



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**



DISSERTAÇÃO

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROCESSAMENTO E
ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS AGRÍCOLAS**

**PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA COM
BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU: INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE
ÁGUA E FONTE DE NITROGÊNIO**

SIUMARA RODRIGUES ALCÂNTARA

Campina Grande - Paraíba

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JANEIRO 2008

SIUMARA RODRIGUES ALCÂNTARA

**PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA COM
BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU: INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE
ÁGUA E FONTE DE NITROGÊNIO**

**Dissertação apresentada ao curso de pós-
graduação em Engenharia Agrícola do
Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
da Universidade Federal de Campina
Grande, em cumprimento às exigências
para a obtenção do grau de Mestre.**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Armazenamento e Processamento de Produtos
Agrícolas

ORIENTADORES:

Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida

À Deus,

Aos meus pais,

As minhas irmãs,

Ao meu namorado.

AGRADECIMENTO

Agradeço á Deus pela força e coragem para enfrentar e conseguir realizar mais uma etapa da minha vida. Porém, nada disso seria possível sem a presença constante de pessoas que me deram muito mais do que apoio.

Agradeço ao meu pai Ronildo e a minha mãe Nilda pelos conselhos dados nas horas mais difíceis, pelas reclamações ouvidas, pelo estresse solidário.

Agradeço as minhas irmãs Ana Carolina, pela energia e alegria constantes, e Clênia, uma vez que, mesmo distante em um período desse processo, sempre se mostrou presente, vibrante e confiante.

Agradeço ao meu namorado Ivonaldo pelos momentos de descontração, pela preocupação e interesse em meu trabalho, pelo carinho, compreensão e incentivo.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva e Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso de Almeida pela orientação e amizade dispensadas.

Agradeço a Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, aos velhos e novos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química pela colaboração constante e aos amigos e professores do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola.

Agradeço a CAPES pela bolsa de incentivo.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1	INTRODUÇÃO	01
1.2	OBJETIVO	04
1.2.1	OBJETIVO GERAL	04
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	04

CAPÍTULO 2

	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1	FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA	05
2.1.1	HISTÓRICO DA FSS	06
2.1.2	TRABALHOS RELACIONADOS A FSS DESENVOLVIDOS NO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA QUÍMICA (LEB)/UFCG	06
2.1.3	FATORES QUE INFLUENCIAM A FSS	08
2.1.4	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE FONTE DE NITROGÊNIO NA FSS	09
2.1.5	QUANTIDADE DE ÁGUA NO MEIO FERMENTATIVO	10
2.2	MÉTODO GRAVIMÉTRICO ESTÁTICO: SOLUÇÕES SATURADAS DE SAIS	11
2.3	ISOTERMAS DE SORÇÃO	12
2.4	CAJU	13
2.5	PECTINASES	15
2.6	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 ^K	16
2.7	ESTADO DA ARTE	17
2.7.1	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	18
2.7.2	FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA	19

CAPÍTULO 3

	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	MICROORGANISMO	22
3.2	SUBSTRATO	22
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO	23
3.3.1	GRANULOMETRIA	23
3.3.2	DENSIDADE APARENTE	23
3.3.3	PH	23

3.3.4	UMIDADE	24
3.3.5	CINZAS	24
3.3.6	TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX)	24
3.3.7	TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES (AR)	25
3.3.7.1	CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES E ABSORBÂNCIA	25
3.3.7.2	ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES NAS AMOSTRAS	25
3.3.8	TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART)	26
3.3.9	PECTINA	27
3.3.10	PROTEÍNA BRUTA	28
3.3.10.1	REATIVO DE NESSLER	28
3.3.10.2	DIGESTÃO SULFÚRICA	28
3.3.10.3	CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO COM ABSORBÂNCIA	29
3.3.10.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA NA AMOSTRA	29
3.4	OBTENÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO: METODOLOGIA DOS SAIS SATURADOS	30
3.4.1	PREPARO DOS RECIPIENTES DE PESAGEM	30
3.4.2	PREPARO DAS AMOSTRAS DO PRODUTO	30
3.4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES SATURADAS DE SAIS	31
3.4.4	DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DE EQUILÍBRIO DO PRODUTO	32
3.4.5	AJUSTE DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	33
3.5	CÁLCULO DO CALOR ISOSTÉRICO DE ADSORÇÃO	34
3.6	PROCESSO FERMENTATIVO	35
3.6.1	INÓCULO	35
3.6.2	PREPARO DO MEIO FERMENTATIVO	37
3.6.3	EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS	37
3.6.4	MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	38
3.6.4.1	ATIVIDADE PECTINOLÍTICA	38
3.6.4.2	ATIVIDADE POLIGALACTURONÁSICA	39
3.7	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL	40

CAPÍTULO 4

	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO SECO DO PEDÚNCULO DO CAJU	42
4.2	CONSTRUÇÃO E AJUSTE DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DO PEDÚNCULO DE CAJU SECO	46
4.3	CALOR ISOSTÉRICO DE ADSORÇÃO	53
4.4	ESTUDO DA FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA: INFLUÊNCIA DA UMIDADE E DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO NO MEIO	56
4.4.1	ENSAIOS PRELIMINARES: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL	56
4.4.2	CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES	61
4.4.3	VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA UMIDADE INICIAL E CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBSERVADAS	67
4.4.4	VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA UMIDADE INICIAL E DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO SOBRE OS PICOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	74

CAPÍTULO 5

	CONCLUSÕES	79
--	-------------------	-----------

CAPÍTULO 6

	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
--	-----------------------------------	-----------

Anexos

LISTA DE ABREVIATURAS

$\%R^2$	Percentual de variância observada pelo modelo empírico
a	Parâmetro das equações de ajuste
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância
AR	Concentração de açúcares redutores (g/g)
ART	Concentração de açúcares redutores totais (g/g)
aw	Atividade de água
b	Parâmetro das equações de ajuste
BET	Modelo de ajuste de isotermas de sorção segundo Brunauer-Emmett-Teller (BRUNAUER et al., 1938)
C	Constante da Equação de BET
C_G	Constante da Equação de GAB
C_L	Constante da Equação de BET linear
curv	Termo que considera efeito da curvatura no modelo empírico
D	Densidade aparente
DNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMPARN	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte
EMPASA	Empresa de Abastecimento e Serviços Agrícolas
F. ajuste	Falta de ajuste
F cal	Valor de F calculado para o Teste F
FSm	Fermentação submersa
FSS	Fermentação semi-sólida
F tab	Valor tabelado de F
GAB	Modelo de ajuste de isotermas de sorção segundo Guggenheim-Anderson-de Boer (VAN DEN BERG, 1985)
GL	Grau de liberdade
k	Constante da Equação de GAB
LAPPA	Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas
LCC	Líquido da castanha de caju

LEB	Laboratório de Engenharia Química
MQ	Média quadrática
n	Número de camadas moleculares (Equação de BET)
N	Concentração de sulfato de amônio
P	Desvio percentual médio
PG23	Atividade poligalacturonásica às 23 h de fermentação
PG	Atividade poligalacturonásica
PPG	Pico da atividade poligalacturonásica
PPt	Pico da atividade pectinolítica
Pt	Atividade pectinolítica
q _{st}	Calor isostérico líquido
Q _{st}	Calor isostérico total
R ²	Coefficiente de determinação
SS	Teor de sólidos solúveis
SQ	Soma quadrática
U	Umidade inicial do meio
T	Temperatura absoluta
t	Tempo de fermentação
t(s)	tempo de escorrimento da amostra de pectina em viscosímetro
x _{eq}	Umidade de equilíbrio
X _m	Umidade na monocamada

LISTA DE TABELAS

1	Curva padrão para análise de proteína bruta	29
2	Umidades relativas de equilíbrio de soluções de sais saturadas a várias temperaturas (ROCKLAND, 1960)	31
3	Preparo das soluções saturadas dos sais (SPIESS & WOLF, 1987)	32
4	Equações para o ajuste das isotermas de adsorção de água no bagaço do pedúnculo do caju seco	34
5	Níveis das variáveis do planejamento experimental fatorial	40
6	Matriz do planejamento experimental fatorial 2 ²	41
7	Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo do caju	42
8	Valores de atividade de água e umidade de equilíbrio do pedúnculo de caju seco	46
9	Parâmetros de ajuste das isotermas de adsorção do pedúnculo do caju seco aos modelos testados	47
10	Valores resultantes do cálculo de $\ln a_w$ para várias umidades de equilíbrio	54
11	Resultado das regressões lineares das curvas do calor de adsorção em função das umidades de equilíbrio	54
12	Atividade poligalacturonásica dos ensaios realizados segundo planejamento fatorial 2 ²	68
13	Atividade pectinolítica dos ensaios realizados segundo planejamento fatorial 2 ²	68
14	Modelos empíricos para atividade poligalacturonásica em cada tempo de fermentação	69
15	Modelos empíricos para atividade pectinolítica em cada tempo de fermentação	69
16	Análise de variância (ANOVA) para Equação 22: tempo de fermentação 23 horas e atividade poligalacturonásica como resposta observada	71
17	Modelos empíricos para atividade poligalacturonásica (PG) considerando o efeito da curvatura	72
18	Modelos empíricos para atividade pectinolítica (Pt) considerando o	73

	efeito da curvatura	
19	Picos da atividade poligalacturonásica seguindo planejamento experimental fatorial 2^2	74
20	Picos da atividade pectinolítica seguindo planejamento experimental fatorial 2^2	75
21	Modelos empíricos para os picos das atividades poligalacturonásica (PPG) e pectinolítica (PPt)	75
22	Modelos empíricos para os picos das atividades poligalacturonásica (PPG) e pectinolítica (PPt) considerando efeito da curvatura	76
23	Análise de variância (ANOVA) para a Equação 23: pico da atividade poligalacturonásica	77

