento de novos produtos como doces, geleias, barras de cereais, pães, biscoitos e massas alimentícias, visto que é rica em pectina, ferro, fibras, minerais e niacina, além de contribuir para agregar valor nutricional a outros alimentos (DIAS, 2016). A farinha da casca do maracujá na alimentação humana também contribui para o controle ou prevenção de doenças relacionadas à anemia, colesterol, glicemia e para o crescimento e produção de hormônios, fortalecimento dos ossos, etc (PITA, 2012).

A produção de doces utilizando a polpa e farinha apresenta-se como uma alternativa viável, dado que o processo de fabricação é simples e de baixo custo e, quando realizado adequadamente, pode resultar em um produto de boa qualidade, com benefícios para a saúde dos consumidores devido ao teor de fibras que apresentam. Além disso, considera-se também a sua relevância social e econômica, tendo em vista a geração de renda e emprego na agricultura familiar e o aproveitamento do resíduo como matéria-prima (DIAS, 2016).

O doce em pasta é um produto obtido a partir do processamento das partes comestíveis dos vegetais, adicionado açúcar, com ou sem adição de água, pectina, ajuste do pH e outros aditivos permitidos até a concentração adequada. Porém, pode ser acrescido de suco de frutas, mel de abelha, ervas e especiarias, como ingredientes opcionais na elaboração do produto (LOVATTO, 2016).

As frutas agregam sabor, cor e aroma ao doce. Essa forma de conservação é muito utilizada no Brasil, principalmente na elaboração da bananada, goiabada, marmelada, pessegada, figada, etc (FRIAS, 2009; GAVA; DA SILVA, 2009).

Segundo Torrezan (2015) e Lovatto (2016), a pectina é a substância que dá a consistência gelatinosa e pode ser adicionada em quantidade que possibilite a compensação da deficiência dos ingredientes em substâncias pécticas dos vegetais básicos e acrescida no final do processo, evitando o efeito de ruptura das cadeias de galacturônico. O açúcar, além de adoçar, contribui para a formação do gel. E o ácido tem por finalidade promover o nível de acidez necessário para que ocorra a geleificação, realçando o aroma natural da fruta.

O doce poderá apresentar consistência cremosa, pastosa ou de corte. Pode ser classificado como simples, quando utilizado apenas uma categoria de polpa ou misto quando é acrescentado de um tipo de polpa. O processo de fabricação é idêntico, diferenciando um do outro na concentração de sólidos solúveis (°Brix) ou na adição de alguns alimentos (CARNEIRO; BEZERRA; GUEDES, 2009).

Segundo Lovatto (2016), o doce deve conter uma mistura de no mínimo 50 partes dos ingredientes vegetais da fruta mais 50 partes em peso dos açúcares, ou seja, proporção de 50:50 polpa: açúcar. As proporções fixadas por estes padrões, são baseadas em teor normal do Brix das frutas "in natura". A proporção mínima de cada ingrediente vegetal será de 20% sobre o total dos ingredientes vegetais, quando participar mais de um vegetal na composição do produto.

O processo e tempo de cocção dependerão de variáveis como o tamanho do recipiente utilizado no preparo, quantidade da mistura processada e temperatura, considerando que o tempo é um parâmetro relevante, visto que poderá influenciar em características sensoriais e tecnológicas do produto final (GAVA, 1977).

Para que a casca do maracujá seja utilizada na elaboração de doces com êxito deve, além de sua segurança absoluta, apresentem características sensoriais adequadas, com qualidade semelhante aos doces tradicionais. A única forma de se avaliar a qualidade é pela análise da cor e textura é preciso se realizar estudos que permitam o conhecimento prévio das concentrações da farinha a serem utilizadas e suas consistências resultantes (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de doce adicionado da farinha da casca do maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*) e sua caracterização de cor e textura.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Produtos Vegetais do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Matéria-prima

Os maracujás do mato foram adquiridos no mercado local de Montes Claros, em outubro de 2018 (época de safra do fruto na região), provenientes da região rural do município de Montes Claros. Os frutos foram selecionados conforme a aparência e grau de maturação, definidos pela coloração amarela da casca. Em seguida higienizados em 3 etapas a primeira lavagem em água corrente, para retirada de sujidade. A segunda em imersão em solução clorada 50 PPM de cloro ativo por 20 minutos e a terceira lavagem em água corrente, para retirada do excesso de cloro. Logo após foram cortados e despulpados mediante uso de uma despulpadeira industrial, envasados em sacos plásticos e congelados para uso posterior na elaboração dos doces.

Figura 1 - Fluxograma do processo para obtenção da polpa e farinha para elaboração dos doces



Fonte: Dos autores, 2019.

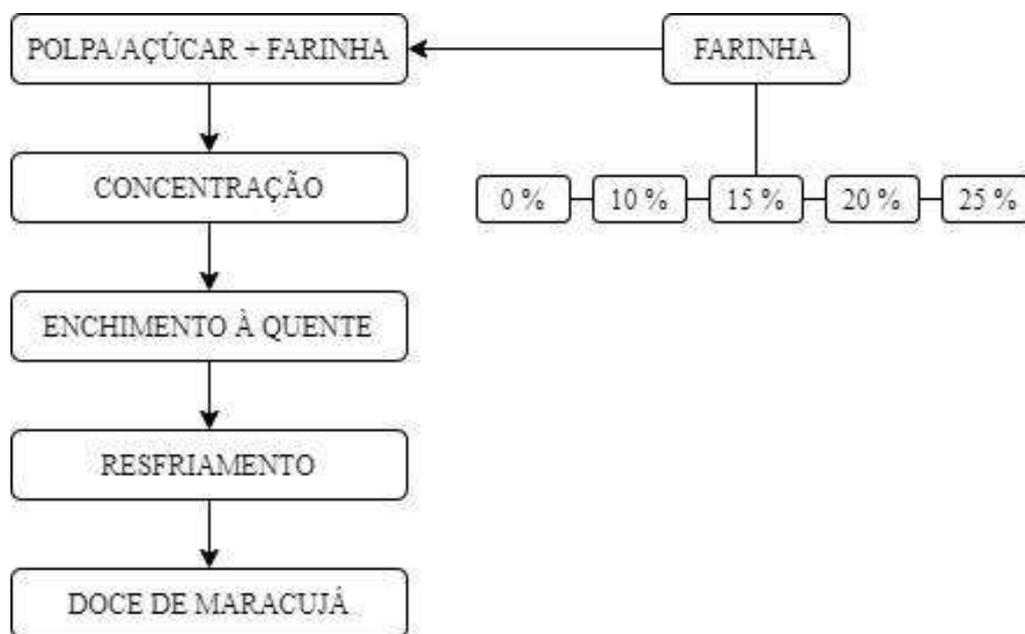
Para obtenção da farinha, as cascas obtidas do despulpamento foram desidratadas em secador de bandejas a 65°C até atingir a umidade de 10% (aproximadamente 24 horas). Após o resfriamento, as cascas foram trituradas em liquidificador, peneiradas e armazenadas em potes de vidros até sua utilização na formulação dos doces. A Figura 1 acima representa as etapas do processamento para obtenção da polpa e farinha para elaboração do doce de maracujá do mato.

Elaboração do doce

Na elaboração do doce foi utilizada uma relação polpa: açúcar de 50:50 e cinco formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) nas concentrações de 0%, 10%, 15%, 20% e 25% de farinha, respectivamente. A formulação F1 foi adicionada 0,5% de pectina e não sofreu adição de farinha (Figura 2).

Os ingredientes foram pesados e adicionados em uma panela de aço inoxidável sob aquecimento e agitação manual, concentrados até °Brix desejado na concentração final, sendo 65 °Brix para a formulação 0% e 55 °Brix para as demais formulações adicionadas de farinha e após isso, foram acondicionados em embalagens plásticas e armazenados para posteriores análises da cor e textura.

Figura 2 - Fluxograma da elaboração do doce de maracujá do mato



Fonte: Dos autores, 2019.

Para a determinação das concentrações de farinha na elaboração do doce foram realizados testes preliminares nas concentrações de 3,6%, 5,0%, 7,0%, 8,6%, 10,7%, 14,3%, 17,9%; 21,4%;

25,0%, 28,6%. O doce elaborado na concentração de 28,6% resultou em um produto com textura muito firme e aparência comprometida, pela qual optou-se por utilizar concentrações abaixo deste valor e em concentrações variadas, desde que não comprometesse a aparência e textura do doce. Logo, foram escolhidas as concentrações 0%, 10%, 15%, 20% e 25%.

Análises físicas

Análises da Cor

Os parâmetros de cor foram mensurados em colorímetro marca Konica Minolta (modelo KM – CR – 400), na escala CIELab, avaliando as coordenadas L^* , a^* e b^* , em que o L^* varia entre 0 (totalmente preto) e 100 (totalmente branco), a^* do verde (-) ao vermelho (+); b^* do azul (-) ao amarelo (+). Para cada doce e em cada um dos frascos foram realizadas três medições de cor.

Análise da Textura

A análise de dureza foi realizada utilizando um penetrômetro (modelo PTR-300 Instrutheme) uma probe cilíndrica de 1,0 cm de diâmetro. As amostras foram submetidas ao equipamento em triplicata e a força de penetração foi medida em Newton.

Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco formulações e 3 repetições. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de significância de 5%. O programa utilizado foi o SISVAR versão 5.6 e R-STUDIO.

Resultados e Discussão

Análises físicas

Cor

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de L*, a* e b* do doce de maracujá do mato. Para o parâmetro L*, indica que houve aumento da tonalidade clara conforme o aumento das concentrações de farinha. Para o parâmetro a*, F1 apresentou maior cor verde enquanto F5 apresentou cor levemente vermelha. Já no parâmetro b*, as formulações de cor amarela foram intensificadas de acordo com a adição de farinha.

Nessa mesma Tabela 1, Para L* (luminosidade) verifica-se que a maior concentração de farinha corresponde menor escurecimento dos doces, onde os resultados variaram de 29,93 para F1 e 38,26 para F5. Isso pode estar associado à quantidade de sólidos solúveis presentes no produto, como descrito por Moro *et al.* (2013), em que produtos com teor reduzido de sólidos solúveis apresentam tendência à coloração mais clara.

De acordo com Albuquerque (1997), durante a cocção, há formação de produtos derivados de reações enzimáticas e não enzimáticas (reação de Maillard, oxidação de vitaminas, caramelização), as quais são influenciadas pela fruta e por condições de processamento e formulação.

Tabela 1 – Avaliação da cor da cor dos doces elaborados com casca de maracujá

Formulações	L*	a*	b*
F1	29.93 ^d	-1.29 ^d	3.57 ^c
F2	34.65 ^c	-0.71 ^c	7.95 ^b
F3	35.66 ^b	-0.31 ^b	8.90 ^b
F4	36.36 ^b	-0.67 ^c	12.35 ^a
F5	38.26 ^a	0.18 ^a	12.66 ^a

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: F1: formulação com 0% de farinha da casca do maracujá; F2: 10% de farinha; F3: 15% de farinha; F4: 20% de farinha; F5: 25% de farinha.

Nota: Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

Policarpo *et al.* (2003) afirmaram que durante o cozimento ocorre um escurecimento devido à oxidação dos pigmentos, principalmente devido a altas temperaturas. Ocorre também um certo grau

de caramelização devido ao tempo de cozimento e presença de açúcares redutores (TORREZAN *et al.*, 2000). Os resultados do presente trabalho são similares aos encontrados por Feijó (2014), analisando doces de pêssego com diferentes concentrações de polpa:açúcar encontraram valores de L^* entre 21,40 para a menor concentração e 27,86 para maior concentração.

Nota-se (Tabela 1), em relação ao parâmetro a^* , que o doce elaborado na F1 alcançou o menor valor (-1,29), o que significa maior tonalidade da cor verde, enquanto a F5 correspondeu ao maior valor (0,18) o que significa uma leve tendência para cor vermelha. Já o parâmetro b^* , evidencia que, os doces com adição da farinha, resultaram em maior intensidade da cor amarela, o que pode ser explicado pela presença de carotenoides na farinha da casca do maracujá. Oliveira *et al.* (2009), a partir da análise de doces elaborados com adição de albedo da casca do maracujá-amarelo, observaram que os parâmetros a^* e b^* aumentaram em função ao teor de albedo o que resultou em tendência para vermelho e amarelo. Relataram ainda que o doce adicionado da casca apresentou diminuição na intensidade da cor amarela e aumento do vermelho.

Textura

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise física de textura do doce de maracujá do mato. A formulação F5 obteve o maior valor de força de corte, o que significa textura mais firme, evidenciando que a adição de farinha influenciou no resultado encontrado. As formulações F2, F3 e F4, resultaram em textura macia, quando comparados com produtos existentes no mercado.

Tabela 2 - Caracterização física de textura dos doces formulados com casca de maracujá

Formulações	Textura (N)
F1	0.29 ^c
F2	1.43 ^b
F3	1.48 ^b
F4	1.77 ^b
F5	5.28 ^a

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: F1: formulação com 0% de farinha da casca do maracujá; F2: 10% de farinha; F3: 15% de farinha; F4: 20% de farinha; F5: 25% de farinha.

Nota: Médias seguidas pelas letras na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

Na tabela 2, as maiores médias da textura (firmeza) foram observadas na formulação 4 e 5, neste caso, a adição de maior teor de farinha contribuiu para o aumento desses parâmetros. O que se pode afirmar que os doces elaborados com as formulações F4 e F5 seria os mais adequados dado que, os doces com maior quantidade de farinha apresentam mais benefícios para a saúde devidos a que resultam em maior teor de fibras. As variações nos valores de firmeza indicam diferenças na estrutura do gel do produto, devido a variabilidade nas formulações e métodos de processamento de cada produto, tendo em vista que a formação do gel e suas características finais estão diretamente relacionadas ao teor de sólidos solúveis, pectina, ácido e polpa.

Oliveira *et al.* (2009) analisando textura em doce de banana elaborado com adição da casca, encontraram resultados entre 5,57 e 6,57 N, sendo esses valores similares ao encontrado na formulação F5 desse trabalho.

Conclusão

A partir do trabalho verifica-se que é possível a elaboração de doces aproveitando a casca do maracujá do mato. A adição da farinha resultou em um produto com boa textura e cor adequada, podendo ser uma alternativa de geração de emprego e renda, tendo em vista o seu potencial de mercado. O doce elaborado com casca de maracujá do mato deve continuar sendo pesquisado em sua qualidade por ser uma boa alternativa de aproveitamento de resíduos e de redução da poluição do meio ambiente.

Referências

ABRAFRUTAS – Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados. Brasil é atualmente o maior produtor mundial de maracujá. **EMPRAPA**, 2019. Brasília – DF. Disponível em: <https://mais500p500r.sct.embrapa.br/view/publicacao.php?publicacaooid=90000036>. Acesso em: 4 maio 2019.

ALBUQUERQUE, J. P. Fatores que influenciam no processamento de geleias e geleadas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 1997.

ALMEIDA, E. L. *et al.* Análise de perfil de textura e aceitabilidade sensorial de goiabadas desenvolvidas com diferentes edulcorantes. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 56, n.6, p. 697-704, 2009.

ANDRE, A, M. *et al.* **Avaliação química e de textura de doces de corte elaborados com o albedo de maracujá**. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia - CONTECC 2018. Maceió- AL. p. 11-15.



BARROS, D. N. *et al.* Caracterização físico-química da casca do maracujá amarelo comercializado em diferentes estabelecimentos comerciais. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 8, n. 2, p. 01-06, 2018.

CARNEIRO, L. C.; BEZERRA, A. M. M.; GUEDES, J. A. M. Fabricação de doce de goiaba com aproveitamento do albedo do maracujá amarelo. **HOLOS**, [S.l.], v. 4, p. 26-32, 2010.

CÓRDOVA, K. R. V. *et al.* Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulisFlavicarpaDegener*) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [S.l.],2005.

DEUS, G. I. **Efeitos da Temperatura de Secagem nos Teores de Cianogênicos Totais e Fibra Alimentar de Casca de Maracujá**. 2011. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

DIAS, L. G. **Aproveitamento da casca do maracujá em formulações de bebidas lácteas saborizadas com boca boa (*buchenavia tomentosa*) e pêra do cerrado (*Eugenia Klotzchiana Berg*)**. 2016. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2016.

FALEIRO, F. G. JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. Importância socioeconômica e cultural do maracujá. Maracujá: O produtor pergunta, a Embrapa responde. IV. Coleção. Brasília -DF: **Embrapa Cerrados**, p. 15-22, 2016.

FEIJÓ, L. *et al.* **Caracterização físico-química e sensorial de doces de pêsego com diferentes teores de açúcar**. In 12º Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, 2014.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects Split plot type designs. **Revista Brasileira De Biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FONSECA, K. G. **Validação de descritores, caracterização e diversidade genética de cultivares de espécies comerciais e silvestres de maracujazeiro**. 2017.183f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Ed. Nobel, 1977.

GAVA, A. J.; DA SILVA, C. A.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo, NBL, 2009.

JESUS, O. N. de; FALEIRO, F. G. **Classificação botânica e biodiversidade**. Maracujá: O produtor pergunta, a Embrapa responde. IV. Coleção. Brasília-DF: Embrapa Cerrados. p. 23-32. 2016.

LOVATTO, M. T. Agroindustrialização de frutas I. Universidade Federal de Santa Mari. **Rede E-Tec Brasil**. p. 98, 2016.

MORO, G. M. B. *et al.* Avaliação da rotulagem e qualidade físico-química de geleias de uva comercializadas na cidade do Rio Grande – RS. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 7, n. 1, p. 897-910, 2013.



OLIVEIRA, J. S. **Recursos genéticos de Passiflora spp.: diversidade genética, caracterização morfoagronômica, molecular, germinação e armazenamento de sementes.** 2018. 205f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

OLIVEIRA JÚNIOR, M. X. *et al.* Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata Mast.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 2, p. 584-590, 2010.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Utilização de casca de banana na fabricação de doces de banana em massa – avaliação da qualidade. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 4, p. 581-590, 2009.

PITA, J. S. L. **Caracterização físico-química e nutricional as polpas e farinha da casca de maracujazeiros do mato e amarelo.** 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

POLICARPO, V. M. N. *et al.* Efecto de aditivos sobre color, textura y aceptación del dulce de umbu (*Spondias tuberosa*, Arr. Cam.) Verde como alternativa para la producción de dulces em massa. **Alimentaria**, v. 346, p. 111-116, 2003.

R Development Core Team (2019). **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 2 maio 2019.

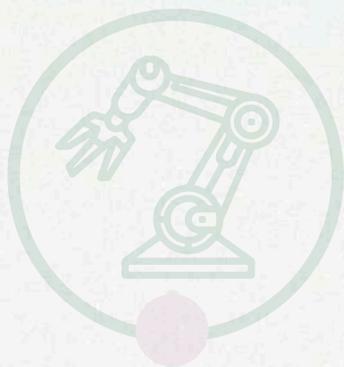
SOARES, R. M. *et al.* **Aproveitamento da casca do maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata*) para a produção de doce diet.** II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq - PAIC/FAPEAM. Manaus, 2013.

TORREZAN, R. Doce em massa. Brasília - DF. **Embrapa**, 2015. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1023820/1/AGFAMILIARDoceemmassaed012015.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2019.

TORREZAN, R. *et al.* Efeito da adição de ingredientes na cor de polpa de goiaba. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 209-220, 2000.

04 Capítulo

Avaliação de diferentes processos de condução para produção de cachaça: Estudo aplicado em Santo Antônio da Patrulha – RS, cidade gaúcha da cachaça



Capítulo 4

Avaliação de diferentes processos de condução para produção de cachaça: Estudo aplicado em Santo Antônio da Patrulha – RS, cidade gaúcha da cachaça

Marcos Vinicius Gust Gund*¹; Ronan Ribeiro Costa Junior²; Carlos Roberto de Menezes Peixoto³; Fernanda Arnhold Pagnussatt⁴

Resumo

A cachaça se destaca por ser uma bebida tipicamente brasileira, sendo a segunda bebida alcóolica mais consumida no país e o terceiro destilado mais consumido no mundo. Em Santo Antônio da Patrulha/RS, conhecida como a cidade gaúcha da cachaça, a produção é feita de modo artesanal, preservando a tradição. Todavia, pequenas modificações visando a melhoria do processo sempre podem ocorrer. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar um processo biotecnológico para a produção de cachaça. Para isso, o processo foi conduzido no modo descontínuo e descontínuo alimentado, aplicado o processo de recuperação e purificação do mosto fermentado e avaliado o seu comportamento cinético. O processo biotecnológico foi dividido em três etapas: 1) preparo do meio de cultivo e da levedura, 2) fermentação propriamente dita e 3) recuperação e destilação da cachaça. A cinética foi acompanhada através das análises de concentração de substrato e etanol, que permitiu a determinação do rendimento, eficiência e produtividade de ambos os processos fermentativos. O sistema descontínuo apresentou valores quanto à produção de álcool de 45,26 g/L, produtividade 2,06 g/L.h, fator de conversão de substrato em produto 0,41 g/g e eficiência de 80%. Para o sistema descontínuo alimentado, a produção de álcool foi de 47,83 g/L, produtividade 2,17 g/L.h, fator de conversão de substrato em produto 0,41 g/g e eficiência de 80%. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que os parâmetros de qualidade estão de acordo com a legislação. Além disso, o processo descontínuo alimentado foi mais indicado para a produção dessa bebida, pelo fato de ter apresentado maior produção de etanol.

Palavras-chave: Aguardente de cana-de-açúcar. Biotecnologia. Processos fermentativos.

¹ Discente, Escola de Química e Alimentos – EQA, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Curso de Graduação em Engenharia Agroindustrial Agroquímica.

² Discente, EQA/FURG. Curso de Especialização em Qualidade e Segurança de Alimentos.

³ Docente, EQA/FURG. Curso de Especialização em Qualidade e Segurança de Alimentos.

⁴ Docente, EQA/FURG. Curso de Especialização em Qualidade e Segurança de Alimentos e Programa de Pós-graduação em Sistemas e Processos Agroindustriais.

* E-mail para correspondência: mgustgund@gmail.com

Introdução

A cachaça é uma das bebidas alcóolicas mais conhecidas e consumidas no Brasil. Atualmente vem ganhando espaço no mercado interno e externo devido à crescente melhoria na qualidade do produto final, fazendo com que esta bebida se transformasse no terceiro destilado mais consumido no mundo. Atrás somente da bebida coreana Soju (destilado de arroz) e da vodka (CBRC, 2019). Este produto é considerado tipicamente brasileiro, sendo uma bebida exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20 °C, obtida pelo processo de destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais típicas, podendo ser adicionada até 6 g/L de açúcares (BRASIL, 2005a).

Segundo o Centro Brasileiro de Referência da Cachaça (2019), o Brasil conta com participação de 30.000 produtores, sendo que destes, 70% produzem cachaça de coluna ou industrial e 30%, cachaça de alambique ou artesanal. Deste percentual, somente 0,5 a 1% de toda produção anual é voltada para a exportação, onde o restante é comercializado e consumido no mercado interno. Embora o seu volume de exportação ainda está aquém do seu real potencial, a cachaça possui representatividade no cenário internacional, sendo que seus principais mercados no ano de 2019 foram os Estados Unidos, Paraguai, Alemanha e Itália, segundo o Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC, 2019).

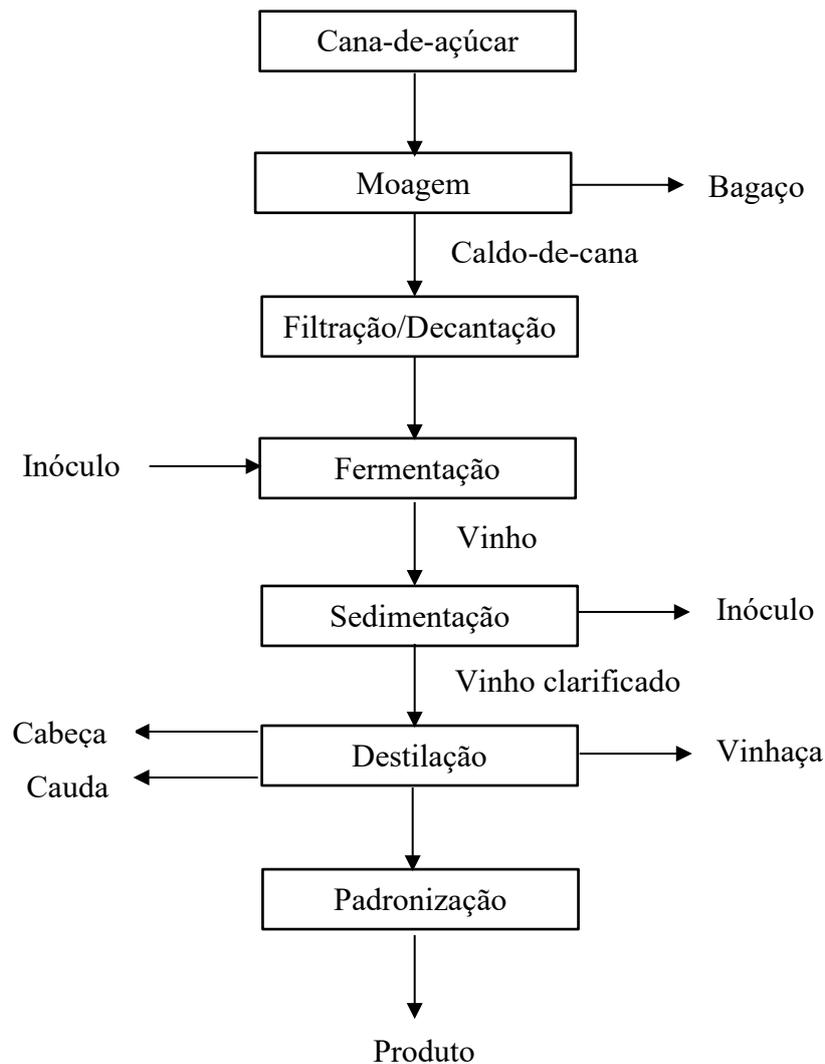
O processo de fabricação de cachaça artesanal é simples (Figura 1). No entanto, a bebida necessita de estudos aprofundados sobre a sua cadeia produtiva, para que assim possam surgir técnicas, alternativas de processamento e ainda, o aperfeiçoamento dos produtores artesanais, gerando um maior controle de qualidade e de padronização desta bebida, conforme a legislação vigente no país (MIRANDA *et al.*, 2007). Uma das regiões produtoras de cachaça artesanal no Brasil é o município de Santo Antônio da Patrulha – RS. De origem açoriana, os produtores rurais gradativamente foram solidificando a agricultura familiar e impulsionando a economia da região com o cultivo de cana-de-açúcar e seus derivados.

Durante toda a cadeia produtiva da bebida, vários fatores podem afetar a qualidade do produto final, como, por exemplo: matéria-prima, microrganismo (levedura), nutrientes, formas de condução do processo e boas práticas de fabricação (BPF). Além disso, por ser desenvolvida em todo o território brasileiro, deve ser levada em consideração a biodiversidade das regiões produtoras, fazendo com que a bebida tenha características sensoriais distintas quanto ao aroma e sabor (LIMA, 2001a).

Nesse sentido, apesar do crescimento internacional do mercado deste produto e a ampliação de sua aceitabilidade pelas diversas classes sociais no Brasil, os pequenos e médios produtores de

cachaça artesanal possuem grande desafio ao expandir o seu nicho de mercado. Uma vez que ficam alocados em um mercado mais restrito, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas, visando a qualidade do produto, com o intuito de gerar valor agregado ou aplicar esforços para a criação de um produto diferenciado para que assim, possam competir com as grandes empresas produtoras desta bebida.

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de cachaça



Fonte: Dos autores, 2021.

Dessa forma, a proposta do trabalho foi estudar diferentes formas de condução do processo fermentativo, visando aumentar a produtividade, melhorar a qualidade e obter um produto dentro dos padrões de comercialização estabelecidos pela legislação brasileira. Além disso, espera-se contribuir com os produtores agroindustriais da região de Santo Antônio da Patrulha – RS, agregando valor ao

produto final típico da região e fornecendo alternativas para a maior valorização desta bebida tradicionalmente brasileira.

Material e Métodos

A produção da cachaça foi realizada em biorreatores de 4,0 litros, onde foram analisadas a influência sobre a forma de condução do processo, recuperação e purificação do etanol após o processo fermentativo.

O caldo de cana-de-açúcar foi fornecido por um produtor rural de Santo Antônio da Patrulha – RS, município conhecido pela produção e tradição da cachaça. O fubá de milho e o fermento biológico prensado resfriado (Fleischmann) contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram adquiridos no comércio local. Os reagentes utilizados no processo fermentativo foram sulfato de zinco heptahidratado P.A. (Alphatec), sulfato de manganês monohidratado (Synth), superfosfato triplo granulado (Yara Brasil Fertilizantes S.A).

O preparo do mosto foi iniciado com a filtração do caldo de cana-de-açúcar através de uma peneira de malha fina com diâmetro de 20 cm, antes do procedimento de correção do pH, que segundo Mutton e Mutton (2010) deve se encontrar na faixa de 4,0 a 5,0, uma vez que interferentes podem influenciar neste parâmetro físico-químico. Em seguida, o caldo de cana-de-açúcar foi diluído com água destilada em frações, para obtenção da concentração de sólidos solúveis de 5 °Brix, 7 °Brix e 10 °Brix, utilizados na etapa de preparo do inóculo.

Na etapa de produção da cachaça, o caldo de cana apresentou uma concentração de sólidos solúveis de 14 °Brix. Além disso, o mosto foi adicionado de: 0,5 g/L de sulfato de zinco, 0,2 g/L de sulfato de manganês, 0,5 g/L de superfosfato triplo e 5,0 g/L de fubá de milho, seguindo os padrões recomendados no estudo desenvolvido por Peixoto *et al.* (2016).

O preparo do inóculo deu-se através da propagação do microrganismo nos próprios biorreatores, sendo erlenmeyers com capacidade de volume de 5 L. Nesse sentido, foi adicionado 80 mL de caldo de cana-de-açúcar diluído a 5 °Brix em 80 g de fermento biológico prensado resfriado, deixando a mistura no biorreator em banho-maria a 30 °C por 30 min até ser observado o crescimento exponencial da levedura. Posteriormente foi adicionado 160 mL do caldo a 7 °Brix, deixando-o por mais 30 min com o intuito de ocasionar a multiplicação celular. Por fim, adicionou-se mais 240 mL do caldo a 10 °Brix deixando-o por mais 30 min.

Após as etapas de preparo do inóculo e do mosto, foi possível iniciar a produção de etanol utilizando o processo fermentativo submerso conduzido no modo descontínuo e descontínuo



alimentado, sem agitação e com controle da temperatura a 30 °C. Para a condução do processo no modo descontínuo, o inóculo foi colocado no biorreator em conjunto com o volume total de mosto, no teor de sólidos solúveis de 14 °Brix. O biorreator foi mantido aberto durante 30 min, permitindo a adaptação da levedura. Em seguida, o biorreator foi fechado, iniciando assim a conversão dos açúcares diretamente fermentescíveis em etanol.

Já para o processo descontínuo alimentado, o inóculo foi colocado no biorreator e o mosto foi adicionado de forma intermitente, a cada 30 min, sendo que cada alimentação continha um volume de 800 mL, totalizando um tempo de enchimento dos biorreatores de 5 horas (BORGES, 2008). Após esse período, o processo passou a ser conduzido de forma descontínua.

O decréscimo do teor do °Brix foi acompanhado com leituras realizadas a cada duas horas com o auxílio de um refratômetro digital para ambos os processos fermentativos, sendo finalizado quando não houve o decaimento deste fator, obtendo-se assim, o vinho ou mosto fermentado. Vale ressaltar que foram realizadas análises dos vinhos obtidos após os processos descontínuo e descontínuo alimentado, quanto à concentração de substrato e de etanol, que permitiu a determinação do rendimento, eficiência e produtividade de cada processo, identificando assim qual a melhor forma de condução do processo fermentativo para a produção de cachaça.

O teor alcoólico do mosto fermentado foi calculado através da Equação 1 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$E = \frac{(Bi - Bf) \times 4}{7,4} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

Bi = Brix inicial (°Brix);

Bf = Brix final (°Brix).

A produção de etanol na fermentação foi calculada através da Equação 2 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$P = V \times \rho \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

V = volume formado de álcool no mosto fermentado (1 °GL = 10 mL de álcool/litro de vinho);

$\rho = 0,79$ g/mL, sendo a densidade do álcool.



O fator de conversão de substrato em produto foi calculado através da Equação 3 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$Y(p/s) = \frac{Pf - Pi}{Si - Sf} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

Pf = concentração final de etanol [g/L];

Pi = concentração inicial de etanol [g/L];

Sf = concentração final de açúcares [g/L];

Si = concentração inicial de açúcares [g/L].

A eficiência da fermentação foi calculada com base no rendimento obtido durante os experimentos e o rendimento teórico de Gay-Lussac, de acordo com a Equação 4 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$E = \frac{Y(p/s)}{Y(\text{teórico})} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

Y(p/s) teórico corresponde a 0,511 g de etanol/g de glicose.

A produtividade foi calculada conforme a Equação 5 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$Q = \frac{Pf - Pi}{t} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

Pf = concentração final de etanol [g/L];

Pi = concentração inicial de etanol [g/L].

t = tempo total de fermentação [h].

Para ambos os processos fermentativos, realizou-se a etapa de recuperação do etanol, sem decantação no vinho após a fermentação. Em seguida o etanol recuperado foi submetido ao processo de destilação, etapa também conhecida como purificação do bioproduto.

A destilação foi realizada em um sistema composto por balão de fundo redondo de 5 L, condensador e manta de aquecimento. Na montagem deste sistema, após a adição do mosto

fermentado no balão de fundo redondo, foi conectado o condensador acoplado de mangueiras para circulação de água e utilizado termômetro para o acompanhamento da temperatura durante este procedimento. Assim, o processo foi dividido em três etapas, para a obtenção das frações cabeça, coração e cauda. Essas frações representam cerca de 10%, 80% e 10%, respectivamente, do volume teórico total do produto (MUTTON; MUTTON, 2010). Cada etapa foi separada através da pesagem de frações distintas em tempos diferentes no decorrer da destilação.

O grau alcoólico foi determinado pelo método densimétrico (BRASIL, 2005b), baseado na separação do álcool por destilação da amostra e sua posterior quantificação de acordo com a densidade relativa do destilado, a 20 °C. Dessa forma, o grau alcoólico foi obtido através da leitura na tabela de grau alcoólico real (Densidade x Grau alcoólico), sendo expressa em %vol a 20 °C.

Resultados e Discussão

No presente trabalho, diferentes formas de condução do processo foram estudadas, visando melhorar a produtividade e a qualidade da cachaça. Além disso, investigou-se a cinética referente a cada processo fermentativo.

A matéria-prima obtida por um produtor da região de Santo Antônio da Patrulha apresentou uma concentração de sólidos solúveis de 21 °Brix e pH de 5,5. Esses valores são condizentes com a literatura para cana madura, com valores de pH entre 5,4 e 5,8 e concentração de sólidos solúveis superior a 18 °Brix (LIMA, 1999). Nestas condições, foi possível iniciar o processo fermentativo.

A cachaça produzida foi elaborada com a mesma formulação operando no sistema descontínuo e descontínuo alimentado. O tempo de duração do processo foi de 22 h. Os parâmetros: teor de sólidos solúveis (°Brix), teor alcoólico (°GL), produção (g/L mosto), produtividade (g/L.h), fator de conversão de substrato em produto (YP/S) e eficiência da fermentação foram avaliados após a operação de recuperação do bioproduto (sem decantação do mosto fermentado) e estão apresentados na Tabela 1.

A variação do teor de sólidos solúveis durante toda a fermentação para o sistema descontínuo foi de 14 a 3,4 °Brix. Já para o processo descontínuo alimentado o teor de sólidos solúveis ao final da fermentação foi de 14 para 2,8 °Brix. Ao observar a Figura 2 foi possível perceber que para o sistema descontínuo alimentado, o teor de sólidos solúveis permaneceu praticamente constante nas 5 primeiras horas, ocorrendo um leve decaimento de 11,2 a 9,8 °Brix sendo este o tempo de enchimento do biorreator. Para o sistema descontínuo, neste mesmo intervalo de tempo, houve um decaimento do °Brix de 13,2 para 7,5 °Brix, tendo assim um consumo maior de substrato. Essa assertiva refere-se ao

fato de que ao adicionar o substrato de maneira gradual, ocorre uma melhor adaptação do microrganismo ao meio, sendo menos agressiva ao seu desenvolvimento inicial, pois evita-se a inibição microbiana pelo excesso de substrato.

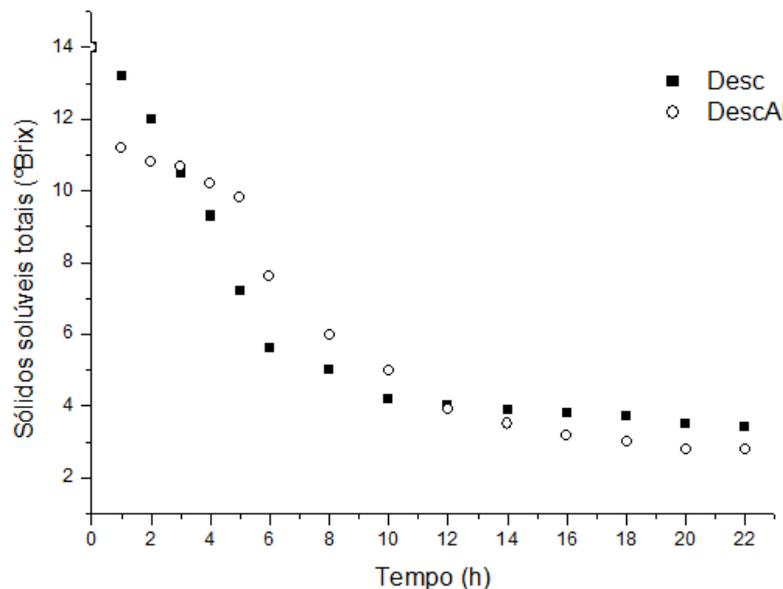
Tabela 1 - Cinética da fermentação para o processo descontínuo e descontínuo alimentado

Variáveis	Biorreator Descontínuo	Biorreator Descontínuo Alimentado
°Brix inicial	14	14
°Brix final	3,4	2,8
E (°GL)	5,73	6,05
P (g/L mosto)	45,26	47,83
Q (g/L.h)	2,06	2,17
Y (P/S)	0,41	0,41
E*	80,2	80,0

Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: E: teor alcóolico; P: produção de etanol; Q: produtividade; Y: fator de conversão; E*: eficiência de fermentação.

Figura 2 - Acompanhamento do °Brix durante toda a fermentação para o processo descontínuo e descontínuo alimentado de 4 L



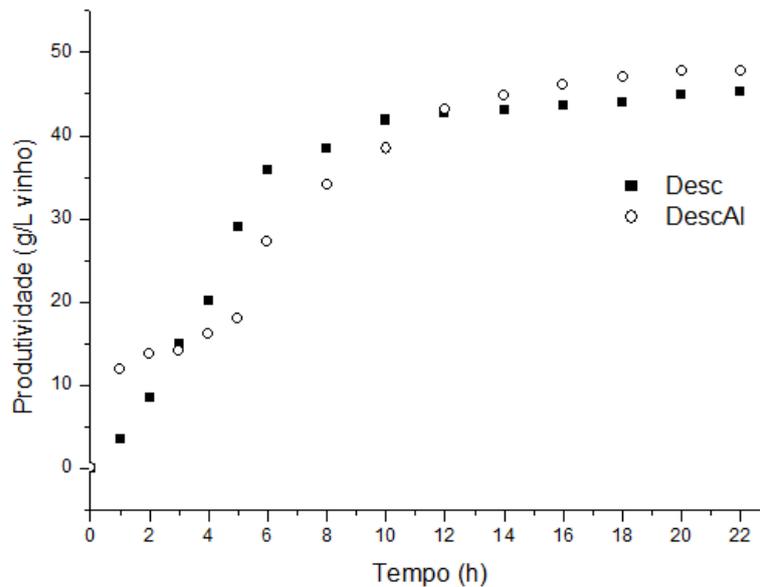
Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: Desc: Processo descontínuo; DescAl: Processo descontínuo alimentado.

A média dos valores encontrados para produção de etanol foi de 45,26 g/L de vinho para o sistema descontínuo e 47,83 g/L para o sistema descontínuo alimentado. Ao analisar a Figura 3, pode-

se observar que a produção de etanol no sistema descontínuo foi maior nas 5 primeiras horas quando comparado com o descontínuo alimentado, onde este se manteve praticamente constante no mesmo intervalo de tempo. Isso indica que o consumo de substrato (sacarose) para o sistema descontínuo alimentado foi menor quando comparado com o sistema descontínuo e, como consequência, ocasionou uma taxa menor de produção de etanol (GUIDINI, 2013).

Figura 3 - Produção de álcool durante a fermentação descontínua e descontínua alimentada de 4 L



Fonte: Dos autores, 2021.

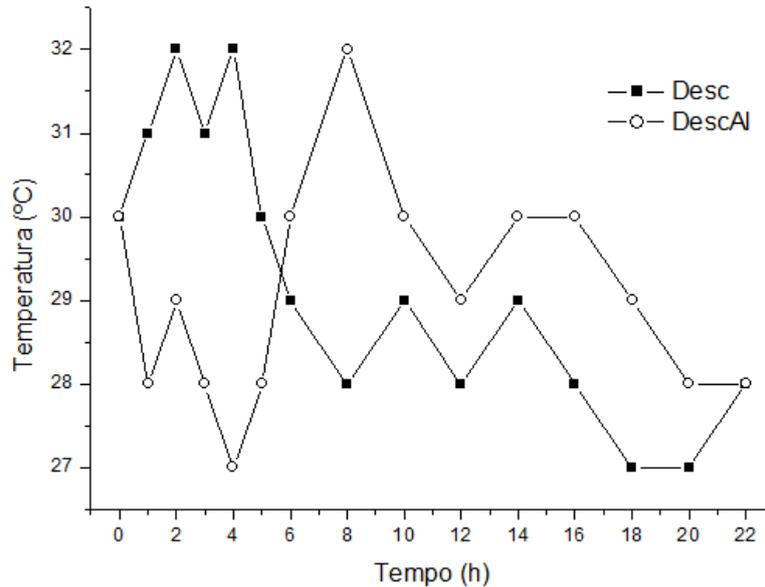
Legenda: Desc: Processo descontínuo; DescAl: Processo descontínuo alimentado.

Quanto ao fator de conversão de substrato em produto (Y_p/s), foi encontrado um valor de 0,41 g/g, levando a uma eficiência de fermentação de aproximadamente 80% para ambos os processos fermentativos. Esses valores foram iguais aos encontrados por Carvalho, Canilha e Silva (2008), que obtiveram uma eficiência de fermentação de 80,4% e um fator de conversão de substrato em produto de 0,41 g/g para fermentação de mosto de caldo-de-cana para produção de cachaça. Ribeiro (2016) encontrou resultado de 70,7% para fermento natural e 80,2% utilizando a levedura CA-11. Para ambos os resultados, a fermentação ocorreu em mosto de caldo-de-cana, com processo conduzido em batelada alimentada e com tempo de enchimento do biorreator de 2 horas. Sendo assim, os valores encontrados no presente trabalho se mostraram pertinentes quando comparados com outros autores da literatura científica.