LISTA DE FIGURAS

1	Regiões da isoterma de sorção (MATHLOUTHI, 2001)	13
2	Caju (<i>Anacardium occidentale L.</i>) (VIVENCIA ANDINA VIAJES, 2006)	15
3	Recipiente hermético contendo amostras do pedúnculo de caju seco (SILVA et al., 2002)	32
4	Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo do caju	45
5	Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de BET	48
6	Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de GAB	48
7	Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de Oswin	49
8	Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de Henderson	49
9	Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de Smith	50
10	Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de BET linear	50
11	Modelo de GAB para isotermas de adsorção do pedúnculo de caju seco	51
12	Curvas de $\ln a_w$ versus $1/T$	54
13	Calor isostérico de adsorção versus umidade de equilíbrio	55
14	Efeito da adição da fonte de nitrogênio na umidade durante fermentação	57
15	Efeito da adição da fonte de nitrogênio no pH durante fermentação	58
16	Efeito da adição da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares redutores (AR) durante fermentação	59
17	Efeito da adição da fonte de nitrogênio na atividade poligalacturonásica ao resíduo de caju	60
18	Comportamento cinético da atividade de água (a_w)	62
19	Comportamento cinético da umidade do meio de cultivo	63

20	Comportamento cinético da concentração de açúcares redutores (AR)	64
21	Comportamento cinético da atividade poligalacturonásica (PG)	65
22	Comportamento cinético da atividade pectinolítica (Pt)	66
23	Comportamento cinético do pH	67
24	Superfície de resposta para atividade poligalacturonásica às 23 horas de fermentação (PG23)	71
25	Superfície de resposta para o pico da atividade poligalacturonásica (PPG)	77

RESUMO

Dentre as diversas influências observadas no processo de fermentação semi-sólida, a atividade de água é um dos fatores mais importantes, pois está diretamente relacionada com a quantidade de água disponível ao microrganismo responsável pela síntese do produto. Assim, objetivou-se a produção de pectinases, usando o pedúnculo de caju seco como meio e o *Aspergillus niger* CCT 0916 como microrganismo, em um processo fermentativo semi-sólido, verificando a influência da quantidade de água e uma fonte de nitrogênio. Com isso, fez-se a caracterização físico-química do resíduo, o levantamento e ajuste das isotermas de adsorção, o cálculo do calor isostérico total e, verificou-se a influência da umidade inicial e a concentração de sulfato de amônio no meio através da execução de um planejamento fatorial 2^2 . Observou-se que a caracterização do pedúnculo indicou a necessidade do ajuste da concentração de açúcares redutores e da pectina. O modelo de GAB foi o que melhor ajustou as isotermas de adsorção. A atividade poligalacturonásica máxima foi obtida com atividade de água entre 0,99 e 1,00 e a atividade pectinolítica foi obtida com atividade de água igual a 0,99. Ocorreu inibição pela presença do sulfato de amônio no meio fermentativo com concentrações a partir de 1,5%, tendo apresentado efeito negativo sobre as atividades enzimáticas observadas. Diferentemente da umidade inicial que apresentou efeito positivo sobre as mesmas. Os maiores valores de atividade enzimática foram 11 U/g. Constatou-se também que o bagaço seco do pedúnculo do caju é um substrato competitivo perante outros descritos na literatura.

Palavras-chave: isoterma de adsorção, *Aspergillus niger*, sulfato de amônio, poligalacturonase

ABSTRACT

The water activity is one of the most important factor in this process, because it is related with the quantity of available water for the microorganism responsible for the synthesis of the product because the larges quantities of the agro industrial residues. In this context, this work has the objective the production of pectinases, using the cashew peduncle like substratum and the *Aspergillus niger* CCT 0916 like microorganism, in a solid-state fermentation process, checking the influence of water quantity and nitrogen source. It had done the physiochemical characterization of the residue, the construction and adjusts of the adsorption isotherms, the calculation of the isosteric heat and had checked the influence of the initial moisture and the ammonium sulphate concentration in the medium by factorial design. It observed that the peduncle characterization showed the necessity of adjust of reducing sugar and pectin. The best equation to fit the adsorption isotherms were GAB model. The maximum poligalacturonase activity was obtained with water activity between 0.99 and 1.00. The maximum pectinolytic activity was obtained with 0.99 of water activity. It was observed that occurred inhibition in the medium by presence of ammonium sulphate with concentration equal and over 1.5%. This variable showed negative effect on enzymatic activity. In the other hand, the inical moisture showed positive effect on the same response. The most values of enzymatic activity were 11 U/g. It had evidenced that the dry bagasse of the cashew peduncle is a competitive substratum.

Key-words: adsorption isotherm, *Aspergillus niger*, ammonium sulphate, poligalacturonase

CAPÍTULO 1

1.1 - INTRODUÇÃO

PINTO et al. (2006) definem as fermentações em meio semi-sólido (FSS) como sendo o processo em que há crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde a quantidade de líquido apresenta um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e o metabolismo dos microrganismos, mas não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz.

O uso de meio semi-sólido pode ser vantajoso por permitir a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais (farelos, cascas e bagaços) como substrato, o que representa, no Brasil, matéria-prima abundante e de baixo custo.

Sendo em substrato sólido, a atividade de água é uma variável de vital importância no estudo do processo. Este parâmetro indica se o microrganismo poderá crescer através da fermentação. SANTIN (1996) afirma que o crescimento dos microrganismos depende da atividade de água, em razão da influência da pressão osmótica sobre as trocas, através da membrana celular.

A atividade de água pode ser relacionada à umidade do substrato através de isotermas de sorção para uma dada temperatura. Esta curva é construída usando-se métodos como o gravimétrico estático (KUROZAWA et al., 2005; KAYA & KAHYAOGU, 2007) e equipamentos como o higrômetro (ARAÚJO et al., 2005b; SILVA et al., 2006).

No método gravimétrico estático, uma pequena e fina camada da amostra é colocada em um recipiente. Este recipiente é colocado em um pote hermético onde a umidade relativa é fixada com soluções saturadas de sais (MATHLOUTHI, 2001).

O conhecimento e a compreensão das isotermas dos alimentos, de modo geral, são de grande importância na área de tecnologia e de ciências dos alimentos para a resolução de muitos problemas, tais como: avaliação e caracterização das ligações da água; análise do calor de sorção; otimização de processos, como o de secagem; avaliação de problemas de estocagem e embalagem; e na estimativa da estabilidade microbiológica, química e física dos alimentos (DITCHFIELD, 2000). Em relação à FSS, as isotermas podem ser

aplicadas quando a relação da atividade de água mínima de crescimento do microrganismo e produção de produtos com a umidade do meio fermentescível.

As pectinases são uma das enzimas mais utilizadas na indústria de alimentos, principalmente, na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas; na produção de alimentos para bebês; na indústria de fermentados como, por exemplo, na fermentação do café, do cacau e do fumo; na extração de óleo vegetal; e, em uso simultâneo com as celulasas e hemicelulasas, no tratamento de biomassa celulósica. Além disso, são utilizadas na indústria têxtil para maceração do linho e tratamento de fibras têxteis brutas como a juta e o rami.

De forma geral, as pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são as responsáveis pela degradação das substâncias pécticas, sendo produzidas somente por vegetais e microrganismos. Estas estão também envolvidas nos processos fisiológicos e patológicos dos vegetais (HENNIES, 1996).

O uso da fermentação semi-sólida para a produção de pectinases tem sido proposto usando diversos resíduos agroindustriais como substrato: farelos de trigo e de soja, bagaços de laranja, cana-de-açúcar, maçã, entre outros (COUTO & SANROMÁN, 2006). No estudo que será desenvolvido, propõe-se a utilização do bagaço do pedúnculo do caju seco como substrato para o processo de fermentação.

Observa-se que o cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é considerado uma das frutíferas mais importantes e de ampla distribuição nos trópicos. No Brasil, a área ocupada com esta frutífera é estimada em 700.000 ha dos quais, mais de 90% se encontra na região Nordeste e, 80% estão distribuídos nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (EMBRAPA, 2006).

Dentro do contexto mundial, o Brasil se insere como o segundo produtor de castanhas de caju, ficando abaixo apenas da Índia, com produção da castanha de caju da ordem de 150 mil toneladas anuais, proporcionando 30 mil toneladas de amêndoas e divisas em torno de 140 milhões de dólares (EMPARN, 2006).

O caju, fruto do cajueiro, tem duas partes: o fruto propriamente dito, que é a castanha, e o pseudofruto, chamado cientificamente pedúnculo floral, que é a parte comumente vendida como a fruta. Este é muito rico em vitamina C.

No Brasil consomem-se pedúnculos do fruto, amêndoa e o líquido extraído da castanha (LCC – resina líquida cáustica). No entanto, quase toda a produção desses dois últimos são exportadas.

O desperdício do pedúnculo do caju é apontado como sendo de 85% (KISS, 2005). Sendo assim, o aproveitamento integral do pedúnculo é uma meta a ser atingida aliada à promoção comercial.

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, como o FSS, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Diante do exposto, propõe-se a utilização do bagaço seco do pedúnculo do caju como substrato na produção de pectinases através de um processo de fermentação semi-sólida, tendo como motivação o estudo de alternativas que venham a valorizar a cultura do caju, aumento sua importância para o desenvolvimento da região nordestina.

1.2 – OBJETIVOS

1.2.1 – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo da produção de pectinases (cinética fermentativa) usando como meio o pedúnculo do caju e como agente da fermentação o microrganismo *Aspergillus niger* CCT 0916, verificando-se a influência de parâmetros, como a umidade inicial e a concentração de sulfato de amônio do meio fermentado.

1.2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização físico-química do bagaço do pedúnculo do caju: granulometria, densidade aparente, sólidos solúveis, pH, umidade, cinzas, açúcares redutores totais (ART), açúcares redutores (AR), proteína bruta e pectina;

- Levantamentos das isotermas de adsorção do bagaço seco do pedúnculo do caju nas temperaturas usuais de fermentação (25, 30, 35 e 40⁰C), utilizando o método gravimétrico estático. O ajuste dessas isotermas com as diversas equações encontradas na literatura e o cálculo do calor isostérico de adsorção;

- Aplicação do planejamento experimental para verificação da influência de variáveis de entrada sobre respostas de interesse no processo de fermentação semi-sólida para produção de pectinases, considerando como variáveis de entrada a umidade do meio e a concentração de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) e como resposta a atividade enzimática.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

A FSS também apresenta as seguintes características (PINTO et al., 2006):

- ✓ A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas;
- ✓ O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas;
- ✓ O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas aos do habitat natural;
- ✓ O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

Estudos da produção de enzimas por fungos na FSS têm mostrado repetidamente que esta, em comparação com a fermentação submersa (FSm), é menos propensa a problemas com inibição do substrato e produz enzimas com alta estabilidade quanto à temperatura e ao pH; o tempo de fermentação pode ser menor em relação aos encontrados na literatura e a degradação das enzimas por proteases é minimizada (HÖLKER et al., 2004). Além disso, HESSELTINE (1972) acrescenta outras vantagens como, por exemplo, simplicidade no preparo do meio de fermentação, uma vez que se necessita normalmente apenas do ingrediente principal e de água para umedecimento; possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido como matéria-prima; menor necessidade de espaço e pouca complexidade dos equipamentos; e maiores rendimentos e concentração mais alta do produto desejado, barateando as normalmente onerosas etapas de *downstream processing*.

As vantagens ecológicas da FSS refletem o fato de que os processos são conduzidos sem excesso de água livre, o que resulta em um consumo mínimo de água, uma baixa produção de água efluente e eliminação da necessidade do uso de agentes anti-espumantes.

Outro aspecto favorável da FSS é que, em muitos casos, pode-se usar resíduos agrícolas como fonte de carbono e energia (HÖLKER & LENZ, 2005; PINTO et al., 2006; DEL BIANCHI et al., 2001).

Por outro lado, as maiores desvantagens são as dificuldades no monitoramento e controle dos parâmetros da fermentação como o conteúdo de biomassa, pH, temperatura, umidade e dificuldades na manutenção da temperatura e umidade especialmente em larga escala (HAMIDI-ESFAHANI et al., 2004).

2.1.1 – HISTÓRICO DA FSS

Esse processo é conhecido desde tempos antigos, e diferentes fungos têm sido cultivados por FSS para produção de alimentos.

Exemplos de alimentos que necessitavam de alguma forma da fermentação em estado sólido: a produção de molho de soja, em 1000 a.C., e a de "Chiang", entre 1500 e 500 a.C., os quais eram obtidos a partir da modificação enzimática do meio utilizando-se o "Koji", ambos sendo produzidos há milênios na China.

No ocidente, o primeiro relato atribui-se a Plínio, no séc. I d.C., que descreveu a maturação de um queijo do tipo Roquefort utilizando fungos (PINTO et al., 2006).

Em tempos mais recentes, também no ocidente, a partir dos anos 40, a FSS tem competido com a FSm, devido à necessidade de se produzir antibióticos em larga escala.

Desde 1986, aqui no Brasil, uma série de pesquisas para adicionar valor comercial a produtos tropicais agrícolas e subprodutos utilizando-se da FSS tem sido desenvolvida exatamente pela grande quantidade desses resíduos que são gerados no país (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Cada vez mais pesquisadores têm se voltado para a FSS, o que corresponde estudos para produção de enzimas, essências alimentícias, corantes entre outras substâncias de interesse para a indústria de alimentos (ROBINSON & NIGAM, 2003).

2.1.2 – TRABALHOS RELACIONADOS A FSS DESENVOLVIDOS NO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA (LEB)/UFMG

ARAÚJO et al. (2005a) fizeram o enriquecimento protéico da raquete da palma forrageira em meio semi-sólido. Três variáveis de cultivo foram usadas: concentração do inóculo *Saccharomyces cerevisiae* (5, 10 e 15%), espessura da camada de substrato (2, 4 e 6 cm) e temperatura (30, 34 e 38 °C). Os autores observaram que a quantidade máxima de proteína, nas condições estudadas, foi maior do que 26%, que é compatível ou melhor do

que as concentrações convencionais de suplemento protéico usadas para alimentação animal. A concentração de proteína raquete da cactácea teve uma alta digestibilidade *in vitro* (95,8%).

CAMPOS et al. (2005) fizeram o enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo do caju, por cultivo semi-sólido, usando diferentes concentrações da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As concentrações da levedura adicionada foram 8, 12 e 16% e as temperaturas do cultivo usadas foram 30, 33 e 36 °C. Estes autores observaram que o maior aumento protéico foi alcançado após 28 h de cultivo (20,25%) e concluíram que a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* através do cultivo semi-sólido no bagaço do pedúnculo do caju viabiliza a obtenção de um concentrado protéico, que poderá posteriormente ser utilizado como fonte de alto potencial em ração animal.

SANTOS (2007) estudou a produção de pectinases através da FSS, usando como substrato o pedúnculo de caju seco e como agente da fermentação o microrganismo *Aspergillus niger* CCT 0916. Este autor observou a influência da umidade inicial e a suplementação do meio com uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) e uma fonte de fósforo (fosfato de potássio monobásico). Como meio de cultivo foram utilizados dois tipos de resíduos de pedúnculo de caju: sem lavar e lavado. A caracterização físico-química dos resíduos mostrou composições diferentes, principalmente em relação aos teores de açúcares e pectina. Para o resíduo sem lavar os picos da atividade poligalacturonásica (16 U/g) e da redução da viscosidade (82%) foram sob as condições de 40% b.u de umidade e 1% de nitrogênio sem adição de fósforo, às 30 h de fermentação. Para o resíduo lavado, os picos de produção enzimática ocorreram sob as mesmas condições dos picos obtidos com o resíduo sem lavar. O pico de atividade poligalacturonásica foi de 9,84 U/g e o percentual de redução de viscosidade foi igual a 81% às 22 h de fermentação.

Neste trabalho, SOUZA et al. (2007), utilizando a casca e o albedo do maracujá, fizeram a caracterização físico-química deste material com o objetivo de posterior utilizá-lo em processo de produção de pectinases através da FSS. Estes autores observaram que as concentrações de pectina e açúcares redutores foram iguais a 15,1% e 6,7%, respectivamente. Além disso, construíram a isoterma de adsorção na provável temperatura de fermentação (30 °C) para avaliar a atividade de água do resíduo e constataram que o modelo de GAB foi o que melhor representou os dados experimentais.

2.1.3 – FATORES QUE INFLUENCIAM A FSS

A natureza do substrato sólido empregado é um dos mais importantes fatores que afetam a FSS. Esta seleção depende seriamente dos fatores intimamente relacionados com o custo e a viabilidade e, ainda, pode envolver o armazenamento de resíduos agroindustriais (COUTO & SANROMÁN, 2006).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo da FSS quanto à escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo, favorece a formação de enzimas (SANTOS et al., 2005a). Nesse sentido, faz-se obrigatória a caracterização do substrato utilizado no processo, sendo que as análises que devem ser feitas estão relacionadas com as variáveis que afetam o processo em questão.

A estrutura destes materiais tem como seus principais componentes a celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas; o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos. A heterogeneidade dos substratos não diz respeito apenas às variações existentes entre diferentes lotes de matéria-prima utilizada, mas também às variações na estrutura química de cada uma das moléculas presentes e à proporção entre os diferentes componentes, que podem variar de acordo com a espécie e tecido vegetal. Desta forma, cada substrato, com potencial de uso em FSS, deve ser cuidadosamente avaliado (PINTO et al., 2006).

Dentre os principais fatores importantes para o crescimento microbiano e para a atividade do substrato está o tamanho da partícula. Geralmente, substratos com partículas pequenas promovem uma área superficial maior para a ação microbiana, mas se o tamanho da partícula for muito pequeno, pode ocorrer à aglomeração do substrato, dificultando assim o crescimento microbiano. Por outro lado, partículas grandes promovem maior espaço entre as partículas, embora possua área superficial menor, o que dificultaria a ação do microrganismo (PANDEY et al., 1999; SANTOS et al., 2005a).

A temperatura é considerada um fator crítico, assim como a umidade e a atividade de água, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado durante a fermentação, que afeta diretamente a germinação dos microrganismos e a formação do produto. No processo de compostagem, este efeito é desejável, porém, para processos biotecnológicos, como a produção de enzimas, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada (DEL BIANCHI et al.,

2001; PINTO et al., 2006).

O controle do pH durante a FSS dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e a consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca desse parâmetro, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação (DEL BIANCHI et al., 2001).

A quantidade de ar a ser introduzida no processo vai depender da natureza dos microrganismos, da quantidade de calor metabólico a ser dissipado, da espessura da camada de substrato, da quantidade de CO₂ e outros metabólitos voláteis a serem eliminados e da necessidade de oxigênio para a síntese dos produtos.

Porém, a taxa de aeração está diretamente relacionada ao desenvolvimento do fenômeno da secagem, que é indesejável em todos os sistemas da FSS, uma vez que a desidratação do meio faz com que a transferência de nutrientes e metabólitos seja lenta ou nula, que a pressão osmótica do meio aumente e se acelere o processo de esporulação.

O desenvolvimento microbiano requer um grande consumo de oxigênio, portanto, a passagem forçada de ar através do meio permite elevadas taxas de crescimento e produtividade.

Quanto à agitação, o emprego da mesma pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer tanto a transferência gasosa pela exposição de partículas de substrato à atmosfera do fermentador como a troca de calor dentro do meio. Porém, devido à fragmentação mecânica do micélio, pode interferir na formação dos esporos e no desenvolvimento natural do microrganismo. Além disso, a agitação pode causar a compactação do meio e a danificação das hifas.

2.1.4 – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO NA FSS

Um fator bastante importante na produção de pectinases através da fermentação semi-sólida é a composição do meio de cultivo.

O balanço apropriado entre as fontes de nitrogênio é importante para o requerimento nutricional do microrganismo, tanto quanto os efeitos das condições do ambiente, que afetam o crescimento micelial (RAIMBAULT et al., 1977).

NOOMHORM et al. (1992) observaram o efeito de vários fatores na produção de proteína através da fermentação em estado sólido usando como microrganismo o *Aspergillus niger* e como substrato a mandioca. Dentre os fatores observados, tem-se a razão entre sulfato de amônia e uréia no meio. Verificou-se que o substrato contendo 10:10 (massa em gramas de sulfato de amônia: massa em gramas de uréia por kg de meio) teve maior produção de proteína. O tratamento com maior concentração de sulfato de amônio em relação à concentração de uréia (20:10) não provocou efeito significativo na assimilação do nitrogênio pelo microrganismo e produziu o resultado com menor conteúdo de proteína. O que indica que há uma faixa de tolerância pelo microrganismo para a concentração deste nutriente.