A temperatura durante a fermentação foi acompanhada em banho-maria a 30 °C, sendo que, durante o processo ocorreram algumas variações no perfil da temperatura (Figura 4). Mesmo

ocorrendo essas variações, a faixa de temperatura permaneceu próxima aos valores considerados como adequados para fermentações alcoólicas, que são entre 25 e 35 °C (LIMA, 2001b).

Figura 4 - Comportamento da temperatura para o processo descontínuo e descontínuo alimentado



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: Desc: Processo descontínuo; DescAl: Processo descontínuo alimentado.

Conclusão

A cachaça produzida no presente estudo atendeu as especificações de qualidade estabelecidas pela legislação brasileira para ambos os processos estudados.

A cinética da fermentação dos processos permitiu obter resultados próximos para às duas formas de condução estudadas quanto ao fator de conversão de substrato em produto, eficiência de fermentação e produtividade. Todavia, o sistema descontínuo alimentado apresentou uma produção de etanol de 47,83 g/L enquanto que para o sistema descontínuo, o valor obtido para esse parâmetro foi de 45,26 g/L.

Dessa forma, os estudos iniciais realizados neste trabalho indicaram que o processo descontínuo alimentado é a forma de condução mais apropriada para a produção da cachaça em escala industrial, em função das características desse processo biotecnológico.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande – FURG, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pela oportunidade de realização deste trabalho, assim como os avaliadores dos trabalhos científicos do IV Simpósio de Engenharia de Alimentos – SIMEALI por sua disponibilidade voluntária.

Referências

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. 2008. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BRASIL. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, dispõe sobre regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 jun. 2005a.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), **Instrução Normativa n. 24 de 08 de setembro de 2005**. Aprova o Manual operacional de bebidas e vinagres. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2005b.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 31, n. 5, p. 493-498, 2008.

CBRC – Centro Brasileiro de Referência da Cachaça. **Números da Cachaça**. Disponível em: <https://www.expocachaca.com.br/numeros-da-cachaca/>. Acesso em: 12 mai 2021.

GUIDINI, C. Z. **Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes**. 2013. 148 f. Tese (Doutorado – Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2013.

IBRAC – Instituto Brasileiro da Cachaça. **Cachaça na Mídia**. Disponível em: <https://ibrac.net/cachaca-na-midia>. Acesso em: 12 mai 2021.

LIMA, U. A. **Aguardente: fabricação em pequenas destilarias**. 1ª ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1999. 187 p.

LIMA, U. A. Aguardentes In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Coord.) **Biotecnologia Industrial**. v.4, São Paulo: Edgar Blucher, 2001a. 145-180p.

LIMA, U. A. Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDT, W (Coord.) **Biotecnologia Industrial**. v.3, São Paulo: Edgar Blucher, 2001b. 01-43p.

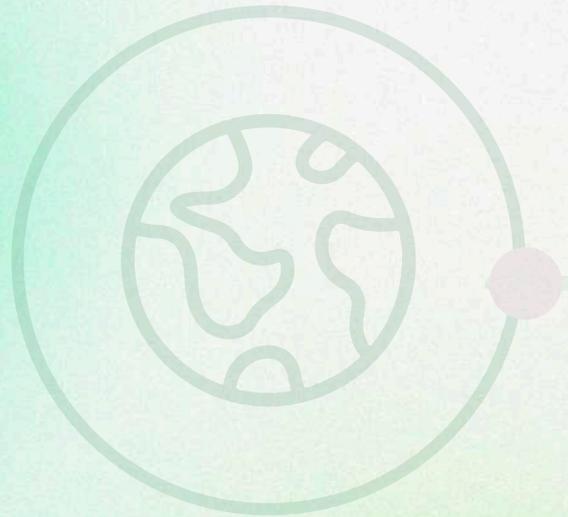
MIRANDA, M. B. *et al.* Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p. 897-901, 2007.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A.; Aguardente de cana. Cap. II In: **FILHO, W. G. V. et al., Bebidas alcoólicas**. v.1, São Paulo: Blucher, 2010. 237-266p.

PEIXOTO, C. R. M. *et al.* Análise estatística paramétrica de fatores de operação no processo de fermentação para obtenção de cachaça. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.7, p.16, 2016.

RIBEIRO, M. L. D. **Qualidade da cachaça em função do tratamento do caldo e tipo de fermento**. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, 2016.





05 Capítulo

Avaliação da estabilidade colorimétrica de pigmentos de *Sphagneticola trilobata* (Wedélia) extraídos com óleo de *Glycine max* (soja)

Capítulo 5

Avaliação da estabilidade colorimétrica de pigmentos de *Sphagneticola trilobata* (Wedélia) extraídos com óleo de *Glycine max* (soja)

Thais Rodrigues de Souza*¹; Maria Christina Sid Carvalho¹; Suely Pereira Freitas²

Resumo

O óleo de soja é o óleo vegetal mais consumido no Brasil. Por se tratar de um óleo extraído com solvente fóssil, uma etapa de refino se faz necessária por razões de segurança alimentar. Entretanto, no refino grande parte dos compostos bioativos do óleo são removidos. A *Sphagneticola trilobata* (L) Pruski, conhecida como Wedélia, é uma erva nativa do Brasil, cujos compostos já foram relacionados a tratamento fitoterápicos. A luteolina isolada de suas flores é um flavonoide que além de apresentar atividade biológica, é um corante natural responsável por conferir a cor amarelada à flor. Atualmente, o uso de corantes naturais vem assumindo uma posição relevante no processamento de alimentos, devido aos benefícios associados a uma alimentação mais natural e também a correlação de alguns corantes sintéticos com efeitos adversos à saúde humana. Assim, neste trabalho avaliou-se o efeito do método de secagem das flores de Wedélia na estabilidade colorimétrica do óleo comercial de soja contendo compostos lipossolúveis da flor, no sistema CIE L*a*b*. O processo foi conduzido por imersão, por 60 dias, das pínulas em óleo de soja na proporção 1:9 (m/m), respectivamente. Foram utilizadas flores desidratadas por quatro técnicas de secagem. Para fins comparativos, uma amostra contendo óleo de soja puro foi usado como padrão. Análise por ANOVA de medidas repetidas e teste Tuckey indicaram efeito significativo dos métodos de secagem das flores em todos os pontos no espectro de cor das amostras. Entretanto, a desidratação a frio foi a única que apresentou diferença significativa entre os tratamentos quanto à distância em relação ao padrão. Este resultado indicou o potencial do uso do pigmento da Wedélia como corante alimentício natural e como fonte de compostos bioativos a partir de um processamento sustentável, ampliando o uso do óleo de soja, como solvente renovável, na formulação de novos produtos.

Palavras-chave: *Asteraceae*. Colorimetria. Compostos bioativos. Liofilização. Micro-ondas.

¹Mestranda em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

² Professora Doutora, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

*Autor para correspondência: thais_souza@eq.ufrj.br

Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de soja do mundo. Em 2020, segundo levantamento da ABIOVE, a produção brasileira do grão girou em torno de 128 milhões de toneladas e para a safra de 2020/2021, estima-se uma produção de 135 milhões. Em relação ao óleo obtido dessa leguminosa, esse mesmo levantamento aponta que durante o período de 2020, a produção foi de aproximadamente 9,6 milhões de toneladas, sendo 89% direcionada para o consumo interno (ABIOVE, 2021).

No âmbito alimentício, o óleo de soja está presente na cesta básica da maioria da população brasileira, por ser comercializado a um preço mais competitivo se comparado aos seus concorrentes. Contudo, antes de chegar à mesa do consumidor, o óleo extraído do farelo do grão precisa passar por um processo de refino.

O refino de óleos vegetais, além de reduzir compostos de degradação, tem como objetivo torná-los mais agradáveis, em termos de sabor, odor e aparência. Todavia, esse processo envolve etapas que acabam por remover dos óleos compostos com funções biológicas, como os tocoferóis; pigmentos (clorofila e/ou carotenoides), o que diminui seu valor nutracêutico (LANFER-MARQUEZ, 2003; TINTORI, 2018).

Desde o final do século XX, observa-se uma mudança comportamental contínua nos consumidores, tornando-os mais exigentes quanto à qualidade dos alimentos e seu efeito na saúde humana (CRUZ *et al.*, 2007; RIBEIRO, 2019). Esse novo mercado reforça o interesse crescente no estudo das atividades biológicas promovidas pelos flavonoides presentes nas plantas. Assim, pesquisas envolvendo o uso de matérias-primas naturais com propriedades que atendam essas demandas, bem como as estratégias para viabilizar sua produção em escala industrial acabam sendo favorecidas.

A *Sphagneticola trilobata* (L) Pruski, uma reclassificação recente da então chamada *Wedelia papulosa* D.C, é uma planta pertencente à família Asteraceae. Trata-se de uma herbácea nativa e rústica, isto é, que não requer cuidados delicados. Na literatura científica diversos estudos abordam o uso de suas flores e folhas para fins fitoterápicos. Nos últimos anos, compostos da *Sphagneticola trilobata* já foram relacionados ao tratamento para a *diabetes mellitus*, devido seu efeito hipoglicemiante (diminuição do açúcar no sangue); anti-inflamatório, promovido pela presença de luteolina e ácido caurenóico; antisséptico e antioxidante (CZEPULA, 2006; FIDELIS, 2003; LEMÕES, 2012). Não foram encontrados estudos científicos relatando efeitos colaterais do uso da flor de Wedélia para o consumo humano.

A luteolina, flavonoide presente nas pínulas da flor, é um dos compostos secundários majoritários, que, além de apresentar funções anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva; manifesta propriedade corantes (corante natural amarelo) (MANZOOOR *et al.*, 2017; VANKAR; SHUKLA, 2018). Desse modo, considera-se que o estudo desta planta é relevante para o setor alimentício, principalmente na sua aplicação como corante.

Entre os corantes sintéticos amarelos mais usados para colorir alimentos artificialmente está o amarelo de tartrazina. Esse composto, entretanto, representa um grande risco para o meio ambiente e para a saúde humana e seu uso é relacionado a inúmeros casos de alergia, sendo inclusive discutida sua proibição em diversos países (BRASIL, 2011; FREITAS, 2012). Adicionalmente, o uso de corantes alimentares não permitidos são elevados no caso de alimentos produzidos por empresas de pequeno porte (SALEEM; NASREEN; KHAN, 2013).

Dado o exposto, os corantes naturais vêm ganhando relevância dentro do setor alimentício. Apesar de seus benefícios à saúde, os corantes de origem vegetal ainda apresentam limitações quanto custo e estabilidade. Na indústria, diferentes processos podem ser usados para estabilização de corantes naturais, desde o controle de pH, em particular para clorofilas e antocianinas, ao uso de antioxidantes. O tipo de extração desses corantes também influencia diretamente na estabilidade do mesmo. De acordo com dados da literatura, a extração enzimática em meio aquoso promove maior estabilidade dos pigmentos se comparado ao processo de extração com solventes apolares (SCHIOZER; BARATA, 2013). O processo de microencapsulamento por spray drying, por exemplo, também uma técnica utilizada pelas indústrias para evitar oxidação dos corantes naturais (SANTIAGO *et al.*, 2016).

Considerando que a flor de Wedélia não foi ainda explorada como fonte de pigmentos para uso como corante alimentício, este trabalho buscou avaliar a influência dos métodos de secagem das flores de Wedélia nas propriedades colorimétricas do óleo comercial de soja, usado como solvente extrator.

Material e Métodos

Os materiais utilizados neste estudo foram as flores de Wedélia, colhidas nos canteiros do campus da UFRJ- Fundão e o óleo de soja orgânico (Korin Agropecuária Ltda., Rio de Janeiro, RJ., Brasil) (Figura 1).



Figura 1 - Materiais usados: flor de Wedélia e óleo de soja orgânico



Fonte: Dos autores, 2018.

Secagem das pinulas

As flores de Wedélia foram colhidas, no tempo de floração, e então usadas para estudo da influência dos métodos de secagem da flor em suas propriedades corantes quando incubada por imersão no óleo de soja. Para este fim, selecionou-se as seguintes técnicas: liofilização; secagem em micro-ondas; secagem em câmara incubadora (10 °C) e secagem em saco de papel kraft por convecção natural (25 °C). Os parâmetros de cada processo de secagem estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros dos processos de secagem

Processo	Parâmetros para secagem	Equipamento
Liofilização	Tempo de liofilização: 1 h	Liofilizador L101 LIOTOP
Micro-ondas convencional	Potência micro-ondas: 400 W.kg ⁻¹ Tempo de secagem: 5 minutos	Micro-ondas consul facilite
Incubadora	Temperatura: 10 °C Tempo de secagem: 24 h	Incubadora B.O.D. NI1704
Convecção natural	Temperatura: 25 °C Tempo de secagem: 24 h	Sacos de papel Kraft

Fonte: Dos autores, 2018.

Incubação no óleo de soja

Após secagem, as flores foram incubadas na proporção de 10% (m/m) em óleo de soja em 4 vidros âmbar, cada um com cerca de 10 g do óleo. Os vidros de cor âmbar foram utilizados para evitar

influência da luz na variação de cor das amostras. As 4 amostras tiveram seu tempo zero (tempo inicial) de incubação iniciadas simultaneamente e as flores foram mantidas em contato com o óleo por um período de 60 dias, com base em resultados reportados por Freitas, Souza e Carvalho (2019). Após esse intervalo de tempo, as amostras foram filtradas através de papel de filtro em funil de büchner para separação das pínulas da fase líquida. Além das amostras contendo extrato das flores de Wedélia, também foi usado o óleo de soja orgânico puro como controle, acondicionado em vidro âmbar.

Análise colorimétrica

Para análise colorimétrica, utilizou-se o espaço de cor $L^* a^* b^*$, definido pela CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), onde as variáveis “a” e “b” têm significados de cor diferentes dependendo do sinal que os antecede e a combinação entre essas variáveis pode representar diferentes cores. O fator L^* varia de zero a 100 e indica a luminosidade da amostra. Em função dessas coordenadas, correlacionou-se a diferença de cores entre as amostras e o padrão por meio de uma equação matemática (ΔE^*_{ab}), para estipular a distância entre seus pontos dentro desse espaço de cor (LOPES, 2009). Os cálculos usados para diferenciar as colorações das amostras com e sem incubação de flores são apresentados na Equação 1.

$$\begin{aligned}\Delta L^* &= L^*_{Amostra} - L^*_{Padrão} \\ \Delta a^* &= a^*_{Amostra} - a^*_{Padrão} \\ \Delta b^* &= b^*_{Amostra} - b^*_{Padrão} \\ \Delta E^*_{ab} &= \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}\end{aligned}\tag{Eq. 1}$$

onde:

$a^*_{amostra}$ = valor da variável “a” obtida a partir da análise da amostra.

$a^*_{padrão}$ = valor da variável “a” obtida a partir da análise do padrão usado.

Δa^* = diferença no eixo vermelho/verde.

$b^*_{amostra}$ = valor da variável “b” obtida a partir da análise da amostra.

$b^*_{padrão}$ = valor da variável “b” obtida a partir da análise do padrão usado.

Δb^* = diferença no eixo amarelo/azul.

$L^*_{amostra}$ = valor da variável “L” obtida a partir da análise da amostra.

$L^*_{padrão}$ = valor da variável “L” obtida a partir da análise do padrão usado.

ΔL^* = diferença no eixo brilho/escurecimento.

ΔE^*_{ab} = valor total da diferença de cor.

As análises foram realizadas utilizando-se uma alíquota de 15 mL de cada amostra e do padrão. Para reduzir o erro experimental, o mesmo caminho óptico foi utilizado para todas as amostras e a influência da iluminação ambiente na análise foi testada. O experimento conduzido com um colorímetro Chroma meter CR-400 e os resultados foram analisados logo após a filtragem ($t = 0$) e após um ano ($t = 365$ dias). A leitura das variáveis foi feita em quintuplicata.

Análise estatística dos dados

Para avaliar a significância das técnicas de secagem, tempo de estocagem e interação método de secagem*tempo de estocagem na coloração do óleo conduziu-se uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. Posteriormente, os dados foram analisados pelo teste post hoc Tuckey com 95% de significância ($p < 0,05$), usando o programa Statistica (v.10) para avaliação dos resultados obtidos.

Resultados e Discussão

Durante o período de incubação da flor de Wedélia no óleo de soja foi possível visualizar uma mudança nítida na coloração do óleo de soja puro que passou de amarelo claro para laranja. Na Figura 2, ilustra-se a diferença de cor do óleo *in natura* se comparado com as amostras incubadas com flores desidratadas por secagem a frio e em micro-ondas.

Figura 2 - Diferença de cor entre o óleo de soja *in natura* e o óleo incubado a 10 °C com as flores secas em micro-ondas



Fonte: Dos autores, 2019.

Os resultados referentes à coloração da amostra expressos no espaço de cor L* a* b*, são ilustrados na Tabela 2. Para sua elaboração, utilizou-se a média da leitura e desvio padrão de cada variável do espaço CIEL*a*b*, selecionado para cada método de secagem e para o padrão (óleo puro).

Tabela 2 - Resultado da leitura de medidas após estocagem por 365 dias

Método de secagem	Variáveis	Média ± Desvio Padrão	
		Dia 1	Dia 365
Óleo puro	L*	21,80 ± 0,45	27,36 ± 0,32
	a*	-1,54 ± 0,07	-2,00 ± 0,23
	b*	5,58 ± 0,10	5,29 ± 0,12
Secagem a 25 °C	L*	19,04 ± 0,30	24,65 ± 0,67
	a*	2,13 ± 0,03	2,44 ± 0,24
	b*	4,84 ± 0,30	7,31 ± 0,35
Secagem a 10 °C	L*	17,47 ± 0,52	23,3 ± 1,58
	a*	3,19 ± 0,16	2,65 ± 0,63
	b*	9,33 ± 0,41	10,14 ± 1,40
Secagem em micro-ondas	L*	18,57 ± 0,36	25,66 ± 0,52
	a*	1,95 ± 0,27	1,86 ± 0,34
	b*	7,74 ± 0,05	8,21 ± 0,40
Liofilização	L*	19,26 ± 0,36	25,67 ± 0,62
	a*	2,83 ± 0,21	2,33 ± 0,22
	b*	7,63 ± 0,16	8,31 ± 0,77

Fonte: Dos autores, 2019.

Após análise estatística dos dados, ANOVA de medidas repetidas e teste Tuckey, constatou-se que a interação método de secagem*tempo de estocagem não apresentou efeito significativo nas respostas obtidas para as variáveis dependentes L* e a*. Contudo, seus efeitos em separado mostraram significância no intervalo de confiança utilizado. Neste caso, os impactos destas variáveis

nas características de cor das amostras foram avaliados individualmente, conforme apresentado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Resultados obtidos para os parâmetros de cor, L* e a*, do óleo de soja em função das diferentes técnicas de secagem

Amostras	Variáveis	Média ± Desvio Padrão
Óleo puro	L*	24,58 ± 3,07 ^c
	a*	-1,77 ± 0,29 ^D
Secagem a 25 °C	L*	21,85 ± 3,11 ^{a,b}
	a*	2,29 ± 0,23 ^{A, B}
Secagem a 10 °C	L*	20,38 ± 3,36 ^b
	a*	2,92 ± 0,51 ^C
Secagem em micro-ondas	L*	22,12 ± 3,90 ^a
	a*	1,91 ± 0,22 ^A
Liofilização	L*	22,47 ± 3,54 ^a
	a*	2,58 ± 0,33 ^{B, C}

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: Letras iguais indicam que os resultados não diferem estatisticamente. As letras maiúsculas fazem referência à variável a* e as letras minúsculas à variável L.

Tabela 4 – Efeito do tempo de estocagem nos parâmetros de cor, L* e a*, do óleo de soja

Tempo	Média ± DP
L* 0	19,23 ^a
L* 365	25,33 ^b
a* 0	1,71 ^B
a* 365	1,46 ^A

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: Letras iguais indicam que os resultados não diferem estatisticamente. As letras maiúsculas fazem referência à variável a* e as letras minúsculas à variável L.

As amostras secas a 25 °C, em micro-ondas e por liofilização, se diferenciam estatisticamente do óleo puro, mas não se diferenciam estatisticamente entre si. Já a amostra seca a 10 °C apresentou menor luminosidade se comparada aos tratamento micro-ondas e liofilizada, mas não se diferenciou da amostra seca a 25 °C. Em relação ao valor a*, que representa o eixo verde-vermelho, vê-se que, independentemente do tratamento, o óleo adquire uma cor mais avermelhada após incubação com as

flores (Tabela 3). Esse resultado já era esperado uma vez que o pigmento de interesse confere uma cor alaranjada à flor.

Para todas as amostras, observou-se uma nítida diferença ($p < 0,05$), para os valores de intensidade da variável a^* , que foi significativamente maior (1,91 a 2,92) se comparado ao óleo puro (-1,77). Neste caso, as amostras apresentaram maior intensidade da cor vermelha em relação ao óleo puro. Pode-se observar ainda uma diferença significativa no valor de a^* do primeiro ao último dia do tempo de estocagem. Observa-se também que após 365 dias houve uma pequena variação de intensidade, de aproximadamente 15%, da cor avermelhada. Esse decaimento pode ser explicado pela degradação do pigmento ao longo do tempo de estudo (Tabela 4).

A partir da Tabela 4, pode-se concluir que o tempo de armazenamento afetou significativamente a luminosidade de todas as amostras, independentemente do método de secagem. Em todos os experimentos, ocorreu um aumento de opacidade (redução do valor de L^*) da amostra se comparado com o óleo puro, indicando o transporte parcial do pigmento para o óleo no primeiro dia do ensaio.

Os resultados expressos na Tabela 4 indicam que, se comparadas entre si, a incubação das flores, independente da metodologia de secagem, resultou em um aumento de luminosidade após 12 meses, em relação ao tempo 0.

A cor mais alaranjada e o aroma mais floral são mudanças organolépticas observadas no óleo e que podem ter um impacto positivo do ponto de vista sensorial do produto.

No caso da variável b^* , a interação tempo versus tratamento foi significativa ($p < 0,05$). Neste caso, avaliou-se também os resultados referentes à interação. Na Tabela 5 estão apresentados os efeitos das técnicas de secagem e tempo de armazenamento no valor b^* .

A partir dos dados apresentados na Tabela 5 foi possível constatar que, exceto para o tratamento a 25 °C no tempo 0, todas as amostras se diferenciam significativamente ($p < 0,05$) do óleo *in natura*. A amostra incubada com as flores secas a 10 °C, quando comparado às demais, foi a que apresentou maior intensidade da cor amarela, durante o armazenamento. As amostras secas em micro-ondas e por liofilização não diferem entre si nessa variável de cor (b^*).

A amostra incubada com as flores secas a 10 °C apresentou cor mais aproximada do amarelo, o que pode conferir uma característica sensorial mais atrativa ao óleo. Ainda de acordo com Tabela 5, o óleo puro preservou a tonalidade amarelo claro ao longo do armazenamento. Esse mesmo comportamento foi observado nas amostras incubadas com flores secas a 10 °C, liofilizadas e por micro-ondas. Apenas a amostra incubada com as flores secas a 25 °C apresentou um aumento significativo na tonalidade amarela ao longo dos 12 meses.

Tabela 5 – Efeito do tempo de estocagem no valor do parâmetro b*

Tratamento	Tempo	(Média ± DP)
Secagem a 25 °C	B0	4,84 ± 0,30 ^c
Óleo puro	B365	5,29 ± 0,12 ^c
Óleo puro	B0	5,58 ± 0,10 ^c
Secagem a 25 °C	B365	7,31 ± 0,35 ^a
Liofilização	B0	7,63 ± 0,16 ^a
Secagem em micro-ondas	B0	7,74 ± 0,05 ^{a,b}
Secagem em micro-ondas	B365	8,21 ± 0,40 ^{a,b}
Liofilização	B365	8,31 ± 0,77 ^{a,b}
Secagem a 10 °C	B0	9,33 ± 0,41 ^{b,d}
Secagem a 10 °C	B365	10,14 ± 1,40 ^d

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: Letras iguais indicam que os resultados não diferem estatisticamente.

Os resultados referentes ao parâmetro global, delta E, podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Efeito do tratamento de secagem no valor do parâmetro delta E_{ab}

Tratamento	Média
Secagem a 25 °C	5,13 ± 0,63 ^a
Secagem em micro-ondas	5,19 ± 0,26 ^a
Liofilização	5,52 ± 0,43 ^a
Secagem a 10 °C	7,66 ± 1,34 ^b

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: Letras iguais indicam que os resultados não diferem estatisticamente.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 6, constata-se que a amostra incubada com as flores secas a 10 °C foi a única que se diferenciou dos demais tratamentos e apresentou maior diferença de cor se comparado ao óleo *in natura*, o que confirma a discussão dos parâmetros individuais. Esses resultados indicam que o processo de secagem a frio favoreceu a estabilidade da cor da flor de Wedélia. Esse fato pode ter como explicação um menor grau de degradação da luteolina quando a secagem foi conduzida em temperaturas mais brandas.

Não foram encontrados na literatura dados de extração de pigmentos naturais usando óleos vegetais como solvente. Entretanto, a luteolina extraída com metanol apresentou um espectro de cor

com tonalidade verde (VANKAR; SHUKLA, 2018) enquanto no presente trabalho a tonalidade predominante foi alaranjada. Isto ocorreu, possivelmente, devido à diferença de polaridade entre os solventes utilizados.

Conclusão

Neste estudo, pode-se observar que a técnica desenvolvida de extração de pigmentos a partir das flores de Wedélia por incubação destas diretamente na matriz oleosa, permitiu o transporte eficiente de pigmentos e outros compostos lipossolúveis dispensando o uso de solventes fósseis.

Dependendo do processo de secagem das flores e do tempo de incubação, o óleo obtido apresentou cores com intensidades diferentes. Entretanto, quando o processo foi conduzido com as flores secas a 10 °C o óleo apresentou melhores parâmetros no espaço de cor, em particular na luminosidade do produto. Portanto, constatou-se o potencial do uso do pigmento da Wedélia como corante alimentício natural estável e como fonte de compostos bioativos, ampliando o uso do óleo de soja na formulação de novos produtos.

Estudos envolvendo a caracterização, quantificação de luteolina, testes sensoriais e análise nutracêutica do óleo obtido, além de técnicas para isolamento e aplicação do corante para outros fins são sugestões de trabalhos futuros.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e à professora Ana Lucia Vendramini (EQ/UFRJ).

Referências

ABIOVE. **Brasil - Complexo Soja**. 2021 Disponível em: <https://abiove.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 18 de maio de 2021.

BRASIL. Câmara dos Deputados. **Projeto de lei n.º 1.271, de 5 de maio de 2011**. Proíbe a utilização do corante Amarelo Tartrazina na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia e dá outras providências. Brasília: Câmara dos Deputados, 2011. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=C16F17376D1F6900EAB3F9F5505FE299.proposicoesWebExterno1?codteor=1562855&filename=Avulso+-PL+1271/2011. Acesso em: 22 de maio de 2021.



CRUZ, G. F. R. *et al.* O comportamento do consumidor de alimentos funcionais. *In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GESTÃO DE PROJETOS, INOVAÇÃO E SUSTENTABILIDADE*, 6., 2007, São Paulo. **Anais[...]**, São Paulo: 2007. p. 1-16. Disponível em: <https://singep.org.br/6singep/resultado/611.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2021.

CZEPULA, A. I. **Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extratos de *Sphagneticola trilobata* (L.) Prusku (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*) (asteraceae) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica in vivo.** 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, 2006. Disponível em: <https://siaiap39.univali.br/repositorio/bitstream/repositorio/1438/1/Alexandra%20dos%20Santos%20Czepula.pdf>. Acesso em: 18 de maio de 2021.

FIDELIS, I. **Crescimento, armazenamento, homeopatia, produção de metabólitos secundários e teste biológico do extrato de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski em coelhos diabéticos.** Viçosa. 2003. 199f. Tese (Pós-graduação em fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/10284/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 18 de maio de 2021.

FREITAS, A. S. Corante artificial amarelo tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Revista Acta Tecnológica**. v. 7, n. 2, p. 65-72, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343173657_CORANTE_ARTIFICIAL_AMARELO_TARTRAZINA_UMA_REVISAO_DAS_PROPRIEDADES_E_ANALISES_DE_QUANTIFICACAO. Acesso em: 22 de maio de 2021.

FREITAS, S. P.; SOUZA, T. R.; CARVALHO, M. C. S. Effect of the drying process on mass transport of *sphagneticola trilobata* pigments using soybean oil as solvent. *In: EUROPEAN DRYING CONFERENCE*, 7., 2019, Torino. **Book of Abstracts [...]**, Torino: 2019. p. 165-179.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 227-242, set. 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322003000300003&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 de maio de 2021.

LEMÕES, M. A. M. *et al.* O uso da planta *sphagneticola trilobata* por agricultores acometidos de diabetes mellitus. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental**. Online, v. 4, n. 1, jan.-mar. 2012, p. 2733-2739. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/5057/505750892020.pdf>. Acesso em: 18 de maio 2021.

LOPES, L. C. **Controle metrológico da cor aplicado à estamperia digital de materiais têxteis.** 2009. 142f. Dissertação (Mestrado em Metrologia) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2009.

MANZOOR, M. F. *et al.* Food based phytochemical luteolin their derivatives, sources and medicinal benefits. **International Journal of Agriculture and Life Sciences**, v. 3, n. 11, p.195-207, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/332275820_Food_based_phytochemical_luteolin_their_derivatives_sources_and_medicinal_benefits. Acesso em: 21 de maio de 2021.

RIBEIRO, P. C. E. **Motivações do consumidor em relação à escolha de alimentos biológicos.** 2019. 112f. Dissertação (Mestrado em Publicidade e Marketing) – Escola Superior de Comunicação Social, Lisboa, 2019. Disponível em: https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/11516/1/Tese%20Mestrado%20Publicidade%20Mark_Paula%20Ribeiro%20n%c2%ba10602%20%281%29.pdf. Acesso em: 22 de maio de 2021.

SALEEM, N.; NASREEN, U.; KHAN, S. I. Survey on the use of synthetic Food Colors in Food Samples procured from different educational institutes of Karachi city. **Journal of tropical life science**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2013.

SANTIAGO, M. C. P. A. *et al.* Effects of encapsulating agents on anthocyanin retention in pomegranate powder obtained by the spray drying process. **LWT**, v. 73, p. 551-556, 2016.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. **Revista Fitos**, v. 3, n. 02, p. 6-24, 2013

TINTORI, F. R. P. **Bioacessibilidade in vitro de tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais.** 2018. 89f. Dissertação (Mestre em ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-04012019-091341/publico/Flavia_Regina_Paggiaro_Tintori.pdf. Acesso em: 22 de maio de 2021.

VANKAR, P. S.; SHUKLA, D. Spectrum of colors from reseda luteola and other natural yellow dyes. **Journal of Textile Engineering & Fashion Technology**, v. 4, n. 2, p. 107-120, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Dhara-Shukla-2/publication/328246457_Spectrum_of_colors_from_reseda_luteola_and_other_natural_yellow_dyes/links/5c0661e8299bf169ae3081ba/Spectrum-of-colors-from-reseda-luteola-and-other-natural-yellow-dyes.pdf. Acesso em: 21 de maio de 2021.



06 Capítulo

Biofortificação de brotos
de feijão mungo com
ferro e zinco



Capítulo 6

Biofortificação de brotos de feijão mungo com ferro e zinco

Vanessa Cristina Silva¹; Paulo Sérgio Monteiro*²; Willian Rodrigues Macedo²;
Danúbia Aparecida Nobre³

Resumo

As deficiências de ferro e zinco são importantes problemas de saúde global e suas principais causas são devido à baixa diversidade de dietas e ao consumo de alimentos com reduzida disponibilidade de minerais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do condicionamento osmótico de sementes de feijão mungo na biofortificação de brotos com ferro e zinco. O condicionamento osmótico foi realizado em concentrações de ferro ou zinco de 0, 20, 40 e 60 μM por 15 horas, a 25 °C. Para a obtenção dos brotos, as sementes submetidas ao condicionamento osmótico foram germinadas em papel do tipo Germitest por 5 dias em uma estufa incubadora tipo BOD. A concentração de minerais não apresentou efeito significativo sobre a taxa de germinação e vigor das sementes e no comprimento das raízes dos brotos. O comprimento do hipocótilo foi significativamente influenciado apenas pelo tratamento com zinco. O incremento na concentração de minerais aumentou significativamente a massa de brotos, exceto para ferro 60 μM onde foi observado efeito fitotóxico. O condicionamento osmótico das sementes com ferro e zinco na concentração de 60 μM resultou em aumento de 82% (m/m) e 46% (m/m) na concentração de ferro e zinco dos brotos, respectivamente. Efeito significativo também foi encontrado no teor de proteínas, onde o condicionamento com soluções de zinco 60 μM e ferro 20 μM resultou em aumento da concentração proteica em 23% (m/m) e 50% (m/m), respectivamente. O teor de lipídeos também foi influenciado significativamente pela concentração de minerais, onde ferro e zinco na concentração de 60 μM proporcionaram aumento de 19% (m/m) e 28% (m/m) na concentração lipídica, respectivamente. A técnica de condicionamento osmótico das sementes é tecnicamente viável para a biofortificação de brotos de feijão verde mungo, além de ser de baixa complexidade e de baixo custo.

Palavras-chave: Anemia. Feijão-moyashi. Malnutrição. Nutrição. Vegetariano.

¹ Estudante de graduação, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa.

² Professor, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa.

³ Professora, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

*E-mail para correspondência: psmonteiro@ufv.br



Introdução

Ferro e zinco são nutrientes essenciais para os humanos, mas as quantidades normalmente ingeridas diariamente são frequentemente abaixo dos níveis adequados. Estas deficiências nutricionais estão entre os principais problemas de saúde pública mundial, principalmente em países em desenvolvimento onde as dietas são baseadas principalmente em cereais. Estas fontes alimentares contêm quantidades consideráveis de inibidores tais como ácido fítico e taninos, que influenciam negativamente na biodisponibilidade dos minerais (GABAZA *et al.*, 2018).

A ingestão inadequada de ferro, zinco, vitamina A e iodo envolve, aproximadamente, dois bilhões de pessoas mundialmente, atingindo principalmente crianças (CLEMENS, 2014). Em 2016, 155 milhões de crianças com idade abaixo de 5 anos apresentavam raquitismo. Além disso, nesta faixa etária, cerca de 45% das mortes foram relacionadas a condições de subnutrição (WHO, 2017).

Neste contexto, a biofortificação é uma estratégia de grande relevância para aumentar a concentração de minerais em alimentos destinados ao consumo humano. A biofortificação é um processo de enriquecimento de alimentos com nutrientes como minerais e vitaminas, que ao serem incorporados nas dietas contribuem para a redução da desnutrição (JEONG; GUERINOT, 2008). Assim, diferentes métodos incluindo a melhoria de práticas agrônômicas tais como aplicação foliar de fertilizantes, seleção de germoplasma e melhoramento genético de plantas têm sido utilizados para aumentar a biodisponibilidade de ferro e zinco em cereais (BOUIS; SALTZMAN, 2017; RAMIREDDY; GALUSZKA; SCHMÜLLING, 2018).

O condicionamento osmótico é uma técnica baseada na hidratação controlada de sementes até o início dos processos metabólicos relacionados à germinação sem que ocorra a emergência da radícula. Os objetivos da técnica são obter melhores taxas, uniformidade e germinação sincronizada e precoce (ATIQUE-UR-REHMAN *et al.*, 2012). A germinação é um processo fisiológico conhecido e utilizado para a produção de alimentos como cereais e leguminosas caracterizados por apresentarem maior biodisponibilidade de nutrientes. Durante o processo, a concentração de fatores antinutricionais tais como fitato e oxalato das sementes é reduzida, o que influencia no aumento da disponibilidade dos minerais (ZOU *et al.*, 2014).

Estudos realizados objetivando a biofortificação de brotos de soja com zinco demonstraram a possibilidade de utilização da técnica de condicionamento osmótico com esta finalidade (JI; CHE, 2009; ZOU *et al.*, 2014) e criaram perspectivas para a biofortificação de várias culturas vegetais.

A crescente percepção da dieta como meio de prevenir doenças e melhorar a qualidade de vida tem influenciado nas escolhas dos consumidores. O interesse por produtos à base de plantas tem

aumentado consideravelmente, uma vez que estes são considerados alimentos saudáveis não somente pelos vegetarianos, mas também por uma considerável parte da população em geral. Neste contexto, o desenvolvimento sustentável de alimentos seguros e saudáveis de uma perspectiva orientada para o consumidor é um dos principais propulsores na área de inovações em alimentos (APARICIO-GARCÍA *et al.*, 2021).

O consumo de brotos de feijão mungo (*Vigna radiata* L.), o qual é originário do Extremo Oriente, tem se difundido em países ocidentais onde são reconhecidos como sendo de grande importância para uma alimentação saudável, principalmente em função do seu conteúdo de proteínas, vitaminas, minerais e fibras (IACUMIN; COMI, 2019).

Assim, a biofortificação de brotos de feijão mungo por meio do condicionamento osmótico pode ser uma ferramenta auxiliar para as estratégias que objetivam reduzir as deficiências de ferro e zinco da população, como também uma alternativa para a inserção de novos produtos de origem vegetal no mercado. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do condicionamento osmótico de sementes de feijão mungo com diferentes concentrações de ferro e zinco na biofortificação de brotos.

Material e Métodos

Materiais e reagentes

As sementes de feijão mungo verde (*Vigna radiata* L.) foram obtidas no comércio local na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da empresa Dinâmica Química Contemporânea (Diadema, São Paulo, Brasil) e possuíam grau analítico.

Condicionamento osmótico e produção dos brotos

As sementes foram separadas e sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio 200 mg/L durante 5 minutos e logo após foram enxaguadas com água deionizada. As sementes foram separadas em grupos de 50 unidades por repetição para cada um dos tratamentos. Na sequência foram imersas em 100 mL de solução de ferro ou zinco nas concentrações de 0, 20, 40 e 60 μ M durante 15 horas, a 25 °C. Após este período, as sementes foram retiradas das soluções, lavadas com água deionizada e submetidas ao teste de germinação. As sementes foram acondicionadas em três camadas de papel do

tipo Germitest umedecido com água deionizada em volume igual a 2,5 vezes em relação à massa de papel utilizada e mantidas à 25 °C em estufa incubadora tipo BOD durante 5 dias (BRASIL, 2009).

Após a germinação, os brotos foram submetidos às análises de crescimento e na sequência foram desidratados em estufa com circulação de ar na temperatura de 62 °C até obtenção de peso constante. As amostras desidratadas foram armazenadas em recipientes herméticos para análises posteriores.

Vigor e taxa de germinação

O vigor e a taxa de germinação das sementes, expressos em porcentagem, foram determinados no quarto e quinto dia de germinação, respectivamente, de acordo com a metodologia de análises de sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), com modificações.

Tamanho das plântulas e rendimento da produção de brotos

As plântulas foram retiradas da região do terço médio do papel de germinação, no quinto dia após a semeadura, e com auxílio de uma régua milimétrica foram aferidas as medidas das partes das plântulas normais emergidas (raiz primária e hipocótilo), conforme metodologia proposta por Nakagawa (1999). Os resultados médios por plântula foram expressos em centímetros. Para a determinação do rendimento da produção, os brotos foram pesados em balança analítica e os resultados foram expressos em gramas.

Determinação de umidade, proteínas e lipídeos dos brotos

As amostras de brotos foram submetidas à secagem a 105 °C até obtenção de peso constante e posteriormente foram resfriadas em dessecador. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre a massa inicial e a massa final da amostra e o resultado foi expresso em porcentagem (AOAC, 1995).

Para determinação do teor de proteínas foi utilizado o método de Kjeldahl, que consiste na determinação de nitrogênio total da amostra. Para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteínas foi utilizado o fator de 6,25 e o resultado foi expresso em porcentagem (m/m) (AOAC, 1995).



A extração da fração lipídica foi realizada em aparelho Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente e após pesagem da fração extraída, o teor de lipídeos foi calculado e expresso em porcentagem (m/m) (AOAC, 1995).

Determinação da concentração de ferro e zinco nos brotos

Para a determinação das concentrações de ferro e zinco foram pesadas 0,5 g das amostras de brotos previamente desidratadas. Subsequentemente, as amostras foram submetidas à digestão em 15 mL de solução contendo ácido nítrico 65% (v/v) e ácido perclórico, na proporção de 3:1, à 180 °C durante 4 horas. Após a liquefação e resfriamento, as amostras foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água deionizada. A análise foi realizada por espectrometria de absorção atômica de chama (AA240F5-Varian- China) seguindo as orientações do fabricante.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado com quatro tratamentos, referentes ao condicionamento osmótico em diferentes concentrações de ferro ou zinco, avaliados separadamente. O experimento foi conduzido com quatro repetições por tratamento e os dados foram submetidos à análise de regressão.

Resultados e Discussão

Taxa de germinação e vigor das sementes

A germinação de sementes é definida como a protrusão da radícula através do revestimento da semente (NAKAUNE *et al.*, 2012) e o comprimento maior ou igual a 3 milímetros foi considerado como padrão neste estudo. O vigor das sementes é caracterizado como as propriedades que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais (BAALBAKI *et al.*, 2009).

As concentrações de ferro e zinco utilizadas no condicionamento osmótico das sementes não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) na taxa de germinação e no vigor das sementes (Tabela 1), as quais apresentaram alta qualidade fisiológica, com elevada expressão do seu potencial genético.



Tabela 1 - Taxa de germinação e vigor das sementes de feijão mungo

Concentração mineral (μM)	Taxa de germinação (%)		Vigor (%)	
	ferro**	zinco**	ferro**	zinco**
0	99,0	99,0	98,5	99,0
20	99,0	100,0	98,5	98,0
40	99,0	99,0	98,5	96,5
60	100,0	98,5	98,5	97,0
CV (%)	1,69	1,03	3,10	5,00

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: **não significativo; CV: coeficiente de variação.

Nota: Resultados expressos como média.

Portanto, os resultados permitem inferir que o uso de diferentes concentrações de ferro e zinco não causou nenhum dano às sementes e conseqüentemente à germinação do feijão mungo. Przybysz *et al.* (2016) também não encontraram efeito significativo na dinâmica e na taxa de germinação de sementes de feijão mungo umedecidas com solução de ferro com concentração na faixa de 6 a 36 mg/L.

O feijão mungo tem um mercado de grande relevância e é amplamente cultivado em vários países asiáticos e em algumas regiões da Europa, Canadá e Estados Unidos (HOU *et al.*, 2019). Assim, a obtenção de altas taxas de germinação no processo de produção de brotos comestíveis se reflete em ganhos qualitativos e quantitativos para os produtores (LOURES; NÓBREGA; COELHO, 2009).

Tamanho da plântula e rendimento da produção de brotos

O interesse por brotos enriquecidos com elementos essenciais tem aumentado, mas a biofortificação só pode ser justificada quando há acúmulo do elemento desejado e não há redução na produção de biomassa ou valor nutricional (PRZYBYSZ *et al.*, 2016).

O tamanho do hipocótilo do feijão mungo foi influenciado ($p < 0,01$) apenas pela concentração de zinco, onde a concentração de 60 μM proporcionou aumento de 10% no comprimento. O comprimento da raiz não foi influenciado pelas concentrações de minerais (Tabela 2).