2.1.5 – QUANTIDADE DE ÁGUA NO MEIO FERMENTATIVO

A água presente no sistema é um fator importantíssimo. E essa quantidade de água está relacionada com o meio através de duas variáveis: a umidade e a atividade de água.

A umidade diz respeito à percentagem de água na massa total do meio. E a determinação do seu valor no processo está intimamente relacionada com a natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado (DEL BIANCHI et al., 2001; PINTO et al., 2006).

Segundo DEL BIANCHI et al. (2001), se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do substrato e irá resultar em uma menor difusão de oxigênio no interior do meio e, conseqüentemente, no decréscimo de trocas gasosas, além de aumentar o risco de contaminação, principalmente a bacteriana.

Para níveis de umidade menores que o necessitado pelo microrganismo, haverá maior dificuldade na difusão de nutrientes, resultando em um menor crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, uma menor produção do produto desejado.

O parâmetro atividade de água (a_w) fornece a quantidade de água não ligada viável à disposição dos microrganismos. Ela é definida como a razão entre a pressão de equilíbrio de vapor do substrato em relação à água pura, à mesma temperatura (DEL BIANCHI, 2001).

Segundo PINTO et al. (2006), para um processo fermentativo em meio semi-sólido, os fungos filamentosos, como o *Aspergillus niger*, por exemplo, são os mais adaptáveis a este tipo de processo, uma vez que são capazes de crescerem com pouca água e muitos

sólidos presentes, além da própria forma de crescimento por meio de hifas, o que favorece a colonização do meio. Sendo em torno de 0,7 o valor da atividade de água mínima para o desenvolvimento de suas atividades metabólicas.

Segundo GERVAIS & MOLIN (2003), considerando uma visão macroscópica do crescimento microbiano, a taxa da extensão radial da colônia é uma função da atividade de água do meio e, como tal, observa-se uma dependência linear com o tempo.

TARAGANO & PILOSOFF (1999) otimizaram os parâmetros atividade de água, pH e tempo de fermentação em um processo de FSS com o *Aspergillus niger* 148 e observaram como resposta a atividade pectinolítica. As condições ótimas obtidas para o processo foram: pH entre 6,5 e 7,0; atividade de água inicial entre 0,93 e 0,94; com dois dias de fermentação.

2.2 – MÉTODO GRAVIMÉTRICO ESTÁTICO: SOLUÇÕES SATURADAS DE SAIS

Os métodos mais difundidos para a determinação da atividade de água são os que utilizam as soluções de ácido sulfúrico, as soluções insaturadas e saturadas de sais e ainda os equipamentos como o Novacina.

As soluções saturadas de sais são consideradas como as mais adequadas, porque podem liberar ou adsorver água sem sofrer alteração da sua umidade relativa de equilíbrio, apesar de não haver concordância unânime entre os pesquisadores quanto ao valor exato da aw de muitos sais (CHIRIFE & RESNIK, 1984).

Porém, é importante observar alguns aspectos, como por exemplo, as soluções alcalinas que podem vir a ser usadas, podem absorver dióxido de carbono, com o passar do tempo, o que diminui a aw. Já outras soluções se degradam facilmente, como os acetatos e iodetos, o que conseqüentemente vêm a modificar suas características.

A solução deve ser uma pasta com excesso de cristais. Todo o fundo do recipiente deve ser coberto pela solução. Os cristais não podem estar acima da camada de líquido, e essa, por sua vez, não deve ter uma espessura maior do que 1,5 – 2 mm. A solução deve ser preparada numa temperatura igual ou maior que a do levantamento da isoterma, uma vez que a solubilidade de muitos sais aumenta significativamente com a temperatura, e uma solução aparentemente saturada pode ter sua aw alterada com o aumento da temperatura (DITCHFIELD, 2000).

SCOTT & BERNARD (1983) verificaram a influência da temperatura na medida

de a_w utilizando a metodologia dos sais saturados. Eles observaram que para as atividades de água maiores, o efeito da temperatura tende a ser menor. Sendo assim, a temperatura é um fator muito importante na comparação de dados de laboratórios diferentes e na medida da a_w .

2.3 – ISOTERMAS DE SORÇÃO

É através das isotermas de sorção que é possível conhecer a umidade de equilíbrio do produto quando mantido sob diferentes condições de umidade relativa do ar, ou seja, a atividade de água.

Existem duas maneiras de construir uma isoterma (DITCHFIELD, 2000):

1) a isoterma de adsorção é obtida colocando-se um material completamente seco em contato com várias atmosferas de umidades relativas crescentes e medindo-se o ganho de massa depois de atingido o equilíbrio;

2) a isoterma de dessorção é obtida colocando-se um material inicialmente úmido sob umidades relativas decrescentes e, nesse caso, medindo-se a perda de massa após o equilíbrio.

A forma da isoterma de sorção pode mudar dependendo do tipo de produto e da afinidade por água. BRUNAUER et al. (1938) descreveram 5 tipos de isotermas. Dentre eles, os alimentos solúveis, como o açúcar, assumem forma assintótica quando a umidade relativa tende a 100%, e os produtos orgânicos, onde as isotermas obtidas são do tipo sigmóide (MATHLOUTHI, 2001; SANTOS et al., 2004).

A curva de sorção pode ser dividida em três regiões A, B e C (Figura 1). A região A corresponde à quantidade de água na monocamada, onde moléculas de água estão ligadas ao produto por ligações fortes. A região B corresponde à parte linear da isoterma. A água é adsorvida pelas multicamadas de moléculas até chegar à monocamada. A região C é a que contém água livre ou solvente. As moléculas de água nesta região são menos fortemente ligadas que nas regiões A e B. Esta fração de água é disponibilizada para microrganismos ou para a dissolução de solutos solúveis (MATHLOUTHI, 2001).

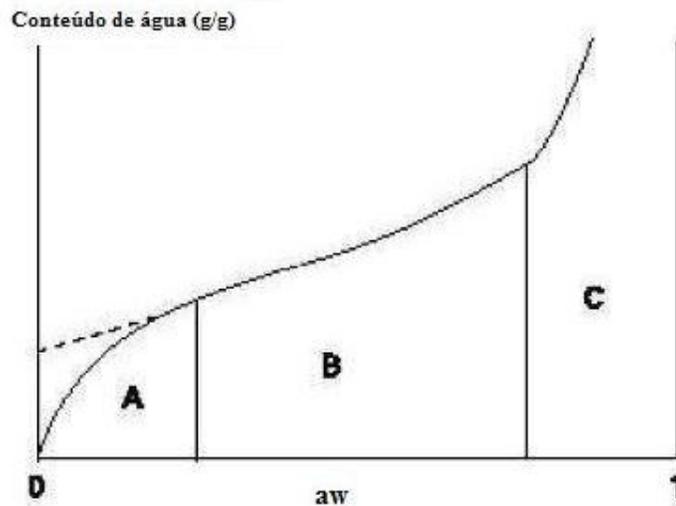


Figura 1 – Regiões da isoterma de sorção (MATHLOUITHI, 2001)

As isotermas de sorção possuem muitas aplicações. Do ponto de vista termodinâmico, elas informam sobre as entalpias de sorção e o tipo de ligação da água com o material seco. Sob um nível estrutural, elas podem ajudar, por exemplo, na obtenção da área específica na sorção do vapor de água. Com relação ao aspecto tecnológico, as isotermas são usadas na predição da vida útil, no controle da secagem e na prevenção do endurecimento de alimentos em pó, entre outras aplicações (MATHLOUITHI, 2001).

MOURA et al. (2004) ajustaram a Equação de GAB, BET, Halsey e Oswin para a dessorção da polpa de caju do tipo vermelho e concluíram que a equação de GAB foi a que melhor se ajustou aos dados das isotermas nas temperaturas de 35, 40, 60 e 65°C com atividades de água entre 0 e 0,8.

2.4 – CAJU

O cajueiro é nativo do Brasil, principalmente das regiões Norte e Nordeste. No final do século XVI, este se espalhou para outros países como Moçambique, Índia, Angola e Quênia. Duas variedades de pseudofruto podem ser encontradas no Brasil, uma com a pele de cor amarela e outra com a cor vermelha, mas ambas com a mesma polpa amarelo pálido.

Em francês, o caju é conhecido como cajou e acajou; em espanhol é chamado de marañon, cajuil, merey ou acayouba; os ingleses o conhecem por cashew, cashew apple,

cashew nut; ma Itália, chamam-no de anacardio e na Índia de kaju. O certo é que tais denominações derivam da palavra *akayu* do tupi, que significa pomo amarelo, e é prova da origem brasileira do caju (MOURA, 2001).

O principal produto do caju (Figura 3) é a castanha, que é bastante conhecida pelo mundo. A amêndoa, no seu interior, é a parte comestível e o mesocarpo contém um líquido viscoso, sumamente cáustico, de cor quase negra e sabor picante, conhecido como LCC (Líquido de Castanha do Caju), contendo o ácido anacárdico (90%) e dois fenóis (10%) ou cardol, muito empregado na indústria de plásticos, isolantes, vernizes, inseticidas, etc. (MOURA, 2001).

O suco é processado do pseudofruto, que é considerado um resíduo pela indústria da castanha. Este pseudofruto tem estrutura carnosa e é muito suculento. Além do seu consumo natural, pelo sabor delicioso, é utilizado na fabricação dos mais variados doces e bebidas, tais como: doce de massa, caju seco (passa), caju ameixa, cristalizado, doce em calda, geléias, sucos, cajuína, vinho (TORRES NETO et al., 2006), conhaque, champanha, vinagre (MOURA, 2001; SILVA et al., 2007).

O consumo do pseudofruto fresco ainda é limitado apesar do suco ser amplamente aceito pela população. Contudo, o Brasil produziu 1,8 milhão de toneladas de caju em 2005, e do pseudofruto explorado (apenas como suco de fruta), os números alcançados foram de 15% do total produzido (KISS, 2005).

O pedúnculo do caju *in natura* (Figura 2) torna-se um produto altamente perecível, porque possui uma casca muito frágil, o que dificulta o seu manuseio e transporte das áreas de produção aos mercados de consumo ou a indústria. Sobre sua casca existe uma mucilagem na qual se fixam os fungos, dando-lhes condições propícias para seu desenvolvimento, que é ainda favorecido quando as condições de temperatura e umidade forem elevadas nas regiões produtoras (MOURA et al., 2004).