O aumento da concentração de ferro no condicionamento osmótico teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a massa de brotos, onde o aumento de massa foi observado para todas as concentrações, exceto para a concentração de 60 μM , onde foi observado efeito negativo. Para o zinco, o aumento da concentração mineral no condicionamento osmótico também teve efeito

significativo ($p < 0,05$) e proporcionou aumento na massa dos brotos (Tabela 3). A redução na massa dos brotos observada na concentração de ferro 60 μM pode ter ocorrido devido ao efeito fitotóxico causado pela alta concentração de ferro acumulada nas sementes. Os minerais são importantes no processo de germinação, pois desempenham papéis específicos no desenvolvimento das sementes e das plantas. No entanto, concentrações inadequadas durante o processo prejudicam o desenvolvimento dos brotos (MAGALHÃES, 2009). De forma contrária, Przybysz *et al.* (2016) não encontraram diferença significativa na massa fresca de brotos obtidos de sementes tratadas com solução de ferro na concentração de 6 a 36 mg/L.

Tabela 2 - Comprimento das raízes e do hipocótilo dos brotos de feijão mungo

Concentração mineral (μM)	Comprimento da raiz (cm)		Comprimento do hipocótilo (cm)	
	ferro **	zinco**	ferro **	zinco*
0	13,48 \pm 0,44	13,48 \pm 0,44	9,29 \pm 0,22	9,29 \pm 0,22
20	12,41 \pm 0,62	14,41 \pm 0,41	8,30 \pm 1,29	9,73 \pm 0,13
40	12,80 \pm 0,46	12,79 \pm 0,57	9,53 \pm 0,29	9,84 \pm 0,11
60	12,84 \pm 0,57	13,04 \pm 0,36	9,43 \pm 0,19	10,22 \pm 0,28
C.V (%)	9,00	8,32	16,72	4,40

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: *significativo; ** não significativo; CV: Coeficiente de variação.

Nota: Resultados expressos como média e erro padrão da média. Hipocótilo de feijão mungo tratado com zinco ($Y = 0,029X + 9,3354$).

Tabela 3 - Efeito das concentrações de ferro e zinco na massa de brotos de feijão mungo

Concentração mineral (μM)	Massa de brotos (g)	
	ferro *	zinco*
0	21,26 \pm 0,64	21,26 \pm 0,64
20	22,61 \pm 0,53	23,52 \pm 0,54
40	24,27 \pm 0,45	21,96 \pm 0,19
60	22,65 \pm 0,29	23,72 \pm 0,29
C.V (%)	4,64	5,33

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: *significativo; CV: Coeficiente de variação.

Nota: Resultados expressos como média e erro padrão da média.

Ferro e zinco são nutrientes essenciais para as plantas. Além disso, participam de processos importantes como fotossíntese, respiração e síntese de DNA, mas em excesso podem causar redução

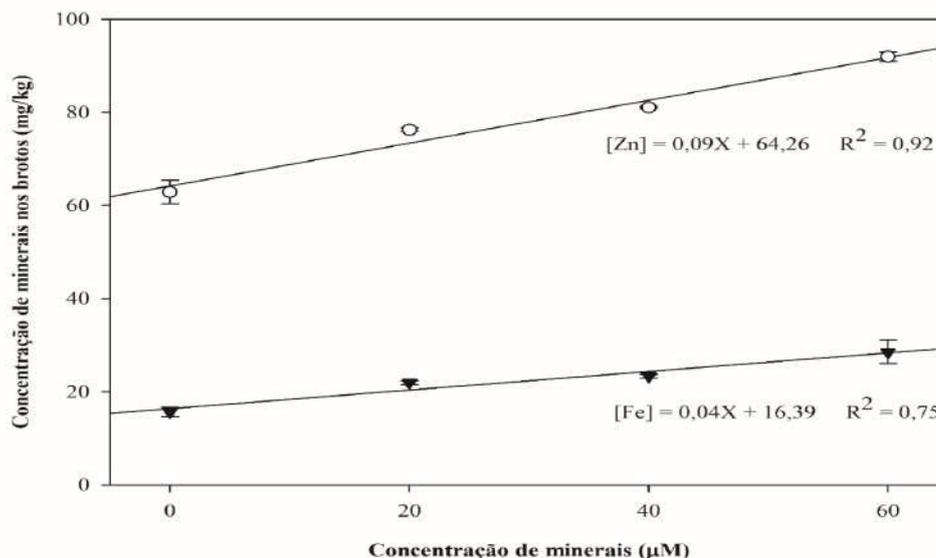
no crescimento e na produtividade das plantas (JUCOSKI *et al.*, 2016). Zinco é indispensável em diversos processos como o metabolismo de carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos, além da síntese de proteínas. Sua deficiência reduz o crescimento da planta, a resistência a condições de estresse e a síntese de clorofila. No entanto, o zinco é tóxico para as plantas quando está presente em altas concentrações (SHARMA *et al.*, 2013).

O maior rendimento na produção de brotos germinados proporciona maior retorno financeiro para os produtores. Assim, no desenvolvimento da biofortificação por condicionamento osmótico das sementes é importante que sejam utilizadas concentrações adequadas de minerais que possibilitem aumento da concentração de minerais nos brotos e também efeito positivo na produtividade.

Concentração de ferro e zinco dos brotos

As concentrações de ferro utilizadas no condicionamento osmótico das sementes resultaram em aumento significativo ($p < 0,01$) da concentração de minerais nos brotos (Figura 1), onde a concentração de 60 μM resultou em aumento de 82% (m/m) na concentração do mineral nos brotos, promovendo a biofortificação da cultura. Da mesma forma, Przybysz *et al.* (2016) observaram aumento na concentração de ferro na faixa de 36% (m/m) a 61% (m/m) em brotos de feijão mungo obtidos de sementes tratadas com solução de ferro em concentrações na faixa de 6 a 36 mg/L.

Figura 1 - Efeito da concentração de minerais do condicionamento osmótico na concentração de ferro e zinco nos brotos de feijão mungo



Fonte: Dos autores, 2020.

Nota: Resultados expressos como média e erro padrão da média.

O aumento da concentração de zinco no condicionamento osmótico também teve efeito significativo ($p < 0,01$) sobre a concentração do mineral nos brotos produzidos, onde o condicionamento a 60 μM resultou em aumento de 46% (m/m) na concentração de zinco dos brotos. Zou *et al.* (2014) também observaram aumento considerável na concentração de zinco em brotos de soja obtidos a partir de sementes submetidas ao condicionamento osmótico com soluções de zinco.

Esses resultados mostram a relevância da biofortificação de brotos por meio da técnica de condicionamento osmótico de sementes, onde os produtos foram enriquecidos nutricionalmente sem as alterações genéticas da cultura, que requerem procedimentos mais complexos. Assim, a técnica que é de notável simplicidade é uma estratégia promissora para o enriquecimento nutricional de brotos. Além disso, pode ser considerada uma ferramenta auxiliar com potencial para contribuir para a redução dos problemas relacionados às deficiências de ferro e zinco, principalmente em países em desenvolvimento.

Teor de umidade, proteínas e lipídeos dos brotos

As concentrações de ferro e zinco utilizadas no condicionamento osmótico das sementes não influenciaram no teor de umidade dos brotos. No entanto, a variação nas concentrações de ferro e zinco no condicionamento osmótico apresentou efeito significativo sobre o teor de proteínas ($p < 0,05$) e de lipídeos ($p < 0,01$), conforme pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de umidade, proteínas e lipídeos dos brotos de feijão mungo

Minerais (μM)	Umidade (% m/m)		Proteínas (% m/m)		Lipídeos (% m/m)	
	ferro **	zinco**	ferro*	zinco*	ferro*	zinco*
0	70,0 \pm 1,2	70,0 \pm 1,2	28,76 \pm 2,20	28,76 \pm 2,20	3,11 \pm 0,04	3,11 \pm 0,04
20	69,3 \pm 0,6	70,0 \pm 1,2	43,00 \pm 3,38	31,99 \pm 1,98	3,23 \pm 0,11	3,66 \pm 0,05
40	71,0 \pm 0,5	69,9 \pm 0,6	35,29 \pm 0,48	31,62 \pm 1,50	3,59 \pm 0,05	3,85 \pm 0,03
60	69,4 \pm 0,4	69,0 \pm 0,2	32,65 \pm 0,79	35,29 \pm 0,87	3,69 \pm 0,13	3,97 \pm 0,02

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: **não significativo. *significativo.

Nota: Resultados expressos como média e média do erro padrão.

A maior concentração de proteínas foi obtida nos brotos produzidos a partir de sementes submetidas ao condicionamento osmótico com solução de zinco 60 μM , onde o teor de proteínas foi 23% (m/m) superior ao teor proteico dos brotos obtidos convencionalmente. No entanto, para o tratamento com ferro, a maior concentração de proteínas foi obtida na concentração de 20 μM , que

proporcionou um incremento de 50% (m/m) na concentração proteica. Assim, além da obtenção de brotos biofortificados com ferro e zinco, ocorre também aumento do valor nutricional do produto baseado no maior teor de proteínas encontrado nos brotos.

O aumento do teor de proteínas em sementes submetidas ao condicionamento osmótico já foi relatado anteriormente. Recentemente, Rehman *et al.* (2018) observaram que a aplicação de zinco por meio do condicionamento osmótico de sementes de trigo antes do cultivo proporcionou aumento da concentração de proteínas nos grãos obtidos. Efeito semelhante também foi observado por Liu *et al.* (2015). O efeito positivo da aplicação de ferro na concentração de proteínas foi observado por Ghafari e Razmju (2015), onde a aplicação de nanopartículas de óxido de ferro aumentou a concentração de proteínas nos grãos de trigo. O ferro é importante para o processo de germinação e tem efeito positivo na síntese proteica (SHARIFI; MOHAMMADI; ROKHZADI, 2016).

De forma semelhante, a variação da concentração de minerais das soluções também influenciou na concentração de lipídeos dos brotos, onde ferro e zinco na concentração de 60 μM proporcionou aumento da fração lipídica em 19% e 28%, respectivamente.

Conclusão

A produção de brotos comestíveis de feijão mungo biofortificados com ferro e zinco por meio da técnica de condicionamento osmótico é tecnicamente viável, de baixa complexidade e apresenta baixo custo. Dentre as concentrações de minerais avaliadas neste estudo, as concentrações de ferro e zinco mais adequadas para o condicionamento osmótico das sementes de feijão mungo para a produção de brotos biofortificados são 40 μM e 60 μM , respectivamente. Nestas condições, os brotos foram biofortificados e não houve redução no rendimento da produção. Esses resultados também são importantes pois podem contribuir para a realização de novos estudos referentes à biofortificação de brotos pela técnica de condicionamento osmótico, onde poderão ser avaliadas diferentes condições de produção, bem como a utilização de outras culturas vegetais.

Referências

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16 ed. Washington, DC: AOAC, 1995.

APARICIO-GARCÍA, N. *et al.* Sprouted oat as a potential gluten-free ingredient with enhanced nutritional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 338, 127972, 2021.



- ATIQUÉ-UR-REHMAN, A. *et al.* Seed priming with boron improves growth and yield of fine grain aromatic rice. **Plant Growth Regulation**, v. 68, p. 189-201, 2012.
- BAALBAKI, R. Z. *et al.* (org). **Seed vigor testing handbook**. Ithaca: Association of official seed analysts, 2009.
- BOUIS, H. E.; SALTZMAN, A. Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. **Global Food Security**, v.12, p. 49-58, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 365 p.
- CLEMENS, S. Zn and Fe biofortification: The right chemical environment for human bioavailability. **Plant Science**, v. 225, p. 52-57, 2014.
- GABAZA, M. *et al.* Iron and zinc bioaccessibility of fermented maize, sorghum and millets from five locations in Zimbabwe. **Food Research International**, v. 103, p. 361-370, 2018.
- GHAFARI, H.; RAZMJOO, J. Response of durum wheat to foliar application of varied sources and rates of iron fertilizers. **JAST**, v. 17, n. 2, p. 321-331, 2015.
- HOU, D. *et al.* Mung Bean (*Vigna radiata* L.): Bioactive Polyphenols, Polysaccharides, Peptides, and Health Benefits. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1238, 2019.
- IACUMIN, L.; COMI, G. Microbial quality of raw and ready-to-eat mung bean sprouts produced in Italy. **Food Microbiology**, v. 82, p. 371-377, 2019.
- JEONG, J.; GUERINOT, M. L. Biofortified and bioavailable: the gold standard for plant-based diets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 6, p. 1777-1778, 2008.
- JI, L.; CHE, Z. M. Preparation of iron and zinc enriched nutrition bean sprouts. **Science and Technology of Food Industry**, v. 6, p. 232-234, 2009.
- JUCOSKI, G. O. *et al.* Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 4, p. 720-728, 2016.
- LIU, H. E. *et al.* Zinc fertilization alters flour protein composition of winter wheat genotypes varying in gluten content. **Plant Soil and Environment**, v. 61, n. 5, p. 195-200, 2015.
- LOURES, N. T. P.; NÓBREGA, L. H. P.; COELHO, S. E. M. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de brotos de lentilha da variedade PRECOZ. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 599-606, 2009.
- MAGALHÃES, S. C. **Disponibilidade de minerais, germinação e vigor de sementes de milho**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. *In*: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D.; NETO J.B.F. (org.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-24.

NAKAUNE, M. *et al.* Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 28-37, 2012.

PRZYBYSZ, A. *et al.* Vegetable sprouts enriched with iron: Effects on yield, ROS generation and antioxidative system. **Scientia Horticulturae**, v. 203, p. 110-117, 2016.

RAMIREDDY, E.; GALUSZKA, P.; SCHMÜLLING, T. Zn-fortified cereal grains in field-grown barley by enhanced root cytokinin breakdown. **Plant Signaling Behavior**, v. 13, n. 11 e1530023, 2018.

REHMAN, A. *et al.* Seed priming of Zn with endophytic bacteria improves the productivity and grain biofortification of bread wheat. **European Journal of Agronomy**, v. 94, p. 98-107, 2018.

SHARIFI, R.; MOHAMMADI, K.; ROKHZADI, A. Effect of seed priming and foliar application with micronutrients on quality of forage corn (*Zea mays*). **Environmental and Experimental Biology**, v. 14, p. 151-156, 2016.

SHARMA, A. *et al.* Zinc - An Indispensable Micronutrient. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 1, p. 11-20, 2013.

WHO - World Health Organization. **Levels and trends in child malnutrition**. 2017. Disponível em https://www.who.int/nutgrowthdb/jme_brochure2017.pdf. Acesso em: 15 jun. 2020.

ZOU, T. *et al.* Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n.14, p. 3053-3060, 2014.

07 Capítulo

Determinação da melhor umidade inicial no meio de cultivo em fermentação semissólida para produção das enzimas celulolíticas e xilanases utilizando farelo de trigo e bagaço de cana tratado termicamente como substratos indutores a partir da cepa *Trichoderma reesei* RUT C-30



Capítulo 7

Determinação da melhor umidade inicial no meio de cultivo em fermentação semissólida para produção das enzimas celulolíticas e xilanases utilizando farelo de trigo e bagaço de cana tratado termicamente como substratos indutores a partir da cepa *Trichoderma reesei* RUT C-30

Maria Clara de Oliveira e Almeida¹; Euler Rodrigues dos Santos^{*2}; Robson Antônio Vasconcelos³; Igor Viana Brandi⁴; William James Nogueira Lima⁴

Resumo

Para a fermentação semissólida, um dos principais parâmetros a ser considerado é a umidade. Fatores como as necessidades do microrganismo utilizado, natureza do substrato e o tipo de produto final desejado são essenciais para definição da umidade do substrato. Dessa maneira, neste trabalho, foram analisadas as umidades de 30, 50 e 70% para bagaço de cana moído tratado termicamente e farelo de trigo, ambos fermentados com *T. reesei* RUT C-30, na produção de enzimas celulolíticas e xilanases em fermentação semissólida. A avaliação foi feita a cada 7 dias por 28 dias. Foi obtida maior produção de carboximetilcelulase (CMCase) (217,93 UI/g substrato) na fermentação de *T. reesei* RUT C-30 em bagaço de cana com umidade de 70% após 21 dias a 28 °C. Para exoglucanase (FPase), o maior pico de produção (5,45 UI/g substrato) ocorreu na fermentação do fungo em bagaço de cana com 70% de umidade após 21 dias de cultivo. Foi obtida maior atividade de xilanase (1021,7 UI/g substrato) na fermentação do fungo em farelo de trigo com umidade de 70%. Foi obtida maior produção de β -glicosidase (2,42 UI/g substrato) na fermentação do fungo em farelo de trigo com umidade de 70% após 28 dias. Foi observada maior atividade de enzimas celulolíticas e xilanolíticas na fermentação de *Trichoderma reesei* RUT C-30 em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar tratado termicamente com 70% de umidade.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Biomassa lignocelulósica. Celulases.

¹ Pesquisadora, Departamento de Pesquisa, Biomm S/A.

² Estudante de Graduação, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Mestrando, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴ Docente, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

* E-mail para correspondência: euler187@hotmail.com

Introdução

Mais de 80% da energia consumida em todo o mundo é fornecida por combustíveis fósseis produzidos por processos geológicos e esse consumo de energia derivada de combustíveis fósseis resulta em um aquecimento global massivo. Estima-se que se o consumo de combustíveis fósseis continuar nessa taxa, as reservas de petróleo se esgotarão em 50 anos (ZABED *et al.*, 2017). Assim, a segurança energética e a proteção ambiental impulsionam o desenvolvimento de novas tecnologias na área de fontes renováveis de energia como solar, eólica, biomassa e geotérmica. Para atingir os objetivos de desenvolvimento sustentável, a energia futura deve ser limpa e deve vir apenas de fontes renováveis (MANSOURI *et al.*, 2016).

A biomassa lignocelulósica representa uma fonte promissora de energia renovável e pode ser utilizada para a produção de bioetanol de segunda geração (SQUINCA; BADINO; FARINAS, 2018). Atualmente, a maior parte do etanol lignocelulósico é produzida por hidrólise e fermentação. A sacarificação enzimática da biomassa vegetal é o método mais eficiente para a transformação da lignocelulose em açúcares, embora o custo dessa operação ainda seja um dos principais gargalos na comercialização do álcool de segunda geração (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2017)

A fermentação semissólida (FSS) é definida como qualquer processo de fermentação no qual microrganismos crescem em materiais de suporte sólidos na ausência de água corrente (PANDEY, 1992). Dois tipos de suportes sólidos podem ser usados em FSS: suportes naturais (por exemplo, resíduos lignocelulósicos) e suportes inertes (por exemplo, espumas de plástico). A FSS tem ganhado muito interesse nos últimos anos devido às vantagens que apresenta sobre a fermentação submersa, como maior rendimento do produto, menor requisitos de energia, aeração mais fácil, menos geração de efluentes, contaminação bacteriana reduzida e recuperação mais fácil do produto (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Para a fermentação semissólida, um dos principais parâmetros a ser considerado é a umidade. Fatores como as necessidades do microrganismo utilizado, natureza do substrato e o tipo de produto final desejado são essenciais para definição da umidade do substrato (PARIS, 2008). A umidade não deve ser alta a ponto de diminuir a porosidade do meio, resultando em diminuição das trocas gasosas e aumento da temperatura interna do meio e, conseqüentemente, facilitando a contaminação microbiana. Porém não deve ser muito baixa, pois isso dificulta o crescimento microbiano causando uma diminuição na produção do produto desejado. A fermentação semissólida possui umidade de 18 a 85%, dependendo da capacidade de absorção do meio de cultivo utilizado (BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001, citados por LIMA, *et al.*, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a melhor umidade inicial no meio de cultivo em fermentação semissólida para produção das enzimas celulolíticas e xilanases utilizando farelo de trigo e bagaço de cana tratado termicamente como substratos indutores a partir da cepa *Trichoderma reesei* RUT C-30.

Material e Métodos

Micro-organismos

A cepa utilizada nesse trabalho foi a *Trichoderma reesei* RUT C-30 (ATCC 56765), cedida pela Dra. Elba Pinto da Silva Bon, do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Química da UFRJ. Para obtenção e manutenção do estoque de esporos, foram realizados repiques em placas de Petri, contendo meio Agar dextrose batata (PDA), incubados em estufa a 30 °C até a esporulação e então recolhidos e aliquotados em microtubos contendo 20% de glicerol e estocados em nitrogênio líquido.

Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura descrito por Mandels e Weber (1969) modificado. Os frascos foram esterilizados a 121 °C por 30 minutos, e posteriormente adicionado o micélio fúngico na forma de discos de 7 mm de diâmetro e incubados a 28 °C ± 2 durante 48 horas sob agitação 150 rpm.

Composição do meio de fermentação

Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo foram os substratos utilizados nas fermentações. O bagaço de cana e o farelo de trigo foram adquiridos na cidade de Montes Claros-MG, sendo que o bagaço foi obtido em pontos de venda de caldo de cana e o farelo de trigo fino, da marca Granunn, adquirido no comércio local. Com o intuito de eliminar o excesso de açúcar e sujeiras, o bagaço de cana foi submetido a várias lavagens em água corrente. A secagem foi realizada em estufa e ao ar livre por 24 horas. Para utilização, o bagaço foi triturado em moinho elétrico de facas e submetido a um pré-tratamento térmico.



Pré-tratamento Térmico

O bagaço foi pesado em um béquer sendo adicionada água destilada até sua total cobertura. Em seguida, foi realizada a autoclavagem do material a 121 °C por 20 minutos. Posteriormente, foi realizada a lavagem e a secagem em estufa a 100 °C por 24 horas.

Fermentação semissólida

As fermentações foram feitas em frascos de 500 mL de capacidade, contendo 30 g de substrato e 17 mL de solução nutritiva (em g/L: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; KCl 0,2; tween 80 0,5). Para melhor aeração do meio foi acrescentada 10 g de casca de arroz. Adicionou-se água destilada para obtenção das umidades estudadas (30, 50 e 70%). Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 mL de inóculo e a incubação foi realizada a 28 °C durante 28 dias em cultivo estacionário.

Extração das enzimas

A análise foi feita a cada 7 dias. A análise consistiu em retirar um frasco de cada condição do experimento (fermentações de bagaço de cana pré-tratados termicamente e de farelo de trigo, ambos para as três umidades estudadas) sendo feita a adição de 400 mL de água e agitação por 30 minutos. Como a análise foi feita por 28 dias, haviam 4 frascos para cada condição do experimento. Em seguida, foi feita a filtração em tela de nylon e centrifugação refrigerada em centrífuga Sorvall RC-3C por 20 minutos a 18.000 rpm (40.000 g) utilizando-se o sobrenadante para avaliar a produção das enzimas celulolíticas e xilanases.

Determinação das atividades e concentrações enzimáticas do complexo celulolítico e hemicelulolítico.

Atividade Carboximetilcelulase – CMCase

Foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita por Ghose (1987) modificada. O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC).



O meio reacional foi formado por 0,250 mL de uma solução de CMC 4% p/v em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,250 mL do sobrenadante das culturas (extrato enzimático). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição imediata de 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática, obtida após fervura por 5 minutos a 96 °C e após resfriamento dos tubos, feita leitura em espectrofotômetro em absorvância 540 nm (MILLER, 1959). Para a determinação da concentração de açúcares, uma curva padrão foi construída de acordo com o recomendado por Ghose (1987).

A atividade enzimática foi expressa em UI (μmol de açúcar redutor liberado/minuto) e determinada pela Equação 1:

$$UI = \frac{\text{Diluição} \times \Delta Abs. \times \text{Fator} \times 0,5}{10} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

Diluição: Apenas se for necessário diluir o sobrenadante da enzima.

Fator: Fator obtido da curva padrão de glicose ($\mu\text{mol}/\text{mL}$).

0,5: Volume total da mistura reacional (mL).

10: Tempo de reação (min.).

A concentração enzimática foi expressa em UI/g substrato e determinada pela Equação 2:

$$[Enz.] = \frac{\text{Diluição} \times \Delta Abs. \times \text{Fator} \times 0,5 \times 400}{10 \times 0,250 \times 40} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo:

400: Volume total de água na extração da enzima (mL).

0,250: Volume do sobrenadante (mL).

40: Total de substrato em cada frasco (g).

Atividade FPase (exoglucanase)

Foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita por Ghose (1987) modificada. O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro.

O meio reacional foi formado por 0,5 mL do sobrenadante das culturas, 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e uma tira de papel filtro Whatmann nº1 medindo 1,0 x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de DNS a um tubo contendo 0,5 mL da mistura reacional. A determinação da concentração de açúcares redutores foi realizada em seguida, como já descrita para CMCase. Para a determinação da concentração de açúcares, uma curva padrão foi construída de acordo com o recomendado por Ghose (1987).

A atividade enzimática foi expressa em UI (μmol de açúcar redutor liberado/minuto) e determinada pela Equação 3:

$$UI = \frac{\text{Diluição} \times \Delta Abs. \times \text{Fator} \times 1,5}{60} \quad \text{Eq. 3}$$

Sendo:

Diluição: Apenas se for necessário diluir o sobrenadante da enzima.

Fator: Fator obtido da curva padrão de glicose ($\mu\text{mol}/\text{mL}$).

1,5: Volume total da mistura reacional (mL).

60: Tempo de reação (min.).

A concentração enzimática foi expressa em UI/g substrato e determinada pela Equação 4:

$$[Enz.] = \frac{\text{Diluição} \times \Delta Abs. \times \text{Fator} \times 1,5 \times 400}{60 \times 0,5 \times 40} \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo:

400: Volume total de água na extração da enzima (mL).

0,5: Volume do sobrenadante (mL).

40: Total de substrato em cada frasco (g).

Atividade β -glicosidase

Foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita por Ghose (1987) modificada usando celobiose como substrato.

O meio reacional foi formado por 0,5 mL do sobrenadante das culturas e 0,5 mL de solução 15 mM de celobiose em tampão citrato de sódio pH 4,8, 50 mM. A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A reação foi terminada colocando os tubos em água fervente por 5 minutos.

A determinação da glicose foi realizada utilizando-se o kit para análise de Glicose GOD-POD® da Biosystems.

A atividade enzimática foi expressa em UI (μmol de açúcar redutor liberado/minuto) e determinada pela Equação 5. No caso da β -glicosidase o fator foi obtido pela amostra padrão nas dosagens de β -glicosidase utilizando o kit GOD-POD® (glucose oxidase/peroxidase) da Biosystems, onde a concentração do padrão = 5,55 mM/L de glicose.

$$UI = \frac{\text{Diluição} \times \Delta\text{Abs.} \times \text{Fator} \times 1 \times 5,55}{(\text{Abs. padrão} \times 30)} \quad \text{Eq. 5}$$

Sendo:

Diluição: Apenas se for necessário diluir o sobrenadante da enzima.

1: Volume total da mistura reacional (mL).

30: Tempo de reação (min.).

A concentração enzimática foi expressa em UI/g substrato e determinada pela Equação 6:

$$[\text{Enz.}] = \frac{\text{Diluição} \times \Delta\text{Abs.} \times \text{Fator} \times 1 \times 400}{30 \times \text{Abs. do padrão} \times 40} \quad \text{Eq. 6}$$

Sendo:

400: Volume total de água na extração da enzima (mL).

40: Total de substrato em cada frasco (g).

Atividade hemicelulase (xilanase)

A atividade de xilanase foi dosada utilizando a xilana solúvel como substrato, (xilana birchwood, Sigma). A reação consiste na mistura contendo 0,1 mL de sobrenadante das culturas, 0,2 mL de solução de 1% de xilana em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0. A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,3 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em banho fervente por 10 minutos. A determinação da concentração de açúcares redutores, tendo como padrão a xilana, foi realizada em seguida, como já descrita para CMCase. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 μmol de açúcares redutores em 1 minuto a 50 °C.

A atividade enzimática foi expressa em UI (μmol de açúcar redutor liberado/minuto) e determinada pela Equação 7:

$$UI = \frac{\text{Diluição} \times \Delta\text{Abs.} \times \text{Fator} \times 0,15}{30} \quad \text{Eq. 7}$$



Sendo:

Diluição: Apenas se for necessário diluir o sobrenadante da enzima.

Fator: Fator obtido da curva padrão de xilana ($\mu\text{mol/mL}$).

0,15: Volume total da mistura reacional (mL).

30: Tempo de reação (min.).

A concentração enzimática foi expressa em UI/g substrato e determinada pela Equação 8:

$$[Enz.] = \frac{Diluição \times \Delta Abs. \times Fator \times 0,15 \times 400}{30 \times 0,05 \times 40} \quad \text{Eq. 8}$$

Sendo:

400: Volume total de água na extração da enzima (mL).

0,05: Volume do sobrenadante (mL).

40: Total de substrato em cada frasco (g).

Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata e o software estatístico empregado para a validação dos dados foi o Origin 5.0.

Resultados e Discussão

Foi analisado o efeito da porcentagem de umidade (30, 50 e 70%) dos substratos bagaço de cana moído tratado termicamente e farelo de trigo, na fermentação semi-sólida de *T. Reesei* RUT C-30 e produção de enzimas celulolíticas e xilanases. A avaliação foi feita a cada 7 dias por 28 dias.

A Figura 1 ilustra que foi obtido maior atividade de CMCase (217,93 UI/g substrato) na fermentação do fungo em bagaço de cana com umidade de 70% após 21 dias. Na fermentação do fungo em farelo de trigo com 70% de umidade foi obtido 69,51 UI/g substrato de CMCase após 14 dias.

Foi obtida maior de produção de FPase (5,45 UI/g substrato), na fermentação do fungo em bagaço de cana com 70% de umidade após 21 dias (Figura 2). O segundo maior pico de produção, no entanto, ocorreu na fermentação em farelo de trigo com 70% de umidade após 7 dias de cultivo, superando a fermentação em bagaço de cana com 30 e 50% de umidade, mostrando o parâmetro umidade como preponderante na produção dessa enzima. Considerando as mesmas porcentagens de

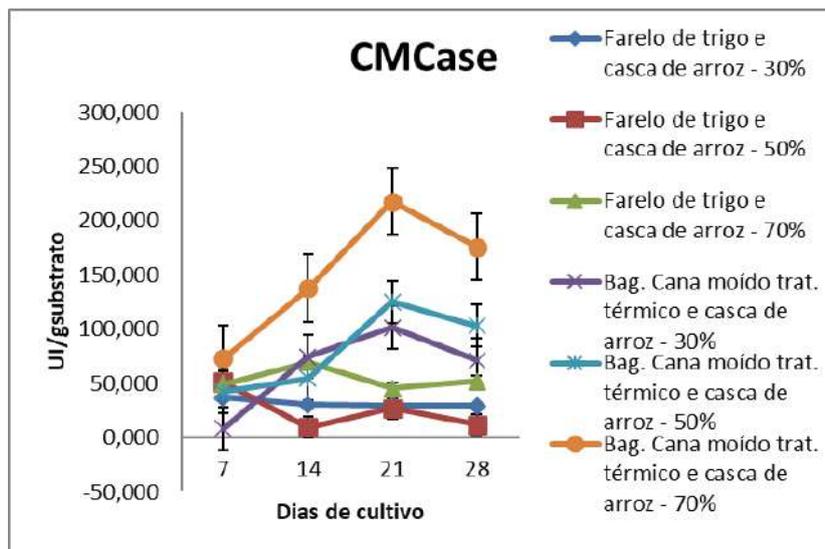


umidade do substrato, a produção de FPase pelo fungo fermentado em bagaço de cana superou a produção da enzima fermentada em farelo de trigo.

Foi obtida maior produção de xilanase na fermentação do fungo em farelo de trigo com umidade de 70% (1021,7 UI/g substrato) e 30% (1002,47 UI/g substrato) (Figura 3).

Para β -glicosidase (Figura 4), o farelo de trigo com umidade de 70% apresentou o maior pico de produção (2,42 UI/g substrato) em 28 dias. Com o substrato bagaço de cana, a produção de β -glicosidase foi menor quando comparada à alcançada no farelo de trigo. Neste caso, a umidade não foi um parâmetro determinante, pois houve pouca variação na medida de atividade detectada. O fungo *T. reesei* RUT C-30 apesar de ser um dos micro-organismos mais estudados em relação à produção de celulases, produz pouca β -glicosidase devido a mutações em seu genoma, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação da biomassa (KIM *et al.*, 1997).

Figura 1 - Atividade enzimática de CMCase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em fermentação semissólida de bagaço de cana e farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 7, 14, 21 e 28 dias



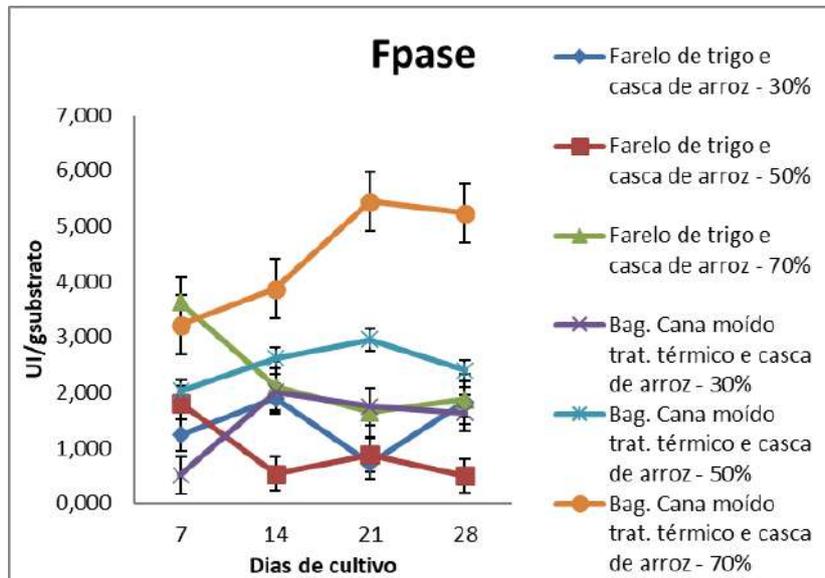
Fonte: Dos autores, 2021.

O trabalho desenvolvido por Basso (2010) mostrou atividade de CMCase de 3,5 UI/g e FPase de 2,3 UI/g, utilizando *T. reesei* RUT C-30 em FSS com bagaço de cana *in natura* como indutor, em 15 dias de fermentação. Portanto, os valores obtidos no presente trabalho para CMCase e FPase foram superiores para ambas as enzimas.

Os resultados mostram que, para o *T. reesei* RUT C-30, a melhor umidade inicial entre as analisadas foi 70%. Latifian *et al.* (2007), encontraram resultados semelhantes para a fermentação do

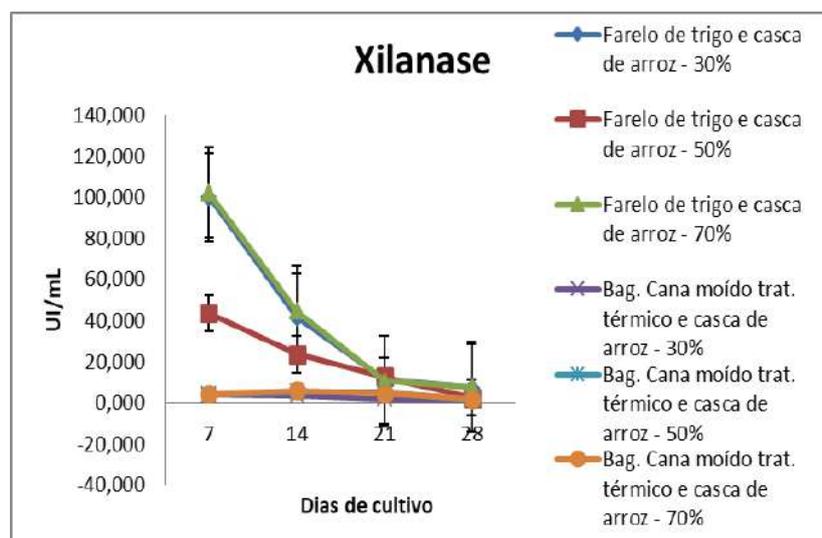
fungo *T. reesei* QM9414 em farelo de arroz, ao avaliar três porcentagens de umidade do substrato (40, 55 e 70%) e encontrarem valores superiores para atividade de celulase com substrato contendo 70% de umidade inicial.

Figura 2 - Atividade enzimática de FPase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em fermentação semissólida de bagaço de cana e farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 7, 14, 21 e 28 dias



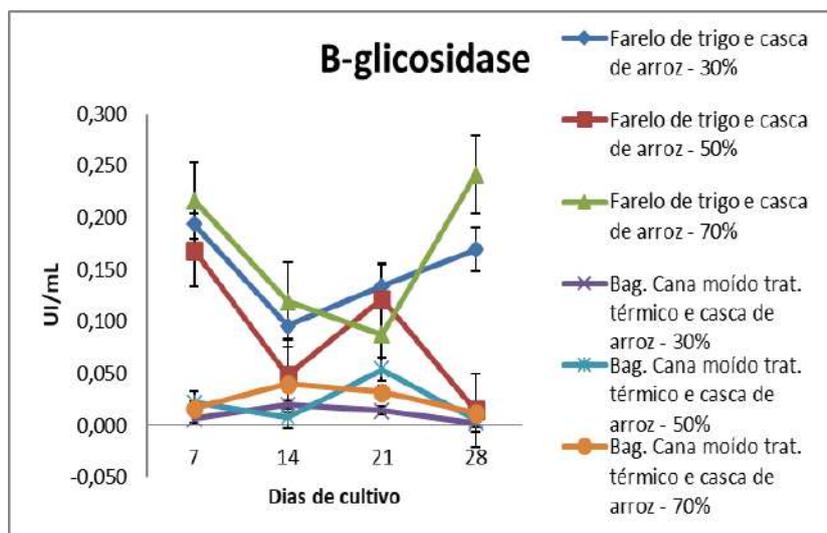
Fonte: Dos autores, 2021.

Figura 3 - Atividade enzimática de xilanase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em fermentação semissólida de bagaço de cana e farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 7, 14, 21 e 28 dias



Fonte: Dos autores, 2021.

Figura 4 - Atividade enzimática de β -glicosidase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em fermentação semissólida de bagaço de cana e farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 7, 14, 21 e 28 dias



Fonte: Dos autores, 2021

Conclusão

Os resultados apresentados demonstram o potencial da fermentação semissólida para produção das enzimas celulolíticas e xilanase utilizando os resíduos de farelo de trigo e bagaço de cana como indutores.

Dentre as umidades estudadas, a mais adequada para fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* RUT C-30 foi a de 70%. A atividade de todas as enzimas estudadas em ambos os substratos (farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar tratado termicamente) tiveram seus valores máximos nessa umidade. Os valores máximos para as atividades de CMCase, FPase, xilanase e β -glicosidase obtidas foram, respectivamente, 217,93 UI/g substrato (bagaço de cana), 5,45 UI/g substrato (bagaço de cana), 1021,7 UI/g substrato (farelo de trigo) e 2,42 UI/g substrato (farelo de trigo). Estudos futuros para aumento da produtividade do processo devem ser realizados.

Referências

BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Org.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3. p. 264.

CHOUHDARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 342-346, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.10.007>. Acesso em: 28 abr. 2021.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/journals/pac/59/2/article-p257.xml>. Acesso em: 02 mai. 2021.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v.59, n.1, p. 63-67, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00127-7). Acesso em: 28 abr. 2021.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v.98, n.18, p.3634-3637, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.019>. Acesso em: 28 abr. 2021.

LIMA, U. A. *et al.* **Biotecnologia industrial – vol.3**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher LTDA, 2001.

MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. **Advances in Chemistry**, v. 95, n.1, p. 391-414, 1969. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023>. Acesso em: 02 mai. 2021.

MANSOURI, A. *et al.* Production of bioethanol from a mixture of agricultural feedstocks: biofuels characterization. **Fuel**, v. 185, n.1, p. 612-621, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.008>. Acesso em: 30 abr. 2021.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 27 mai. 2021.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)80017-W](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W). Acesso em: 30 abr. 2021.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. A. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7). Acesso em: 30 abr. 2021.

PARIS, L. D; **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólidos das sojas orgânica, transgênicas e convencional**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo – PR, 2008. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/1881>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SQUINCA, P.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. A closed-loop strategy for endoglucanase production using sugarcane bagasse liquefied by a home-made enzymatic cocktail. **Bioresource Technology**, v. 249, n.1, p. 976-982, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.107>. Acesso em: 28 abr. 2021.

ZABED, H.; SAHU, J.N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n.1, p. 475-501, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>. Acesso em: 28 abr. 2021.



08 Capítulo

Investigação de
atividade lipolítica
em fontes vegetais de
lipase: uso de extrato
bruto da polpa e caroço
de *Mauritia Flexuosa* L.

Capítulo 8

Investigação de atividade lipolítica em fontes vegetais de lipase: uso de extrato bruto da polpa e caroço de *Mauritia Flexuosa* L.

Eva Maria Fonseca Gonçalves¹; Rayssa Souza dos Santos¹; Raphael Oliveira de Figueiredo¹; Bruna de Araújo Guimarães*¹, Alison Silva de Almeida¹, João da Silva Carneiro²

Resumo

As lipases são enzimas categorizadas de hidrolases responsáveis por romper ligações de cadeias de lipídios, acelerando a reação de hidrólise de óleos e gorduras na interface óleo/água, podendo ser adquirida de três fontes: animal, microbiana e vegetal. No Brasil, há uma vasta variedade de vegetais com potencial lipásico, destacando-se a *Mauritia Flexuosa* L., espécie de palmeira nativa da região amazônica, com potencialidades industriais e alternativas devido à sua fácil obtenção e disponibilidade. Com o objetivo de identificar a atividade lipolítica relativa na polpa e no caroço do extrato bruto do fruto da *Mauritia Flexuosa* L., utilizou-se a metodologia proposta por Soares *et al.* (1999), com adaptações. As análises do extrato bruto da polpa e caroço do fruto de Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) apresentaram atividade lipolítica em todos os tempos de reação estudados, tanto na utilização do substrato óleo de soja, tanto do azeite de oliva, nas mesmas condições de pH 7,0 e temperatura de 25 °C, nos tempos de 5 a 20 minutos. Notou-se que para o óleo de soja, o desempenho máximo, ou seja, sua atividade relativa foi referente ao extrato bruto do caroço do fruto, sendo de 27,93 U/mL, em 5 minutos de reação. Nos tempos posteriores analisados foram constatados resultados consideráveis, de 12,98 U/mL, 8,49 U/mL e 6,0 U/mL, demonstrando uma maior afinidade com ésteres de cadeia curta. Além disso, notou-se que o azeite de oliva apresentou desempenho máximo na análise do extrato bruto da polpa, nos intervalos de tempo de 5 a 10 minutos com atividade relativa de 3,9 U/mL e 4,38 U/mL, respectivamente, tendo maior afinidade na hidrólise de ésteres de cadeia longa. Portanto, ressalta-se a característica da seletividade da enzima lipase, pois diferentes substratos apresentaram maior afinidade em diferentes subprodutos do fruto do Buriti.

Palavras-chave: Atividade relativa. Biotecnologia. Matriz vegetal.

¹ Licenciatura em Química, Departamento de Ciências Naturais, Universidade do Estado do Pará.

² Professor Doutor, Departamento de Ciências Naturais, Universidade do Estado do Pará.

* E-mail para correspondência: brunadearaujo.guimaraes@gmail.com

Introdução

O Brasil detém o título de país mais biodiverso do planeta, contendo cerca de 15 a 20% da variedade biológica do mundo, além de ter a flora mais diversificada (RNP, 2020). É no seu bioma Amazônico aonde verifica-se uma ampla diversidade de plantas e de frutos com potencial enzimático lipolítico, isto é, vegetais dotados de enzimas encarregadas de degradar lipídeos ou gorduras, a estas enzimas nomeia-se lipases (RNP, 2020).

As lipases fazem parte do grupo de enzimas categorizadas de hidrolases (HASSAN; SHAH; HAMEED, 2016; PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003). Denominam-se lipases, conhecidas também como triacilglicerol acilhidrolases, àquelas enzimas capazes de romper ligações de cadeias lipídicas, transformando-as em álcoois e ácidos orgânicos (HASSAN; SHAH; HAMEED, 2006). Elas são as responsáveis por catalisar as reações de hidrólise e esterificação, pois, elas atuam como catalisadores químicos em diferentes reações (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

A reação considerada típica catalisada pelas lipases é a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, por isso, essas enzimas são agrupadas na subclasse das éster-carboxílico hidrolases pela Enzyme Commission, codificadas pelo número 3.1.1.3 e denominadas triacilglicerol acilidrolase. A reação de hidrólise de lipídeos consiste no rompimento da ligação éster do glicerídeo produzindo glicerol e ácidos graxos, na presença de água (CASTRO *et al.*, 2004).

Para Carvalho *et al.* (2005) as lipases ditas “verdadeiras” são capazes de realizar hidrólises totalmente ou parcialmente de ligações ésteres de glicerol, fornecendo álcoois específicos e ácidos graxos livres. Essas enzimas operam na área de interação óleo/água e, por isso, quando em ambientes aquo-restritos são capazes de realizar hidrólises e reações inversas, podendo resultar em interesterificações e/ou transesterificações (CARVALHO *et al.*, 2005). Assim, dentre a multiplicidade de aplicações das lipases, os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases (ROVEDA; HEMKEIMEIER; COLLA, 2010; VULFSON, 1994).

Diante das suas propriedades ativas, destacam-se a importância e a eficiência na apropriação de lipases pelas vastas áreas industriais, tais como: detergentes, têxtil, celulose, tratamento de óleos e biodiesel, alimentícias de laticínio, de molhos e condimentos, de processamento de carnes; indústria farmacêutica, química fina, médica diagnóstica, couros, tratamento de resíduos, entre outras (DELGADO, 2014; PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003).

As lipases encontram-se em larga escala na natureza em três fontes: de origem animal e vegetal, encontrada em células dos tecidos, ou microbiana, produzida por microorganismos como fungos e bactérias (PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003). Sendo que as lipases de origem vegetal, de acordo com os crescentes estudos dos últimos anos, tem sido uma tendência para as indústrias biotecnológicas, uma vez que possuem vantagens industriais e alternativas, em relação aos catalisadores químicos, como a facilidade de obtenção e abundância de matérias primas (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010). Além disso, lipases vegetais são muito atrativas devido ao seu baixo custo, especificidade de substrato e o fato de estarem amplamente disponíveis em fontes naturais sem a necessidade de tecnologia genética molecular para produzi-los, tornando-os uma boa alternativa para exploração comercial como enzimas industriais (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010; VILLENEUVE, 2003).

Tendo em vista as vantagens apresentadas pela reação enzimática de uso das lipases em comparação com os catalisadores químicos utilizados, comercialmente, hoje em dia, como: são produtos naturais biológicos e biodegradáveis, atuam em pH e temperaturas brandas, alta especificidade, etc, (MONTEIRO; SILVA, 2009), pode-se citar algumas fontes vegetais de onde são extraídas enzimas para utilização industrial, como a *Carica papaya* L., *Armoracia rusticana* L., *Zea mays* L. e *Triticum vulgare* V. Destas são extraídas proteases, oxidases, peroxidase, carboxilase e fitase, respectivamente (DELGADO, 2014). Além disso, vale citar o estudo realizado por Delgado (2014), no qual foi utilizado o bagaço da laranja e da manga, para uso em escala industrial (têxtil, detergentes, etc) ou aplicação no processo de hidrólise e síntese, reduzindo e reaproveitando o descarte de toneladas de resíduos gerados em abundância no mundo, todos os anos. Sendo essa uma característica bastante viável quanto ao uso de subprodutos de frutos, como fontes de lipases nos processos industriais, pois, segundo Sagar *et al.* (2018), estima-se que as perdas e o desperdício de frutas e vegetais são os maiores entre todos os tipos de alimentos e podem chegar a 60%. As operações de processamento de frutas e vegetais produzem quantidades significativas de resíduos. O resíduo é composto principalmente de semente, pele, casca e bagaço, os quais podem ser boas fontes de compostos bioativos potencialmente valiosos, como carotenoides, polifenóis, fibras alimentares, vitaminas, enzimas e óleos, entre outros.

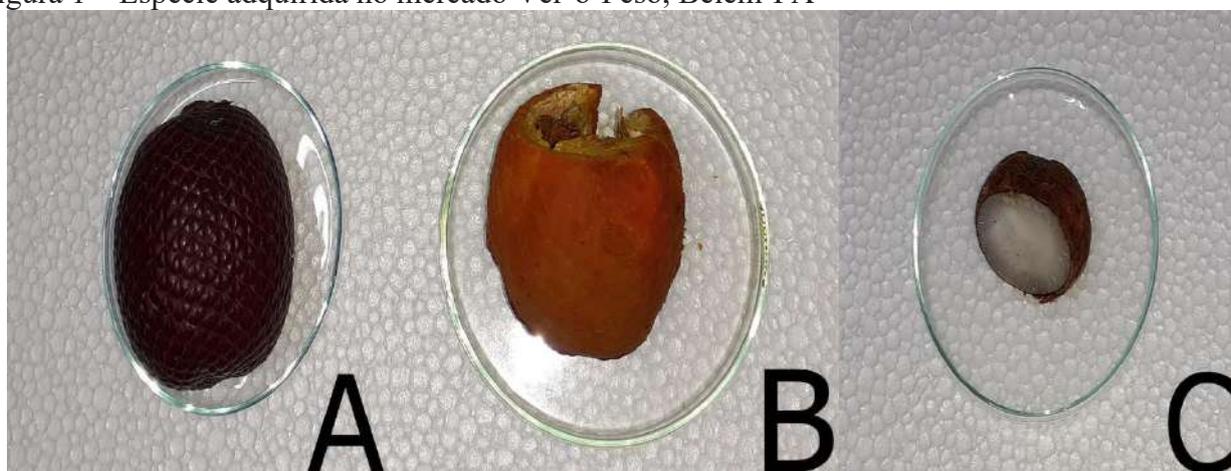
Considerando a biodiversidade presente no território brasileiro e as vantagens do uso de lipases vegetais na indústria, elucida-se uma possibilidade de contribuir para o aproveitamento de vegetais regionais úteis como fonte enzimática, principalmente, de frutos, sem valor agregado no mercado nacional. No entanto, hoje, as lipases vegetais têm pouca apropriação em escala comercial em virtude da falta de fontes adequadas do ponto de vista econômico (DELGADO, 2014).



Em vista disso, depara-se com a Região Amazônica onde é mina de plantas e frutos oleaginosos, algumas de baixo custo, como é o caso do fruto da árvore do buriti (*Mauritia Flexuosa* L.), um fruto proveniente do buritizeiro - uma espécie de palmeira nativa da Amazônia, pertencente à família Arecaceae (CARNEIRO; CARNEIRO, 2011). O Buriti é, também, conhecido pelos nomes de buriti-do-brejo, carandá-guaçu, carandaí-guaçu, itá, miriti, muriti, muritim e muruti. Sua palmeira é, facilmente, localizada em estados como o Pará e engloba toda a região amazônica como, também, é predominante em estados do Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. (CARNEIRO; CARNEIRO, 2011).

A árvore do buritizeiro pode atingir 35 m de altura, a produção do buriti é anual e o número de inflorescência ou de cachos com frutos varia de 5 a 7 por planta por ano, com cerca de 400 a 500 frutos por cacho. O buriti também fornece palmito comestível. Seus frutos são elipsóide-oblongos, cobertos por escamas córneas, medindo 5,0 x 4,2 cm de diâmetro, de coloração marrom-avermelhado na maturidade. Do fruto do buriti se extrai o óleo de miriti, comestível e empregado na fritura de alimentos. A sua polpa é bastante apreciada e após a fermentação fornece o vinho de buriti, consumido com açúcar e farinha de mandioca. Também é empregada no preparo de doces, sorvetes, picolés, refrescos, entre outras. A amêndoa é espessa e duríssima, semelhante ao marfim vegetal (FERREIRA, 2005). As características do fruto do Buriti podem ser visualizadas na Figura 1, abaixo.

Figura 1 – Espécie adquirida no mercado Ver-o-Peso, Belém-PA



Fonte: Os autores, 2021.

Legenda: A: parte externa (escama); B: polpa do fruto do Buriti; C: Amêndoa.

Até o presente momento, não há registros de estudos na literatura acerca da atividade lipolítica no fruto da árvore de buriti (*Mauritia Flexuosa* L.). Diante disso, esse trabalho objetiva-se em investigar a possível presença de atividade lipásica na polpa e no caroço do buriti, separadamente, pois o estudo separado de cada fração possibilita a análise do potencial individual, o que é interessante

para processos de larga escala, já que, utilizando apenas a parte do fruto com maior atividade haveria maior rendimento em comparação com o uso do fruto inteiro ou frações misturadas, tornando, ainda, o processo mais rentável (DELGADO, 2014). Além de determinar o melhor tempo de processamento do extrato bruto enzimático, frente ao substrato óleo de soja e azeite de oliva, separadamente, deste modo, contribuindo para o desenvolvimento do conhecimento químico do fruto e para a obtenção de lipases a baixo custo em condições adequadas, sendo de pH 7,0 e temperatura 25 °C.

Material e Métodos

Os frutos do Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) foram adquiridos *in natura* no mercado Ver-o-Peso, Belém-PA, e transportados em saco plástico até o Laboratório de Química da Universidade do Estado do Pará. Os frutos foram lavados em água corrente e cortados com uma lâmina devidamente higienizada. O extrato bruto enzimático foi preparado a partir da polpa e do caroço do fruto, assim foram pesados 10 g de cada subproduto e homogeneizados em 45 mL de solução Tampão Fosfato 0,1 M. A mistura resultante foi mantida sob agitação em agitador magnético por 3 horas.

Para análise da atividade lipolítica foi utilizada a metodologia de Soares *et al.* (1999) com adaptações. Em erlenmeyers de 50 mL foram adicionados 3,92 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, 2,45 mL de água, 170 mg de goma arábica (agente emulsificante) e 2,45 mL de substrato, sendo utilizado o óleo de soja e o azeite de oliva para posterior comparação e 1 mL de extrato bruto enzimático. Para titulação das amostras foi utilizada solução hidróxido de sódio (NaOH 0,05M) e 2 gotas de fenolftaleína 1%.

As análises foram realizadas em triplicatas, nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos, além do teste em branco, o qual consistiu em titular com NaOH a emulsão (tampão, substrato, goma arábica e extrato) no tempo 0 (zero) minutos a fim de desconsiderar a acidez do próprio fruto e do substrato em questão. As quantidades de base gasta em cada tempo foram anotadas, a fim de se realizar o cálculo da determinação de atividade lipolítica relativa. O cálculo foi realizado de acordo com a Equação 1, apresentada abaixo:

$$Atividade = \frac{(V_A - V_B) \cdot 1000 \cdot N_{(NaOH)}}{t \cdot V} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que V_A corresponde ao volume de NaOH gasto na amostra, V_B o volume gasto no branco, N_{NaOH} é a Normalidade da base, t o tempo de reação e V o volume de extrato. A atividade enzimática é mensurada em U/mL, esta é definida como a quantidade de enzima bruta que liberou 1 μmol de



ácido graxo por minuto. Por fim, a partir dos resultados obtidos foram construídos tabela e gráficos utilizando o programa Microsoft Excel 2019.

Resultados e Discussão

Os dados obtidos nas análises dos extratos brutos da polpa e caroço do buriti estão expressos na Tabelas 1, na qual é possível observar a atividade relativa calculada a partir da Equação 1 para cada fração e cada substrato.

Tabela 1 - Dados obtidos na análise do extrato bruto da polpa e do caroço do fruto da espécie *Mauritia Flexuosa* L, frente aos substratos azeite de oliva e óleo de soja

Item analisado	Substrato	Tempo (min)	Ativ. Relativa (U/mL)
Polpa	Azeite de oliva	5	3,90
		10	4,38
		15	2,27
		20	2,19
BRANCO			
Polpa	Óleo de soja	5	2,92
		10	2,44
		15	1,30
		20	0,73
BRANCO			
Caroço	Azeite de oliva	5	1,95
		10	0,97
		15	0,97
		20	0,85
BRANCO			
Caroço	Óleo de soja	5	27,93
		10	12,98
		15	8,49
		20	6,00
BRANCO			

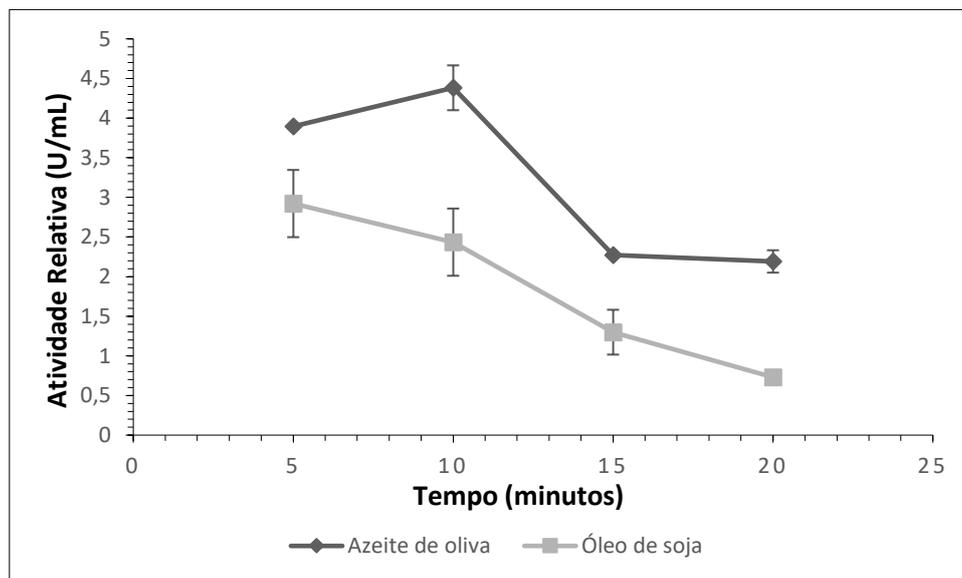
Fonte: Os autores, 2021.

Legenda: Ativ. Relativa: a quantidade de enzima bruta que liberou 1 μmol de ácido graxo por minuto.

As análises do extrato bruto da polpa do fruto de Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) apresentaram atividade lipolítica em todos os tempos de reação, como mostra a Figura 2, tanto ao se utilizar o substrato óleo de soja, tanto na utilização do substrato azeite de oliva.

Nesse contexto, a polpa do fruto, quando analisada com o azeite de oliva apresentou desempenhos máximos, nos tempos de reações de 5 e 10 minutos, com atividade relativa de 3,9 U/mL e 4,38 U/mL, respectivamente. Posteriormente, houve um decaimento nos valores em 15 e 20 minutos, nos quais as atividades relativas foram abaixo de 3 U/mL. Na utilização do substrato óleo de soja, nos tempos de reação de 5 e 10 minutos, os resultados foram de 3,9 U/mL e 3,16 U/mL, respectivamente, e nos tempos de 15 e 20 minutos os resultados decaíram para valores inferiores a 1,5 U/mL.

Figura 2 - Gráfico da atividade relativa (U/mL) versus tempo (min) da polpa do fruto analisada frente aos substratos óleo de soja e azeite de oliva



Fonte: Os autores, 2021.

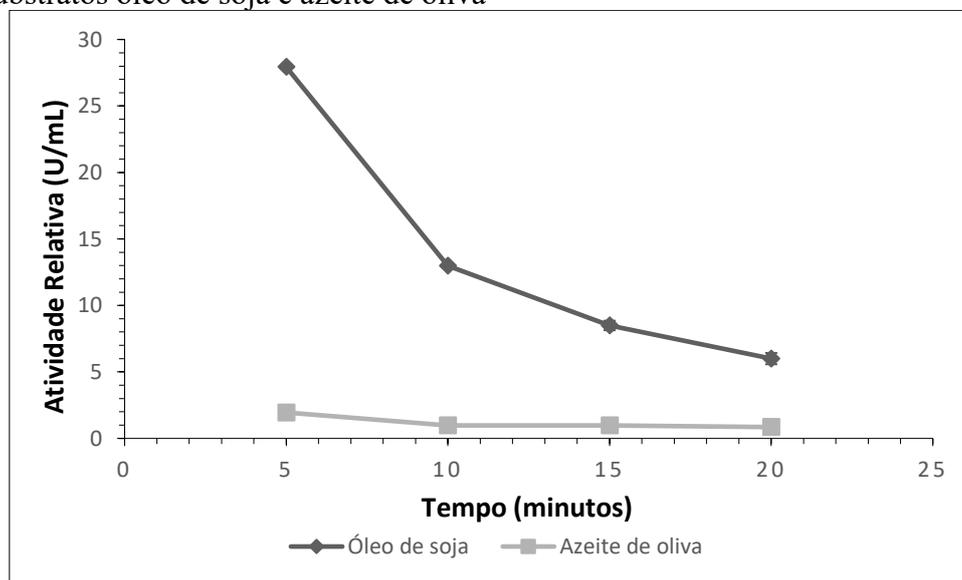
Os dados obtidos para a análise do extrato bruto do caroço da planta do Buriti estão expressos na Figura 3, abaixo. Na análise do extrato bruto, os dados mostram que a matriz apresentou atividade enzimática quando analisada frente ao substrato azeite de oliva, tendo desempenho máximo de 1,95 U/mL (5 minutos) e decaindo para 0,97 U/mL (10 e 15 minutos) e 0,73 U/mL (20 minutos). O extrato bruto do caroço, frente ao substrato óleo de soja, mostrou resultados mais satisfatórios, com atividade máxima de 27,93 U/mL, em 5 minutos. Entretanto, em todos os tempos analisados foram obtidos resultados consideráveis: 12,98 U/mL (10 minutos); 8,49 U/mL (15 minutos); 6,0 U/mL (20 minutos).

O desempenho máximo obtido foi referente ao extrato bruto do caroço do fruto, frente ao substrato óleo de soja, nos primeiros 5 minutos (27,93 U/mL), sendo esse resultado considerável pois supera os resultados obtido por Santos (2019) nas análises das atividades lipolíticas feitas com fungos isolados de Colmeias de *Melipona scutellaris*, utilizando substrato de p-nitrofenil palmitato (p-NPP),

cujo desempenho máximo de atividade relativa foi de 20,76 U/mL, nas condições físico-químicas de pH 8,0 e 37 °C por 30 minutos de reação.

Logo, infere-se que as lipases do extrato bruto do caroço do fruto do buriti possuem maior afinidade na hidrólise de ésteres de cadeia curta, como é o caso do óleo de soja, o qual contém teores de ácidos graxos com duas e três ligações duplas, tendo rápida degradação por oxidação (REDA; CARNEIRO, 2007). Portanto, apresenta-se o Buriti como uma fonte viável para extração de enzimas lipase para uso industrial, em comparação com as fontes de microrganismos como os fungos, sendo o fruto de fácil obtenção e de baixo custo, além de o caroço ser uma fração do fruto sem utilização industrial, até o momento.

Figura 3 - Gráfico da atividade relativa (U/mL) versus tempo (min) do caroço do fruto analisada frente aos substratos óleo de soja e azeite de oliva



Fonte: Os autores, 2021.

Nota-se uma melhor atividade relativa no extrato bruto do caroço do Buriti, em comparação à polpa, pois, segundo Quettier e Eastmond (2009), as lipases vegetais são encontradas principalmente em tecidos de reserva de energia, como nas sementes. Durante o seu desenvolvimento, as sementes armazenam substâncias, sendo as principais substâncias carboidratos, lipídeos e proteínas. Também podem armazenar enzimas como invertases, amilases, lipases e galactosidases, as quais são responsáveis pela conversão das macromoléculas armazenadas em metabolizáveis (amido em glicose, triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos, polipeptídios em peptídeos e aminoácidos), que serão transferidas e utilizadas pela planta para o crescimento e germinação das sementes

(MARTINS *et al.*, 2007; QUETTIER; EASTMOND, 2009). No entanto, sementes de plantas não são as únicas fontes de lipases vegetais existentes.

Ao observar os demais valores obtidos com os resultados relatados por Delgado (2014), com a polpa da laranja frente ao substrato de óleo de oliva extra virgem, em temperatura de 40 °C e pH 7,0, tem-se valores superiores, de 14,2 U/mL. Por outro lado, ao associar aos resultados descritos por Rosa *et al.* (2019), no qual o trabalho investigou a atividade lipolítica do extrato bruto da polpa do jenipapo (*Genipa americana* L.) feita com o substrato de óleo de soja realizada em condições de pH 7,0 e temperatura de 25 °C, que resultou na atividade relativa máxima de 3,3 U/mL, nota-se, assim, um resultado inferior quando comparado à polpa do fruto buriti. Segundo os resultados dos desempenhos máximos descritos por Guimarães *et al.* (2020), realizados com extrato bruto da polpa do fruto ajuru (*Chrysobalanus icaco* L.) e frente ao substrato de óleo de soja, em temperatura de 50 °C, constatou-se atividade enzimática relativa (5,55 U/mL), superiores em comparação com extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa* L. nas condições estudadas. Logo, nota-se um melhor aproveitamento da *Mauritia flexuosa* L. em relação a outras fontes vegetais como a *Genipa americana* L. e *Chrysobalanus icaco* L.

Ademais, pode-se afirmar que as lipases do extrato bruto da polpa do fruto *Mauritia flexuosa* L. oferecem maiores atividades lipolíticas relativas, utilizando o azeite de oliva como substrato, sendo esta atividade de 4,38 U/mL no tempo de 10 minutos, evidenciando-se maior afinidade na hidrólise de ésteres de cadeia longa, produzindo ácido oleico. Esse fato implica na preponderante presença de ácido oleico na fração lipídica, cuja molécula possui apenas uma ligação dupla, sendo classificado como um ácido graxo monoinsaturado (GIMENO *et al.*, 2002).

Segundo Macêdo *et al.* (2016) as lipases são enzimas que atuam de maneira específica sobre lipídeos, portanto, esses resultados podem sofrer alterações, caso haja mudança na temperatura, pH, adição de sais ou tempo de germinação.

Conclusão

Pela primeira vez, foi identificada atividade lipolítica relativa nos extratos brutos da polpa e do caroço do fruto Buriti (*Mauritia Flexuosa* L.), utilizando os resultados adquiridos mediante a investigação lipolítica na, até então, possível fonte vegetal. Sendo que o dado máximo obtido mais relevante da pesquisa foi de 27,93 U/mL correspondendo ao intervalo de tempo de 5 minutos, usando o extrato bruto do caroço do fruto quando analisada com o substrato óleo de soja, dando ênfase à afinidade com o substrato. Assim, apresenta-se o Buriti como uma fonte biotecnológica e alternativa



de enzimas lipase para uso industrial, de baixo custo e fácil obtenção; como também, destaca-se que tais valores obtidos podem variar se houver mudanças nas condições físico-químicas estudadas de temperatura, pH, adição de sais (cofatores), substratos e tempo de germinação.

Portanto, esta pesquisa pôde cooperar para que mais um fruto típico da região amazônica fosse analisado e catalogado como matriz de potencial apropriação nas indústrias que demandam matérias primas, como as enzimas metabólicas, as quais têm alto custo devido à sua principal fonte microbiana e animal.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade do Estado do Pará pelo apoio, suporte técnico e materiais laboratoriais e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa concedida.

Referências

BARROS M.; FLEURI L. F.; MACEDO G. A. Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. **Braslian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 01, pag. 15-29, 2010.

CARNEIRO, T. B.; CARNEIRO, J. G. M. Frutos e Polpa Desidratada Buriti (*Mauritia flexuosa L.*): Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil), v.6, n.2, p. 105-111, 2011. Disponível em: <https://editoraverde.org/gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/483>. Acesso em: 21 nov. 2020

CARVALHO, P. O. *et al.* Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 614-625, 2005.

CASTRO, H. F. *et al.* Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DELGADO, C. H. O. **Obtenção, caracterização e aplicação de lipases vegetais:** Utilizando Subprodutos do Processamento de Laranja e Manga para Suco. 2014. 89f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

FERREIRA, M. G. R. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestral de Rondônia. **Buriti** (*Mauritia flexuosa L.*). Porto Velho, RO, 2005. Cartilha (INFOTECA-E).

GIMENO, E. *et al.* The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, a-tocopherol, and b-carotene) in virgin olive oil. **Food Chemistry**. n. 78, p. 207-211, 2002.



GUIMARÃES, B. A. *et al.* Determinação de Lipase no Extrato Bruto da Polpa de Ajuru (*Chrysobalanus icaco* L.). *In: SIMPÓSIO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS NA AMAZÔNIA. 9º. Anais virtuais [...]*. Belém: UEPA, 2020. v. 2, p. 123-130.

HASSAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial application of microbial lipase. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 39, p. 235-251, 2006.

MACÊDO, J. K. A. *et al.* Estudo da atividade enzimática de lipases presentes no mesocarpo de dendê (*Elaeis guineensis*). *In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA. 3, 2016, Brasília/DF. Anais [...]*. 2016.

MARTINS, M. T. C. S. *et al.* Composição química de sementes de espécies de Manihot Mill (*Euphorbiaceae*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 621–623, 2007.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**. v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus* sp. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, n. 23, v.2, p. 135-140, 2003.

QUETTIER, A. L. e EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 485-490, 2009.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**. n. 27, p. 60-67, 2007.

ROVEDA, M.; HEMKEIMEIER; COLLA, L.M. Avaliação da Produção de Lipases por Diferentes Cepas de Microorganismos Isolados em Efluentes de Laticínios por Fermentação Submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.1, p.126-131. 2010.

RNP BRASIL. **SiBBR**: Biodiversidade Brasileira, Produção Científica e Políticas Públicas Mais Assertivas. Sistema da Rede Nacional de Ensino e Pesquisa, 2020. Disponível em: <https://www.rnp.br/noticias/sibbr-biodiversidade-brasileira-producao-cientifica-e-politicas-publicas-mais-assertivas>. Acesso em: 21 nov. 2020.

ROSA, C. M. C., *et al.* Investigação de Fontes Vegetais de Lipase: Jenipapo (*Genipa americana* L.). *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA. 59, 2019, João Pessoa/PB. Anais Virtuais [...]*. João Pessoa, 2019.

SAGAR, N. A. *et al.* Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. ed. 3, v. 17, p. 512-531, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12330>. Acesso em: 7 jun. 2020.

SANTOS, J. E. F. **Fungos isolados de colmeias de *Melipona scutellaris* e avaliação da capacidade de produção de lipases**. 2019. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SOARES, C. M. F. *et al.* Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 79, p. 745–757, 1999.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 105, n. 6, p. 308-317. 2003

VULFSON, E. N. Industrial applications of lipases. *In*: WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. (eds.). **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application**. Cambridge University Press: Great Britain, 1994, p. 271-288.



09 Capítulo



Otimização da extração
de β -caroteno em casca
e bagaço de limão cravo
(*Citrus limonia Osbeck*)
liofilizados

Capítulo 9

Otimização da extração de β -caroteno em casca e bagaço de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) liofilizados

Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira*¹; Larissa Carolina de Moraes¹; Sérgio Henrique Silva²; Jaime Vilela de Resende³

Resumo

O limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) é um tipo de citros amplamente cultivado no território brasileiro, seu processamento gera uma elevada quantidade de subprodutos ricos em compostos bioativos, como o β -caroteno, um pigmento natural com ação antioxidante, anti-inflamatória e pró-vitamina A, que auxilia inclusive na prevenção de doenças cardiovasculares. A recuperação desse pigmento é influenciada por fatores como, tipo e concentração do solvente, temperatura de extração e características da matriz alimentar em que está presente, sendo necessário realizar um estudo que otimize o processo de extração. Dessa forma, o trabalho objetivou otimizar a extração de β -caroteno em casca e bagaço de limão cravo liofilizados. Para isso foi empregado um delineamento composto central (DCC) contendo oito pontos fatoriais e quatro pontos centrais. Foram avaliados os efeitos da temperatura de extração, bem como das concentrações de acetona e de hexano na solução extratora de β -caroteno. A quantificação desse composto foi realizada por método espectrofotométrico e as concentrações variaram de 0,1858 a 0,3171 mg/100g, sendo que a extração foi favorecida quando se aplicou soluções extratoras com concentrações de hexano superiores a 13 % e concentrações de acetona inferiores a 70 % em temperaturas mais baixas (< 15 °C). Nota-se que esse subproduto industrial pode ser explorado visando a recuperação de β -caroteno, e aplicando as condições adequadas é possível alcançar maiores extrações desse carotenoide.

Palavras-chave: Antioxidante. Resíduo. Solventes.

Introdução

A cultura de citros no Brasil teve início com as expedições colonizadoras na Bahia e hoje está

¹ Doutoranda em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

² Doutor em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

³ Professor titular, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

*E-mail para correspondência: anacristina.engalimentos@gmail.com

presente em diversos estados, impactando sócio e economicamente todo o território nacional (RODRIGUEZ *et al.*, 1991). Segundo Sharma *et al.* (2017), o Brasil é considerado o maior processador de frutas cítricas do mundo, detendo 47 % dessa fatia de mercado e estima-se que a produção se intensifique ainda mais devido ao crescimento do cultivo cientificamente aprimorado, à técnicas de manejo mais avançadas e à melhores condições fitossanitárias.

Os citros compreendem um grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família Rutaceae, representado por laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas e doces, pomelo, cidra, laranja-azedada e toranjas (LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012). Pertencente a esse grupo, o limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck), é uma espécie de citros amplamente cultivada em pomares e viveiros nacionais, já que apresenta fácil adaptação em diferentes solos e elevada resistência à seca (REDA *et al.*, 2005). Além disso, de acordo com Reda *et al.* (2005) a cultura de limão cravo no Brasil tem sido utilizada como porta-enxerto para cultivo de diversas plantas cítricas, auxiliando inclusive na maturação precoce das frutas.

O processo de industrialização de citros gera grandes quantidade de resíduos e subprodutos como cascas, bagaços e sementes (CHON; CHON, 1997). Após a extração do suco dos citros, por exemplo, acredita-se que praticamente 50 % do fruto se tornam subprodutos (CHON; CHON, 1997; SHARMA *et al.*, 2017). Uma parte destes subprodutos podem ser utilizados na elaboração de ração animal ou fertilizantes, o restante é descartado no meio ambiente, muitas vezes sem o processamento adequado, representando um problema ambiental (KOBORI; JORGE, 2005).

No entanto, os subprodutos dos frutos de citros, principalmente as cascas, apresentam quantidades significativas de compostos biologicamente ativos, como carotenoides, terpenoides, cumarinas, furanocumarinas e flavonoides, principalmente flavononas e flavonas polimetoxiladas (GÓMEZ-MEJÍA *et al.*, 2019). Esses metabólitos, além de auxiliar na proteção do fruto, também revelam-se como substâncias bioativas promotoras de saúde, com potencial de aplicação como ingredientes em suplementos dietéticos e alimentos nutraceuticos, matérias-primas em cosméticos e aditivos naturais em produtos alimentícios (AHMAD *et al.*, 2006; GÓMEZ-MEJÍA *et al.*, 2019; BENAVENTE-GARCIA; CASTILLO, 2008).

Entre os compostos bioativos presentes nas cascas de citros, os carotenoides têm despertado grande interesse aos pesquisadores, devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e evidências que associam sua ingestão a baixa incidência de câncer, doenças relacionadas ao envelhecimento, doenças cardiovasculares e osteoporose (DUGO *et al.*, 2006; JAVED *et al.*, 2013; SALGADO, 2017). Segundo Jun *et al.* (2003), mais de 115 carotenoides foram descobertos em citros, entre eles o beta-caroteno (β -Caroteno) é o pigmento natural mais abundante do grupo (SHARMA *et*

al., 2017). Esse composto tem atividade pró-vitamina A e também está presente em vegetais e frutas de cor amarelo-alaranjada e em vegetais folhosos de cor verde-escura, sendo frequentemente empregado como corante na indústria de alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; ELVIRA-TORALES; GARCÍA-ALONSO; PERIAGO-CASTÓN, 2019).

A obtenção de β -caroteno a partir de casca de citros deve ser cuidadosamente analisada a fim de evitar a perda ou a inativação do pigmento. Nesse contexto, inúmeras técnicas podem ser empregadas para a recuperação de tal composto, como por exemplo, a extração assistida por micro-ondas, a extração ultrassônica, a extração com fluido supercrítico, a extração com líquido pressurizado e a extração sólido líquido com uso de solventes orgânicos, sendo esta última, uma das metodologias mais utilizadas para obtenção deste tipo de carotenoide (GÓMEZ-MEJÍA *et al.*, 2019; HIRANVARACHAT; DEVAHASTIN, 2014). Vale ressaltar que a eficiência da extração, neste caso, é diretamente influenciada pelo tipo de solvente empregado, a temperatura utilizada, o tamanho das partículas das amostras trituradas, a hidratação das amostras e o tempo de contato entre a amostra e o solvente (BURKHARDT; BOHEM, 2007).

O alto teor de água nas cascas de citros é geralmente considerado desfavorável para a extração eficiente de β -caroteno, já que esses carotenoides e os solventes de extração apresentam natureza hidrofóbica. Dessa forma, para aumentar o rendimento da extração faz-se necessário o emprego de técnicas de desidratação térmicas ou não-térmicas (SAINI; KEUM, 2018). Entretanto, os métodos de desidratação com base térmica comumente usados (por exemplo, secagem em forno e micro-ondas) causam degradação térmica e isomerização de carotenoides. Assim, para proteger os β -carotenos da degradação mediada por alta temperatura, as amostras de alimentos podem ser desidratadas por meio de liofilização (SAINI; KEUM, 2018).

A liofilização também chamada de criodesidratação é um processo de secagem que possibilita que a água previamente congelada seja convertida diretamente para o estado gasoso, ou seja, a mudança de estado físico ocorre por sublimação. Esta operação unitária é realizada sob vácuo e baixas temperaturas, sendo ideal para secagem de alimentos que possuem compostos sensíveis a temperaturas elevadas como é o caso dos carotenoides (IBARZ; BARBOSA-CANOVAS, 1999).

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo liofilizar casca e bagaço de limão cravo, otimizar a extração de β -caroteno presente nesse resíduo e quantificá-lo por método espectrofotométrico, visando o aproveitamento desses subprodutos como matéria-prima para produção de ingredientes ou compostos que podem ser incluídos na alimentação humana.

Material e Métodos

Material

Os limões cravo foram adquiridos em comércio local de Lavras-MG e adequadamente higienizados. Em seguida, retirou-se manualmente o suco dos limões e as cascas e bagaço foram acondicionados em sacos plásticos e congelados à -75 °C em Ultra Freezer (modelo CL 120-86V) por 24 horas. Posteriormente, realizou-se a liofilização por 72 horas no liofilizador (marca Edwards, modelo L4KR). Então, as cascas e bagaços secos foram triturados com auxílio de um liquidificador industrial, foi feita uma peneiragem para homogeneização do tamanho da amostra e por fim o material foi armazenado em vidro em local escuro. As análises de β -caroteno foram realizadas no Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA) na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Extração de β -caroteno

O processo de extração do β -caroteno foi realizado em diferentes temperaturas, utilizando diferentes concentrações de solventes orgânicos acetona e hexano. Visando otimizar a extração desses compostos utilizou-se um Delineamento Composto Central (DCC), os níveis reais e codificados são expostos na Tabela 1. Foram realizados 12 tratamentos, sendo oito pontos fatoriais e quatro repetições no ponto central (Tabela 2).

Tabela 1 - Variáveis do Delineamento Composto Central (DCC)

Variáveis	-1	0	+1
Concentração de acetona (%) – CA	60	70	80
Concentração de hexano (%) – CH	5	10	15
Temperatura de extração (°C) - T	10	20	30

Fonte: Dos autores, 2021.

Para extrair o β -caroteno foi adicionando em tubo 1 g do pó da casca e do bagaço de limão cravo e 10 mL de solução de solventes combinados segundo o delineamento (Tabela 2). A extração foi realizada em ambiente escuro por 2 horas com agitação esporádica, decorrido o tempo as amostras foram centrifugadas a 1549 x g por 10 min em centrífuga refrigerada (modelo SP-701) e os sobrenadantes foram retirados para quantificação em espectrofotômetro.

Quantificação de β -caroteno

A quantificação de β -caroteno foi realizada segundo Nagata e Yamashita (1992), na qual realizou-se leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 453 nm, 505 nm, 645 nm e 663 nm. Posteriormente inseriu-se os valores de absorvância na Equação 1.

$$\beta - \text{caroteno} = 0,216 A_{663} - 1,22 A_{645} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{453} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde A_{663} é a absorvância a 663 nm, A_{645} é a absorvância a 645 nm, A_{505} é a absorvância a 505 nm e A_{453} é a absorvância a 453 nm.

Análise estatística

Os resultados foram analisados com auxílio do software Statistica (versão 8.0). Os dados foram submetidos a análise de variância com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), em seguida ajustou-se um modelo matemático utilizando-se como critério a significância dos parâmetros ajustados ($p < 0,05$), a falta de ajustamento do modelo e o coeficiente de determinação (R^2) e plotou-se as curvas de superfície de resposta e curvas de contorno.

Resultados e Discussão

As concentrações de β -caroteno obtidos para cada tratamento de extração do DCC aplicado são apresentados na Tabela 2. Observa-se que a maior quantidade de β -caroteno (0,3171 mg/100g) foi extraída quando se empregou uma solução contendo uma concentração de acetona de 60 % combinada com uma concentração de hexano de 15 % a uma temperatura de extração de 10 °C. Esse resultado foi inferior ao obtido por Ghosh *et al.* (2019) ao analisarem casca de laranja (*Citrus reticulata*) por análise cromatográfica (4,99 mg/100g) e superior ao encontrado por Abou-Arab, Mahmoud e Abu-Salem (2016) que ao analisarem o conteúdo de β -caroteno em casca de laranja (*Citrus valência*) e tangerina (*Citrus reticulata*) secas por micro-ondas, secagem ao sol e secagem com ar quente atingiram, respectivamente, concentrações de 44,19 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 34,42 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 23,76 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 31,70 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 25,63 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 17,68 $\mu\text{g}/100\text{g}$. As diferenças observadas entre os trabalhos podem ser atribuídas a distinção entre as espécies de citros analisadas e principalmente ao método de secagem aplicado. Diferente da liofilização, os métodos de secagem empregados pelos

autores mencionados promovem a degradação do β -caroteno que é uma substância termossensível.

Tabela 2 - Resultados da concentração de β -caroteno dos tratamentos do DCC

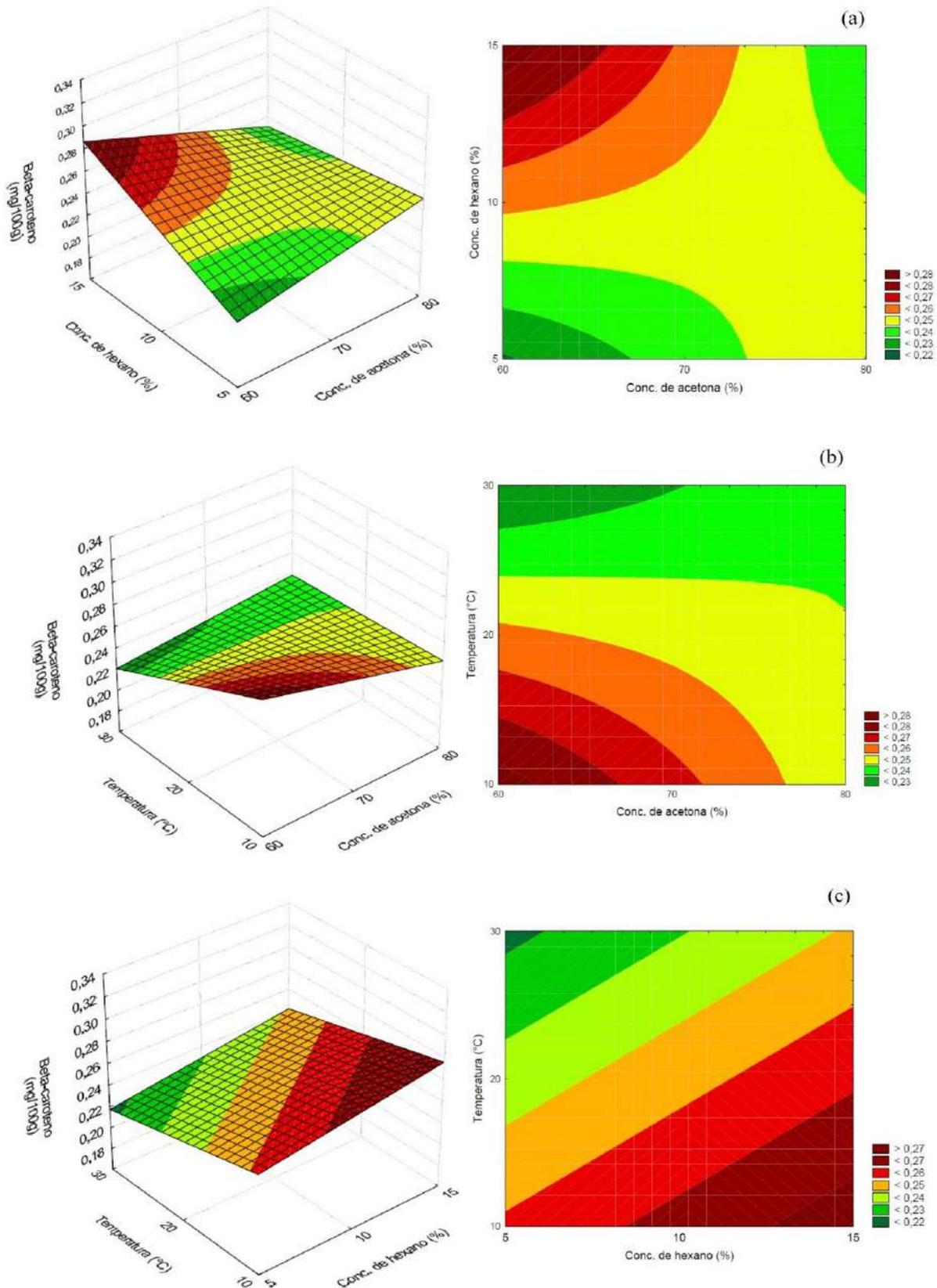
Ensaio	Concentração		Temperatura (°C)	β -caroteno (mg/100g)
	acetona (% v/v)	hexano (% v/v)		
1	-1 (60)	-1 (5)	-1 (10)	0,2568
2	-1 (60)	-1 (5)	1 (30)	0,1858
3	-1 (60)	1 (15)	-1 (10)	0,3171
4	-1 (60)	1 (15)	1 (30)	0,2603
5	1 (80)	-1 (5)	-1 (10)	0,2582
6	1 (80)	-1 (5)	1 (30)	0,2472
7	1 (80)	1 (15)	-1 (10)	0,2325
8	1 (80)	1 (15)	1 (30)	0,2337
9	0 (70)	0 (10)	0 (20)	0,2402
10	0 (70)	0 (10)	0 (20)	0,2407
11	0 (70)	0 (10)	0 (20)	0,2352
12	0 (70)	0 (10)	0 (20)	0,2501

Fonte: Dos autores, 2021.