Figura 2 – Caju (*Anacardium occidentale L.*) (VIVENCIA ANDINA VIAJES, 2006)

2.5 – PECTINASES

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes e desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Porém, os fungos são os preferidos em escala industrial, já que cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio (BLANDINO et al., 2001).

As pectinases foram algumas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas ao redor de 1930 e somente a partir de 1960, quando os estudos sobre a natureza química de tecidos vegetais se tornaram mais aparentes, foi que os cientistas começaram a utilizar as enzimas mais eficientemente (KASHYAP et al., 2000).

Diversas companhias na Europa, Estados Unidos e Japão produzem pectinases e preparações comerciais da mesma. Atualmente, essas enzimas correspondem a cerca de 25% do mercado mundial de enzimas. O valor estimado de vendas em 1995 foi de US\$ 1 bilhão, dos quais US\$ 75 milhões somente com pectinases (KASHYAP et al., 2001).

As enzimas pectinolíticas são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir a viscosidade e melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação (ALKORTA et al., 1998), e no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais, na extração de polpa de tomate; no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxtil e de papel; entre outras aplicações (UENOJO & PASTORE, 2007).

A classificação das pectinases está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico da molécula da substância péctica. Basicamente, existem três tipos de enzimas (ALKORTA et al., 1998; UENOJO e PASTORE, 2007):

- pectina esterase, que remove os grupos metil éster;
- pectinases (hidrolases e liases), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas;
- protopectinases, que solubilizam protopectina para formar pectina.

Segundo ANTIER et al. (1993), industrialmente, as pectinases são produzidas tanto pela FSm quanto pela FSS com linhagens de *Aspergillus niger CH4*, porém a FSS é geralmente considerada a técnica mais suscetível a rendimentos maiores de pectina esterase e poligalacturonases. UENOJO & PASTORE (2007) explicam que esta preferência ocorre, porque a FSS permite a produção de enzimas brutas mais concentradas e, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação.

2.6 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2^k

Segundo BARROS NETO et al. (1996), o planejamento experimental é a especificação detalhada das operações experimentais que devem ser realizadas e dependerá do objetivo particular que ele queira atingir.

As principais vantagens na utilização do planejamento experimental são (RODRIGUES & IEMMA, 2005):

- ✓ Reduzir o número de experiências ou repetições e melhorar a qualidade da informação obtida através dos resultados;
- ✓ Os fatores são analisados simultaneamente;
- ✓ É possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo;
- ✓ Permitir calcular e avaliar o erro experimental;
- ✓ Depender mais da competência do profissional em sua área de atuação do que de seus conhecimentos em estatística.

De modo geral, para um planejamento fatorial, sendo determinado k variáveis controladas no processo, o planejamento com dois níveis irá requerer a realização de 2^k ensaios diferentes. Dado a essa razão, denomina-se este tipo de planejamento fatorial 2^k .

O planejamento fatorial 2^2 é de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta, e

não se está preocupado ainda com uma descrição muito rigorosa dessa influência. São planejamentos muito simples de executar e podem ser ampliados para formar um planejamento mais sofisticado, que é necessário quando se quer conhecer melhor a relação funcional existente entre a resposta e os fatores (BARROS NETO et al., 1996).

Para executar um planejamento experimental fatorial precisa-se, primeiramente, especificar os níveis em que cada fator será estudado, portanto, devem-se escolher os valores das variáveis de entrada para que seja possível a realização dos experimentos. Costuma-se identificar os níveis superior e inferior com os sinais (+) e (-). E o ponto central, que é a média aritmética dos valores dos níveis superior e inferior, simboliza-se por (0).

A adição de pontos centrais ao planejamento fatorial 2^K consiste em uma estratégia de repetição que protege uma possível curvatura resultante do efeito de um modelo de segunda ordem, além de permitir uma estimativa independente de erros, apesar de primeiramente ajustar-se um modelo de primeira ordem aos dados obtidos (MONTGOMERY, 1997).

Em seguida, devem-se executar estes experimentos em todas as possíveis combinações destes níveis. A listagem dessas combinações é chamada de matriz de planejamento.

Para evitar a ocorrência de distorções estatísticas nos resultados, isto é, para impedir erros atípicos que sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis, os ensaios devem ser realizados em ordem totalmente aleatória (BARROS NETO et al., 1996).

Quanto a um processo fermentativo, a otimização das condições, particularmente parâmetros químicos e físicos, é de vital importância no desenvolvimento do processo, devido ao seu impacto sobre a economia e a praticidade do mesmo. A diversidade das interações combinatórias dos componentes do meio com o metabolismo das células, assim como a grande quantidade de constituintes no meio necessário para o crescimento celular e produção, não permitem modelagem detalhada satisfatória (FRANCIS et al., 2003).

2.7 – ESTADO DA ARTE

Nesta seção serão descritos trabalhos sobre isoterms de sorção e suas aplicabilidades, além de trabalhos relacionados com o processo de fermentação semi-sólida

e a produção de pectinases.

2.7.1 – ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Um grande número de trabalhos pode ser encontrado na literatura onde o principal objetivo é a determinação e ajuste das isotermas de um produto com a finalidade de caracterizar e obter produtos mais estáveis, preservação e armazenamento, dimensionamento de equipamentos, como uma ferramenta em processos como o de FSS e secagem, entre outros. Para o ajuste, várias equações têm sido propostas para diversos tipos de alimentos. Seguem-se abaixo alguns exemplos de trabalhos referenciados, que descrevem a utilização das isotermas de sorção.

SANTOS et al. (2004) realizaram levantamento das isotermas de adsorção de umidade nas temperaturas 20, 30 e 40 °C de duas formulações de farinhas de mandioca, compostas por mistura e homogeneização de farinha de mandioca e diferentes proporções de tempero, elaborado com corante natural à base de urucum, sal de cozinha, cebola desidratada, coentro desidratado e gordura vegetal. A caracterização físico-química foi feita quanto o teor de umidade, cinzas, pH e acidez alcoólica. Foram utilizados os modelos de GAB e Oswin para o ajuste das isotermas, tendo ambos apresentando bom ajuste em relação aos dados experimentais. As isotermas apresentaram forma sigmóide, sendo classificadas como tipo II.

LAHSASNI et al. (2004) determinaram a umidade de equilíbrio do fruto da palma forrageira usando o método gravimétrico estático nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C na faixa de umidade relativa entre 0,05 e 0,9. As curvas de adsorção do produto decrescem com o aumento da temperatura em umidade relativa constante. As equações de GAB, Halsey modificado, Chung-Pfost modificado, Oswin modificado e Henderson modificado foram testados para ajustar os dados experimentais. O modelo de GAB foi o que melhor descreveu as curvas. Os valores da umidade de equilíbrio aumentam com o decréscimo da temperatura em umidade relativa constante. Os calores isostéricos de dessorção e adsorção foram determinados a partir dos dados de equilíbrio em diferentes temperaturas e ajustados a uma função polinomial.

Segundo CASSINI et al. (2005), a proteína de soja texturizada tem sido usada há muitos anos para substituir a proteína animal. E mais recentemente, como ingrediente em alguns processos alimentícios. No entanto, é necessária a utilização do processo de

secagem desse produto. Assim, as isotermas de adsorção da proteína de soja texturizada foram determinadas usando o método estático com soluções saturadas de sais nas temperaturas de 10, 20, 30 e 40 °C. Os dados experimentais foram ajustados com as equações de Oswin, Halsey, BET, GAB, Peleg e Darcy Watt. As isotermas de adsorção obtidas foram bem próximas, indicando fraca influência da temperatura. As isotermas de 20 e 40 °C se cruzam em atividade de água de 0,9. Este fato é característico de alimentos ricos em açúcar. Os modelos que melhor se ajustaram aos dados experimentais foram o de GAB e Peleg. O calor total de sorção obtido decresce com o aumento da umidade.

ARAÚJO et al. (2005b) obtiveram isotermas de dessorção da raquete da palma forrageira nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C (temperaturas usuais de fermentação) de modo a correlacionar a atividade de água e a umidade de equilíbrio com o processo de enriquecimento protéico deste produto através da fermentação semi-sólida. As isotermas foram ajustadas pelos modelos de GAB e BET, sendo que o modelo que melhor se ajustou foi o de GAB. A partir das isotermas obtidas, observa-se que, na fermentação para enriquecer a cactácea com *Saccharomyces cerevisiae*, deve-se iniciar o processo com umidade da palma forrageira acima de 90%, correspondendo a uma atividade de água acima de 0,9. Para conservação e manutenção da qualidade da cactácea enriquecida seca, é necessário ter umidade residual de 15% e a_w abaixo de 0,35 para as três temperaturas estudadas.

CLADERA-OLIVEIRA et al. (2006) produziram farinha de pinhão (*Araucaria angustifolia*) com a finalidade de obter um produto estável. Para tanto, construíram isotermas de adsorção deste produto nas temperaturas de 10, 20, 30 e 40 °C. O modelo de Chirife foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais.

2.7.2 – FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Os estudos sobre fermentação semi-sólida vêm sendo ampliadas a cada ano devido ao caráter ecológico dado por este processo. Além disso, a grande quantidade de resíduos gerados nos países agrícolas, em todo o mundo, propicia a utilização de uma grande variedade de substratos de baixo valor comercial para a produção de diversos tipos de bioprodutos com alto valor agregado, chamando assim a atenção dos países altamente industrializados para este processo.

ANTIER et al. (1993) avaliaram duas linhagens de *Aspergillus niger* CH4 para

produção de pectinases por FSS usando polpa de café como substrato. Fizeram à seleção de 248 linhagens isoladas da área de cultivo de café no México e lhes permitiu selecionar a linhagem que em 72 h produziu um pico de 27,7 U/mL (138 U/g de polpa seca) de pectinase medida pelo método viscosimétrico. A utilização de um meio com atividade de água (aw) igual a 0,954 com glicose possibilitou isolar as linhagens que mais produziram enzimas. A linhagem selecionada foi o mutante AW96.

DANIEL et al. (1996) estudaram a utilização da casca de limão como fonte de carbono e energia e a influência da qualidade da fonte de nitrogênio (uréia e sulfato de amônio) empregada, bem como a utilização deste parâmetro como variável indireta no controle do pH durante o processo fermentativo. Os resultados indicam a escolha da fonte uréia para composição do meio por ser mais eficiente na condução de uma cinética mais rápida e maior atividade enzimática envolvidas.