Por meio da análise de variância dos tratamentos empregados no DCC foi possível perceber que houve diferença significativa entre os mesmos, uma vez que o p-valor foi inferior a 0,05 ($p = 0,00455$). Assim, os gráficos de superfície de resposta foram plotados (Figura 1) e os dados experimentais foram ajustados em um modelo matemático (Equação 2).

Pelas superfícies de respostas e curvas de contorno apresentadas na Figura 1a, b e c nota-se que maiores concentrações de β -caroteno foram atingidas quando empregou-se concentrações de acetona inferiores a 70 %, concentrações de hexano superiores a 13 % e temperaturas menores que 15 °C. De acordo com Saini e Keum (2018), β -carotenos são carotenoides apolares altamente lipofílicos, com estrutura de hidrocarboneto conjugado sem grupos funcionais polares. Devido sua natureza química, a extração do β -caroteno de matrizes alimentares comumente é realizada com o emprego de acetona e hexano e a combinação desses solventes orgânicos com diferentes polaridades fornece um efeito sinérgico, o que possibilita a solubilização adequada do composto de interesse, facilitando a obtenção desses carotenoides (SAINI; KEUM, 2018).

Figura 1 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para concentração de β -caroteno



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: Concentração de β -caroteno em função de (a) concentração de acetona e concentração de hexano, (b) concentração de acetona e temperatura e (c) concentração de hexano e temperatura.

Segundo Ghazi (1999) a acetona por apresentar uma natureza polar, pode se ligar a água presente no alimento e forçar o esgotamento do caroteno que está presente naturalmente nas células vegetais rodeadas pelo citoplasma aquoso, enquanto o hexano de alta pureza reúne propriedades desejadas para extrair o caroteno. Pela Figura 1a e b é possível perceber que maiores concentrações de hexano favoreceram a extração de β -caroteno, pois esse solvente orgânico apresenta um caráter apolar assim como esse pigmento natural o que torna possível uma maior interação entre os mesmos e, conseqüentemente uma melhor extração do carotenoide (SAINI; KEUM, 2018).

Quanto ao parâmetro temperatura, observa-se na Figura 1b e c que o emprego de temperaturas menores resultou em uma maior extração de β -caroteno. Norshazila *et al.* (2017) ao avaliar o efeito do tempo e da temperatura na extração de β -caroteno em abóbora relataram que o aumento da temperatura de extração de 15 °C para 30 °C promoveu maior extração desse composto. Segundo os autores, um incremento na temperatura pode aumentar a permeabilidade das paredes celulares dos vegetais, facilitando a entrada de solvente e a solubilidade dos carotenoides, o que conseqüentemente, acarreta o aumento do coeficiente de difusão e diminui a viscosidade do solvente durante a extração. Todavia é imprescindível que a temperatura de extração seja inferior à temperatura de degradação desses pigmentos, que encontra-se entre 35 °C e 40 °C (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, em temperaturas mais elevadas os β -carotenos que normalmente se encontram na forma *trans* são convertidos em isômeros *cis*, o que é considerado um efeito negativo, já que os isômeros *cis* apresentam menor ação como pró-vitamina A (NORSHAZILA *et al.*, 2017). Sugere-se que no presente estudo os melhores resultados para a extração foram encontrados em temperaturas inferiores à 15 °C devido à uma interação entre essa variável e a concentração de solvente utilizada.

A Equação 2 representa uma regressão significativa ($p < 0,05$) ajustada para concentração de β -caroteno, cujo coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,964, a raiz quadrada do erro médio (RMSE) foi 0,008 e o modelo não apresentou falta de ajuste (Tabela 3).

$$\beta - \text{caroteno} = 0,246 - 0,006 CA + 0,012 CH - 0,017 T - 0,022 CAxCH + 0,015 CAxT \text{ (Eq. 2)}$$

Observa-se na Equação 2 e na Tabela 3 que a concentração de hexano (CH), e a temperatura (T) apresentaram efeitos significativos sobre a concentração de β -caroteno. Além disso, as interações concentração de acetona e concentração de hexano (CA x CH) e concentração de acetona e temperatura (CA x T) também foram significativas sobre a concentração de β -caroteno extraído. Todavia, a interação concentração de hexano e temperatura (CH x T) não foi significativa para o teor do carotenoide e por isso não foi apresentada na Tabela 3. O efeito linear da concentração de acetona também não foi significativo, entretanto, sua interação com outros fatores foi significativa, por isso esse parâmetro foi inserido ao modelo.

Tabela 3 - Análise de variância para a concentração de β -caroteno obtida pelo DCC

Fatores	SQ	GL	QM	F	p
(1) CA (L)	0,000294	1	0,000294	7,62238	0,070102
(2) CH (L)	0,001143	1	0,001143	29,63296	0,012173*
(3) T (L)	0,002369	1	0,002369	61,43506	0,004325*
CA (L) x CH (L)	0,003785	1	0,003785	98,15415	0,002187*
CA (L) x T (L)	0,001743	1	0,001743	45,18712	0,006720*
Falta de ajuste	0,000234	3	0,000078	2,02703	0,288222
Erro puro	0,000116	3	0,000039		
Total SQ	0,009683	11			

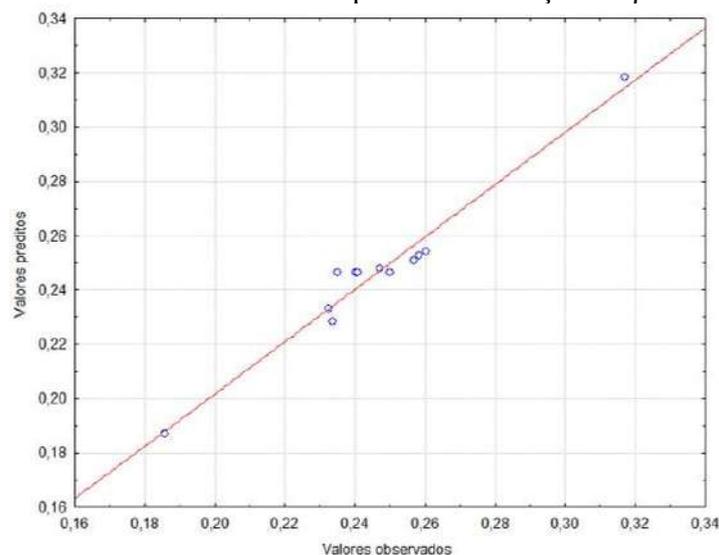
Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: SQ: soma de quadrados, GL: graus de liberdade, QM: quadrados médios, F: estatística de análise de variância, p: significância, CA: concentração de acetona, CH: concentração de hexano, T: temperatura, CA x CH: interação entre CA e CH, CA x T: interação entre CA e T.

*significativo ao nível de 5% de probabilidade.

A Figura 2 ilustra a relação entre as concentrações de β -caroteno observadas e as previstas pelo modelo. Os valores previstos estão dispostos em linha diagonal, observa-se que os valores obtidos experimentalmente estão muito próximos aos previstos pelo modelo demonstrando que o modelo proposto foi adequado para descrever o processo de extração de β -caroteno em função da temperatura e das concentrações de solvente empregadas. Nota-se ainda uma coerência ao analisar o valor elevado do coeficiente de determinação obtido.

Figura 2 - Valores previstos e valores observados para concentração de β -caroteno



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: (—) Valores previstos pelo modelo, (○) Valores obtidos experimentalmente.

Conclusão

A casca e o bagaço de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) são subprodutos agroindustriais ricos em β -caroteno, um composto bioativo pertencente ao grupo dos carotenoides que possui atividade antioxidante, atua na prevenção de doenças e ainda pode ser empregado como um pigmento natural ou corante na indústria de alimentos. Ao empregarmos diferentes concentrações de acetona e hexano e diferentes temperaturas para extração desse carotenoide, observou-se que a maior concentração de β -caroteno obtida foi de 0,3171 mg/100g. Otimizando a extração deste composto por meio de um delineamento composto central (DCC) observou-se que maiores concentrações desse pigmento foram obtidas empregando temperaturas menores que 15 °C e utilizando soluções extratoras contendo concentrações de hexano maiores que 13 % e concentrações de acetona menores que 70 %. Os dados de concentração de β -caroteno foram ajustados a um modelo que apresentou uma alta capacidade de explicação da variabilidade dos valores experimentais ($R^2 = 0,964$), indicando que os resíduos industriais do limão cravo podem ser explorados visando a recuperação de β -caroteno, e aplicando as condições adequadas é possível alcançar maiores extrações desse carotenoide.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

Referências

- ABOU-ARAB, A. A.; MAHMOUD, M. H.; ABU-SALEM, F. M. Bioactive compounds content of citrus peel as affected by drying processes. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**, v. 10, n. 4, p. 240-243, 2016.
- AHMAD, M. M. *et al.* Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 319-324, 2006.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6185-6205, 2008.

BURKHARDT, S; BOHEM, V. Development of a new method for the complete extraction of carotenoids from cereals with special reference to durum wheat (*Triticum durum* Desf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8295-8301, 2007.

CHON, R.; CHON, A. L. **Subprodutos del procesado de las frutas**. In: ARTHEY, D; ASHURST, P. R. (Eds.). *Procesado de Frutas*. Zaragoza: Acribia, 273 p, 1997.

DUGO, P. *et al.* Elucidation of carotenoid patterns in citrus products by means of comprehensive normal-phase reversed-phase liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 7743-7750, 2006.

ELVIRA-TORALES, L.; GARCÍA-ALONSO, J.; PERIAGO-CASTÓN, M. J. Nutritional Importance of Carotenoids and Their Effect on Liver Health: A Review. **Antioxidants** (Basel), v. 7, n. 229, p. 2-23, 2019.

GHAZI, A. Extraction of β -carotene from orange peels. **Nahrung**, v. 43, n. 4, p. 274-277, 1999.

GHOSH, S. *et al.* Estimation of beta carotene from fruit peel wastes by high performance thin layer chromatography. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, p. 2598-2600, 2019.

GÓMEZ-MEJÍA, E. *et al.* Citrus peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 295, p. 289-299, 2019.

HIRANVARACHAT, B.; DEVAHASTIN, S. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 17-26, 2014.

IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Deshidratación y Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos**, Lancaster, Basel, 1999.

JAVED, S. *et al.* Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of Citrus limetta var. Mitha (sweet lime) peel in Pakistan. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 3071-3077, 2013.

JUN, T. *et al.* Analysis of major carotenoid composition and its content in citrus fruit. **Agricultural Sciences in China**, v. 36, p. 1202-1208, 2003.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S.A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 530-546, 2012.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple Method for Simultaneous Determination of Chlorophyll and Carotenoids in Tomato Fruit. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 39, p. 925–928, 1992.

NORSHAZILA, S. *et al.* The Effect of Time, Temperature and Solid to Solvent Ratio on Pumpkin Carotenoids Extracted Using Food Grade Solvents. **Sains Malaysiana**, v. 46, p. 231–237, 2017.

OLIVEIRA, R.G.A. *et al.* Assessment and degradation study of total carotenoid and β -carotene in bitter yellow cassava (*Manihot esculenta* crantz) varieties. **African Journal of Food Science**, v. 4, p. 148-155, 2010.

REDA, S. Y. *et al.* Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 672–676, 2005.

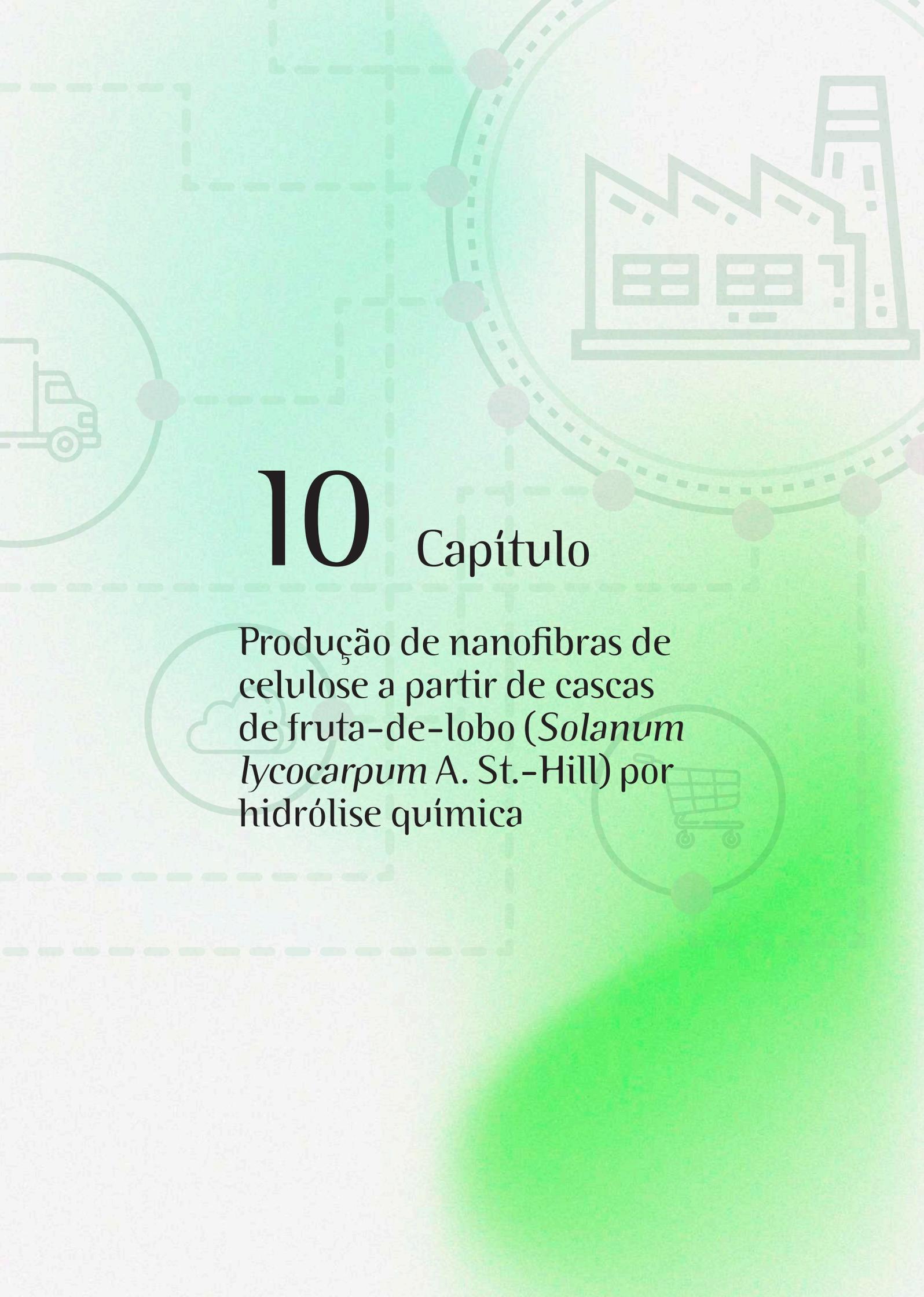
RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and Food Preparation : The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared , Processed , and Stored Foods**. Arlington: Snow, John, 1997.

RODRIGUEZ, O. *et al.* **Citricultura Brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargil, 1991.

SAINI, R.K.; KEUM, Y.S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90-103, 2018.

SALGADO, J. **Alimentos funcionais**. 1. ed. São Paulo: Oficina de textos, 2017.

SHARMA, K. *et al.* Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29-46, 2017.



10 Capítulo

Produção de nanofibras de celulose a partir de cascas de fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hill) por hidrólise química

Capítulo 10

Produção de nanofibras de celulose a partir de cascas de fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hill) por hidrólise química

Amanda Lélis de Souza*¹; Letícia Moraes Costa Teixeira²; Maria Betânia de Freitas Marques³; Guilherme Carneiro⁴; Franciele Maria Pelissari⁵

Resumo

A casca da fruta-de-lobo é um subproduto pouco explorado e com potencial uso para produção de nanopartículas e posterior aplicação como reforço em matrizes poliméricas. A utilização de subprodutos alimentares representa uma alternativa com alto potencial para o desenvolvimento de novas materiais. Visando a utilização do subproduto proveniente da fruta-de-lobo (casca), fruto oriundo do Cerrado brasileiro, objetivou-se investigar o potencial deste resíduo como fonte de material lignocelulósico para obtenção de nanofibras de celulose (NCs). Para o isolamento das nanopartículas optou-se pelo uso do método químico, onde a influência de diferentes concentrações de ácido sulfúrico (0,1, 1 e 10%) sobre as propriedades das NCs resultantes foi estudada. A análise morfológica mostrou a eficácia dos tratamentos no isolamento de fibras em escala nanométrica, obtendo diâmetros entre 93 a 158 nm. Ademais, foi possível observar a remoção dos componentes amorfos conforme a realização das etapas do tratamento químico. A análise de potencial zeta evidenciou que quanto menor a concentração de ácido sulfúrico, mais estável a suspensão coloidal, maximizando as forças repulsivas entre as NCs de modo a prevenir sua agregação. Das análises realizadas, a amostra de nanofibra de celulose obtida com 0,1% de H₂SO₄ apresentou características mais adequadas (suspensão coloidal mais estável) para ser utilizada como agente de reforço em materiais compósitos.

Palavras-chave: Hidrólise ácida. Lobeira. Material de reforço. Nanopartículas. Tratamento químico.

¹ Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Materiais Verdes, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

² Graduanda em Engenharia de Alimentos, Laboratório de Materiais Verdes, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

³ Pós-doutora em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Biologia e Ciências da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

⁴ Docente, Laboratório de Materiais Verdes, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

⁵ Docente, Departamento de Farmácia, Faculdade de Biologia e Ciências da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

*Autor para correspondência: amandalelis247@gmail.com

Introdução

Anualmente bilhões de toneladas de resíduos agroindustriais ricos em biomassa são gerados em todo o mundo, sendo sua maioria simplesmente descartada ou queimada (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018). A maior parte da biomassa vegetal de baixo valor é material lignocelulósico constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina.

A celulose é a substância orgânica mais abundante na natureza, sua estrutura confere resistência e estabilidade às paredes celulares de vegetais superiores. Do ponto de vista químico, é um homopolissacarídeo estrutural constituído por unidades de β -D-glicopiranosose em arranjo linear unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). As cadeias de celulose formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. O primeiro tipo de interação é responsável pela rigidez da cadeia e o segundo pela formação da fibra vegetal (PAKHARENKO *et al.*, 2021).

Atualmente, as fibras de celulose têm recebido atenção especial devido às suas características únicas, como: disponibilidade, biodegradabilidade, renovabilidade, custo acessível, resistência mecânica e leveza (CHOWDHURY *et al.*, 2013; ILYAS; SAPUAN; ISHAK, 2018). No entanto, existem algumas características desfavoráveis, como comportamento não uniforme, baixa adesividade com matrizes poliméricas, menor durabilidade e natureza hidrofílica (RIDZUAN *et al.*, 2016; ILYAS *et al.*, 2017). Dessa forma, uma alternativa para suprir essas imitações é através do isolamento de fibrilas de celulose em nanoescala, denominadas de nanofibras de celulose (NCs).

A produção de nanomateriais a partir de biomassa lignocelulósica gera oportunidade para o desenvolvimento e aplicação de novos materiais de reforço no campo da nanotecnologia (DU *et al.*, 2019). Atualmente, os pesquisadores estão estudando diferentes maneiras para desenvolver materiais no nível nanométrico a fim de aproveitar suas vantagens, incluindo peso mais leve, maior resistência e boa reatividade química (THEIVASANTHI *et al.*, 2018).

As NCs são materiais promissores com potencial aplicação nas áreas de embalagens, estabilizador de alimentos, materiais de revestimento e cargas de reforço. Essas nanopartículas apresentam redes emaranhadas com alta razão de aspecto, tipicamente compostas por agregados estruturalmente ordenados de fibras elementares. É importante ressaltar que as nanofibras possuem alta tenacidade, ótimos desempenhos mecânicos e alta área de superfície específica (PAKUTSAH; AHT-ONG, 2020; SOOFI *et al.*, 2021).

O isolamento de NCs pode se dar mediante diferentes métodos que podem ser agrupados em: tratamentos químicos, mecânicos e enzimáticos, sendo utilizados separadamente, em sequência ou

em combinação (HERNANDEZ; FERREIRA; ROSA, 2018; SHARMA *et al.*, 2019). A eficácia do tratamento é altamente dependente do tipo de substrato, bem como do tipo de método utilizado devido à complexidade e variabilidade das estruturas lignocelulósicas (PELLERA; GIDARAKOS, 2018).

Solanum lycocarpum é uma espécie arbórea pertencente à família Solanaceae popularmente conhecida como lobeira ou fruta-de-lobo. Encontrada na região do Cerrado brasileiro, a fruta-de-lobo possui alta produção e abundância (PRATES *et al.*, 2012). Para o consumo humano utiliza-se apenas a polpa da fruta, sendo a casca descartada resultando na geração de resíduos. Portanto, torna-se necessário encontrar soluções para o aproveitamento desse subproduto, que permanece praticamente inexplorado como fonte renovável de biomassa lignocelulósica.

A perspectiva de um desenvolvimento sustentável tem sido cada vez mais empregada na preparação de novos materiais provenientes de fontes renováveis. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi atribuir ao subproduto proveniente do processamento da fruta-de-lobo (casca), uma nova finalidade tecnológica. Utilizá-los como fonte de material lignocelulósico para obtenção de nanofibras de celulose através de tratamento químico para posteriores aplicações como material de reforço em embalagens biodegradáveis.

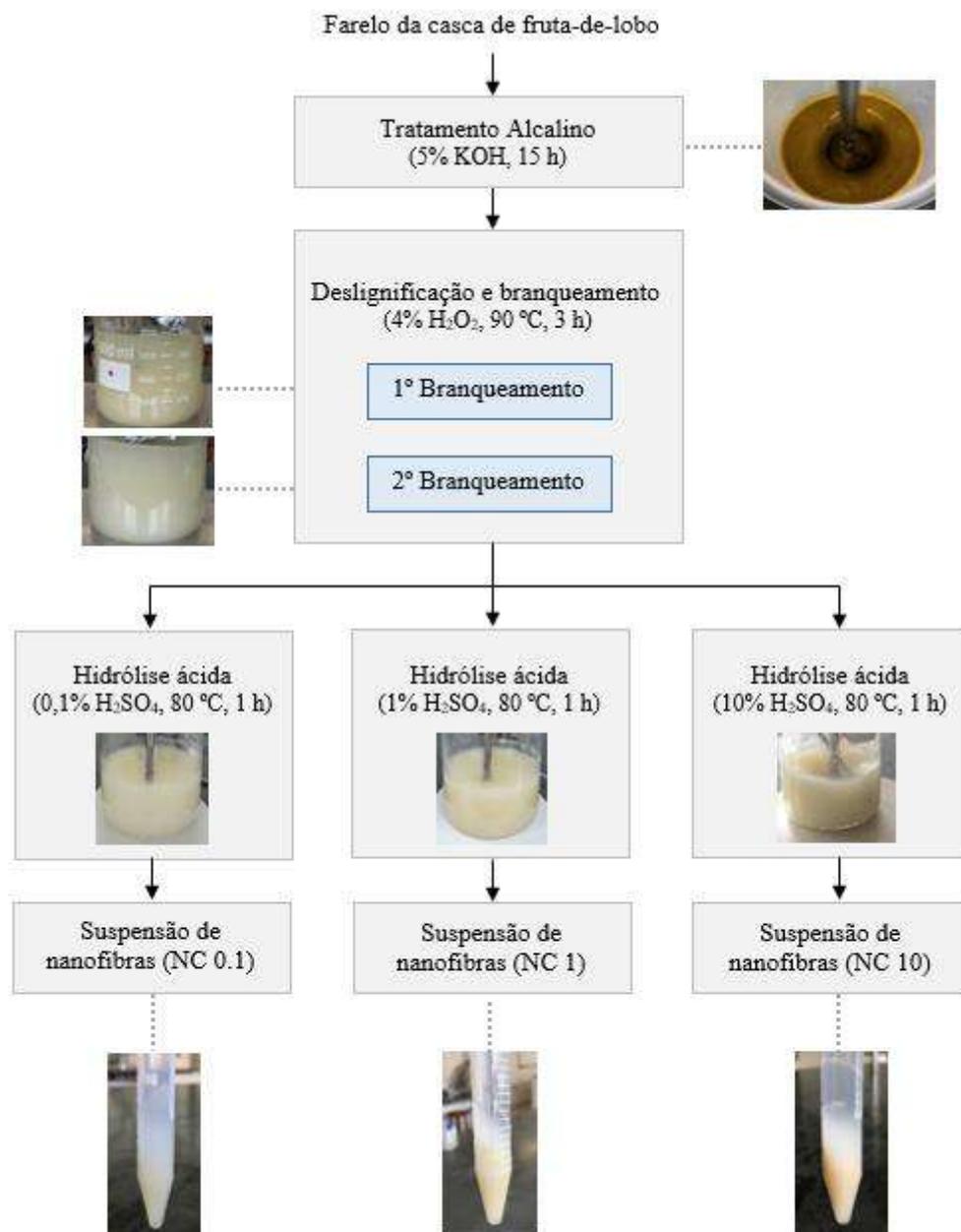
Material e Métodos

O farelo da casca de fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hill) foi extraído em estágio de maturação verde. As frutas foram colhidas na cidade de Diamantina - MG, distrito de Conselheiro Mata, Brasil (-18.228930, -43.610849) no período de janeiro de 2019, e posteriormente, armazenadas a 4 °C em recipiente de polietileno até a etapa de preparação do farelo. Todos os reagentes químicos utilizados são de grau analítico.

Os frutos foram lavados, higienizados e posteriormente, descascados manualmente. As cascas, por sua vez, foram dispostas em bandejas e submetidas à secagem em estufa de convecção forçada (Tecnal Equipamentos Científicos Ltda, modelo TE-394/2) a 65 °C por 24 horas. O material seco foi triturado em um moinho de facas (Lucadema Científica Ltda, modelo 226172), peneirado através de uma peneira da série de Tyler de 100 mesh, para eliminar as partículas maiores. Por fim, o material foi estocado a 4 °C em recipiente de polietileno.

As NCs foram isoladas a partir do farelo da casca da fruta-de-lobo usando o tratamento químico descrito por Pelissari *et al.* (2017), com algumas modificações. A Figura 1 mostra o esquema do procedimento utilizado.

Figura 1 - Procedimento usado para isolar as nanofibras de celulose da casca de fruta-de-lobo



Fonte: Dos autores, 2021.

Primeiramente, o farelo da casca foi tratado com solução KOH 5% (m/v) (razão de 1:20) sob agitação mecânica em temperatura ambiente por 14 h. O resíduo insolúvel foi então deslignificado com 4% de H₂O₂ a 90 °C por 3 h em pH 5, ajustado com ácido acético 10% (v/v) (ANDRADE-MAHECHA *et al.*, 2015). O resíduo foi submetido novamente ao mesmo processo de branqueamento para uma descoloração mais efetiva. Por fim, a etapa de hidrólise ácida foi realizada empregando-se três concentrações diferentes 0,1%, 1% e 10% (v/v) de H₂SO₄ a 80 °C por 1 h, para introdução de cargas aniônicas nas superfícies das celuloses e retirada de materiais amorfos. Após cada etapa do

tratamento químico, os resíduos insolúveis foram neutralizados com solução alcalina ou ácida (KOH 5% (m/v) ou ácido acético 10% (v/v)), dependendo do pH, e lavados extensivamente com água destilada por meio de centrifugação (6000 rpm, 5 °C, 20 min) até pH neutro. Após cada etapa do processo foi retirado uma alíquota (20 mL) para fins analíticos. Os resíduos finais foram diluídos em água destilada e as suspensões foram estocadas a 4 °C em recipiente de polietileno.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) 30 g das suspensões de nanofibras foram secas em liofilizador (Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus) a -40 °C e 0,12 mbar durante 48 h.

Caracterização das nanofibras de celulose

Concentração das suspensões de nanofibras

Pesaram-se 2 g de cada suspensão previamente homogeneizada, em seguida secou-se em estufa de circulação forçada (modelo TE-394/2, Tecnal Equipamentos Científicos Ltda) a 105 °C por 24 h.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura das suspensões de nanofibras liofilizadas foi avaliada. As amostras foram fixadas com auxílio de fita dupla face e com a finalidade de melhorar a condutividade térmica, as mesmas foram revestidas com uma camada de ouro (Sputter Coater POLARON, modelo SDC050). Após o revestimento as amostras foram submetidas ao microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, modelo VEGA-LMH, Brno – República Checa) para visualização, com tensão de aceleração de 10 kV. Os tamanhos das NCs foram medidos através do *software* ImageJ®.

Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado pela técnica de DLS associado à mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments – Worcestershire, Inglaterra), em ângulo fixo de 173° e temperatura de 25 °C. As formulações foram diluídas 100 vezes na fase externa da formulação previamente à leitura.



Análise estatística

Para fins comparativos das diferenças entre as médias das propriedades das nanofibras de celulose tratadas com diferentes teores de H₂SO₄ na etapa de hidrólise ácida, a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey de comparações múltiplas com nível de significância de 5% foram executados usando o *software* Statistica 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, Oklohoma, EUA) (STATSOFT, 2004).

Resultados e Discussão

Aparência e concentração das suspensões de nanofibras

Para o isolamento das NCs da casca de fruta-de-lobo foi utilizado o tratamento químico, sendo que as alterações ocorridas no material foram perceptíveis a cada etapa do processo. Esse tratamento consiste na remoção da lignina da lamela média (região entre as fibras rica em lignina), separando dessa forma as fibras de celulose (ANDRADE-MAHECHA *et al.*, 2015). As etapas envolvidas no percorrer do processo foram detalhadas na Figura 2 sendo possível notar a mudança de coloração em cada estágio do tratamento, dos resíduos insolúveis e sobrenadantes a serem descartados. Durante o tratamento alcalino a cor do farelo de casca de fruta-de-lobo passou de marrom escura para caramelo após as lavagens. No primeiro branqueamento é possível averiguar a mudança gradual da cor caramelo para um branco amarelado que perdurou durante o segundo branqueamento e a hidrólise ácida.

Segundo Vadivel *et al.* (2017), o tratamento alcalino causa alterações físicas na parede da fibra, o que facilita a penetração e difusão de reagentes na estrutura fibrilar. Além disso, essa etapa é responsável pela hidrólise e solubilização dos grânulos de amido, hemiceluloses, pectinas e proteínas (KHAWAS; DEKA, 2016). Ao realizar a imersão do material lignocelulósico em solução alcalina evidenciou-se o escurecimento da amostra, sendo esse fato atribuído principalmente à ionização de grupos fenólicos (compostos cromógenos) (VADIVEL *et al.*, 2017).

Já os processos de branqueamento consistem na remoção da lignina e dos taninos responsáveis pela coloração marrom do farelo da casca (PELLISSARI; SOBRAL; MENEGALLI, 2014). A brusca mudança de cor observada nessas etapas de branqueamento, indica também a remoção de grupos cromógenos responsáveis pela cor marrom escura do material lignocelulósico inicial.

Figura 2 - Etapas envolvidas no tratamento químico para o isolamento de nanofibras de celulose de cascas de fruta-de-lobo



Fonte: Dos autores, 2021.

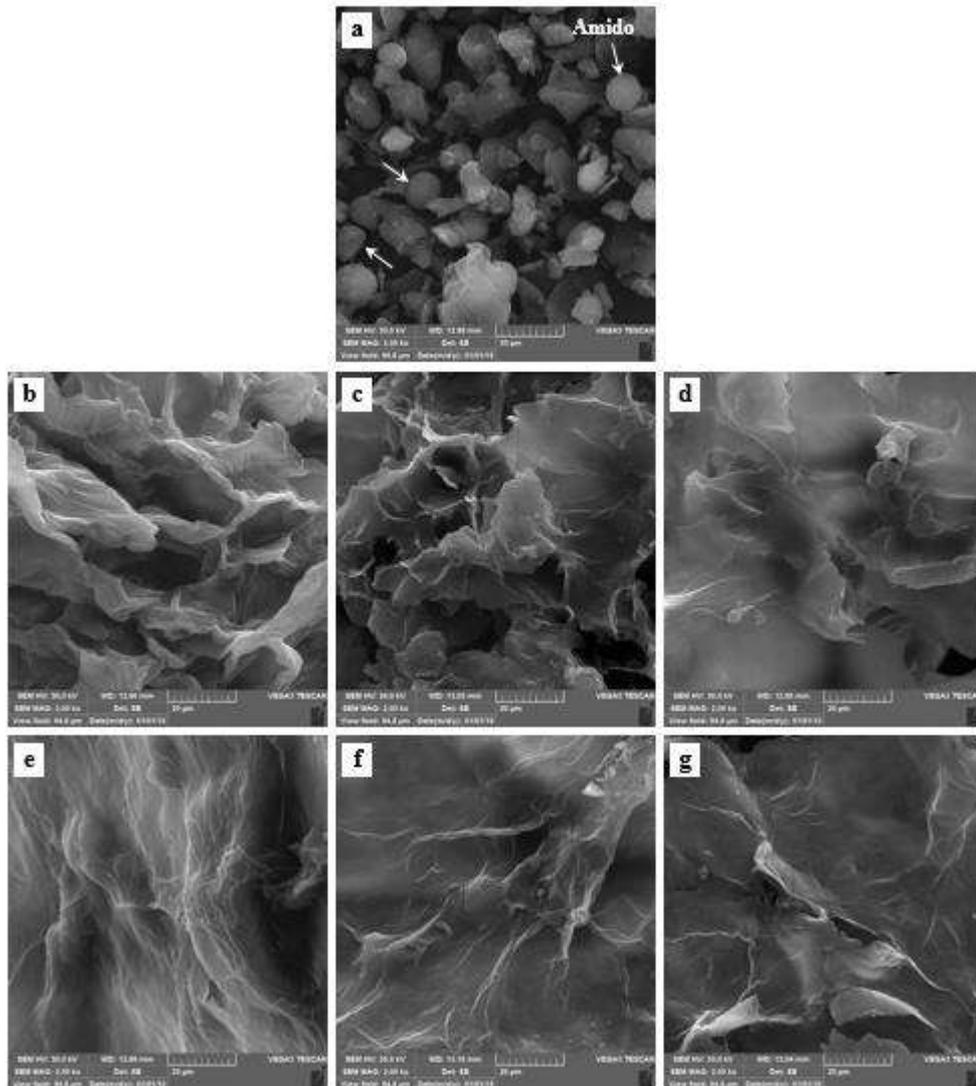
Observou-se que após as duas etapas de branqueamento a coloração permaneceu branco amarelado. Isso pode ter ocorrido devido a presença de metais no farelo da casca de fruta-de-lobo. De fato, a análise de cinzas revelou que o farelo possui $3,61\% \pm 0,01$ de resíduos inorgânicos em sua composição. De acordo com Andrade-Mahecha *et al.* (2015), o peróxido de hidrogênio como agente de branqueamento depende fortemente da concentração desses metais no material lignocelulósico, sendo que quanto menor a concentração dos metais, mais efetiva será a etapa de branqueamento. Além disso, a quelação de íons manganês pode causar a decomposição indesejável do peróxido de hidrogênio.

Ao final, os tratamentos realizados para obtenção das NCs resultaram em suspensões aquosas de nanopartículas cujas concentrações médias foram 0,70 g de nanofibras/100 g de suspensão, 0,79 g de nanofibras/100g de suspensão e 0,78 g de nanofibras/100 g de suspensão para hidrólise ácida com 0,1%, 1% e 10% de H₂SO₄, respectivamente.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi analisada tendo em vista as características do farelo da casca de fruta-de-lobo (fibra bruta) e sua modificação estrutural após cada etapa do tratamento químico (Figura 3).

Figura 3 - Microestruturas do farelo da casca de fruta-de-lobo e das etapas envolvidas no tratamento químico para o isolamento das nanofibras de celulose



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: (a) farelo da casca de fruta-de-lobo; (b) tratamento alcalino; (c) primeiro branqueamento; (d) segundo branqueamento; (e) hidrólise ácida com 0,1% de H₂SO₄; (f) hidrólise ácida com 1% de H₂SO₄; (g) hidrólise ácida com 10% de H₂SO₄ (2000x, escala = 20µm).

A micrografia do farelo exibiu alguns grânulos de amido ao redor do material fibroso (ver flecha - Figura 3a). Isto está em concordância com os trabalhos de Versino, López e García (2015) e Leite, Zanon e Menegalli (2017), pois no processo de retirada da casca, parte da polpa ficou aderida, acarretando a presença dos grânulos no farelo.

O material fibroso por sua vez, apresentou superfície irregular. A irregularidade observada nas superfícies das fibras é uma característica importante no seu uso como material de reforço em filmes, uma vez que proporciona melhor ancoragem na matriz polimérica.

Ao longo das etapas do método químico (tratamento alcalino → primeiro branqueamento → segundo branqueamento → hidrólises ácidas 0,1; 1 e 10%), apresentadas na Figura 3b-g, respectivamente, verificaram-se algumas alterações morfológicas nas fibras. De modo geral é possível constatar a remoção parcial de materiais amorfos no decorrer das etapas, como pectina, hemicelulose e lignina, e desta forma a preservação do material celulósico.

Após o tratamento alcalino (Figura 3b) observou-se a desintegração da estrutura do farelo ocasionada pela remoção dos componentes na estrutura e a permanência das fibras celulósicas, embora estas ainda estejam envolvidas por materiais amorfos. Segundo Hernandez, Ferreira e Rosa (2018) a extração por tratamento alcalino visa remover lignina, hemicelulose e açúcares (glicose e xilose, os quais são os principais constituintes da hemicelulose). No entanto a remoção desses materiais não celulósicos é considerada resistente devido à associação entre xiloglucano e celulose ser forte. Portanto, para extrair de maneira mais eficaz é necessária mais de uma etapa de branqueamento.

A Figura 3c-d revelou fibras mais expostas após os processos de branqueamento devido a maior remoção de lignina ao redor das estruturas.

Após a etapa de hidrólise ácida (Figura 3e-g) as fibras estão mais separadas e evidentes, apresentando boa estrutura uniforme e uma superfície relativamente lisa em comparação com a fibra bruta. O devido controle sobre a morfologia de partículas na escala nano está compreendido na faixa de 1 e 1000 nm (GARNETT; KALLINTERI, 2006). Através do *software* ImageJ® os diâmetros foram medidos obtendo os valores de 158 nm, 124 nm e 93 nm para as nanofibras hidrolisadas com 0,1%, 1% e 10% de H₂SO₄, respectivamente, mostrando que o tratamento químico foi eficaz na obtenção de fibras de celulose em escala nanométrica. Os diâmetros das NCs isoladas foram superiores às dimensões de estruturas nanométricas de outras fontes vegetais, como nanofibras do bagaço de mandioca (4,5 – 12,3 nm) (TRAVALINI *et al.*, 2019), bambu (5,3 – 10,9 nm) (SAURABH *et al.*, 2016), casca de banana (10,9 – 22,6 nm) (PELISSARI; SOBRAL; MENEGALLI, 2014) e polpa de beterraba (10 – 70 nm) (LI *et al.*, 2014). Por outro lado, foram similares às nanofibras do bagaço de *Agave tequilana* (54 – 171 nm) (ROBLES-GARCÍA *et al.*, 2018) e de tamanho inferior àquelas obtidas da polpa de *Macaranga hypoleucha* (340 nm) (SUTRISNO *et al.*, 2020).

Potencial zeta

O potencial zeta é um parâmetro importante para avaliar a estabilidade das suspensões de nanoestruturas, indicando o grau de repulsão entre as partículas adjacentes e com carga similar em uma dispersão (PELISSARI; SOBRAL; MENEGALLI, 2014). Nos processos de obtenção de nanofibras é interessante maximizar as forças repulsivas entre elas, ou seja, obter suspensões com alto potencial zeta em valor absoluto (Tabela 1). Desta forma evitam-se interações que possam levar à formação de agregados (baixo potencial zeta), o que poderia afetar negativamente a capacidade de reforço das nanofibras na matriz polimérica (ANDRADE-MAHECHA *et al.*, 2015). De acordo com Pelissari, Sobral e Menegalli (2014), a repulsão eletrostática de nanofibras em suspensão pode ser gerada pela hidrólise com ácido sulfúrico devido à introdução de grupos sulfato na superfície delas. Nanopartículas com potencial zeta inferior a +30 mV ou superior a -30 mV podem não permanecer fisicamente estáveis, pois as cargas não são repulsivas o suficiente para manter as partículas separadas, resultando na formação de agregados (SANCHÉZ-DOMINGUES; RODRÍGUEZ-ABREU, 2016).

Tabela 1 - Potencial zeta de nanofibras de celulose obtidas por diferentes hidrólises ácidas

Amostra	Potencial zeta (mV)
NC 0.1	-19,3 ± 0,1 ^a
NC 1	-17,2 ± 0,4 ^b
NC 10	-10,5 ± 0,3 ^c

Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: (NC 0.1) nanofibras de celulose obtida por hidrólise ácida com 0,1% de H₂SO₄, (NC 1) nanofibras de celulose obtida por hidrólise ácida com 1% de H₂SO₄, (NC 10) nanofibras de celulose obtida por hidrólise ácida com 10% de H₂SO₄.

Nota: ^{a,b,c} Médias com expoentes diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p < 0,05).

Os resultados obtidos (Tabela 1) revelam a existência de cargas negativas nas suspensões. Ao avaliar o efeito da concentração de ácido sulfúrico sobre a propriedade potencial zeta, verificou-se que as NCs tratadas com alta concentração (10% de H₂SO₄) apresentaram carga superficial negativa mais baixa (-10,5 mV) em comparação com as NCs tratadas com concentrações mais baixas desse ácido (19,3 e 17,2 mV para 0,1% e 1% de H₂SO₄, respectivamente). A menor carga superficial negativa da amostra NC 10 deve-se a maior quantidade de grupos H⁺ livres disponíveis no meio, o que ocasiona a redução da carga negativa geral da superfície da nanofibra (TIBOLLA *et al.*, 2018).

Assim, a concentração de ácido influenciou de forma significativa esta propriedade ($p < 0,05$), quanto menor a concentração de ácido sulfúrico, a suspensão coloidal pode ter maior estabilidade física, com menor agregação. Por fim, cabe ressaltar que as forças repulsivas são apenas um dos fatores que influenciam a estabilidade de agregação das nanopartículas, havendo também outros fatores, como os impedimentos estéricos, por exemplo.

Conclusão

O tratamento químico realizado no farelo de casca de lobeira foi efetivo na remoção de compostos amorfos, proporcionando a purificação da celulose. O tratamento alcalino, as duas etapas de branqueamento e hidrólise ácida com diferentes concentrações (0,1, 1 e 10% de H_2SO_4) produziram fibras de celulose em escala nanométrica com propriedades diferentes. Os resultados do MEV revelaram que as fibras sofreram alterações morfológicas ao longo das etapas do tratamento químico confirmando a presença de fibras de celulose em todas as amostras tratadas. A análise de potencial zeta revelou a existência de cargas negativas nas suspensões e evidenciou que quanto menor a concentração de ácido sulfúrico, maior estabilidade potencial da suspensão coloidal, maximizando as forças repulsivas entre as nanopartículas e prevenindo sua agregação. As contribuições das nanopartículas sobre as propriedades de filmes biodegradáveis ainda precisam ser avaliadas, portanto é necessário um estudo para investigar o potencial reforço que essas nanofibras promovem nos compósitos.

Portanto, NCs foram extraídas com sucesso da casca de fruta-de-lobo através de tratamento químico. Desta maneira, a casca de fruta-de-lobo pode ser usada para produzir nanofibras de celulose, podendo por sua vez ser aplicada como agentes de reforço em compósitos. A produção de filmes biodegradáveis mostra-se uma alternativa interessante para a recuperação deste subproduto (casca de fruta-de-lobo), oferecendo vantagens em termos de sustentabilidade, além de possibilitar o desenvolvimento de polímeros com menor custo e melhores propriedades mecânicas favorecendo o setor de bioeconomia.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Apoio ao Conselho Nacional



de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC). E ao apoio da UFVJM e do LMMA patrocinado pela FAPEMIG (CEX-112-10), SECTES / MG e RQ-MG (FAPEMIG: CEX-RED 00010-14).

Referências

ANDRADE-MAHECHA, M. M. *et al.* Achira as a source of biodegradable materials: Isolation and characterization of nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 406-415, 2015.

CHOWDHURY, M. N. K. *et al.* Modification of oil palm empty fruit bunch fibers by nanoparticle impregnation and alkali treatment. **Cellulose**, v. 20, p. 1477-1490, 2013.

DU, H. *et al.* Cellulose nanocrystals and cellulose nano fibrils based hydrogels for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 209, p. 130-144, 2019.

GARNETT, M. C.; KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. **Occupational Medicine**, v. 56, p. 307-311, 2006.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Bioresource Technology Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 310-318, 2018.

HERNANDEZ, C. C.; FERREIRA, F. F.; ROSA, D. S. X-ray powder diffraction and other analyses of cellulose nanocrystals obtained from corn straw by chemical treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, p. 39-44, 2018.

ILYAS, R. A. *et al.* Effect of delignification on the physical, thermal, chemical, and structural properties of sugar palm fibre. **Bioresources**, v. 12, p. 8734-8754, 2017.

ILYAS, R. A.; SAPUAN, S. M.; ISHAK, M. R. Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from sugar palm fibres (*Arenga Pinnata*). **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 1038-1051, 2018.

KHAWAS, P.; DEKA, S. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from culinary banana peel using high-intensity ultrasonication combined with chemical treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 608-616, 2016.

LEITE, A. L. M. P.; ZANON, C. D.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from cassava root bagasse and peelings. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 62-70, 2017.

PAKHARENKO, V. *et al.* Cellulose nanofiber thin-films as transparent and durable flexible substrates for electronic devices. **Materials & Design**, v. 197, 2021.

PAKUTSAH, K.; AHT-ONG, D. Facile isolation of cellulose nanofibers from water hyacinth using water-based mechanical defibrillation: Insights into morphological, physical, and rheological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 64-76, 2020.

PELISSARI, F. M.; SOBRAL, P. J. D. A.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels. **Cellulose**, v. 21, p. 417–32, 2014.

PELISSARI, F. M. *et al.* Nanocomposites based on banana starch reinforced with cellulose nanofibers isolated from banana peels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 505, p. 154-167, 2017.

PELLERA, F. M.; GIDARAKOS, E. Chemical pretreatment of lignocellulosic agroindustrial waste for methane production. **Waste Management**, v. 71, p. 689-703, 2018.

PRATES, M. F. O. *et al.* Cinética de secagem de folhas de Solanum lycocarpum A. St.-Hil. (fruta-de-lobo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, 2012.

RIDZUAN, M. J. M. *et al.* Characterisation of natural cellulosic fibre from Pennisetum purpureum stem as potential reinforcement of polymer composites. **Materials & Design**, v. 89, p. 839-847, 2016.

SAURABH, C. K. *et al.* Isolation and Characterization of Cellulose Nanofibers from *Gigantochloa scortechinii* as a Reinforcement Material. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

SANCHÉZ-DOMINGUES, M.; RODRÍGUEZ-ABREU, C. Meeting point for scientists and technologists. **Nanocolloids**, p. 514, 2016.

SHARMA, A. *et al.* Commercial Application of Cellulose Nano-composites - A review. **Biotechnology Reports** v. 21, 316-324, 2019.

SOOFI, M. *et al.* Preparation of nanobiocomposite film based on lemon waste containing cellulose nanofiber and savory essential oil: A new biodegradable active packaging system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 352-361, 2021.

STATSOFT. **STATISTICA (Data Analysis Software System)**, version 7, 2004. Disponível em: www.statsoft.com. Acesso em: 10 jan. 2021.

SUTRISNO, E. *et al.* Investigation of cellulose nanofibers (CNFs) from *Macaranga hypoleuca* pulp in chemical treatment phase. **Materials Today: Proceedings**, v. 23, p. 674-680, 2020.

THEIVASANTHI, T. *et al.* Synthesis and characterization of cotton fiber-based nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 832-836, 2018.

TIBOLLA, H. *et al.* Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and mechanical treatments: Characterization and cytotoxicity assessment. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 192-201, 2018.

TRAVALINI, A. P. *et al.* Cassava starch films reinforced with lignocellulose nanofibers from cassava bagasse. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1151-1161, 2019.

VADIVEL, V. *et al.* Effects of an acid/alkaline treatment on the release of antioxidants and cellulose from different agro-food wastes. **Waste Management**, v. 64, p. 305-314, 2017.

VERSINO, F.; LÓPEZ, O. V.; GARCÍA, M. A. Sustainable use of cassava (*Manihot esculenta*) roots as raw material for biocomposites development. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 79-89, 2015.



II Capítulo

Produção e purificação
parcial de *L*-asparaginase
a partir do *Aspergillus*
caespitosus CCDCA 11593

Capítulo 11

Produção e purificação parcial de *L*-asparaginase a partir do *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593

Natana Gontijo Rabelo*¹; Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira²; Maysa Lima Parente Fernandes³;
Angélica Cristina de Souza⁴; Lizzy Ayra Alcantara Veríssimo⁵; Disney Ribeiro Dias⁵

Resumo

O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de produção da *L*-asparaginase, a partir de *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593 utilizando o soro de leite em pó como substrato no processo de fermentação submersa (FSbm) e purificar parcialmente a enzima. Um delineamento de face centrada foi aplicado de modo a avaliar o efeito da concentração de substrato, concentração de inóculo, concentração de asparagina, tempo de fermentação, pH e temperatura sobre a atividade enzimática da *L*-asparaginase no meio de fermentação. Verificou-se que a condição experimental predita de maior atividade volumétrica foi obtida nas condições de concentração de inóculo superior a $9,8 \times 10^6$ esporos/mL, a concentração de substrato entre 4 a 6% m/v, a concentração de asparagina entre 10 a 20% m/v, um pH acima de 6,2, temperatura de 25,0 °C a 32,0 °C e tempo de fermentação 70 a 75 horas de fermentação, revelando ser as melhores condições para a produção de *L*-asparaginase, obtendo 0,6 U/mL de enzima. A *L*-asparaginase obtida a partir da FSbm foi submetida a uma purificação parcial utilizando uma coluna de criogel catiônico. O eluído obtido após a purificação apresentou uma atividade específica e volumétrica de 4,400 U/mg e 0,776 U/mL, respectivamente. Os resultados obtidos na fermentação utilizando o soro de leite em pó como substrato suporte para a produção da *L*-asparaginase e o uso de um criogel de troca catiônica para a purificação parcial desta enzima se mostraram técnicas promissoras.

Palavras-chave: *Aspergillus caespitosus*. Fermentação submersa. *L*-asparaginase. Purificação por troca iônica.

¹Mestre, Departamento de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras.

²Doutoranda, Departamento de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

³Pós-Doutoranda, Czech Academy of Sciences, CAS, República Tcheca.

⁴Pós-Doutoranda, Departamento de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras.

⁵Professor(a), Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

*e-mail para correspondência: natanagr@gmail.com

Introdução

A produção de enzimas a partir de microrganismos é conduzida por processos fermentativos, nos quais podem ser utilizados substratos alternativos como fonte de carbono para a sua produção. Estes substratos muitas vezes podem ser resíduos agroindustriais que necessitam de disposição final adequada já que podem gerar impactos ambientais negativos, além da perda econômica associada ao seu não aproveitamento. A redução de desperdício tem se tornado uma preocupação cada vez maior, de modo que há uma maior aplicação dos conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e a bioconversão de resíduos para melhorar a sustentabilidade da cadeia produtiva agroindustrial (FERNANDES *et al.*, 2021; LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). A utilização destes substratos para a produção de enzimas torna o processo fermentativo vantajoso por apresentar uma produção mais limpa, de baixo custo e também um aumento da produtividade em relação à utilização do meio sintético (VALA *et al.*, 2018).

O soro de leite é um coproduto gerado nos laticínios e é considerado um dos efluentes mais poluentes deste setor industrial. Com o aumento da produção de produtos lácteos, tem-se uma preocupação com a liberação destes resíduos ao meio ambiente. Desta forma, os produtores e as indústrias buscaram alternativas para sua reutilização (LAPPA *et al.*, 2019). Com a descoberta do seu alto valor nutricional (proteínas do soro, lactose, minerais, aminoácidos essenciais e vitaminas), o soro de leite é utilizado na produção de diversos produtos de alto valor de mercado) (RISNER *et al.*, 2018), como nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química (LAPPA *et al.*, 2019), produção de biodiesel, ácidos orgânicos (CAROTA *et al.*, 2017), entre outros.

Apesar das aplicações em diferentes setores industriais, o volume de soro produzido ainda é maior do que consumido, gerando grande desperdício nutricional e financeiro. Sendo assim, o soro de leite foi utilizado neste trabalho como substrato suporte para a produção da enzima *L*-asparaginase (EC 3.5. 1.1.) por fermentação submersa (FSbm). Esta enzima é uma amida hidrolase que catalisa a hidrólise do grupo amina da cadeia lateral do aminoácido *L*-asparagina em ácido *L*-aspártico e amônia. Desta forma, esta enzima é utilizada para diminuir a quantidade de acrilamida em alimentos ricos em amido que são fritos e/ou assados acima de 120 °C. Além disso, é utilizada no tratamento de diversas doenças do sistema linfático e linfomas (YIM; KIM, 2019). Portanto, este trabalho objetivou otimizar a produção de *L*-asparaginase de *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593 por processo de fermentação submersa utilizando o soro de leite em pó como substrato suporte e posteriormente, purificar parcialmente essa enzima.

Material e Métodos

Microorganismo e condição de cultivo

O fungo filamentosos *Aspergillus caespitosos* CCDCA 11593 foi escolhido para este trabalho com bases nos resultados apresentados por Fernandes *et al.* (2021). Este fungo foi obtido na Coleção de Cultura de Microrganismos Agrícolas da Universidade Federal de Lavras (Lavras, Minas Gerais, Brasil).

A cepa foi cultivada em tubo inclinado contendo meio Agar Batata Dextrose (BDA) a 25 °C durante 10 dias. A suspensão de esporos foi padronizada utilizando a câmara de Neubauer (FERNANDES *et al.*, 2021).

Otimização da produção da L-asparaginase por Fermentação Submersa (FSbm)

O soro de leite em pó foi utilizado como substrato alternativo para a produção da *L*-asparaginase a partir da fermentação submersa. A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Czapeck Dox modificado, composto por: 1,52 g de KH_2PO_4 , 0,52 g de MgSO_4 , 0,52 g de KCl , 0,001 g de CuNO_3 , 0,001 g de ZnSO_4 , 0,001 g de FeSO_4 (GULATI *et al.*, 1997). O extrato enzimático bruto foi obtido conforme a metodologia de Imada *et al.* (1973). Os filtrados livres de células foram submetidos a dosagens enzimáticas e de proteínas totais.

Empregou-se um Delineamento de Face Centrada 2^6 com quatro repetições e 4 pontos centrais (Tabela 1) para otimizar a produção de *L*-asparaginase por FSbm.

A atividade enzimática de *L*-asparaginase foi realizada conforme descrito por Imada *et al.* (1973), com adaptações. As misturas reacionais compostas por 0,5 mL de *L*-asparagina (0,04 mol/L), 0,5 mL de tampão Tris-HCl pH 8,0 (50 mmol/L) e 0,5 mL de extrato fermentado foram incubadas a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético (1,5 mol/L). Uma alíquota de 125 μL da mistura reacional foi diluída em 2 mL de água destilada e 125 μL de reagente de Nessler. A absorbância foi medida a 450 nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão com sulfato de amônio foi usada para quantificar a amônia liberada. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto nas condições do ensaio.

A quantificação das proteínas totais nas amostras foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) a 595 nm, utilizando a albumina de soro bovino como proteína padrão.

Tabela 1 - Fatores e níveis do Delineamento de Face Centrada 2⁶ com quatro repetições e 4 pontos centrais empregando para a otimização da produção de *L*-asparaginase por FSbm

Variáveis independentes	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Concentração de <i>L</i> -asparagina (% m/v)	X_1	10	20	30
Concentração de soro de leite em pó (% m/v)	X_2	2	4	6
Concentração de Inóculo (esporos/mL)	X_3	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Temperatura (°C)	X_4	25,0	32,5	40,0
pH	X_5	5	6	7
Tempo (h)	X_6	72	96	120

Fonte: Dos autores, 2021.

Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteína total

Purificação parcial de L-asparaginase

Foi realizado uma purificação parcial da enzima *L*-asparaginase usando criogel de poliacrilamida sintetizado conforme descrito por Veríssimo *et al.* (2017). Visando aumentar a capacidade adsortiva (q , mg/g) do criogel foi feita uma funcionalização química de sua superfície pelo método glutaraldeído, seguindo a metodologia proposta por Oliveira *et al.* (2019), empregando o ligante ácido 2-aminoetanossulfônico.

Após a síntese e funcionalização do criogel, este foi utilizado na purificação parcial da *L*-asparaginase presente no extrato obtido por FSbm.

A etapa de purificação foi conduzida à temperatura ambiente (± 25 °C), usando uma vazão constante de 1,0 mL/min. Um Monitor UVis-920 (GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Suécia) com um filtro de detecção de UV em 280 nm e uma bomba peristáltica compacta (Traceable® Products, Webster, Texas, EUA) foram utilizados. Primeiramente, a coluna de criogel funcionalizada com ácido 2-aminoetanossulfônico foi equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão fosfato de sódio (0,050 mol/L, pH 3,0). Posteriormente, a solução de meio fermentado diluída em fosfato de sódio (0,050 mol/L, pH 3,0) em proporção 1:1 (% v/v) foi bombeada através da coluna até a formação de uma curva de ruptura. Em seguida, a coluna foi lavada com 3 VC com o tampão fosfato de sódio

(0,050 mol/L, pH 3,0). Por fim, as proteínas foram eluídas da coluna em modo isocrático, a uma taxa de fluxo de 1 mL/min, bombeando 5 VC de solução de fosfato de sódio (0,050 mol/L, pH 3,0) adicionado de cloreto de sódio (1,5 mol/L). A atividade enzimática e o conteúdo da solução inicial de meio fermentado e do eluído foram determinadas.

A eficiência da purificação foi avaliada por meio do fator de purificação (F_p), calculado de acordo com a Equação 1 (MÓL *et al.*, 2019).

$$F_p = \frac{AE_e}{AE_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde AE_e é a atividade específica (U/mg_{proteína}) da amostra eluída da coluna de criogel e AE_i é a atividade específica (U/mg_{proteína}) do extrato bruto injetado na coluna.

Análise estatística

Os resultados obtidos a partir do DFC para a FSbm foram submetidos à análise de regressão ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SAS® University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A confiabilidade do modelo matemático obtido foi avaliada verificando-se a falta de ajustamento do modelo ($p > 0,05$), o coeficiente de determinação R^2 e o nível de significância ($p < 0,05$) dos coeficientes da regressão. As superfícies de resposta foram geradas no software SigmaPlot versão 12 (Systat Software, Inc., San Jose, EUA).

Resultados e Discussão

Otimização dos parâmetros utilizados no processo de FSbm para a produção de L-asparaginase

A produção da enzima *L*-asparaginase pelo processo de fermentação submersa foi avaliada pelo delineamento de face centrada 2^6 com quatro repetições e quatro pontos centrais. Os valores de atividade volumétrica obtidos a partir desse delineamento estão apresentados no Anexo 1.

Os resultados experimentais (Anexo 1) foram submetidos à ANOVA (Anexo 2). Foi verificado que as variáveis de concentração de inóculo, concentração de substrato,

tempo de fermentação pH, concentração de asparagina e temperatura influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a atividade volumétrica de *L*-asparaginase.

O modelo matemático obtido pela análise de regressão que descreve a relação entre as variáveis independentes e a variável dependente (atividade volumétrica), considerando os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) é apresentado na Equação 2. O modelo obtido apresentou um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,64$.

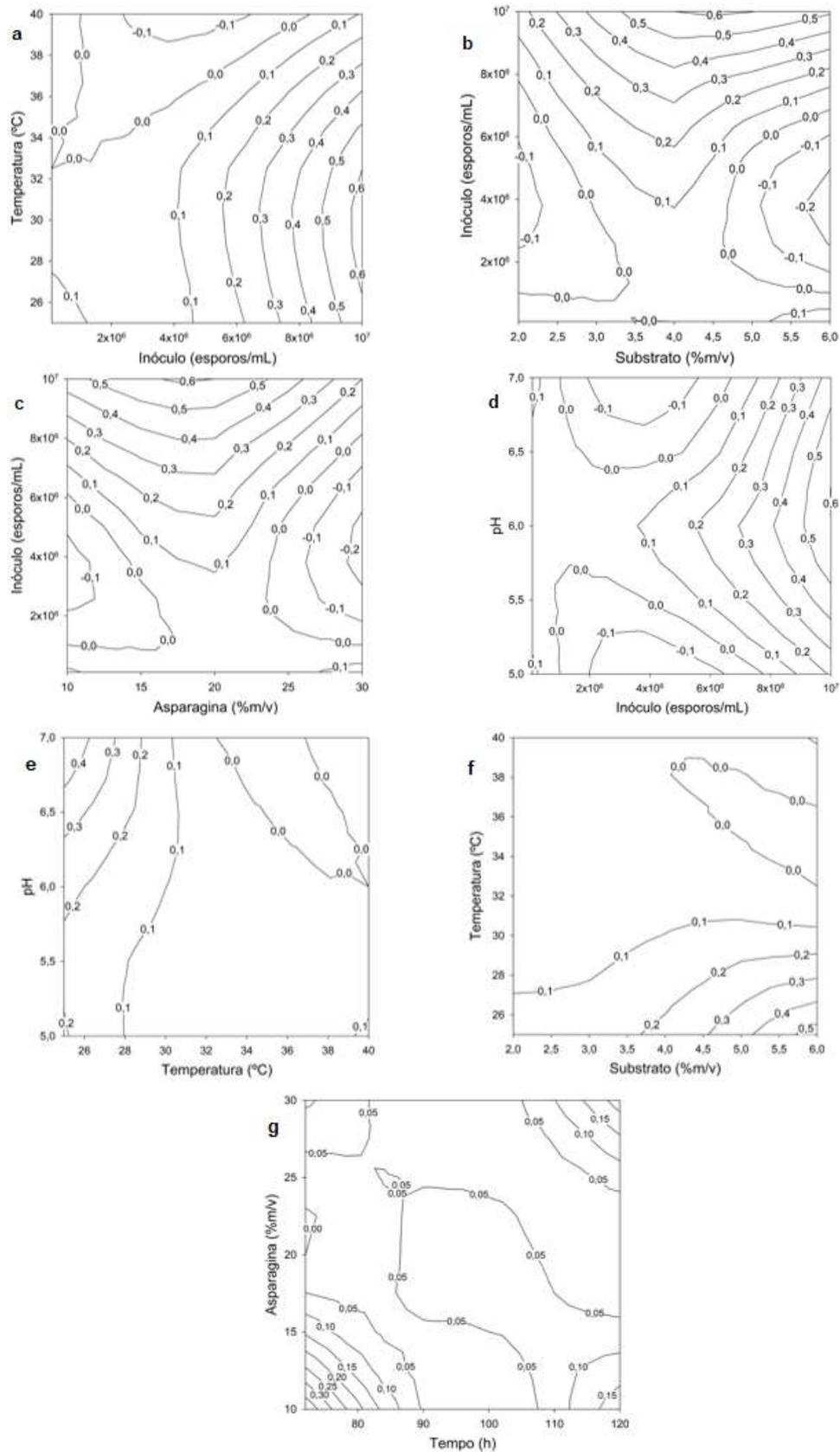
$$\begin{aligned} Y = & (-2,041002563) - (0,030530055 * x_1) + (0,0218688758 * x_2) + (0,0000000034 * x_3) \\ & + (0,083746041 * x_4) + (0,355620550 * x_5) - (0,007607069 * x_6) \\ & - (0,000000002 * x_3 * x_1) - (0,000000002 * x_3 * x_4) \\ & + (0,000000012 * x_3 * x_5) + (0,000000006 * x_3 * x_2) \\ & - (0,006119979 * x_4 * x_2) + (0,000334705 * x_6 * x_1) \\ & - (0,010805979 * x_4 * x_5) \end{aligned} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que Y é a atividade volumétrica (U/mL), X_1 é a concentração de asparagina (% m/v), X_2 é a concentração de soro de leite em pó (% m/v), X_3 é a concentração de inóculo (esporos/mL), X_4 é a temperatura (°C), X_5 é o pH e X_6 é o tempo de fermentação (h).

Os gráficos de contorno apresentados na Figura 1, permitem visualizar a atividade volumétrica (U/mL) de *L*-asparaginase, em função das variáveis independentes significativas ($p < 0,05$) estudadas.

De acordo com as Figuras 1a, 1b, 1c, e 1d, a concentração ótima de inóculo para a produção da *L*-asparaginase por FSbm foi acima de $9,8 \times 10^6$ esporos/mL. Quando a concentração de inóculo esteve abaixo de $4,0 \times 10^6$ esporos/mL a produção de enzimas foi muito baixa. A Figura 1a indica que, quando a temperatura esteve entre 26,5 °C a 32,0 °C e a concentração de inóculo esteve acima de $9,8 \times 10^6$ esporos/mL, a produção de *L*-asparaginase foi maior, com atividade enzimática de 0,6 U/mL. Contudo, quando a temperatura se manteve entre os níveis intermediários de 25,0 °C a 26,5 °C, verificou-se uma redução da atividade volumétrica da enzima para 0,4 U/mL e 0,5 U/mL, respectivamente (Figuras 1e e 1f). Segundo Madigan e Brock (2009), cada microrganismos possui uma condição favorável de crescimento e este parâmetro possui bastante influência sobre o crescimento dos mesmos. A temperatura ótima de crescimento, é onde o fungo cresce de forma mais acelerada e conseqüentemente, quando o metabolismo e as reações enzimáticas acontecem, aumentando o crescimento do fungo e a produção de metabólitos de interesse. Verifica-se então, que a melhor temperatura para cultivo deste microrganismo é entre 26,5 °C a 32,0 °C.

Figura 1 - Resultados experimentais da atividade volumétrica (U/mL) da *L*-asparaginase em função das variáveis independentes avaliadas na produção da enzima por FSbm



Fonte: Dos autores, 2021.

Os resultados das Figuras 1b e 1f, demonstram que a baixa quantidade de substrato e sua composição foram suficientes para que ocorresse a conversão de substrato em metabólitos. Estes resultados sugerem que este substrato utilizado para produção de *L*-asparaginase possui componentes que favoreceram a produção e, por isso, a quantidade necessária foi baixa para produzir a enzima de interesse utilizando o *Aspergillus caespitosus*. Assim, a utilização de uma pequena quantidade de substrato (entre 4 a 6% m/v) foi o suficiente para o fungo produzir a enzima. Portanto, o substrato soro de leite em pó é um candidato promissor para a produção de *L*-asparaginase a partir do *Aspergillus caespitosus*, por FSbm. A Figura 1c apresenta a interação entre concentração de inóculo e concentração de asparagina. Observa-se que, quando a concentração de asparagina no meio se manteve intermediária (entre 17 a 20% m/v) e a concentração de inóculo foi superior a $9,8 \times 10^6$ esporos/mL, a produção da enzima foi alta, produzindo 0,6 U/mL (Figura 1c). Estudos relatam que a privação de asparagina para produção de *L*-asparaginase em meio fermentado é benéfica por causar a desrepressão de amônio e conseqüentemente, o aumento da atividade enzimática. Por isso, quando a concentração de asparagina foi mais baixa, houve melhor produção de *L*-asparaginase (COSTA-SILVA *et al.* (2018). Porém, nas demais concentrações de asparagina, a produção da enzima diminuiu consideravelmente, com a produção de 0,3 U/mL de enzima (Figura 1g). As Figuras 1d e 1e evidenciam que a melhor condição para produção se deu quando o valor do pH esteve acima de 6,2. Uzma, Murthy e Srinivas (2016) relatam que o parâmetro pH é importante para o cultivo de microrganismo e, também, para a produção de metabólitos. Este parâmetro também pode influenciar na disponibilidade dos nutrientes, que são vitais para a síntese de biomoléculas. Além disso, pode também afetar a atividade das enzimas por meio da desnaturação e inativação das mesmas. Estas são cruciais para o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, para seu crescimento e produção de metabólitos. Desta forma, este resultado revela que este fungo filamentoso cresce melhor em pH básico. A Figura 1g, representa a interação entre concentração de asparagina e tempo de fermentação. Quando a concentração de asparagina esteve a mais baixa entre 10 a 12% m/v, o tempo necessário para produzir 0,3 U/mL de enzima foi entre 70 a 75 horas. A concentração de inóculo superior a $9,8 \times 10^6$ esporos/mL, a concentração de substrato entre 4 a 6% m/v, a concentração de asparagina entre 10 a 20% m/v, um pH acima de 6,2, temperatura de 25,0 °C a 32,0 °C e tempo de fermentação de 70 a 75 horas de fermentação, revelaram ser as melhores condições para a produção de *L*-asparaginase.

O maior resultado de atividade enzimática obtido nesse trabalho foi inferior ao relatado por Dias, Aguiar e Sato (2019), que ao utilizarem o fungo *Aspergillus oryzae* LBA 01 e o meio Czapeck Dox modificado para produção da *L*-asparaginase em uma FSbm encontraram uma atividade

enzimática de 20 U/mL. Para obtenção deste resultado foi empregado um pH 6,5, temperatura 30 °C e um tempo de fermentação de 120 h. Apesar das semelhanças entre as condições de temperatura e pH ótimos para a produção da *L*-asparaginase, as diferenças entre os resultados de atividade enzimática e o tempo ótimo de fermentação podem ser explicadas pela diferença entre as espécies de microrganismos utilizadas.

Gurunathan e Sahadevan (2012), quando utilizaram o fungo *Aspergillus terreus* e o meio Czapeck Dox modificado para a produção de *L*-asparaginase por FSbm a uma temperatura de 35 °C, pH 6,3 e tempo de fermentação de 58,5 h também observaram uma atividade enzimática superior (43,29 U/mL). A diferença observada entre os valores de atividade enzimática provavelmente está associada ao substrato, a temperatura e a espécie de fungo empregada.

Purificação parcial de L-asparaginase

Os resultados obtidos na purificação parcial de *L*-asparaginase de *A. caespitosus* produzida em FSbm são representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Conteúdo de proteína (mg/mL), atividade específica (U/mg) e volumétrica (U/mL) do extrato bruto contendo *L*-asparaginase obtida por FSbm e das amostras eluídas da coluna de troca catiônica

Amostras	Proteína total (mg/mL)	Atividade enzimática total (U)	Atividade específica (U/mg)	Atividade volumétrica (U/mL)	Fator de purificação
Extrato inicial	0,088	0,155	2,779	0,218	-
Eluído	0,008	0,043	4,400	0,776	1,583

Fonte: Dos Autores, 2021

Pela Tabela 2, observa-se que a concentração de proteína total diminuiu de 0,088 para 0,008 mg/mL com a etapa de cromatografia de troca iônica. A atividade específica aumentou de 2,779 para 4,400 U/mg, nota-se que empregando apenas uma etapa de purificação houve um aumento considerável da atividade específica quando comparado ao meio fermentado inicial. O mesmo foi observado para a atividade volumétrica.

A atividade específica da *L*-asparaginase no eluído (4,400 U/mg) foi superior ao obtido por Issac e Abu-Tahon (2016) que após realizar uma série de etapas visando purificar *L*-asparaginase proveniente de fermentação sólida do *Fusarium solani* alcançou um valor de 4,314 U/mg. Já Patro *et al.* (2012), ao empregar precipitação seguida por filtração em gel e cromatografia de troca iônica para

purificar *L*-asparaginase, proveniente de fermentação submersa do *Aspergillus flavus* obteve uma atividade específica de 13,970 U/mg.

O fator de purificação encontrado neste trabalho (1,583) também foi superior ao obtido por Mól *et al.* (2019) ($F_p = 1,33$), ao aplicar um criogel aniônico na purificação de β -glucosidase produzida pela fermentação sólida do fungo *Thermoascus aurantiacus*.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o soro de leite em pó é um substrato alternativo que pode ser utilizado no processo de FSbm para a produção extracelular de *L*-asparaginase por *Aspergillus caespitosus*. Verificou-se que na condição experimental de concentração de inóculo superior a $9,8 \times 10^6$ esporos/mL, concentração de substrato entre 4 a 6% m/v, conteúdo de asparagina entre 10 a 20% m/v, temperatura de 25,0 a 32,0 °C, pH acima de 6,2, e tempo de fermentação superior a 70 a 75 horas resultou em maior produção da *L*-asparaginase. A enzima parcialmente purificada apresentou um aumento da atividade específica de 1,58 vezes e um aumento da atividade volumétrica de 3,55 vezes, indicando que este adsorvente empregado foi capaz de realizar uma purificação parcial desta enzima em apenas uma única etapa de purificação. Desta forma, este estudo abre novas perspectivas para a utilização do soro de leite em pó como um substrato alternativo para a produção de outros metabólitos e o emprego de criogel catiônico na purificação de metabólitos provenientes de fermentação fúngica.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro e também aos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento deste trabalho e a Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Referências

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 12, p. 248-254, 1976.



- CAROTA, E. *et al.* A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. **Science of The Total Environment**, v. 584-585, p. 554-560, 2017.
- COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged from *Aspergillus terreus* CCT7693. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 95-104, nov. 2018.
- DIAS, F. F. G.; AGUIAR, J. G. dos S.; SATO, H. H. L-asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotechnology**, v.9, n. 289, p. 1-10, jun. 2019.
- FERNANDES, M. L. P. *et al.* Low-cost agro-industrial sources as a substrate for the production of L-asparaginase using filamentous fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 1-35, 2021.
- GULATI, R.; SAXENA, R.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening l-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in applied microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23-26, 1997.
- GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of Culture Conditions and Bench-Scale Production of L-Asparaginase by Submerged Fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923-929, apr. 2012.
- IMADA, A. S.; IGARASI, K. N.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-99, 1973.
- ISSAC, G. S.; ABU-TAHON, M. A. Production of Extracellular Anti-leukemic Enzyme Lasparaginase from *Fusarium solani* AUMC 8615 Grown under Solid-State Fermentation conditions: Purification and Characterization of The Free and Immobilized Enzyme. **Egyptian Journal of Botany**, v. 56, n. 3, p. 799-816, 2016.
- LAPPA, I. K. *et al.* Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. **Foods**, v. 8, n. 347, p. 1-37, 2019.
- LAUFENBERG, G.; KUN, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, apr. 2003.
- MADIGAN, M. T.; BROCK, T. C. **Brock Biology of Microorganisms**. 12ed. San Francisc, CA, Ed. Pearson/Benjamin Cummings, 2009.
- MÓL, P. C. G. *et al.* Production and capture of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 75-83, 2019.
- OLIVEIRA, A. C. F de. *et al.* Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 54, n. 18, p. 1–13, 2019.
- PATRO, K. R.; GUPTA, N. Extraction, purification and characterization of L-Asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. **Biology Research**, v. 3, p. 30-34, 2012.

RISNER, D. *et al.* Fermentation and distillation of cheese whey: Carbon dioxide-equivalent emissions and water use in the production of whey spirits and white whiskey. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 2963-2973, 2018.

UZMA, F.; MURTHY, K. N.; SRINIVAS, C. Optimization of physiological conditions for L-asparaginase production by endophytic fungi (*Fusarium solani*) isolated from *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. F & Thomson. **Eur. J. Exp. Biol.**, v. 6, p. 37–45, 2016.

VALA, A. K. *et al.* Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 41-46, mar. 2018.

VERÍSSIMO, L. A. A. *et al.* Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, 52, p. 1973-1982, 2017.

YIM, S.; KIM, M. Purification and characterization of thermostable L-asparaginase from *Bacillus amyloliquefaciens* MKSE in Korean soybean paste. **LWT**, v. 109, p. 415-421, jul. 2019.

ANEXOS

Anexo 1 - Resultados experimentais obtidos para atividade volumétrica extracelular de *L*-asparaginase de *A. caespitosus* por FSbm, empregando um delineamento fatorial completo 2^6

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Atividade volumétrica (U/mL)
1	10	2	10 ⁵	25,0	5	72	0,000
2	10	2	10 ⁵	25,0	5	120	0,000
3	10	2	10 ⁵	25,0	7	72	0,000
4	10	2	10 ⁵	25,0	7	120	0,000
5	10	2	10 ⁵	40,0	5	72	0,246
6	10	2	10 ⁵	40,0	5	120	0,000
7	10	2	10 ⁵	40,0	7	72	0,203
8	10	2	10 ⁵	40,0	7	120	0,000
9	10	2	10 ⁷	25,0	5	72	0,000
10	10	2	10 ⁷	25,0	5	120	0,000
11	10	2	10 ⁷	25,0	7	72	1,256
12	10	2	10 ⁷	25,0	7	120	0,000

Continua

Cont. Anexo 1

13	10	2	10 ⁷	40,0	5	72	0,265
14	10	2	10 ⁷	40,0	5	120	0,000
15	10	2	10 ⁷	40,0	7	72	0,209
16	10	2	10 ⁷	40,0	7	120	0,000
17	10	6	10 ⁵	25,0	5	72	0,227
18	10	6	10 ⁵	25,0	5	120	0,000
19	10	6	10 ⁵	25,0	7	72	0,282
20	10	6	10 ⁵	25,0	7	120	0,402
21	10	6	10 ⁵	40,0	5	72	0,202
22	10	6	10 ⁵	40,0	5	120	0,000
23	10	6	10 ⁵	40,0	7	72	0,307
24	10	6	10 ⁵	40,0	7	120	0,000
25	10	6	10 ⁷	25,0	5	72	1,211
26	10	6	10 ⁷	25,0	5	120	0,641
27	10	6	10 ⁷	25,0	7	72	1,431
28	10	6	10 ⁷	25,0	7	120	1,492
29	10	6	10 ⁷	40,0	5	72	0,202
30	10	6	10 ⁷	40,0	5	120	0,411
31	10	6	10 ⁷	40,0	7	72	0,196
32	10	6	10 ⁷	40,0	7	120	0,000
33	30	2	10 ⁵	25,0	5	72	0,000
34	30	2	10 ⁵	25,0	5	120	0,457
35	30	2	10 ⁵	25,0	7	72	0,000
36	30	2	10 ⁵	25,0	7	120	0,000
37	30	2	10 ⁵	40,0	5	72	0,298
38	30	2	10 ⁵	40,0	5	120	0,000
39	30	2	10 ⁵	40,0	7	72	0,200
40	30	2	10 ⁵	40,0	7	120	0,000
41	30	2	10 ⁷	25,0	5	72	0,000
42	30	2	10 ⁷	25,0	5	120	0,000

Continua



Cont. Anexo 1

43	30	2	10 ⁷	25,0	7	72	0,206
44	30	2	10 ⁷	25,0	7	120	0,638
45	30	2	10 ⁷	40,0	5	72	0,000
46	30	2	10 ⁷	40,0	5	120	0,000
47	30	2	10 ⁷	40,0	7	72	0,000
48	30	2	10 ⁷	40,0	7	120	0,000
49	30	6	10 ⁵	25,0	5	72	0,213
50	30	6	10 ⁵	25,0	5	120	0,355
51	30	6	10 ⁵	25,0	7	72	0,000
52	30	6	10 ⁵	25,0	7	120	0,812
53	30	6	10 ⁵	40,0	5	72	0,000
54	30	6	10 ⁵	40,0	5	120	0,000
55	30	6	10 ⁵	40,0	7	72	0,000
56	30	6	10 ⁵	40,0	7	120	0,000
57	30	6	10 ⁷	25,0	5	72	0,224
58	30	6	10 ⁶	25,0	5	120	0,000
59	30	6	10 ⁷	25,0	7	72	0,369
60	30	6	10 ⁷	25,0	7	120	1,106
61	30	6	10 ⁷	40,0	5	72	0,227
62	30	6	10 ⁷	40,0	5	120	0,000
63	30	6	10 ⁷	40,0	7	72	0,000
64	30	6	10 ⁷	40,0	7	120	0,215
65	10	4	10 ⁶	32,5	6	96	0,000
66	30	4	10 ⁶	32,5	6	96	0,000
67	20	2	10 ⁶	32,5	6	96	0,000
68	20	6	10 ⁶	32,5	6	96	0,000
69	20	4	10 ⁵	32,5	6	96	0,000
70	20	4	10 ⁷	32,5	6	96	0,599
71	20	4	10 ⁶	25,0	6	96	0,225
72	20	4	10 ⁶	40,0	6	96	0,000
73	20	4	10 ⁶	32,5	5	96	0,000

Continua



Cont. Anexo 1

74	20	4	10 ⁶	32,5	7	96	0,000
75	20	4	10 ⁶	32,5	6	72	0,000
76	20	4	10 ⁶	32,5	6	120	0,000
77	20	4	10 ⁶	32,5	6	96	0,000
78	20	4	10 ⁶	32,5	6	96	0,000
79	20	4	10 ⁶	32,5	6	96	0,000
80	20	4	10 ⁶	32,5	6	96	0,000

Fonte: Dos autores, 2021.

Anexo 2 - Resultado da análise de regressão para a produção de L-asparaginase, em termos de atividade volumétrica, em função das variáveis independentes estudadas

Fonte de variação	*GL ^a	*SQ ^b	*QM ^c	Pr>F
Concentração de Asparagina (X ₁)	1	0,22639928	0,22639928	0,0369
Concentração de Soro de leite em pó (X ₂)	1	0,65103086	0,65103086	0,0006
Concentração de inóculo (X ₃)	1	1,02828694	1,02828694	<,0001
Temperatura (X ₄)	1	1,06157504	1,06157504	<,0001
pH (X ₅)	1	0,26048502	0,26048502	0,0255
Tempo de fermentação (X ₆)	1	0,3168704	0,3168704	0,4284
X ₃ *X ₁	1	0,36660575	0,36660575	0,0086
X ₃ *X ₄	1	0,47671873	0,47671873	0,0029
X ₃ *X ₅	1	0,22473887	0,22473887	0,0376
X ₃ *X ₂	1	0,23519019	0,23519019	0,0335
X ₄ *X ₂	1	0,53933963	0,53933963	0,0016
X ₆ *X ₁	1	0,41297752	0,41297752	0,0054
X ₄ *X ₅	1	0,42036907	0,42036907	0,0050
Modelo	10	4,34251527	0,43425153	<.0001
Erro	69	3,31686785	0,04807055	
Total	73	7,65938312		

Fonte: Dos autores, 2021.

Nota: *GL^a: grau de liberdade; *SQ^b: soma de quadrados; *QM^c: quadrado médio.

12 Capítulo

Propriedades funcionais
e atributos de textura em
bebida fermentada de soja
contendo transglutaminase
microbiana

Capítulo 12

Propriedades funcionais e atributos de textura em bebida fermentada de soja contendo transglutaminase microbiana

Silvana Pedroso de Góes-Favoni*¹; Débora Calixto Bonfim²; Ítalo Marcos Tamazzo de Oliveira²; Cláudia Dorta¹; Elke Shigematsu¹; Amabriane Oliveira Shimite²

Resumo

Bebidas fermentadas de soja (BFS) apresentam-se como uma alternativa de consumo aos fermentados lácteos, sendo a textura um importante atributo de aceitação nesta categoria de produtos. A estruturação de um coágulo estável e sem sinérese é desejável e pode ser favorecida pela ação da enzima transglutaminase microbiana ao promover ligações cruzadas entre cadeias proteicas da matriz alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar bebida fermentada de soja adicionada da transglutaminase microbiana quanto as características físico-químicas, propriedades funcionais e atributos de textura após 28 dias de armazenamento refrigerado. Extrato hidrossolúvel de soja foi adicionado de cultura láctica mista e enzima na concentração de 0,4% (m/v) para obtenção da BFS. Determinações de pH, acidez, capacidade de retenção de água, sinérese e perfil instrumental de textura foram realizadas na BFS após 28 dias de armazenamento. A BFS contendo transglutaminase apresentou menor variação de acidez, menor sinérese e maior capacidade de retenção de água (CRA) que a amostra Controle (sem enzima) durante o armazenamento, evidenciando que as alterações promovidas pela enzima favoreceram a estruturação de um gel firme e estável. A transglutaminase microbiana influenciou positivamente os atributos de textura relativos a firmeza, coesividade, adesividade e gomosidade do produto final, mantendo suas características durante todo o período de armazenamento sob refrigeração.

Palavras-chave: Bebida de soja. Fermentação láctica. MTGase. Propriedades tecnológicas.

Introdução

Bebidas à base de extratos vegetais apresentam-se como uma alternativa aos derivados lácteos, com demanda crescente entre consumidores com restrições alimentares, como intolerância a lactose e alergias às proteínas do leite, bem como por estilos de vida, entre eles os consumidores

¹ Docente, Faculdade de Tecnologia em Alimentos, FATEC Marília.

² Tecnólogo em Alimentos, Faculdade de Tecnologia em Alimentos, FATEC Marília.

*E-mail para correspondência: silvanafavoni@hotmail.com

veganos (CIRILO; OLIVIERI; MARTINS, 2020). Destaca-se nesta categoria de produtos o extrato hidrossolúvel de soja (EHS), com teor proteico semelhante ao leite de vaca, baixo teor de lipídeos, livre de colesterol e lactose, além de diversos compostos bioativos que trazem benefícios à saúde de seus consumidores (BESSEGATO *et al.*, 2019).

Apesar dos benefícios, o EHS apresenta baixo consumo no Brasil em função do sabor indesejável relatado como de “feijão cru” (*beanny flavour*), bem como pela presença dos oligossacarídeos não digeríveis rafinose e estaquiose que podem causar desconfortos abdominais (JAYARATHNA *et al.*, 2020; BESSEGATO *et al.*, 2019). Por outro lado, bactérias probióticas e bactérias do ácido láctico como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* são capazes de fermentar esses oligossacarídeos e também reduzir a percepção do sabor indesejável durante o processo de fermentação, dando origem a bebidas fermentadas similares aos fermentados lácteos, favorecendo a aceitação do produto (JAYARATHNA *et al.*, 2020; BATTISTINI *et al.*, 2018).