TARAGANO & PILOSOFF (1999) aplicaram o planejamento experimental Doehlert na otimização dos parâmetros atividade de água, pH e tempo de fermentação na produção de enzimas pectinolíticas por FSS e por FSm com *Aspergillus niger* 148. Estes autores constataram que a técnica de fermentação tem grande influência sobre a composição de pectinases produzidas pelo fungo. A produção de poligalacturonase foi 5 vezes maior na FSm do que com a FSS. Entretanto, a produção de pectinaliase foi 3 vezes maior na FSS do que com a FSm. E a pectina esterase foi apenas 30% maior na FSS. A otimização do processo foi baseada na produção mínima de pectina esterase e na produção máxima de pectinaliase. As condições ótimas no processo FSS foram pH 6,5-7,0, atividade de água inicial 0,93-0,94 e 2 dias de fermentação. Para a FSm, as condições foram pH 5,5-6,2, atividade de água inicial acima de 0,99 e 3 dias de fermentação.

CASTILHO et al. (2000) trabalharam com soja e trigo como substrato para produção de pectinases usando *Aspergillus niger* através da FSS. As cinéticas enzimáticas foram investigadas em uma faixa de 13 a 96 h de fermentação e meios com umidades entre 25 e 70% b.u. O meio contendo 40% b.u de umidade e 22 h de fermentação foi o que produziu as maiores atividades pectinolítica e poligalacturonásica. Investigou-se também a melhor combinação entre temperatura de extração das enzimas, o tempo de contato e o tipo de solvente utilizado. Tampão acetato (pH 4,4), 35 °C e 30 min foi a melhor condição observada.

FAWOLE & ODUNFA (2003) observaram os efeitos da variação das condições de cultivo no meio de produção de enzimas pecticas com linhagens de *Aspergillus niger* V.

Tieghem. Poligalacturonase e pectinometilesterase foram encontradas pela indução por ácido poligalacturonásico e pela pectina do meio, respectivamente. Sulfato de amônio foi a melhor fonte de nitrogênio utilizada para a produção de ambas as enzimas. A temperatura e pH também têm feito marcante sobre a produção de enzimas pécicas, sendo as melhores condições 40 °C e pH 5,0.

HAMIDI-ESFAHANI et al. (2004) aplicaram um planejamento fatorial 2^2 , onde estudaram o efeito simultâneo da temperatura e da umidade usando *Aspergillus niger* ATCC 10864 em processo FSS. O aumento da umidade para valores maiores de 55% b.u, entre as temperaturas de 35 e 40 °C, diminuiu o crescimento do microrganismo. Um modelo foi usado para calcular os parâmetros cinéticos de crescimento em diferentes níveis de temperatura e umidade. A equação de Ratkowsky foi usada para expressar o efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento específico. Um polinômio quadrático foi usado para representar a relação entre a umidade e os parâmetros de crescimento (biomassa máxima e taxa de crescimento específico máxima) do *A. niger* inoculado sobre trigo cozido no vapor. Os maiores valores de biomassa máxima e da velocidade de crescimento específico máxima foram $0,29 \text{ h}^{-1}$ e $0,22 \text{ g biomassa/g}$ a 35 °C e 55% b.u, respectivamente.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – MICRORGANISMO

O microrganismo empregado foi *Aspergillus niger* CCT 0916 cedido pela EMBRAPA Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza (CE). Os conídios da linhagem foram preservados em tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo solo estéril, onde foram estocados a -18 °C.

3.2 - SUBSTRATO

O substrato utilizado neste trabalho foi o bagaço do pedúnculo do caju seco. O caju utilizado foi adquirido na Empresa de Abastecimento de Serviços Agrícolas (EMPASA) na cidade de Campina Grande (PB). As seguintes etapas foram realizadas para preparação do mesmo:

- ✓ Recepção: o caju adquirido foi inicialmente lavado em água clorada para retirada de microrganismos e sujeira. Em seguida, foi lavado em água corrente, para retirada do cloro. Após o processo de lavagem, foram retiradas as castanhas. Os pedúnculos foram triturados em liquidificador industrial e extraíram-se o suco manualmente com auxílio de peneiras.
- ✓ Secagem: o bagaço do pedúnculo do caju úmido foi seco em estufa com circulação de ar a 55°C, em bandejas de alumínio forradas com plástico de polietileno.
- ✓ Trituração: o bagaço do pedúnculo do caju seco foi moído em moinho de facas da marca TECNAL, localizado no LAPP (Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas) da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola.
- ✓ Armazenamento: o bagaço do pedúnculo do caju seco em pó foi armazenado em saco plástico de polietileno a temperatura ambiente.

3.3 - CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO

As análises para caracterização do substrato foram realizadas como descritas abaixo. As análises de granulometria, densidade aparente, pH, teor de sólidos solúveis, açúcares redutores e redutores totais e pectina foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química e as análises de umidade e cinzas foram realizadas no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA), ambos da Universidade Federal de Campina Grande. As análises de proteína bruta foram realizadas no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da EMBRAPA Algodão, também localizada em Campina Grande – PB.

3.3.1 - GRANULOMETRIA

Pesou-se 100 g do resíduo em balança analítica. Essa massa foi levada para o agitador de peneiras CONTENGO-PAVITEST durante 10 min, em jogo constituído por seis peneiras, seguindo: 14 (1,18 mm), 20 (0,85 mm), 24 (0,71 mm), 35 (0,45 mm), 48 (0,30 mm), 60 (0,25 mm) segundo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Pesou-se o material retido em cada peneira e expressaram-se os resultados em percentual em relação à massa do material original.

3.3.2 - DENSIDADE APARENTE

Pesou-se 100 g do material e colocou-se essa amostra em uma proveta para determinar o volume ocupado, sem haver compactação.

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{volume ocupado (cm}^3\text{)}} \quad (1)$$

3.3.3 - PH

Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 g da amostra sólida. Após homogeneização, filtrou-se a solução através de algodão e mediu o pH do filtrado em pHmetro digital previamente calibrado (BRASIL, 2005).

3.3.4 - UMIDADE

Pesou-se de 2 a 10 g da amostra em cápsula de metal previamente seca e tarada. Colocou-se a cápsula em estufa a 105°C por 24 h. Resfriou-se em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente e pesou-se a amostra (BRASIL, 2005).

Calculou-se a umidade das amostras pela Equação 2.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{massa inicial da amostra} - \text{massa final da amostra})}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

3.3.5 - CINZAS

Pesou-se de 5 a 10 g da amostra em cadinho de porcelana, previamente aquecido em mufla a 550°C e resfriado em dessecador com sílica gel até a temperatura ambiente. Carbonizou-se a amostra em chapa elétrica e incinerou-se em mufla a 550°C, até eliminação completa do carvão. A cinza ficou de cor branca ou ligeiramente acinzentada. Após a retirada da amostra da mufla, esta foi levada ao dessecador com sílica gel até alcançar temperatura ambiente e pesou-se (BRASIL, 2005).

Utilizou-se a Equação 3 para o cálculo da percentagem de cinzas do material.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa final da amostra}}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100 \quad (3)$$

3.3.6 - TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX)

Adicionou-se 9 mL de água destilada a 1 g do resíduo. Agitou-se manualmente a solução com a amostra até perfeita homogeneização e deixou-se em repouso por 30 min. Em seguida, filtrou-se a suspensão com algodão. A leitura do teor de sólidos solúveis foi

feita em refratômetro. Multiplicou-se o resultado por dez devido à diluição da amostra (BRASIL, 2005).

3.3.7 - TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES (AR)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados usando 0,5 g da amostra pela metodologia do DNS (MILLER, 1959) em espectrofotômetro, modificada de acordo com protocolo da EMBRAPA Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE) usando solução de glicose como padrão.

3.3.7.1 – CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES E ABSORBÂNCIA

Construiu-se a curva padrão pesando-se 0,1 g de glicose e dissolvendo-o até 100 mL de água em balão volumétrico. Após homogeneização, transferiu-se 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e completou-se o volume para 10 mL com água destilada e homogeneizou-se. Com isso, a curva padrão foi construída dentro da faixa de concentração de açúcares entre 0,1 e 1 g/L.

De cada tubo, transferiu-se 1 mL das soluções com concentrações de 0,1 a 1 g/L e adicionou-se mais 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). Estes tubos foram aquecidos em água em ebulição por 5 min, e então resfriados até temperatura ambiente. A cada tubo, adicionou-se 8 mL de água destilada. Após homogeneização, levaram-se as amostras para leitura no espectrofotômetro, onde foram lidas as absorbâncias a 540 nm. Com estes valores, construiu-se a curva de absorbância em função da concentração.

3.3.7.2 – ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES NAS AMOSTRAS

Inicialmente determinou-se o volume de água destilada a diluir 0,5 g das amostras para que a leitura do espectrofotômetro estivesse dentro da faixa da curva padrão. As amostras ficaram em repouso por 30 min em água destilada e, em seguida, foram filtradas com papel filtro Wattman 1. As diluições foram usadas no cálculo para a determinação do teor de açúcar da amostra desconhecida.

Após diluição, transferiu-se 0,5 mL do filtrado para um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de solução de DNS. Em seguida, este tubo foi levado para banho com água fervente por 5 min. Após este intervalo, o tubo foi retirado do banho quente e levado ao banho de água fria por 3 min até temperatura ambiente. Adicionou-se 4 mL de água destilada nos tubos e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Utilizou-se a curva padrão para transformar a leitura de absorbância em gramas de açúcares redutores por litro de solução. Efetuaram-se os cálculos para expressar os resultados em gramas de açúcares redutores por grama de amostra inicial (g açúcares/g amostra).

$$AR(g/g) = \frac{ABS \times f \times V}{m \times 10} \quad (4)$$

Em que: ABS = leitura do espectrofotômetro

f = fator da curva padrão

V = volume de água usado no preparo da diluição (mL)

m = massa da amostra (g)

10 = fator de conversão

3.3.8 - TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART)

O percentual de açúcares redutores totais (ART) das amostras foi determinado pelo método DNS, conforme metodologia adaptada por CORREIA (2004).

Para o preparo da amostra, inicialmente, determinou-se o volume de água destilada para diluição que resulte em leitura dentro da faixa da curva padrão. Em seguida, retirou-se 1 mL da diluição e acrescentou-se 1 mL de HCl 2 N. Levou-se a ebulição por 5 min e, esfriou-se até temperatura ambiente. Neutralizou-se essa solução acrescentando 3 mL de NaOH 1 N.

A curva padrão para a determinação da concentração de açúcares redutores totais foi construída seguindo a metodologia adotada no item 3.3.7.1 deste trabalho. Assim como as análises realizadas para as amostras seguiram a metodologia descrita no item 3.3.7.2. Os cálculos para expressar os resultados em gramas de açúcares redutores totais por grama de amostra inicial (g açúcares/g amostra) foram efetuados de acordo com a Equação 5.

$$\text{ART(g/g)} = \frac{\text{ABS} \times f \times \text{fd} \times V}{m \times 10} \quad (5)$$

Em que: ABS = leitura do espectrofotômetro
 f = fator da curva padrão
 fd = fator de diluição da amostra após o preparo
 V = volume de água usado no preparo da diluição
 m = massa da amostra (g)
 10 = fator de conversão

3.3.9 – PECTINA

A fração de pectina das amostras foi determinada pelo método gravimétrico por precipitação como pectato de cálcio, previamente descrito por RANGANA (1979).

Pesou-se 20 g da amostra em um Becker de 1000 mL. Adicionou-se 400 mL de solução de HCl 0,05 N e levou-se ao aquecimento por 2 h, colocando água destilada perdida por evaporação. Após este período, resfriou-se essa solução até temperatura ambiente e transferiu-se para uma proveta de 500 mL completando-se o volume com água destilada. Filtrou-se em seguida com o auxílio de algodão. Mediu-se o filtrado em uma proveta de 200 mL e transferiu-se para um Becker de 100 mL. A essa mistura, acrescentou-se 250 mL de água destilada. Esta solução foi neutralizada com solução de NaOH 0,1 N com auxílio do pHmetro. Após neutralização, adicionou-se 10 mL de NaOH 1N em excesso, com agitação constante. Em seguida, deixou-se em repouso por 15 h.

No dia seguinte, adicionou-se 50 mL de ácido acético 1 N e, após 5 min, acrescentou-se 25 mL de solução de cloreto de cálcio 1 N com agitação. Levou-se a solução à ebulição por 2 min e deixou-a em repouso por 3 h. Após esse período, filtrou-se esta solução através de papel filtro preparado antecipadamente.

Molhou-se o papel de filtro com água destilada e secou-o em estufa a 105°C por 2 h. Resfriou-o em dessecador com sílica gel e pesou-se. O precipitado foi lavado com água destilada fervente até que este ficasse livre de cloretos. Para verificação da presença destes cloretos na porção retida no papel filtro, fez-se o teste usando uma solução de nitrato de prata a 1%, onde se acrescentou 1 mL dessa solução no filtrado. Estando o filtrado livre de cloretos, o líquido não tornasse turvo. Secou-se o papel de filtro contendo o pectato de

cálcio na estufa a 105°C até massa constante. A pectina foi expressa em percentagem de pectato de cálcio através da Equação 6.

$$\% \text{ pectato de cálcio} = \frac{\text{massa do pectato de cálcio} \times 500}{\text{mL do filtrado} \times \text{massa da amostra}} \times 100 \quad (6)$$

3.3.10 – PROTEÍNA BRUTA

Utilizou-se o método semi-micro Kjeldahl adaptado para nitrogênio por espectrofotometria para determinação da concentração de proteína bruta do resíduo do caju (LE POIDEVIN & ROBINSON, 1964). A análise foi feita em duplicata.

3.3.10.1 - REATIVO DE NESSLER

Pesou-se 45,5 g de HgI em um Becker de 500 mL. Adicionou-se aproximadamente 200 mL de água destilada e misturou-se bem.

Em outro Becker, pesou-se 34,9 g de KI e dissolveu-se água destilada para dissolução prévia. Adicionou-se a esta solução, a solução de HgI e misturou-as bem até dissolução completa.

Em um terceiro Becker, pesou-se 112 g de KOH. Dissolveu-o com 200 mL de água destilada em banho com água fria. Após completa dissolução, e estando a solução em temperatura ambiente, adiciona-se a solução preparada anteriormente com agitação constante. Transferiu-se essa solução para um balão volumétrico de 1000 mL e aferiu-se com água destilada. Após aferição, a solução foi transferida para um Becker e agitada com agitador magnético por 4 h. Filtrou-se esta solução. Por fim, armazenou-se em frasco escuro.

3.3.10.2 - DIGESTÃO SULFÚRICA

Pesou-se 0,1 g da amostra em tubo de ensaio grande. Acrescentou-se 50 mg de sulfato de sódio, 7 a 10 gotas de sulfato de cobre a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico. Fez-se também uma amostra em branco. Uma pré-digestão foi feita por mais ou menos 12 h a frio.

Em seguida, aqueceu-se em bloco digestor a temperatura de 350 °C, aumentando-se gradativamente a temperatura do bloco, acrescentando a temperatura 50 °C por hora, sendo que a partir de 150 °C. Diminuiu-se para 50 °C para cada 30 min até 350 °C.

Retirou-se a amostra do bloco digestor quando esta apresentava coloração clara esverdeada, o que implicava que toda a matéria orgânica havia sido destruída. Com a amostra fria, transferiu-a para um balão volumétrico de 100 mL, lavando bem o tubo de ensaio. Fez-se a aferição. Com isso, tem-se o Extrato 1.

3.3.10.3 - CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO COM ABSORBÂNCIA

A curva foi construída com solução de cloreto de amônia 10 ppm. Numeraram-se 6 balões volumétricos de 50 mL. Seguiu-se a Tabela 1 para construção da curva de calibração para esta análise.

Tabela 1 - Curva padrão para análise de proteína bruta

Concentração de N (ppm)	NH ₄ Cl 10 ppm (mL)	NaOH 10% (mL)	Silicato de Sódio 20% (mL)	Reagente de Nessler (mL)
0	0	1	1	2
0,2	1	1	1	2
0,4	2	1	1	2
0,6	3	1	1	2
0,8	4	1	1	2
1,0	5	1	1	2

Completo-se o volume dos balões com água destilada. Deixou-se a amostra repousar por 30 min. Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 410 nm.

3.3.10.4 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA NA AMOSTRA

Colocou-se 1 mL do Extrato 1 em um balão volumétrico de 50 mL. Acrescentou-se 1 mL de hidróxido de sódio 10%, 1 mL de silicato de sódio 20%, 2 mL do reativo de Nessler e aferiu-se com água destilada. Deixou-se em repouso por 30 min.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 410 nm. Com a Equação 7, obteve-se o teor de proteína bruta da amostra.

$$\%Proteína = (ABS_{Amostra} - ABS_{Branco}) \times (\text{valor da curva}) \times 5 \times 6,25 \quad (7)$$

Em que: $ABS_{Amostra}$ = leitura da absorbância da amostra;

ABS_{Branco} = leitura da absorbância do branco.

3.4 – OBTENÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO: METODOLOGIA DOS SAIS SATURADOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas (LAPPA) da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande.

As temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C foram fornecidas por quatro câmaras tipo B.O.D. modelo 347.

3.4.1 – PREPARO DOS RECIPIENTES DE PESAGEM

Utilizou-se como recipiente de pesagem cadinhos de alumínio. As seguintes etapas foram realizadas para a preparação destes recipientes:

- ✓ Lavagem com água destilada e sabão neutro;
- ✓ Secagem por 3 h em estufa a 105°C;
- ✓ Esfriou-se no dessecador por aproximadamente 1 h;
- ✓ Pesaram-se os recipientes em balança analítica.

3.4.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS DO PRODUTO

Utilizaram-se amostras do pedúnculo do caju seco que foram preparadas segundo o item 3.2. As seguintes etapas foram realizadas para o preparo das amostras:

- ✓ Pesou-se aproximadamente 1 g da amostra em cada recipiente de pesagem;
- ✓ Secou-se por 7 h em dessecador com sílica gel;
- ✓ Pesaram-se os recipientes com as amostras em balança analítica.

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada recipiente hermético com as soluções saturadas e em cada temperatura.

3.4.3 – PREPARO DAS SOLUÇÕES SATURADAS DE SAIS

Na Tabela 2 encontram-se os sais utilizados para o preparo das soluções, juntamente com os valores das umidades relativas, nas temperaturas em que foram construídas as isotermas de adsorção.

Tabela 2 – Umidades relativas de equilíbrio de soluções de sais saturadas a várias temperaturas (ROCKLAND, 1960)

Soluções salinas saturadas	Umidade relativa (%)			
	Temperaturas			
	25°C	30°C	35°C	40°C
K(C ₂ H ₃ O ₂)	23	23	23	23
MgCl ₂	33	32	32	31
K ₂ CO ₃	43	42	41	40
NaBr	57	57	57	57
NaCl	75	75	75	75
KCl	86	84	85	83

Para o preparo das soluções, seguiram-se as seguintes etapas:

- ✓ Higienizaram-se os recipientes herméticos: lavagem com água destilada e sabão; secagem em estufa a 105°C por 1 h e resfriamento até temperatura ambiente;
- ✓ Colocaram-se as quantidades de sais, como indicado na Tabela 3, nos recipientes herméticos;
- ✓ Com agitação, adicionaram-se as quantidades de água fria destilada, também como indicada na Tabela 3;
- ✓ Fecharam-se os recipientes herméticos, que permaneceram em repouso por 1 semana;
- ✓ Agitaram-se as soluções diariamente uma vez ao dia.

Tabela 3 – Preparo das soluções saturadas dos sais (SPIESS & WOLF, 1987)

Sais	Quantidades	
	Massa de sal (g)	Vol. água (mL)
K(C ₂ H ₃ O ₂)	200	65
MgCl ₂	200	25
K ₂ CO ₃	200	90
NaBr	200	80
NaCl	200	60
KCl	200	80

Após o preparo das soluções, as amostras foram levadas aos recipientes herméticos. O sistema montado encontra-se representado na Figura 3.