Em bebidas fermentadas do tipo iogurte além do sabor e aroma característicos, a textura e a estabilidade constituem atributos determinantes na aceitação do produto final (SANTOS *et al.*, 2017; MARIN *et al.*, 2014). Neste tipo de produto, a acidificação desenvolvida durante a fermentação tende a ser maior no EHS que em leite, uma vez que a microbiota cresce mais rápido nesse substrato (BESSEGATO *et al.*, 2019). Acidificação está intimamente ligada a estruturação do gel na etapa fermentativa, sendo que a acidez excessiva pode resultar em géis fracos, instáveis e com elevado grau de sinérese, refletindo na qualidade sensorial e aceitação do produto (BESSEGATO *et al.*, 2019).

Neste sentido, a enzima transglutaminase microbiana (MTGase; proteína-glutamina γ -glutamil transferase, E.C 2.3.2.13) pode contribuir na estruturação e estabilidade do gel em BFS, uma vez que é capaz de catalisar reações de acil transferência, deamidação e ligações cruzadas entre os aminoácidos glutamina e lisina intra e inter cadeias proteicas (GASPAR; GÓES-FAVONI, 2015; DOMAGALA *et al.*, 2013).

As ligações cruzadas promovidas pela MTGase alteram a hidrofobicidade da superfície proteica e com isso sua solubilidade, resultando em mudanças nas propriedades tecnológicas das proteínas, como por exemplo a capacidade de retenção de água e a gelificação (DOMAGALA *et al.*, 2013). Como resultado destas ações produzidas pela MTGase forma-se géis termoestáveis e irreversíveis contribuindo para a obtenção de produtos com características de textura melhoradas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar características físico-químicas, capacidade de retenção de água e o perfil instrumental de textura em bebida fermentada de soja adicionada de MTGase durante 28 dias de armazenamento refrigerado.

Material e Métodos

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS) pasteurizado foi obtido de uma empresa extratora da cidade de Marília - SP, Brasil, a partir de grãos de soja comercial. A enzima transglutaminase (MTGase, E.C. 2.3.2.13) de origem microbiana (ACTIVA WM®) foi fornecida pela empresa Ajinomoto do Brasil – Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., sendo composta por 99% de maltodextrina e 1% de transglutaminase (com atividade de 100 U/g). A enzima foi utilizada na concentração de 0,4% (m/v) determinada conforme testes preliminares.

O fermento lácteo constituído por *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (1×10^6 UFC/g) *Bifidobacterium* BB - 12 (1×10^6 UFC/g) e *Streptococcus thermophilus* (quantidade não especificada pelo fabricante) foi adquirido comercialmente e utilizado na concentração de 0,4 g/L, conforme recomendação do fabricante.

Os reagentes utilizados nas determinações físicas e químicas foram todos de grau analítico. As análises físicas e químicas foram realizadas nos Laboratórios de Pesquisas Físicas, Químicas e Microbiológicas da Faculdade de Tecnologia de Marília – FATEC Marília.

A obtenção da bebida fermentada de soja foi realizada conforme metodologia descrita por Viana, Bueno e Góes-Favoni (2011), com modificações. O EHS foi inoculado asépticamente com o fermento lácteo e adicionado de MTGase na concentração de 0,4% (m/v), seguido de homogeneização manual. Uma amostra Controle contendo apenas o fermento lácteo foi elaborada nas mesmas condições da amostra contendo MTGase. Aliquotas de 50 mL de amostras de EHS contendo MTGase e EHS Controle foram distribuídas em frascos de polietileno previamente higienizados. Os frascos foram incubados em B.O.D. (NOVA instrumentcs mod. NI 1704). Os valores de pH (pHmetro digital GEHAKA mod. Pg 1800), acidez titulável e sólidos solúveis (Refratômetro ABBE NOVA instrumentcs mod. NI WYA – 2) foram determinados a cada 60 minutos de fermentação e nas duas últimas horas os parâmetros foram medidos de 30 em 30 minutos, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

A fermentação foi interrompida quando o pH atingiu 4,6, e as amostras da bebida fermentada de soja (BFS) Controle e com MTGase foram imediatamente armazenadas a 4 °C ($\pm 0,2$ °C) para análises posteriores de pH, acidez titulável em ácido láctico, sinérese, capacidade de retenção de água (CRA) e perfil instrumental de textura.

As análises físico-químicas de pH e acidez titulável em ácido láctico foram realizadas em triplicata nos dias 1 e 28 de armazenamento refrigerado, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada pelo cálculo da razão entre o peso da amostra sem o soro expelido espontaneamente e o peso da amostra contendo o soro (Equação 1), seguindo metodologia de Ramchandran e Shah (2010), com modificações. Os resultados foram expressos em porcentagem, como média de três repetições nos dias 1 e 28 de armazenamento refrigerado.

$$\% CRA = \frac{\text{Peso da amostra sem soro}}{\text{Peso da amostra inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

A sinérese espontânea foi determinada no recipiente da fermentação nos dias 1 e 28 de armazenamento refrigerado. As amostras foram retiradas da refrigeração, mantidas por dois minutos a temperatura ambiente e o soro expelido na superfície da BFS foi coletado com auxílio de uma seringa, conforme metodologia descrita por Costa *et al.* (2013). A sinérese foi expressa em gramas de soro por 100 gramas do produto e o seu índice foi calculado conforme a Equação 2 descrita abaixo. Estas análises foram realizadas em triplicada.

$$\% \text{Sinérese} = \frac{\text{Peso do soro}}{\text{Peso da amostra inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

As análises de textura foram realizadas utilizando texturômetro TA.XT plus (Stable Micro Systems, UK) e os parâmetros foram determinados por meio do software Exponent plus. As BFS foram mantidas em temperatura de aproximadamente 10 °C durante as análises. Foram avaliados, em quadruplicata os parâmetros de firmeza (N), coesividade (adimensional), adesividade (N x s), elasticidade (adimensional) e gomosidade (N) por meio de teste de compressão utilizando probe cilíndrico acrílico de diâmetro 0,5 mm, força de 0,98 N, velocidade de penetração 2 mm/s e distância de retorno 54 mm. O perfil de textura foi avaliado nos dias 1 e 28 de armazenamento refrigerado.

Resultados e Discussão

Influência do pH, acidez e MTGase na estruturação do gel da BFS

O EHS inoculado com cultura láctica contendo MTGase (BFS MTGase) e a amostra Controle (sem a enzima) apresentaram pH 6,2 no tempo zero da fermentação e foram mantidos em incubação a 37 °C até atingir pH 4,6, o que ocorreu ao final de sete horas.

Segundo Farnworth *et al.* (2007), *S. thermophilus* crescem melhor e mais rápido em extrato de soja que em leite e, conseqüentemente a produção de ácidos orgânicos atinge valores maiores em

menor tempo. A presença de ácidos orgânicos no meio propicia o crescimento dos probióticos *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp., e os *L. acidophilus* sendo proteolíticos, liberam aminoácidos essenciais ao crescimento de *Bifidobacterium*. As *Bifidobacterium* por sua vez podem crescer até quatro vezes mais rápido em soja que em leite, pois são capazes de metabolizar além da glicose, os oligossacarídeos rafinose e estaquiose presentes na soja.

A produção de ácidos orgânicos pela cultura microbiana leva a redução do pH no decorrer da fermentação e promove alteração da carga da proteína, desnaturação parcial, alteração da solubilidade, agregação e precipitação proteica de modo a estruturar um coágulo (SANTOS *et al.*, 2017; MARIN *et al.*, 2014). Porém, quando este processo acontece muito rápido a consequência é um gel frágil, quebradiço e com alto grau de sinérese, sendo que a capacidade tamponante das proteínas de soja é menor quando comparada a proteína do leite (BATTISTINI *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2013).

Assim, fermentações de extratos hidrossolúveis de soja por bactérias lácticas normalmente são conduzidas em temperaturas menores que as fermentações tradicionais de leite no intuito de reduzir a velocidade metabólica dos micro-organismos.

Evangelista (2011) avaliou o efeito de diferentes temperaturas (34, 37 e 40°C) sobre o pH durante a fermentação de bebida simbiótica à base de soja e concluiu que quanto maior a temperatura, maior o metabolismo microbiano e conseqüentemente a redução do pH. Os pesquisadores também verificaram um melhor crescimento de micro-organismos probióticos quando a fermentação ocorreu a 37 °C.

A acidez estimada como formação de ácido láctico passou de 0,44% ($\pm 0,01$) no dia 1 de armazenamento refrigerado na amostra Controle para 1,12% ($\pm 0,03$) no 28º dia de armazenamento refrigerado, indicando que houve metabolismo residual das bactérias lácticas ao longo do período avaliado (JAYARATHNA *et al.*, 2020). Resultados semelhantes foram relatados por Battistini *et al.* (2018) no estudo com bebida fermentada de soja suplementada com os prebióticos frutooligossacarídeos e inulina. Os pesquisadores atribuíram a pós-acidificação principalmente aos *S. thermophilus* que constitui uma espécie homofermentativa que produz maior quantidade de ácido láctico comparada com *L. acidophilus* e as *Bifidobacterium*. Jayarathna *et al.* (2020) reportaram diminuição do pH durante armazenamento a 4 °C de bebida fermentada de soja adicionada de gelatina evidenciando o metabolismo microbiano. O pH da amostra Controle sofreu redução de 4,8% durante o período de armazenamento refrigerado, passando de 4,54 no dia 1º dia para 4,32 no 28º dia.

Na amostra contendo MTGase, a variação dos índices de acidez durante o período avaliado foi menor, aumentando de 0,46% ($\pm 0,02$) no 1º dia para 0,89% ($\pm 0,02$) no 28º dia de armazenamento

refrigerado. Esta variação menor da acidez na amostra contendo enzima (BFS MTGase) em comparação a amostra Controle sugere que a MTGase pode, indiretamente, ter influenciado o metabolismo dos micro-organismos presentes no produto. É possível que os aminoácidos glutamina e lisina presentes no meio passaram a integrar as ligações cruzadas catalisadas pela enzima, deixando de estar disponíveis para o consumo dos micro-organismos, tornando seu crescimento mais lento e com menor produção de ácidos orgânicos (GÓES-FAVONI *et al.*, 2012; OZER *et al.*, 2007).

Conforme Valentino (2019) a acidez em produtos fermentados tem grande influência na aceitação do produto e os valores encontrados nas BFS favorecem sua aceitabilidade e estão dentro do valor indicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a concentração final de ácido láctico em iogurte, que deve estar entre 0,6-2,0% (BRASIL, 2007).

A viabilidade celular da cultura láctea não foi analisada neste trabalho, porém Ozer *et al.* (2007) avaliaram o desenvolvimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* na presença de diferentes concentrações de MTGase (0,1 a 0,5 g/L) durante a produção de iogurtes de leite de vaca e observaram menor crescimento microbiano e menor produção de ácido láctico proporcionalmente ao aumento da concentração da enzima. Os pesquisadores concluíram que MTGase não apresenta efeitos tóxicos para as culturas do iogurte, e sugeriram que os resultados observados ocorreram em função da indisponibilidade de aminoácidos requeridos para o crescimento do *S. thermophilus*, pois os aminoácidos estariam envolvidos nas ligações cruzadas promovidas pela MTGase. Góes-Favoni *et al.* (2012), entretanto, ao comparar o desenvolvimento da cultura láctea em bebida fermentada de soja com e sem a presença de MTGase na concentração de 0,3% (m/v), não observaram diferença significativa na viabilidade celular durante o período de 28 dias de armazenamento refrigerado, mantendo-se ao nível de 10^8 UFC/mL. Assim, estudos futuros são necessários para melhor compreensão dos efeitos da MTGase no desenvolvimento de bactérias lácticas e probióticas.

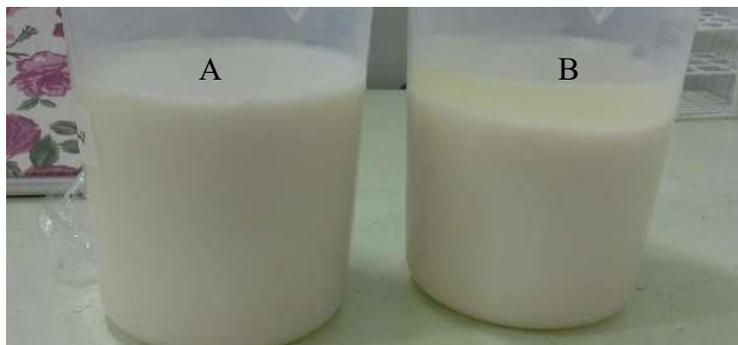
Capacidade de retenção de água (CRA) e sinérese nas BFS

Visualmente, a BFS MTGase mostrou-se mais firme e sem sinérese ao final da fermentação, mantendo aparente retenção de água durante os 28 dias de armazenamento refrigerado. Na amostra Controle foi possível observar claramente grande expulsão do soro após 24 horas de refrigeração (dia 1 do armazenamento) (Figura 1B), sendo que a partir do 21º dia de armazenamento não foi mais possível diferenciar o soro expelido do restante da amostra, pois o coágulo frágil obtido no primeiro dia se desfez completamente desestruturando o gel.

Conforme Domagala *et al.* (2013), a sinérese ocorre quando há separação da fase líquida de um gel, espontaneamente ou pela ruptura mecânica do gel. A sinérese é considerada um defeito na

fabricação de iogurtes e, portanto, indesejável uma vez que tem influência negativa sobre a aceitabilidade do produto pelo consumidor.

Figura 1 - Sinérese aparente em bebidas fermentadas de soja no 1º dia de armazenamento refrigerado. A – BFS MTGase (0,4%; m/v); B - amostra Controle (sem enzima)



Fonte: Dos autores, 2021.

Os parâmetros de sinérese e Capacidade de Retenção de Água (CRA) das duas bebidas, apresentaram diferença entre elas (Tabela 1). No primeiro dia de armazenamento refrigerado, a CRA foi 6,16% maior na BFS MTGase em relação a amostra Controle, enquanto a sinérese foi 21,37% menor na amostra contendo enzima (Tabela 1). Dados semelhantes foram obtidos por Temiz e Çakmak (2018) ao promoverem a fermentação da mistura leite e EHS adicionada de MTGase em diferentes concentrações, sendo a sinérese inversamente proporcional a concentração da enzima utilizada. Xing *et al.* (2019), observaram que géis obtidos a partir da mistura de extrato de soja e leite de vaca tratados com MTGase e fermentados por bactérias lácticas apresentam maior capacidade de reticulação proteica e formaram agregados de tamanho médio, com poros que retêm mais firmemente a água, mantendo o coágulo hidratado e estável por mais tempo.

Conforme Gaspar e Góes-Favoni (2015), a MTGase catalisa reações de deamidação e ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina das cadeias proteicas promovendo a estruturação de géis fortes e estáveis. Uma vez que durante a fermentação ocorre desnaturação parcial das proteínas, os aminoácidos tornam-se expostos e disponíveis para às reações catalisadas pela enzima. Além disso, a desnaturação das proteínas expõe seus sítios de ligação com a água fortalecendo ainda mais sua retenção na malha do gel promovido pela MTGase.

Ainda em função da desnaturação proteica, grupos hidrofóbicos que não estão envolvidos nas ligações cruzadas podem interagir com outros compostos da matriz alimentar, como carboidratos e lipídeos, aumentando o peso molecular do polímero e conseqüentemente a força do gel com maior retenção de água (GASPAR; GÓES-FAVONI, 2015).

Tabela 1 – Capacidade de Retenção de Água (CRA) e sinérese na bebida fermentada contendo MTGase (0,4%; m/v) (BFS MTGase) e amostra Controle (sem enzima) nos dias 1 e 28 de armazenamento refrigerado.

Período		CRA	Sinérese
Armazenamento	Amostra	(%)	(%)
(dias)			
1	Controle	88,77 ± 0,19	37,90 ± 1,57
	MTGase	94,60 ± 0,68	29,80 ± 2,87
28	Controle	*	*
	MTGase	95,65 ± 0,80	5,16 ± 0,58

Fonte: Dos autores, 2021.

Média (± DP) de três repetições.

*Impossível a determinação.

Houve redução do volume do soro expelido na BFS MTGase após 28 dias de armazenamento refrigerado (Tabela 1). Jayarathna *et al.* (2020) observaram redução da sinérese durante armazenamento refrigerado de bebida fermentada de soja estabilizada por gelatina e concluíram que durante o armazenamento um rearranjo da estrutura do gel pode ter ocorrido promovendo maior CRA da estrutura.

Assim, é possível que na amostra Controle, a completa desestruturação do gel após 21 dias de armazenamento ocorreu em função da perda da CRA, provocada pelo rearranjo da estrutura proteica do gel devido a maior acidificação microbiana durante o período de armazenamento. Como provavelmente não houve a formação de ligações cruzadas e reações de deamidação promovidas pela MTGase, as quais fortaleceriam a rede proteica garantindo sua estabilidade, o coágulo da amostra se desfez.

Perfil Instrumental de Textura nas BFS

A BFS MTGase apresentou maior firmeza que a amostra Controle (sem a enzima), havendo aumento deste índice durante o período de armazenamento avaliado (28 dias) (Tabela 2). Resultados semelhantes foram relatados por Domagala *et al.* (2013) na obtenção de iogurte a partir de leite de cabra adicionado de MTGase. Conforme os pesquisadores, firmeza, coesividade, adesividade e gomosidade foram maiores nos produtos adicionados de MTGase, bem como observaram aumento

desses índices ao longo do período de 14 dias de armazenamento refrigerado em que analisaram o produto.

Conforme Gaspar e Góes-Favoni (2015) tanto as reações de deamidação quanto as ligações cruzadas promovidas pela MTGase conduzem a alterações da hidrofobicidade proteica e com isso alteração da solubilidade da proteína. A solubilidade por sua vez afeta diretamente propriedades funcionais como a gelificação e a capacidade de retenção de água (CRA). Estas propriedades funcionais dependem das interações que as proteínas estabelecem entre si e com outras macromoléculas da matriz alimentar e influenciam fortemente atributos de textura como firmeza, elasticidade, viscosidade, adesividade além da sinérese. Desta forma, o gel obtido através da acidificação mediada pelas bactérias lácticas, têm suas ligações internas intensificadas pela reticulação proteica promovida pela MTGase, o que justifica os índices maiores dos parâmetros de textura avaliados neste trabalho quando a enzima foi adicionada na BFS.

Tabela 2 – Perfil instrumental de textura da bebida fermentada de soja contendo MTGase (0,4%; m/v) (BFS MTGase) e amostra Controle (sem enzima) nos dias 1 e 28 de armazenamento refrigerado.

Período	Amostra	Firmeza	Coabilidade	Adesividade	Gomosidade
Armazenamento		(N)	(adimensional)	(N x s)	(N)
(dias)					
1	Controle	0,1917 ± 0,005	0,2373 ± 0,003	-0,0007 ± 0,000	0,1512 ± 0,010
	MTGase	0,6864 ± 0,016	0,2806 ± 0,010	-0,001 ± 0,000	0,2083 ± 0,019
28	Controle	*	*	*	*
	MTGase	0,7365 ± 0,015	0,9177 ± 0,002	-0,002 ± 0,000	0,6772 ± 0,021

Fonte: Dos autores, 2021.

Média (± DP) de quatro repetições.

* Impossível a determinação.

A avaliação dos parâmetros de textura na amostra Controle foi realizada apenas no dia 1 da estocagem, pois a partir do 21º dia houve desestruturação total do coágulo e com isso a descaracterização do produto.

Os parâmetros de coabilidade e gomosidade foram maiores na BFS MTGase que na amostra Controle, indicando que ao catalisar as ligações cruzadas, a enzima promoveu o aumento da coabilidade, tornando mais dispendioso o processo para romper as ligações, ou seja, aumentou o índice de gomosidade.

A firmeza ou dureza de um produto tem influência direta nos parâmetros de coabilidade e gomosidade, uma vez que coabilidade refere-se à força intrínseca das ligações existente numa matriz

alimentar, enquanto a gomosidade está relacionada à energia requerida para romper estas ligações (SÜHNEL, 2007). Faria (2010) ao estudar a influência da MTGase em iogurtes com adição de soro de queijo, observou que a enzima propiciou a obtenção de um coágulo mais firme e coeso e concluiu que a firmeza está relacionada ao aumento das ligações cruzadas favorecidas pela enzima.

Quanto ao parâmetro adesividade, definido como a força necessária para vencer as forças de atração entre a sonda e a superfície do iogurte (SÜHNEL, 2007), a BFS MTGase apresentou índice maior que a amostra Controle e sem alteração durante o período de armazenamento, sendo estes resultados semelhantes aos observados por Ziarno e Zereba (2020) quando avaliaram o perfil de textura de iogurtes tradicionais de leite bovino adicionados de MTGase.

Dados semelhantes aos observados neste trabalho quanto ao perfil de textura foram observados por Bedani *et al.* (2014) ao realizarem experimentos com bebida fermentada de soja tipo iogurte adicionados de inulina e *okara*, e constataram aumento dos parâmetros de textura nas amostras contendo *okara*. Conforme os pesquisadores, *okara* é rico em fibras e ao ser adicionado a bebida promoveu aumento da CRA influenciando os parâmetros de firmeza, adesividade, gomosidade, elasticidade e coesividade.

Haully, Fuchs e Prudencio-Ferreira (2005) avaliaram o perfil de textura de iogurtes a base de soja suplementados com frutooligossacarídeos e concluíram que a maior coesividade e adesividade observadas nas amostras suplementadas, ocorreu em função da elevada capacidade de ligação de água da fibra em questão.

Conforme Han *et al.* (2009), géis são fortemente estabilizados por MTGase devido as ligações intermoleculares promovidas pela enzima formando uma microestrutura homogênea com poros reduzidos e alta capacidade de reter a água nestes poros. Sendo a adesividade um atributo resultante da interação proteína-água, quanto maior esta interação, ou seja, quanto maior a CRA, maior a adesividade (GASPAR; GÓES-FAVONI, 2015).

Conclusão

As ligações promovidas pela enzima MTGase favoreceram positivamente a manutenção da estrutura do gel na bebida fermentada de soja durante o armazenamento refrigerado. O aumento da capacidade de retenção de água promovido pela MTGase refletiu em melhorias das propriedades de textura da bebida, proporcionando maior estabilidade ao produto e menor sinérese, mantendo o coágulo firme e hidratado durante os 28 dias de armazenamento refrigerado. Assim, o emprego da enzima transglutaminase microbiana em bebidas fermentadas de soja constitui uma tecnologia viável com incremento na qualidade do produto, o que pode contribuir para sua maior aceitação.

Referências

- BATTISTINI, C. *et al.* Development and characterization of an innovative symbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 303-309, 2018.
- BEDANI, R. *et al.* Incorporation of soybean by-product okara and inulin in a probiotic soy yoghurt: texture profile and sensory acceptance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 119-125, 2014.
- BESSEGATO, T. B. *et al.* Fermented beverage based on water-soluble soybean extract. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 2, p. 518-526, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, 24 out. 2007.
- CIRILO, G. M. D.; OLIVIERI, C. M. R.; MARTINS, M. C. T. Bebidas vegetais alternativas ao leite: comparação nutricional com leite de vaca. **LifeStyle Journal**, v. 7, n. 1, p. 15-25, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.19141/2237-3756.lifestyle.v7.n1.p15-25>. Acesso em: 20 maio 2021.
- COSTA, A. V. S. *et al.* Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 209-226, 2013.
- DOMAGALA, J. *et al.* Effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. **Small Ruminant Research**, v. 112, n. 1-3, p. 154-161, 2013.
- EVANGELISTA, S. R. **Estudo da fermentação e vida-de-prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- FARIA, D. S. **Estudo dos efeitos da aplicação de transglutaminase em bebida láctea fermentada com alto conteúdo de soro**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá, Centro Universitário do Instituto de Mauá, São Caetano do Sul, 2010. Disponível em: <https://www.maua.br/arquivos/.../h/36c67862c17737d46ff176548f762f01>. Acesso em: 05 abr. 2021.
- FARNWORTH, E. R. *et al.* Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 174-181, 2007.
- GASPAR, A. L. C.; GÓES-FAVONI, S. P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: a review. **Food Chemistry**, v. 171, p. 315-322, 2015.

GÓES-FAVONI, S. P. *et al.* Transglutaminase microbiana: padronização do protocolo de aplicação em bebida fermentada de soja tipo iogurte. *In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS*, 23. 2012, Campinas. **Resumos** [...]. Campinas: SBCTA, 2012. p. 1.

HAN, M. *et al.* Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 4, p. 665-670, 2009.

HAULY, M. C. de O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v18n5/a04v18n5.pdf>. Acesso em: 15 maio 2021.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Ed. Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JAYARATHNA, S. *et al.* Probiotic enriched fermented soy-gel as a vegan substitute dairy yoghurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, p. 1-10, 2020.

MARIN, M. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de bebida probiótica de soja. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos - CEPPA**, v. 32, n. 1, p. 93-104, 2014.

MARTINS, G. H. *et al.* Perfil físico-químico, sensorial e reológico de iogurte elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e suplementado com inulina. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 93-102, 2013. Disponível em: <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev151/Art1510.pdf>. Acesso em: 15 maio 2021.

OZER, B. *et al.* Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. **International Dairy Journal**. v. 17. P. 199-207, 2007.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N. P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43. n. 5. p. 819-827, 2010.

SANTOS, P. A. *et al.* Bebida fermentada a base de soja com sabor de ameixa e suplementada com inulina em substituição ao iogurte tradicional. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 4, p. 724-733, 2017.

SÜHNEL, J. A. G. **Uso e avaliação de transglutaminase em reestruturado de peixe obtido com aparas de tilápia (*Oreochromis sp.*)**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TEMIZ, H.; ÇAKMAK, E. The effect of microbial transglutaminase on probiotic fermented milk produced using a mixture of bovine milk and soy drink. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71. n. 4, p. 906-920, 2018.

VALENTINO, L. R. P. **Bebida fermentada elaborada com soro de queijo e extrato hidrossolúvel de soja**. 2019. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2019.

VIANA, A.; BUENO, F. R.; GÓES-FAVONI, S. P. Bebida fermentada de soja tipo iogurte: formulação e aceitabilidade. **Revista Alimentus**, v. 1, p. 1-15, 2011.

XING, G. *et al.* Microbial transglutaminase-mediated polymerization in the presence of lactic acid bacteria affects antigenicity of soy protein component present in bio-tofu. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 292-298, 2019.

ZIARNO, M.; ZAREBA, D. The effect of the addition of microbial transglutaminase before the fermentation process on the quality characteristics of three types of yogurt. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 109-199, 2020.



13 Capítulo

Revestimento comestível
a partir de goma de
cajuero e óleo essencial
de erva baleeira visando
o controle de patógenos
de pós-colheita da maçã

Capítulo 13

Revestimento comestível a partir de goma de cajueiro e óleo essencial de erva baleeira visando o controle de patógenos de pós-colheita da maçã

Paulo Roberto Gagliardi*¹; Valter Rubens Alcântara Sobrinho²; Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Junior³; Filipe de Oliveira Melo⁴; Patrícia Beltrão Lessa Constant⁵

Resumo

O revestimento comestível de goma de cajueiro, natural, isolado ou em composição com óleo essencial de erva baleeira (*Varronia curassavica*) é aqui apresentado como uma tecnologia alternativa, que visa mitigar os impactos econômicos gerados pelas perdas na pós-colheita da maçã (*Malus domestica*), principalmente no que se refere ao ataque de micro-organismos fitopatogênicos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de um revestimento comestível elaborado com goma de cajueiro e óleo essencial de erva baleeira (*Varronia curassavica*) no controle do fungo *Lasiodiplodia theobromae*. Os compostos foram elaborados pela da mistura de duas soluções contendo 6% de goma de cajueiro e 2% de óleo essencial da erva baleeira (1:1). A análise do efeito patogênico do fungo na qualidade pós colheita de maçãs foi avaliado pela inoculação de 10 µL da suspensão de esporos em frutos com e sem revestimento. Filmes elaborados com a goma do cajueiro (6%) conferiram aos frutos menores perdas de peso ao longo do período de armazenamento, redução de 3%. O revestimento comestível com e sem a adição do óleo essencial atuou como agente inibidor do desenvolvimento do *L. theobromae*, bem como no desenvolvimento de patógenos secundários. Além disso, com o revestimento comestível pode ter ocorrido retardamento dos processos fisiológico, preservando as características físicas e físico-químicas da maçã Fuji, demonstrando assim a potencialidade de uso deste composto no controle pós-colheita de frutos.

Palavras-chave: Biopolímero. Controle alternativo. Pós colheita de frutos.

¹ Professor Associado do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe.

² Aluno de graduação do curso de Engenharia Agrônômica do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe.

³ Professor Associado do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe.

⁴ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Sergipe.

⁵ Professora Associada do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Sergipe.

*E-mail para correspondência: prgagli@yahoo.com

Introdução

A demanda mundial por frutas e hortaliças há décadas vem crescendo expressivamente sendo a fruticultura um dos mais importantes segmentos da agricultura brasileira (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2006). O Brasil continua como o terceiro maior produtor de frutas com 36,3 milhões de toneladas, ficando atrás da China (265 milhões) e Índia (93 milhões). Contudo, é o maior produtor mundial de frutas tropicais e, graças às suas condições de solo e de clima diversificadas, pode também dedicar-se ao plantio de fruteiras de clima temperado e subtropical, produtos com elevado potencial para o mercado externo (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2016; ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI, 2020; MORGADO *et al.*, 2004; SEBRAE, 2015). Entre as culturas de clima temperado a cultura da macieira apresenta importância agrícola e econômica no mundo inteiro, inclusive no Brasil, que é o décimo primeiro produtor mundial de maçãs (FAO, 2010).

Em 2013, a produção brasileira de maçã alcançava a marca histórica de 1.226.555 toneladas de acordo com o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2016). Embora com uma queda acentuada em 2018, em 2017 passava de 1,3 milhões de toneladas colhidas das quais 90% da produção correspondente as cultivares Gala e Fuji. O consumo desta fruta no Brasil é feito durante todo o ano e sua produção é concentrada na região sul do país, onde as condições climáticas são mais favoráveis à produção.

A macieira pertence à família das Rosaceae, subfamília Maloidae (Pomoidae), gênero *Malus*. Apesar de serem citados vários nomes para a espécie, a denominação *Malus doméstica* é a primeira denominação válida publicada para a macieira cultivada, segundo o Código Internacional de Nomenclatura para plantas Cultivadas (PETRI, 2008).

A maçã está entre as quatro frutas mais consumidas no mundo. No Brasil, é comercializada os doze meses do ano e distribuída em todo o País. Além do consumo in natura é utilizado para purês, geleias, fruta desidratada, suco concentrado e bebidas fermentadas. O fruto da macieira é rico em substâncias pécicas e celulose, que, juntamente com a lignina constituem as fibras. Os teores de proteína e lipídios são baixos, apresentando uma grande variedade de ácidos orgânicos, predominando o ácido málico (PETRI, 2008).

O consumo da maçã em todo o território nacional é possível devido ao manejo e técnicas de pós-colheita que permitem ao fruto chegar ao seu destino com qualidade comercial. Atualmente, a produção nacional concentra-se na região Sul, envolvendo seus três estados, notadamente nas regiões mais frias dos mesmos, destacando-se a região de Vacaria, no Rio Grande do Sul, São Joaquim e

Friburgo, no Estado de Santa Catarina, e de Palmas, no Estado do Paraná. No Nordeste a cultura apresenta bons resultados no semiárido na região do São Francisco (PETRI *et al.*, 2016).

De uma forma geral, um dos principais entraves está relacionado à relativa baixa qualidade das frutas brasileiras, principalmente ao aspecto visual provocado por manuseio inadequado nos processos de colheita e também por consequência do ataque de patógenos, este último tanto na pré quanto na pós colheita. Tais fatores representam um grande desafio para essas culturas em um mercado cada vez mais de padrões exigentes de qualidade (JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

São diversas as técnicas que visam a preservação pós-colheita de frutas e hortaliças, destacando-se a embalagens, a refrigeração, o controle e modificação da atmosfera, o revestimento dos frutos, entre outros (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O uso de revestimentos na pós-colheita tem sido empregado para promover a manutenção da qualidade e ampliar a vida útil dos frutos. Em meio aos revestimentos utilizados estão os revestimentos ativos, aqueles que têm interação com o alimento (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Dentro deste subgrupo, as coberturas comestíveis apresentam diversos mecanismos envolvidos no aumento da conservação dos frutos, como por exemplo a diminuição na perda de água, controle das trocas gasosas, diminuição da taxa respiratória, prevenção contra danos mecânicos e ataques de fungos (VELICKOVA *et al.*, 2013; BAUTISTA-BAÑOS *et al.*, 2013).

Há mais de 10 anos, já se estuda estes materiais com enfoque maior as propriedades antifúngicas e/ou fungistáticas de revestimentos comestíveis, assim, surgindo diversos métodos de uso dessa película biodegradável, principalmente no controle de doenças em pós-colheita (AGUIAR, 2011). A goma do cajueiro, por sua vez, é um produto que apresenta potencialidade para diversos usos na área da biotecnologia com bons resultados em diversas áreas.

A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é obtida pelo exsudato do tronco da árvore do cajueiro após injúria ou ferimento da planta. Ela pode ser produzida a partir de estimulantes químicos, intencionalmente ou surgir de forma espontânea (CAMPOS *et al.*, 2012; CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2009). O produto, goma de cajueiro associado a um óleo essencial pode aumentar a potencialidade do efeito antifúngico sem que ocorra inerência nos parâmetros sensoriais de frutos e outros produtos agrícolas, incluindo a maçã.

A planta *Varronia curassavica* Jacq., conhecida popularmente como erva-baleeira, maria-preta e salicina, é uma espécie medicinal originária do Brasil. Possui uma ampla distribuição no território brasileiro, podendo ser encontrada ao longo das regiões costeiras, da Bacia Amazônica até o Rio Grande do Sul, grande parte do Sudeste e Goiás. Com forte odor de suas folhas são empregadas

na medicina popular em vários tratamentos como reumatismo, inflamações e úlceras (BARROS, 2009; BAYEUX *et al.*, 2002; GASPARINO).

Os óleos essenciais de *V. curassavica* têm sido alvos de diversos estudos devidos também às suas propriedades antimicrobianas. Assim, diversas atividades já foram relatadas, entre elas, antibacteriana (MECCIA *et al.*, 2009; PINHO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012) e antifúngica contra agentes fitopatogênicos (SILVA *et al.*, 2012; HOYOS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014). Desta forma o trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da incorporação do revestimento comestível elaborado a partir de um composto de goma de cajueiro e óleo essencial de erva baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) nas características bioquímicas dos frutos ao longo do armazenamento, bem como determinar sua atividade antifúngica no controle do fungo *Lasiodiplodia theobromae* na maçã cultivar Fuji.

Material e Métodos

Os ensaios e as análises foram conduzidos no Laboratório de Ecofisiologia e Pós-colheita (ECOPOC) do Departamento de Engenharia Agrônômica em parceria com o Laboratório de Cereais e Massas do Departamento de Tecnologia de Alimentos para as análises físico-químicas. Ambos são laboratórios da Universidade Federal de Sergipe, localizados no campus de São Cristóvão – SE.

O isolado do fungo *Lasiodiplodia theobromae* que foi utilizado para o experimento é proveniente da coleção de fungos do ECOPOC, preservado segundo trabalhos descritos por Castellani (1967). O fungo foi reativado e cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) repicada e mantida em câmara BOD a 25 °C de temperatura.

Após o desenvolvimento do fungo, realizaram-se os “Postulados de Koch” para o teste de patogenicidade e para a confirmação da identidade do isolado. Para o mesmo propósito, também foram realizadas observações de estruturas dos fungos utilizando microscópio ótico e, comparações com a literatura especializada.

Tanto para o pré-teste quanto para o ensaio proposto no presente trabalho, utilizaram-se frutos provenientes da Central Estadual de Abastecimento (CEASA) localizado na Rua Riachão, 228, Bairro Getúlio Vargas, na cidade de Aracaju – SE. Os frutos foram selecionados no estágio de maturação mediana num mesmo padrão. Esses frutos, quando no laboratório, foram limpos com água destilada e sanitizados com hipoclorito de sódio a 1%. Suspensões de esporos do fungo foram preparadas adicionando-se uma alíquota de água destilada na superfície das placas de Petri contendo o fitopatógeno na fase de esporulação (aproximadamente com 6 dias de idade). Em seguida foi feito a

filtragem desta suspensão com gaze e o ajuste da concentração para aproximadamente $1,0 \times 10^5$ esporos/mL utilizando câmara de Neubauer.

Foram realizados ferimentos com ferramenta perfurante contendo 4 alfinetes de 1 mm de diâmetro à profundidade de aproximadamente 2 mm na região equatorial dos frutos. Em seguida, a inoculação se deu pela com alíquotas de 10 μ L da suspensão de esporos depositadas sobre os ferimentos e os frutos foram armazenados em bancada do laboratório à temperatura ambiente.

A goma de cajueiro proveniente de plantas não comerciais, coletada no litoral sul do estado de Alagoas foi purificada de acordo com o método de Rinaudo-Milas (COSTA *et al.*, 1996), com modificações. O exsudado da goma bruta foi seco em estufa a 60 °C por 24 h. Após esse período o material foi quebrado e triturado em triturador analítico “IKA® A 11 Basic” até formar um pó fino. A amostra foi transferida para um béquer onde foi acrescentada água destilada na proporção de 1 L de água para cada 300 g de goma (1:0,3). A mistura foi homogeneizada mecanicamente e deixada em repouso por 24 h. Em seguida a mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min e filtrada a vácuo ficando uma solução límpida. A precipitação da goma purificada foi feita com etanol comercial na proporção de 1 L de solução para 3 L de álcool e foi deixado em repouso por 24 h. O precipitado foi drenado e deixado secar em estufa a 60 °C por 3 dias. Por fim a goma já seca foi triturada até formar um pó fino e armazenada em frasco de vidro hermeticamente fechado em temperatura ambiente.

A solução de goma de cajueiro foi preparada na concentração de 6% (60 g/L). Esta concentração foi também utilizada em trabalhos de Santos *et al.* (2011) que usaram amido como agente formador de filmes. Foram diluídas 30 g de goma de cajueiro em 500 mL de água e o conteúdo ficou sob agitação durante 24 horas. O óleo essencial de erva baleeira foi preparado na concentração de 2%. Nesta concentração Nizio *et al.* (2015) obtiveram os melhores resultados na inibição de vários fungos de pós-colheita de frutos em experimentos *in vitro*. Foram misturados 3 mL de óleo essencial com 2 mL de DMSO (agente emulsificante) em volume final de 100 mL de água destilada. Para preparo do composto de goma de cajueiro mais óleo essencial de erva baleeira, foram utilizados 100 mL de cada solução.

Os frutos foram novamente selecionados de acordo com seu grau de maturação, aspecto físico (sem injúrias mecânicas) e fitossanitário, livres de contaminações ou infecções microbianas. Em seguida foi realizada a desinfestação superficial com água destilada, e hipoclorito de sódio a 1%. Os procedimentos de aplicação dos tratamentos foram realizados após 1 hora da realização da inoculação dos fungos. Os frutos foram então revestidos por nebulização (borrifados), com sistema de pressão manual (*spray*), sendo aplicado solução de goma de cajueiro a 6%, mais solução de óleo essencial de

erva baleeira a 2% e a solução composta apenas pela goma na mesma concentração em frutos inoculados e não inoculados.

Após a aplicação da cobertura, os frutos foram mantidos em repouso durante uma hora, para devida secagem da cobertura e, em seguida, armazenados a temperatura ambiente.

As análises foram realizadas em intervalos de 4 e 4 dias, durante 12 dias, sendo o primeiro dia de avaliação no início do experimento.

A pesagem dos frutos foi realizada em balança semianalítica (BG 8000, Gehaka), máxima de 8000 g e mínima de 2,5 g, e a percentagem de perda de massa (PM) dos frutos calculada por meio da expressão: $PM (\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$, sendo P_i o peso inicial dos frutos, e P_f o peso final. Os resultados são expressos em porcentagem.

A cor dos frutos foi determinada por leitura direta na casca, no colorímetro Cr-10, obtendo as coordenadas L^* (luminosidade), a^* (avermelhado) e b^* (amarelado), de acordo com o sistema de três coordenadas CIELAB proposto pela *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) em 1971.

A avaliação dos sintomas causados pelas doenças dos fitopatógenos inoculados foi realizada visualmente, de forma a observar a incidência ou não de sintomas causados pela doença do fungo em estudo, nos frutos tratados e não-tratados, inoculados e não-inoculados. Os frutos inoculados foram avaliados nas áreas onde foi feita a inoculação, marcados com um círculo. Nos frutos não-inoculados foram avaliados a incidência dos sintomas em toda a região do fruto. As avaliações consistem em quantificar os frutos com sintomas das doenças e determinar sua porcentagem.

Quanto a avaliação das características físicas e físico-químicas dos frutos ao longo do armazenamento, a textura dos frutos foi determinada utilizando penetrômetro (FRUIT HARDNESS TESTER), com profundidade de penetração de 2,0 mm, velocidade de 2,0 mm s⁻¹ e ponteiro, TA 8/1000. As leituras foram realizadas nos frutos inteiros, tomando-se quatro medidas por fruto, em faces opostas, após a remoção de porções da casca. Os resultados obtidos foram expressos em Newtons (N).

Já acidez total titulável (ATT) foi determinada de acordo com metodologia recomendada pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), utilizando-se 10 gramas de polpa homogeneizada e diluída em 100 mL de água destilada, seguida de titulação com solução padronizada de NaOH 0,1 N, usando como indicador o ponto de viragem da fenolftaleína. Os resultados serão expressos em g de ácido cítrico/100 g da amostra.

O pH dos frutos, por sua vez, foram determinados através de pHmetro digital de bancada por leitura direta na polpa homogeneizada e diluída em água, conforme IAL (2008).

O experimento foi realizado seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x3x2x9, sendo goma de cajueiro, 6%, Óleo essencial de Erva baleeira 2%, goma de cajueiro + Óleo essencial de Erva baleeira e Controle, com frutos inoculados e não-inoculados com o patógeno, com nove repetições para cada tratamento. Foram avaliados em intervalos de quatro dias (0, 4, 8 e 12) até o final, ou seja, o décimo segundo dia. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as medias comparadas pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do Programa estatístico ASSISTAT Versão 7.7 beta 2016.

Resultados e Discussão

O tratamento 2 com revestimento comestível elaborado somente com a goma de cajueiro a 6%, apresentou estatisticamente a menor perda de massa fresca dentre os tratamentos, com 4,83% (Tabela 1) com eficiência na redução de PMF de mais de 3%. O tratamento 3 (goma de cajueiro a 6% mais óleo essencial de erva baleeira a 2%), por sua vez, apresentou a segunda menor perda de massa dentre os tratamentos não inoculados com o fungo *L. theobromae*, com 5,52% (Tabela 1).

Tabela 1 – Média da perda de massa e análise colorimétrica das maçãs tratadas com e sem o inóculo

Parâmetro	Sem inóculo			Com inóculo		
Tratamento	1	2	3	4	5	6
Perda de massa	5,84 ^d	4,83 ^f	5,52 ^e	6,61 ^b	7,88 ^a	6,15 ^c
L*	2,7 ^{ab}	1,87 ^{ab}	3,22 ^b	3,1 ^{2b}	1,67 ^a	2,04 ^{ab}
a*	4,49 ^b	3,56 ^{ab}	4,86 ^b	5,88 ^b	2,55 ^a	3,73 ^{ab}
b*	7,36 ^c	5,75 ^{ab}	4,61 ^a	6,14 ^{abc}	6,32 ^{abc}	6,91 ^{bc}

Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: 1) Sem revestimento comestível; 2) Revestimento comestível de Goma de cajueiro a 6%; 3) revestimento comestível de goma de cajueiro a 6% mais óleo essencial de erva baleeira a 2%; 4) Sem revestimento comestível; 5) Revestimento comestível de goma de cajueiro a 6%; 6) Revestimento comestível de goma de cajueiro a 6% mais óleo essencial de erva baleeira a 2%.

Nota: Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha (comparação entre tratamentos) não diferem significativamente ao nível de a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A redução da perda de massa fresca pode estar associada ao revestimento comestível utilizado, visto que sua aplicação proporciona uma atmosfera modificada, impactando principalmente na diminuição na perda de água e o controle das trocas gasosas de CO₂, O₂ e C₂H₄, resultando em menor taxa respiratória. Souza *et al.* (2002) encontraram resultados positivos também no uso dessa técnica de filme em mangas.

O tratamento 1 apesar de não ser tratado com o revestimento comestível apresentou perda de massa inferior ao controle inoculado com fungo em estudo (Tratamento 4) e dos tratamentos 5 e 6, com revestimento e com inóculo. Estatisticamente a PMF teve diferença entre os tratamentos

Nos tratamentos 5 e 6, mesmo com o filme foram observadas perdas de massa fresca elevadas comparado aos demais (Tabela 1). Isso deve-se a uma possível interação com o fungo inoculado nos respectivos frutos já que patógenos possuem capacidade de gerar mudanças no metabolismo resultando em aumento da respiração, apesar da inexistência de sintomas visíveis nas cascas das maçãs avaliadas.

A temperatura média durante o período do experimento foi de 25 °C e a Umidade relativa em torno de 80%. As condições de armazenamento, determinadas pelas temperaturas e umidade relativa, interferem diretamente sobre o metabolismo da fruta, restringindo ou favorecendo a perda de água (BOMFIM, 2011)

A análise de colorimetria cujos parâmetros de cor da escala Hunter são L^* a^* b^* onde, L^* indica a luminosidade que varia de 0 (preto puro) a 100 (branco puro) e a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade e, valores positivos para a^* indicam vermelho e valores negativos indicam verde; e b^* os valores positivos indicam amarelo e negativo, azul.

De acordo com Chitarra; Chitarra (2005), o amadurecimento de frutos compreende o estágio fisiológico, durante o qual ocorrem mudanças em suas características. A coloração da casca está entre os vários fatores destacados pelos autores. A cultivar de maçã Fuji quando madura apresenta em sua casca uma coloração mesclada característica entre vermelho e amarelo.

Quanto a luminosidade os frutos do tratamento apenas com goma de cajueiro, na concentração de 6% (Tratamentos 2 e 5), apresentaram menores médias (Tabela 1). Nota-se que houve menor oscilação das características iniciais de armazenamento. Estatisticamente o tratamento 5 diferenciou-se dos tratamentos 3 (goma de cajueiro a 6% mais óleo essencial) e 4 (Sem revestimento comestível).

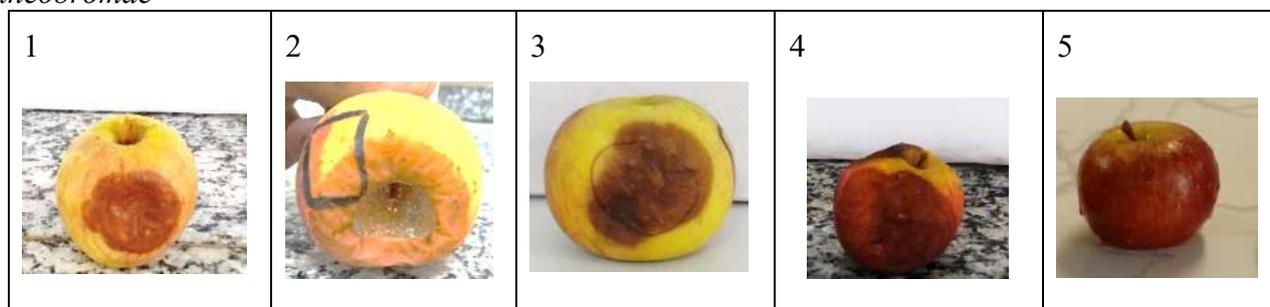
Em relação ao parâmetro “a” observou-se que o tratamento 5 (revestimento comestível com 6% de goma de cajueiro) também apresentou menor mudança comparado aos demais tratamentos, com mais de 3,0 na escala Hunter, sendo mais eficiente estatisticamente do que os tratamentos sem revestimento comestível (1 e 4) e o tratamento 3. No parâmetro “b” o tratamento 3, com goma de cajueiro e óleo essencial, foi o que apresentou melhor média, desta forma o aspecto visual da fruta é de maturação menor. O aspecto visual é também um dos fatores que favorecem a comercialização do fruto. Frutos com aspecto de maduros podem ser reprovados frente ao consumidor final, devido a redução do tempo de consumo. Outra consequência para o produtor/comerciante é a redução no preço do produto. Quanto à exportação, são reprovados na sua totalidade, os frutos no estágio de

amadurecimento fisiológico avançado, indicado visualmente pela coloração da casca. Adicionalmente, a cor da casca é o atributo que mais chama atenção do consumidor (FANTE, 2011) pois é o primeiro quesito de qualidade do produto que está relacionada às características de estética, de segurança e sensoriais, bem como a aceitabilidade dos alimentos. Sugestões visuais permitem a identificação do alimento que por experiências anteriores evoca antecipadamente sensações orais (CONSTANT, comunicação pessoal).

A avaliação dos sintomas causados pelo fungo inoculado foi realizada visualmente, de forma a observar a incidência ou não de sintomas típicos causados pelo fitopatógeno nos frutos tratados e não tratados, não inoculado (Tratamento 1 ao 3) e inoculados (tratamento 4 ao 6). Os frutos inoculados foram avaliados nas áreas da inoculação, marcados com um círculo e os frutos não inoculados foram avaliados os sintomas em toda a região do fruto. A avaliação consistiu em determinar, em porcentagem, a quantidade de frutos com sintomas das doenças.

Dentre os frutos inoculados com o fungo objeto do presente estudo, observou-se que o tratamento 4 (fruto inoculado, porém sem revestimento), apresentou valores superiores a 50% na quantidade de frutos com sintomas típicos da doença (Figura 1). Notou-se também a presença de fungos oportunistas neste mesmo tratamento. No demais tratamentos, por sua vez, não foram observados sintomas, tanto em frutos inoculados como não inoculados.

Figura 1 – Sintomas visuais nos frutos sem o revestimento comestível inoculado com o fungo *L. theobromae*



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: Frutos com sintomas secundários de *Penicillium expansum* (“doença do bolor azul”) de 1 e 2; Frutos com sintomas causados pelo fungo *L. theobromae* em 3 e 4; Fruto sadio em 5 (controle não inoculado).

Desta forma notou-se que o uso do revestimento comestível de goma de cajueiro puro ou associado ao óleo essencial de erva baleeira (*V. curassavica*) exerceu influência sobre micro-organismos na maçã, o que corrobora o seu efeito no controle antibacteriano (MECCIA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2012) e antifúngico (SILVA *et al.*, 2012; HOYOS *et al.*, 2012).

Com a aplicação dos revestimentos comestíveis, as características físicas e físico-químicas dos frutos dispostos na Tabela 2, observou-se inicialmente que ao longo do tempo houve um decréscimo significativo na firmeza dos frutos avaliados, principalmente naqueles tratados com o revestimento comestível (T2 e T3) associada ao processo de amolecimento natural em decorrência do amadurecimento dos frutos. Porém, apesar desse comportamento, o tratamento 1 (T1) (sem revestimento comestível) manteve suas características de firmeza ao longo do período de armazenamento.

Tabela 2 – Características físicas e físico-químicas das maçãs Fuji submetidas a tratamentos com e sem o revestimento comestível de cajueiro e óleo essencial

D	Tratamento 1 (T1)				Tratamento 2 (T2)				Tratamento 3 (T3)			
	Firm.	Brix	pH	ATT	Firm.	Brix	pH	ATT	Firm.	Brix	pH	ATT
0	59,70	15,80	3,59	3,40	57,43	12,70	3,50	2,80	55,75	10,10	3,33	3,10
6	47,34	11,50	4,07	2,57	39,16	9,36	3,69	2,50	32,13	10,26	3,80	2,06
12	42,58	11,43	3,65	2,13	38,56	10,20	3,49	2,16	34,53	10,30	3,72	2,26

Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: D. – Dias; Firm. – Firmeza; ATT – Acidez Total Titulável; T1 - Frutos sem revestimento comestível; T 2 – Frutos com revestimento comestível de goma de cajueiro e sem óleo essencial; T3 – Frutos com revestimento comestível de goma de cajueiro e óleo essencial.

Quanto ao pH dos frutos, observou-se que ao longo do armazenamento não houve diferença entre os tratamentos com e sem a aplicação do revestimento comestível. Comportamento este, similar ao encontrado na avaliação da Acidez Total Titulável (ATT) dos frutos. Já em relação ao teor de sólidos solúveis (°Brix), observou-se que o tratamento 2 (frutos com revestimento comestível de goma de cajueiro e sem óleo essencial) manteve-se estável ao longo do armazenamento, diferente dos tratamentos T1 e T3 que sofreram uma leve oscilação ao longo do armazenamento. Em trabalhos realizados por Jorge (2010) o conteúdo de sólidos solúveis variou entre 12,0 e 14,0 °Brix para as maçãs revestidas com quitosana. Contudo, os frutos revestidos apresentaram maior teor de sólidos solúveis somente aos 14 e 42 dias de estocagem, não tendo ocorrido diferença significativa com relação ao controle aos 14 dias. Os teores de açúcares redutores, acidez total titulável e pH, se mantiveram praticamente constantes durante todo armazenamento, segundo os mesmos autores.

Conclusão

Observou-se com o presente estudo que a incorporação de revestimento comestível de goma de cajueiro pode atuar como um agente redutor das perdas pós-colheita de maçã Fuji, reduzindo principalmente os impactos nas perdas de massa ao longo do processo de amadurecimento e armazenamento dos frutos. Além disso, observou-se que a aplicação de revestimento comestível nas concentrações de 6% de goma de cajueiro e 2% de óleo essencial de erva baleeira (*V. curassavica*) atuou como agente inibidor da ação fitopatogênicas de fungos da espécie *L. theobromae*, bem como inibindo a ação de fungos associados, demonstrando assim a potencialidade de uso desses agentes no controle desse patógeno, reduzindo assim as perdas pós-colheita dos frutos em questão.

A incorporação do revestimento comestível impactou diretamente nas características bioquímicas dos frutos analisados (ATT, Sólidos Solúveis e pH) aumentando a sobrevida dos frutos, quando utilizados.

Agradecimentos

Agradecimento a Universidade Federal de Sergipe, ao CNPq e CINTTEC/UFS.

Referências

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI E FRUTI 2020. CEPEA, Piracicaba, São Paulo: 2020. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-de-horti-fruti-2020/>. Acesso em: 15 jun. 2021.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2016. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz. 2016. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-da-fruticultura-2016/>. Acesso em: 15 jun. 2021.

ARAÚJO, I. M. S. *et al.* Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale L.*) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science and Engineering**. 2012.

BAYEUX, M. C. *et al.* Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, nº10, p. 1229–1232. 2002.

BOMFIM, M. P. *et al.* Conservação pós-colheita de manga 'Tommy Atkins' com 1-metilciclopropeno. **Revista Brasileira de Fruticultura**. volume especial, p. 290-297, 2011.



- CAMPOS, D. A. *et al.* Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**. v. 90, n. 1, p. 270-274. 2012.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. *et al.* Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Journal of Food Engineering**. v. 95, n. 3, 379–385. 2009.
- CASTELLANI, A. A maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**. v.70, p. 181-184. 1967.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Embalagens e Transporte: Embalagens Ativas ou Inteligentes. In: CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-Colheita de Frutas e Hortalças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras: UFLA, 2005, p. 316-354.
- CIA, P.; BENATO, E. A. Controle Alternativo com Atmosferas Modificada e Controlada. In: OLIVEIRA, S. M. A. de. *et al.* (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 245-264.
- COSTA, S. M. O.; RODRIGUES, J.; PAULA DE, R. C. M. Monitorização do Processo de Purificação de Gomas Naturais: Goma do Cajueiro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. p. 49-55. 1996.
- FANTE, L.; **Estudo da cinética de branqueamento e de secagem por ar quente e liofilização do alho (*Allium sativum* L.)**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: RS, 2011.
- HOYOS, J.M.A. *et al.* Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 36, n. 3, p. 270-284. 2012.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. ed. 4, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.
- JORGE, P. C. S. **Avaliação de maçã ‘royal gala’ revestida com filme de quitosana durante o período de pós-colheita**. 2010. 166f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.
- JUNQUEIRA, N. T. V. *et al.* **Controle das doenças da mangueira**. In: ZAMBOLIM, L. *et al.* (Ed.). Controle de doenças de plantas: fruteiras. Viçosa, MG:[s.n.], 2002. cap. 6.
- MECCIA, G. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communications**. v. 4, n. 8, p. 1119-122, 2009.
- MORGADO, I. F.; AQUINO, C. N. P. A.; TERRA, D.C.T. Aspectos econômicos da cultura do abacaxi: sazonalidade de preços no estado do rio de janeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n. 1, p. 44-47, 2004

- NIZIO, D. A. C. *et al.* Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.437-448. 2015.
- OLIVEIRA, S. M. A. *et al.* Patologia pós-colheita. In: (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, oleícolas e ornamentais tropicais**. Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. cap.1.
- PASSOS, G. F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, n. 2 p.323-333. 2007.
- PETRI, J. L.; MACIEIRA. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 30, n. 4 p.857.
- RODRIGUES, F. F. G. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**. v. 4, n. 3, p. 161-165. 2012.
- SANTOS, C. E. *et al.* **Anuário brasileiro da fruticultura 2013**. Santa Cruz. Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 136 p.
- SANTOS, A. E. O. *et al.* Efeito do tratamento hidrotérmico e diferentes revestimentos na conservação pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.6, n.1, p.140-146, 2011.
- SILVA, A. C. *et al.* Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**. v. 37, p. 305-313. 2012.
- SOUZA, J. P. *et al.* Influência do armazenamento refrigerado em associação com atmosfera modificada por filmes plásticos na qualidade de mangas ‘Tommy Atkins’. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.24, n.3, p.665-668, 2002.
- VELICKOVA, E. *et al.* Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. **LWT - Food Science and Technology**. v. 52, n. 2, p. 146-150, 2013.



14 Capítulo

Utilização da torta residual de pequi para obtenção de compostos fenólicos microencapsulados por liofilização

Capítulo 14

Utilização da torta residual de pequi para obtenção de compostos fenólicos microencapsulados por liofilização

Natalie Stephanie Sawada Nunes*¹; Cassia Roberta Malacrida²

Resumo

O Cerrado brasileiro é conhecido por sua diversidade de fauna e flora entre as savanas mundiais. Dentre os frutos nativos, o pequi se destaca por apresentar compostos bioativos como carotenoides, vitaminas e compostos fenólicos que possuem atividades anticarcinogênicas, antioxidantes, antimicrobianas, dentre outras. Estes compostos, no entanto, são sensíveis a luz e oxigênio. Assim, com intuito de preservar essas atividades, é possível encapsular esses compostos bioativos. A extração do óleo de pequi por prensagem a frio gera uma torta residual que pode ser aproveitada para extração de compostos bioativos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi a encapsulação dos compostos fenólicos obtidos da torta residual utilizando quatro agentes encapsulantes: amido de mandioca modificado fisicamente, goma arábica, maltodextrina e ovoalbumina. O extrato aquoso rico em compostos fenólicos foi obtido utilizando extração ultrassônica com 240 W de potência, 50% de pulso durante 10 minutos. Os agentes encapsulantes corresponderam a 20% do extrato e inicialmente foram adicionados puros com intuito de verificar os melhores encapsulantes. Em uma segunda etapa, os melhores agentes encapsulantes - amido de mandioca modificado (AM) e maltodextrina (MD) - foram misturados em proporções (50% AM e 50% MD, 25% AM e 75% MD, 75% AM e 25% MD). As amostras foram liofilizadas gerando pós de cor amarela, os quais foram avaliados com relação as características físico-químicas. Os rendimentos dos processos de secagem foram de 70-80% e os pós obtidos apresentaram baixa umidade (3 a 4%). A mistura de 75% AM e 25% MD se destacou pela retenção dos compostos fenólicos (90%) e baixa higroscopicidade (10%). O AM e MD demonstraram ser bons agentes encapsulantes nas condições testadas.

Palavras-chave: Bioativos. *Caryocar brasiliense* Camb. Microencapsulação. Pó.

¹Doutoranda em Biociências, Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

² Professora Assistente Doutora, Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

*E-mail para correspondência: natalie_sawada@hotmail.com

Introdução

Os biomas brasileiros são conhecidos por sua extrema abundância de espécies. Dentre os biomas, o Cerrado é considerado um *hotspot* mundial devido as suas espécies endêmicas. Em geral, os frutos encontrados nesse bioma possuem características sensoriais intrínsecas e com grande qualidade nutricional, o que demonstra atrativo para comercialização e pesquisa (REIS; SCHMIELE, 2019).

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é amplamente utilizado pelas famílias que vivem nessas regiões, sendo sua extração e processamento a base econômica local (SANTOS *et al.*, 2013). A extração do óleo é feita de forma artesanal, consistindo na extração aquosa a quente, porém esta resulta em baixo rendimento e pode causar alteração na composição química do óleo (MARIANO, 2008). Para um maior rendimento e melhor qualidade do óleo, a extração por prensagem a frio é uma boa alternativa. Esta extração gera um produto livre da mistura com solventes e preserva as propriedades terapêuticas, além disso gera uma torta residual rica em compostos bioativos que pode ser aproveitada.

Os principais compostos encontrados no pequi são lipídeos (ácidos graxos palmítico e oleico, principalmente), proteínas, carotenoides (α e β -caroteno), compostos fenólicos (polifenóis e proantocianidinas não extraíveis) e vitaminas A e C (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2013; REIS; SCHMIELE, 2019). Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, prevenindo ou retardando a oxidação. Além disso, podem ter propriedades anticarcinogênicas, antidegenerativas, antimicrobianas e retardadoras do envelhecimento (REIS; SCHMIELE, 2019). Estes compostos são metabólitos encontrados nas plantas e as classes mais importantes para dieta humana são os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (HELENO *et al.*, 2015; VUOLO; LIMA; JUNIOR, 2019).

A extração de polifenóis pode ser feita por diversas metodologias e a sua escolha é baseada no maior rendimento e menor custo (ŽIVKOVIĆ *et al.*, 2018). Em geral, as técnicas tradicionais utilizam solventes a alta temperatura, porém deve-se considerar diversos fatores como a polaridade do composto, afinidade da molécula com solvente, transferência de massa, segurança ambiental, toxicidade humana e viabilidade financeira (AZMIR *et al.*, 2013; GOLTZ *et al.*, 2018).

A capacidade dos compostos bioativos de reagir com outros compostos os torna instáveis, assim é comum aumentar ou prologar sua estabilidade por meio de métodos de encapsulação como liofilização, *spray drying*, coacervação entre outros (NESTERENKO *et al.*, 2013). A liofilização é uma técnica que gera produtos de excelente qualidade, pois é pouco degradante e desnaturante, diminuindo as perdas vitamínicas e constituintes voláteis que são associadas a altas temperaturas

(KRUMREICH *et al.*, 2016). Para tanto, agentes encapsulantes como polissacarídeos (maltodextrina, goma arábica, amido), lipídeos (mono e diglicerídeos) e proteínas (albumina, caseína, gelatina, proteína de soja) são utilizados para encapsular compostos bioativos (YADAV *et al.*, 2019; ESTÉVEZ *et al.*, 2019; FARRAG *et al.*, 2018; GIBIS *et al.*, 2014; DRUSCH; SCHAWARZ, 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi a encapsulação por liofilização de compostos fenólicos obtidos da torta residual gerada pela prensagem a frio da polpa de pequi utilizando diferentes agentes encapsulantes.

Material e Métodos

Material

Os frutos do pequi utilizados foram obtidos no CEASA (Centrais de Abastecimento de Campinas, Campinas, SP) provenientes do estado de Goiás (safra 2016/2017). As tortas residuais foram obtidas por meio da extração do óleo da polpa de pequi por prensagem a frio. Os agentes encapsulantes utilizados foram amido de mandioca modificado fisicamente (Podium Alimentos – Tamboara, PR) (informações sobre o tipo de modificação física não foram cedidas pela empresa), goma arábica (Dinâmica – Indaiatuba, SP), maltodextrina DE 10 (Cargill – Uberlândia, MG) e ovoalbumina (Maxxi ovos – Indaiatuba, SP).

Métodos

Processamento do pequi

Os frutos do pequi foram escolhidos, descascados, lavados em água corrente e armazenados em freezer a -20 °C até o momento do uso. Para obter as tortas, as polpas do pequi foram retiradas manualmente dos frutos, picadas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C por 24 horas. Posteriormente, a polpa seca foi prensada em uma miniprensa hidráulica (PH 10, Nowak, Brasil) sendo aplicada uma força de 0,5 ton/cm² durante uma hora. O óleo extraído foi acondicionado em vidro âmbar e armazenado a -18 °C e a torta residual foi envolvida em papel alumínio e acondicionada em dessecador para posterior trituração.



Obtenção dos extratos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada utilizando sonda ultrassônica de potência (Sonic Ruptor 400, Omni International, Kennesaw, GA). A torta residual triturada foi misturada com solvente aquoso (1:6 m/v) e submetida a extração ultrassônica por sonda a frequência de 20 KHz, potência de 240 W e pulso de 50% durante 10 minutos (LEITE *et al.*, 2018). A amostra ultrassonicada foi passada em peneira cônica de aço inox para retirada de partículas sólidas maiores e a parte aquosa (extrato) foi utilizada na encapsulação. Para padronização, manteve-se a concentração de sólidos solúveis dos extratos a 5 ° Brix.

Mistura de extrato e agente encapsulante

Os agentes encapsulantes (amido de mandioca modificado fisicamente, goma arábica, maltodextrina e ovoalbumina) foram adicionados na concentração de 20% (m/v) do extrato. A primeira etapa do estudo foi a seleção dos melhores agentes encapsulantes e posterior mistura de dois agentes encapsulantes.

As proporções utilizadas para misturas dos agentes encapsulantes, após a seleção dos melhores resultados, foram as seguintes: 100% de amido de mandioca modificado; 100% de maltodextrina; 25% de amido de mandioca modificado e 75% de maltodextrina; 75% de amido de mandioca modificado e 25% de maltodextrina; e 50% de amido de mandioca modificado e 50% de maltodextrina. Essas proporções escolhidas para restringir porcentagens mínimas e máximas de cada agente encapsulante para estudos futuros.

A metodologia descrita por Ascheri (1999) com modificações foi utilizada no preparo da mistura com maltodextrina e goma arábica. A maltodextrina foi adicionada diretamente ao extrato e a goma arábica foi dissolvida em água destilada a 60 - 70 °C e submetida a centrifugação a 2,7171 x g por 15 minutos para retirada das impurezas e adicionada ao extrato. O amido de mandioca modificado foi submetido a gelatinização e adicionado ao extrato e a ovoalbumina foi adicionada diretamente ao extrato. As misturas de extrato e agentes encapsulantes foram homogeneizadas utilizando sonda ultrassônica com frequência de 20 KHz e potência de 200 W por 3 minutos conforme Malacrida *et al.* (2015). As amostras foram congeladas a -80 °C por 24 horas e submetidas a liofilização a temperatura de -40 °C por 48 horas.

Caracterização do material

Umidade

A umidade foi determinada gravimetricamente em estufa a 105 °C até peso constante (4 horas) (AOAC, 1995).

Rendimento

O rendimento do processo foi calculado pela Equação 1:

$$\%RD = \frac{MSF}{MSI} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

MSI = massa total de sólidos antes da encapsulação

MSF = massa total de sólidos após encapsulação

Fenólicos totais

Os fenólicos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico descrito por Singleton e Rossi (1965) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O ácido gálico foi utilizado como padrão e os teores de fenólicos totais foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de material (mg EAG/g), em base seca.

Retenção de compostos fenólicos totais

A eficiência de encapsulação foi avaliada em termos de retenção, ou seja, a porcentagem de fenólicos retida após liofilização, e calculada pela Equação 2:

$$\%RT = \frac{C_F}{C_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

C_F = Concentração de fenólicos totais (mg/g) no material após liofilização

C₀ = Concentração de fenólicos totais (mg/g) na mistura antes da liofilização

Solubilidade

A solubilidade em água foi determinada de acordo com a metodologia de Cano-Chauca *et al.* (2005).

Higroscopicidade

Os ensaios de higroscopicidade foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita por Cai e Corke (2000). A higroscopicidade foi expressa em gramas de umidade adsorvida por 100 gramas de massa seca da amostra.

Carotenoides totais

A determinação dos carotenoides totais foi feita por método espectrofotométrico descrito por Rodríguez-Amaya (1999). O coeficiente de absorvidade molar para β -caroteno utilizado foi $E=2396$.

Atividade Antioxidante (DPPH)

A atividade antioxidante foi determinada pela metodologia descrita por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995) com modificações feitas por Rufino *et al.* (2007). Este método consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Foi utilizada a Equação 3:

$$\% \text{ Inibitória} = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} * 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

$Abs_{controle}$ = amostra apenas com radical livre DPPH

$Abs_{amostra}$ = amostra com radical livre DPPH e extrato

Cor

A análise de cor foi realizada por medidas objetivas feitas com colorímetro Hunter e os valores foram calculados pelas Equações 4, 5 e 6:



$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$h^* = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\Delta E = [(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

a^* = Coordenada cromática (+a = vermelho e -a= verde)

b^* = Coordenada cromática (+b = amarelo e -b= azul)

L^* = Luminosidade

C^* = Saturação de cor

h^* = ângulo de tonalidade cromática

ΔE = Diferença global de cor

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura utilizando um microscópio eletrônico (DSM 960, Zeiss, Goettingen, Alemanha). O pó foi fixado usando fita adesiva revestida com ouro sob vácuo (Bal-Tec Sputter Coater SCD 050, Scotia, NY). O MEV foi realizado com uma voltagem de aceleração (EHT) de 30 kV e uma distância de trabalho de 8,5 mm (WD).

Análise dos resultados

Os resultados obtidos das determinações analíticas em triplicata foram avaliados estatisticamente por ANOVA com auxílio do *software* Minitab® com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas do extrato seco e extratos encapsulados. As porcentagens de umidade obtidas demonstram que os pós encapsulados são ligeiramente mais secos do que o extrato puro, demonstrando que a liofilização associada principalmente ao uso de agentes encapsulantes é uma ótima técnica de secagem, pois o baixo teor de umidade em pós preserva as propriedades iniciais, a estabilidade microbiológica e evita a degradação química do material (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Tabela 1 - Rendimento do processo, retenção de fenólicos e características físico-químicas do extrato e dos pós obtidos após liofilização com agentes encapsulantes

Formulação	Extrato	Amido de mandioca modificado	Goma Arábica	Maltodextrina	Ovoalbumina
Umidade (% b. u.)	5,7±1,25 ^a	3,5±0,71 ^{ab}	4,0±0,90 ^{ab}	3,0±0,75 ^b	3,1±0,62 ^b
Rendimento (%)	87,0±2,72 ^a	73,0±1,38 ^b	71,0±5,09 ^b	70,4±1,18 ^b	69,7±3,30 ^b
Retenção de Fenólicos (%)	100±0,00 ^a	58,1±16,67 ^b	66,1±9,37 ^b	60,1±11,30 ^b	50,1±11,26 ^b
Solubilidade (%)	62,0±0,86 ^a	67,4±0,77 ^b	84,3±1,68 ^c	84,4±1,11 ^c	67,5±2,62 ^b
Compostos Fenólicos totais (mg EAG/g)	7,6±0,47 ^a	1,18±0,30 ^b	4,4±0,50 ^c	2,3±0,12 ^d	3,5±0,53 ^c
Carotenoides totais (mg/g)	25,5±2,13 ^a	8,2±1,44 ^b	8,0±1,11 ^b	7,2±0,30 ^b	12,5±1,51 ^c
Parâmetros de cor					
<i>L</i> *	65,6±0,02 ^a	78,9±0,00 ^b	71,9±0,05 ^c	76,5±0,01 ^d	75,4±0,00 ^e
<i>a</i> *	9,1±0,02 ^a	2,5±0,00 ^b	4,4±0,00 ^c	3,0±0,00 ^d	5,5±0,01 ^e
<i>b</i> *	40,5±0,02 ^a	29,3±0,00 ^b	30,0±0,02 ^c	30,9±0,00 ^d	39,4±0,03 ^e
<i>h</i> *	77,3±0,02 ^a	85,0±0,00 ^b	81,0±0,00 ^c	84,3±0,00 ^d	82,0±0,01 ^e
<i>C</i> *	41,5±0,02 ^a	29,4±0,00 ^b	30,4±0,02 ^c	31,1±0,00 ^d	39,8±0,03 ^e

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: *a**: Coordenada cromática (+a = vermelho e -a= verde); *b**: Coordenada cromática (+b = amarelo e -b= azul); *L**: Luminosidade; *C**: Saturação de cor; *h**: Ângulo de tonalidade cromática; *ΔE*: Diferença global de cor.

Nota: Médias ± desvio padrão seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Analisando os resultados obtidos, houve diferença significativa entre os rendimentos do extrato e as demais formulações com agentes encapsulantes, essa diferença é justificada pelas perdas

de material durante o processo, uma vez que quando adicionados os agentes encapsulantes a mistura tornava-se mais viscosa, o que dificultava a transferência entre os recipientes.

A retenção de compostos fenólicos totais não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os agentes encapsulantes, apresentando valores de 50,1 a 66,1%. Assim, para a etapa posterior foram escolhidos o amido de mandioca modificado e maltodextrina. A escolha foi realizada baseada no custo e disponibilidade desses materiais. Além disso, análises de compostos fenólicos totais foram realizadas nos agentes encapsulantes puros e tanto a maltodextrina como o amido de mandioca modificado não apresentaram quantidades significativas destes compostos.

A solubilidade aumentou significativamente nos pós obtidos com agentes encapsulantes. A maior solubilidade dos materiais encapsulados é interessante devido à aplicabilidade em meios aquosos. Entre os agentes encapsulantes, a maltodextrina e a goma arábica originaram pós com maior solubilidade em água.

A adição de agentes encapsulantes decresceu significativamente as concentrações de compostos fenólicos e carotenoides totais. Os pós produzidos com goma arábica e ovoalbumina apresentaram concentrações de fenólicos totais superiores ao amido modificado e a maltodextrina. No entanto, estes materiais puros já apresentaram quantidades superiores de compostos fenólicos totais. Com relação aos carotenoides observou-se diferença significativa apenas para os pós obtidos com ovoalbumina.

Os parâmetros de cor demonstraram valores menores de a^* , valores maiores de b^* e valores de h^* próximos de 90, indicando a cor amarela característica do extrato. Os valores de L^* foram maiores nas formulações com agentes encapsulantes, resultando em amostras mais claras. A diminuição do parâmetro C^* demonstrou cores mais opacas. O uso da ovoalbumina originou extratos com coloração amarela mais intensa, o que pode ser observado pelo valor significativamente superior do parâmetro b^* . A cor amarela característica do extrato assim como dos pós deve-se a presença de carotenoides naturalmente presentes na polpa do pequi. Os pós obtidos com ovoalbumina foram os que apresentaram maior concentração desses compostos.

A Tabela 2 apresenta os resultados de rendimento do processo, retenção de fenólicos e características físico-químicas dos pós obtidos com diferentes misturas de amido de mandioca modificada (AM) e maltodextrina (MD). As proporções foram escolhidas com intuito de avaliar a combinação e também delimitar proporções para estudos futuros. Os dados das formulações de extrato com amido de mandioca modificado e maltodextrina separadamente foram dispostos com a finalidade de comparação com a mistura dos dois agentes encapsulantes.



Os rendimentos das formulações foram semelhantes com valores entre 71,6 a 76,2%. A combinação dos agentes encapsulantes apresentou um aumento na retenção dos compostos fenólicos. A melhor combinação foi de 75% AM e 25% MD que apresentou 90% de retenção, esse valor é semelhante ao relatado no estudo do Pellicer *et al.* (2019), que obtiveram uma eficiência de 87 e 88% na encapsulação de flavorizante de morango com maltodextrina e amido de milho modificado e amido de milho modificado e β -ciclodextrina, respectivamente. Embora não tenha sido verificada diferença significativa entre as diferentes formulações, os pós com maiores concentração de amido modificado apresentaram maior retenção de compostos fenólicos. Além disso, a possível interação entre os agentes encapsulantes nas proporções 75% AM e 25% MD e 50% AM e 50% MD melhoraram a retenção desses compostos.

Tabela 2 - Rendimento do processo, retenção de fenólicos e características físico-químicas dos pós obtidos com diferentes misturas de amido de mandioca modificado (AM) e maltodextrina (MD) após liofilização

Mistura	75% AM e 25% MD	50% AM e 50% MD	25% AM e 75% MD	AM	MD
Umidade (% b. u.)	3,6±0,20 ^a	3,4±0,40 ^a	3,0±0,35 ^a	3,5±0,71 ^a	3,0±0,75 ^a
Rendimento (%)	76,2±5,41 ^a	71,6±7,51 ^a	73,0±2,48 ^a	73,0±1,38 ^a	70,4±1,18 ^a
Retenção (%)	90,1±16,83 ^a	71,7±4,88 ^{ab}	56,7±1,76 ^b	58,1±16,67 ^{ab}	60,1±11,30 ^{ab}
Solubilidade (%)	70,5±4,55 ^{ab}	75,3±1,15 ^b	74,3±3,86 ^{ab}	67,4±0,77 ^b	84,4±1,11 ^c
Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	1,5 ± 0,21 ^{ab}	1,4 ± 0,06 ^a	1,6 ± 0,12 ^{ab}	1,1 ± 0,3 ^b	2,3 ± 0,12 ^c
Carotenoides totais (mg/g)	9,6±2,22 ^a	8,5±0,55 ^a	7,5±0,87 ^a	8,2±1,44 ^a	7,2±0,30 ^a

Fonte: Dos autores, 2020.

Legenda: AM: amido de mandioca modificado; MD: maltodextrina.

Nota: Médias ± desvio padrão seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As misturas apresentaram porcentagens de solubilidade semelhantes entre 70,5 - 75,3%. Estes valores foram inferiores a solubilidade dos pós obtidos apenas com maltodextrina, o que indica que a substituição de parte da maltodextrina por amido de mandioca modificado diminuiu a solubilidade dos pós. A maltodextrina possui em sua estrutura inúmeras ramificações com grupos hidrofílicos que facilitam a absorção de água (TONON *et al.*, 2009).

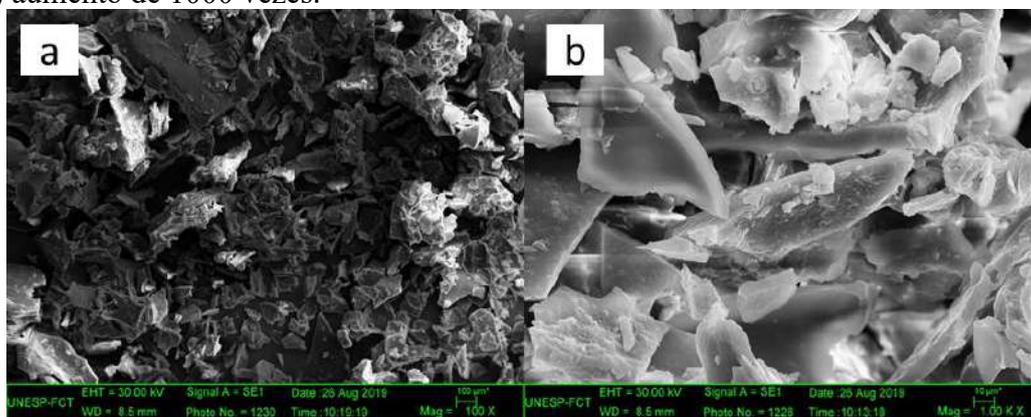
A formulação de 75% AM e 25% MD, apresentou valores globais melhores, especialmente bom rendimento do processo, elevada retenção de compostos fenólicos e concentração de

carotenoides totais, assim ela foi submetida a análises adicionais de cor, higroscopicidade, atividade antioxidante e microscopia eletrônica de varredura. Os parâmetros de cor foram: $L^* = 67,6 \pm 0,11$; $a^* = 5,40 \pm 0,03$; $b^* = 27,8 \pm 0,01$; $h^* = 79,0 \pm 0,26$ e $C^* = 28,3 \pm 0,01$, que quando comparados a formulações com apenas um carreador (amido de mandioca modificado ou maltodextrina) dispostos na Tabela 1, apresentaram diferenças significativas com diminuição da intensidade de cor amarela (parâmetro L^* , b^* , h^* e C^*).

Com relação a higroscopicidade o pó (75% AM e 25% MD) apresentou uma absorção de $10,2 \pm 1,90$ g de água/ 100 g de material (aproximadamente 10%). Segundo Tontul e Topuz (2017), pós com valores abaixo de 20% são considerados pouco higroscópicos, o que proporciona estabilidade ao material. A atividade antioxidante apresentou, para concentrações de 100 mg/mL, porcentagens de inibição de $74,75 \pm 2,03\%$ para a formulação 75% AM e 25% MD e $86,30 \pm 0,91\%$ para o extrato puro, demonstrando que mesmo com o agente carreador, a atividade antioxidante se manteve elevada. Uma vez que a concentração de fenólicos e carotenoides, compostos antioxidantes, é bem superior no extrato puro, a atividade antioxidante apresentada pelo extrato encapsulado é bastante satisfatória.

As micrografias do material liofilizado contendo 75% AM e 25% MD são apresentadas na Figura 1. O pó apresentou uma estrutura irregular e superfície lisa, parecida com vidro quebrado, sendo uma morfologia típica do processo de liofilização (BALLESTEROS *et al.*, 2017). Apenas em alguns pontos foram observadas a presença de poros. Segundo Kuck e Noreña (2016), o congelamento provoca uma rigidez estrutural, formando uma estrutura porosa e sem encolhimento, o que justifica as formas irregulares observadas em materiais liofilizados. Além disso, as diferenças nos tamanhos e formas das partículas devem-se ao processo de transformação do material seco em pó, no caso a trituração manual.

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura da amostra 75% AM e 25% AM: (a) aumento de 100 vezes; (b) aumento de 1000 vezes.



Fonte: Dos autores, 2020

Conclusão

A liofilização associada ao uso de agentes encapsulantes mostrou ser um processo satisfatório para obtenção de compostos fenólicos em pó a partir do resíduo da extração do óleo da polpa de pequi. O uso da mistura de amido de mandioca modificado (75%) e maltodextrina (25%) apresentou os melhores resultados: baixa umidade, bom rendimento do processo e alta retenção dos compostos fenólicos totais.

Agradecimentos

À CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of The Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1995.

ASCHERI, D. P. R. Estudo das características de adsorção de água e da estabilidade das microcápsulas de óleo essencial de laranja na seleção de material de parede. **Food Science and Technology**, v. 19 n. 3, 1999.

AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 177, n. 4, p. 426-436, 2013.

BALLESTEROS, L. F. *et al.* Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v. 237, p. 623-631, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1248-1252, 2000.

CANO-CHAUCA, M. *et al.* Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420-428, 2005.

DRUSCH, S.; SCHWARZ, K. Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatized starch. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 155-164, 2006.

ESTÉVEZ, M. *et al.* Encapsulation of grape seed phenolic-rich extract within W/O/W emulsions stabilized with complexed biopolymers: evaluation of their stability and release. **Food Chemistry**, v. 272, p. 478-487, 2019.

FARRAG, A. *et al.* Microencapsulation of grape phenolic compounds using whey proteins as a carrier vehicle. **Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 7, p. 373-380, 2018.

GIBIS, M. *et al.* Interaction of polyphenols and multilayered liposomal-encapsulated grape seed extract with native and heat-treated proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 119-131, 2014.

GOLTZ, C. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) extracts. **Industrial Crops & Products**, v. 115, p. 227-234, 2018.

HELENO, S. A. *et al.* Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2015.

KRUMREICH, F. *et al.* Physicochemical analysis and bioactive compounds stability of uvaia pulp powder obtained by drying methods and addition of maltodextrin and Arabic gum. **Revista Thema**, v. 13, n. 2, p. 4-17, 2016.

KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569-576, 2016.

LEITE, A. C. M. *et al.* Aplicação de ultrassom na extração de compostos fenólicos de resíduo do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB.). In: VI SIMPÓSIO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2018, São José do Rio Preto. Anais [...] São José do Rio Preto: UNESP, 2018.

MALACRIDA, C. R. *et al.* Freeze-drying for microencapsulation of turmeric oleoresin using modified starch and gelatin. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 1710-1719, 2015.

MARIANO, R. G. B. **Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) por processos convencionais combinados com tecnologia enzimática.** 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

NESTERENKO, A. *et al.* Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469-479, 2013.

OLIVEIRA, M. N. S. *et al.* Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 380-386, 2006.

PELLICER, J. A. *et al.* Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed. **Powder Technology**, v. 347, p. 179-185, 2019.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76-83, 2016.

REIS, A. F.; SCHMIELE, M. Characteristics and potentialities of Savanna fruits in the food industry. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, e2017150, 2019.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A. **Guide to Carotenoid Analysis in Food**. Washington, USA: International Life Sciences Institute Press, 1999.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela captura do radical livre DPPH**. Concórdia: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 127).

SANTOS, F. S. *et al.* A cultura do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB.), **Acta Iguazu**, v. 2, n. 3, p. 46-57, 2013.

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

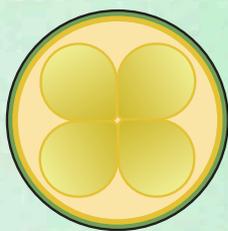
TONON, R. *et al.* Physicochemical and morphological characterization of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 1950-1958, 2009.

TONTUL, I.; TOPUZ, A. Spray-drying of fruit and vegetable juice: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 63, p. 91-102, 2017.

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; JUNIOR, M. R. M. Phenolic compounds: structure, classification, e antioxidant power. In: **Bioactive Compounds**, Chapter 2, p. 33-50, 2019. Woodhead Publishing.

YADAV, K. *et al.* Encapsulation of grape seed extract phenolics using whey protein concentrate, maltodextrin and gum arabic blends. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 426-434, 2019.

ŽIVKOVIĆ, J. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 194, p. 40-47, 2018.



SIMEALI

IV Simpósio de Engenharia
de Alimentos

www.simeali.com

ORGANIZAÇÃO:

ICA
INSTITUTO
DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

APOIO:

Embrapa
Agroindústria de Alimentos

UFG
UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS

ZEA USP
Universidade de São Paulo

CRQ - MG
ENSINO - PESQUISA
TECNOLOGIA - ENGENHARIA

ISBN: 978-65-88389-07-2



9 786588 389072