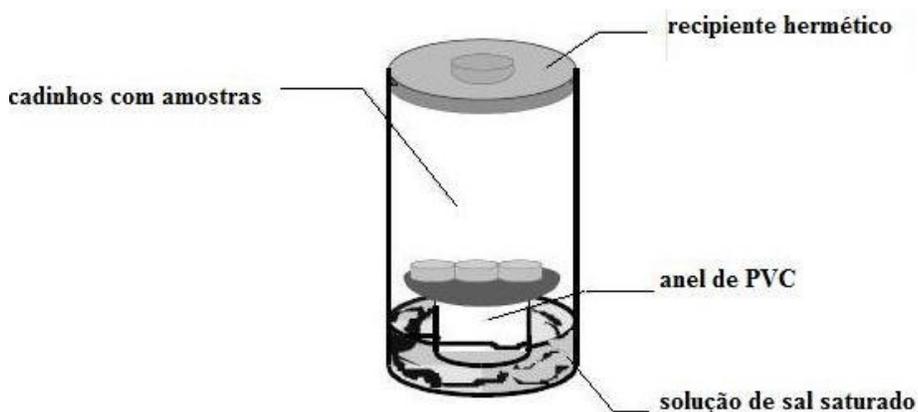


Figura 3 – Recipiente hermético contendo amostras do pedúnculo de caju seco (SILVA et al., 2002)

Foram preparados 24 recipientes de vidro com fechamento hermético, sendo 6 recipientes por temperatura. Em cada recipiente, colocaram-se anéis de PVC para elevação das amostras, assim como telas para apoiar os cadinhos com as amostras. Tanto os anéis de PVC quanto as telas foram higienizados antes de colocadas nos recipientes herméticos.

3.4.4 – DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DE EQUILÍBRIO DO PRODUTO

As etapas abaixo foram realizadas na determinação da umidade de equilíbrio do produto:

- ✓ Pesaram-se os recipientes com as amostras a cada 24 h em balança analítica;

- ✓ Observaram-se as variações de massa das amostras inferiores a 0,001 g (massa constante).

Calcularam-se as umidades de equilíbrio do produto através da Equação 8.

$$x_{eq} = \frac{100 \times M_{\text{água}}}{M_{\text{seca}}} \quad (8)$$

Em que: x_{eq} = umidade de equilíbrio (% b.s);

$M_{\text{água}}$ = massa de água no produto;

M_{seca} = massa seca do produto.

A massa seca do produto foi determinada em estufa a 105°C até massa constante. A massa de água foi obtida pela diferença entre a massa da amostra no equilíbrio e a massa seca. Os cálculos dos valores da umidade de equilíbrio foram feitos para cada cadinho e, por último, obteve-se a média aritmética das três repetições para cada sal em cada temperatura (SANTOS et. al., 2004).

3.4.5 – AJUSTE DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Com os dados de equilíbrio, ajustaram-se os modelos matemáticos indicados pelas Equações de 10 a 15 (Tabela 4). Fizeram-se regressões não-lineares, utilizando o programa computacional Statistica. Os critérios utilizados para a escolha do melhor ajuste foram o coeficiente de determinação (R^2) entre as respostas observadas e os valores preditos pelo modelo ajustado e o desvio percentual médio (P) (Equação 9). Os melhores ajustes foram os que apresentaram maior R^2 e menores valores de P (SANTOS et. al., 2004).

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|X_{\text{exp}} - X_{\text{teo}}|}{X_{\text{exp}}} \quad (9)$$

Em que: n = número de observações;

X_{exp} = umidade experimental do material;

X_{teo} = umidade calculado através dos modelos ajustadas.

Tabela 4 - Equações para o ajuste das isotermas de adsorção de água no bagaço do pedúnculo de caju seco

BET (BRUNAUER et al., 1938)	$\frac{x_{eq}}{X_m} = \frac{C \cdot aw}{1 - aw} \left[\frac{1 - (n + 1)(aw)^n + n(aw)^{n+1}}{1 - (1 - C)aw - C(aw)^{n+1}} \right]$	(10)
GAB (VAN DEN BERG, 1985)	$x_{eq} = \frac{X_m \cdot C_G \cdot k \cdot aw}{(1 - k \cdot aw)(1 - k \cdot aw + C_G \cdot k \cdot aw)}$	(11)
Oswin (LOMAURO et al., 1985)	$x_{eq} = a \left(\frac{aw}{1 - aw} \right)^b$	(12)
Henderson (HENDERSON, 1952)	$x_{eq} = \left(- \frac{\ln(1 - aw)}{a} \right)^{1/b}$	(13)
Smith (SMITH, 1947)	$x_{eq} = a + b \cdot \log(1 - aw)$	(14)
BET linear (BRUNAUER et al., 1938)	$\frac{aw}{(1 - aw)x_{eq}} = \frac{1}{X_m C_L} + \frac{(C_L - 1)aw}{X_m C_L}$	(15)

Em que: x_{eq} = umidade de equilíbrio em base seca;
 aw = atividade de água;
 C e C_L = constante de BET e de BET linear;
 X_m = umidade na monocamada molecular (% b.s);
 n = número de camadas moleculares;
 C_G e k = constantes de adsorção que estão relacionadas com as interações energéticas entre as moléculas da monocamada e as subsequentes em sítio de sorção (ARAÚJO et al., 2005b);
 a e b = parâmetros que dependem da temperatura e da natureza do produto.

Além disso, avaliou-se a distribuição dos valores residuais em relação aos valores preditos dos modelos ajustados para as isotermas de adsorção nas temperaturas observadas. Para que os ajustes sejam confiáveis, é necessário que esta distribuição seja aleatória, ou seja, os pontos devem estar distribuídos de forma aleatória de modo a caracterizar uma variância constante dos erros.

3.5 – CÁLCULO DO CALOR ISOSTÉRICO DE ADSORÇÃO

Calcularam-se os calores isostéricos líquidos de adsorção (q_{st}) através da equação de Clausius-Clayperon (Equação 16), que pode ser aplicada a alimentos e a água pura.

$$\frac{d(\ln a_w)}{d(1/T)} = \frac{-q_{st}}{R} \quad (16)$$

Em que: T = Temperatura absoluta (K);
 q_{st} = Calor isostérico líquido de adsorção (kJ/kg⁻¹);
 R = Constante universal dos gases (0,461 kJ (kg/K⁻¹)).

Construiu-se gráfico de $\ln a_w$ em função de $1/T$ a diferentes umidades de equilíbrio, onde o termo $\frac{d(\ln a_w)}{d(1/T)}$ representa o coeficiente de inclinação de uma reta. Os dados de a_w foram obtidos através da equação que melhor se ajustou aos dados experimentais. O critério de ajuste observado foi o coeficiente de determinação (R^2).

Para cada umidade de equilíbrio foram feitas regressões lineares dos dados, obtendo assim a inclinação das respectivas retas. O calor isostérico líquido (q_{st}) obtido, para cada umidade, corresponde ao valor do coeficiente de inclinação das retas multiplicado pela constante universal dos gases (SILVA et al., 2002).

Calculou-se o calor isostérico de adsorção (Q_{st}) através da Equação 17 (FERREIRA & PENA, 2003; CASSINI et al., 2005; KAYA & KAHYAOGU, 2006).

$$Q_{st} = q_{st} + \lambda \quad (17)$$

Em que: λ = Calor latente da água pura (2388,9 kJ/kg⁻¹).

3.6 - PROCESSO FERMENTATIVO

O processo fermentativo foi conduzido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande.

3.6.1 - INÓCULO

Com alça de platina, os conídios foram retirados do solo estéril e transferidos para um meio básico. Este meio foi composto por pectina cítrica (10 g/L), NaNO₃ (3 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), FeSO₄·7H₂O (0,01 g/L) e Agar-agar (20 g/L) e previamente esterilizado por 20 min a 111 °C e ainda quente inclinado (COURI,

1993). Após a transferência, o meio com os conídios foram incubados por cinco dias em estufa a 30°C.

Os tubos contendo os esporos do 1º repique foram mantidos sob refrigeração por um período máximo de quatro meses. O segundo repique foi obtido de modo semelhante ao primeiro, partindo dos esporos de primeiro repique, sendo estes utilizados para obtenção de grande quantidade de esporos no meio de sabugo de milho.

O meio de sabugo foi preparado de acordo com protocolo da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, com sede no Rio de Janeiro (RJ), no qual primeiro preparou-se as seguintes soluções:

- ✓ Solução A: pesou-se 20 g de fosfato de potássio monobásico e dissolveu-se em água destilada. Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e aferiu-se.
- ✓ Solução B: pesou-se 3,96 g de sulfato de zinco e dissolveu-se em um pouco de água destilada. Adicionou-se 4,60 g de sulfato de ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5 mL de ácido sulfúrico (95-97%). Após completa dissolução, avolumou-se a 100 mL com água destilada.
- ✓ Solução umidificante: pesou-se 2,8 g de peptona e dissolveu-se em um pouco de água destilada. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 0,19 mL da solução A e 0,025 mL da solução B. Avolumou-se e homogeneizou-se.

Para cada Erlenmeyer de 125 mL, foram pesados 4,6 g de sabugo de milho seco e moído e adicionado 6 mL da solução umidificante. O frasco foi fechado com tampão de algodão envolvido em gaze, homogeneizado e esterilizado em autoclave por 1 h a 120 °C.

Para inoculação no meio de sabugo de milho, foram transferidos 10 mL de solução 0,3% (v/v) de Tween 80 para tubos com os microrganismos de segundo repique. Com auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram suspensos e transferiu-se 1 mL para cada frasco com o sabugo. Os frascos foram agitados manualmente e incubados em estufa a 30 °C por um período de 5 dias. Após este período, os frascos foram armazenados sob refrigeração e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

Nos frascos de sabugo com esporos, foi adicionado 40 mL de solução 0,3% v/v de Tween 80. Após agitação vigorosa, os esporos foram transferidos para Erlenmeyer estéril com auxílio de gaze estéril. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a se ter um inóculo de

10^7 esporos por grama de meio (TRINDADE et al., 1996; FONTANA et al., 2005; SANTOS, 2007).

3.6.2 – PREPARO DO MEIO FERMENTATIVO

O meio de cultivo foi preparado com os resíduos obtidos de acordo com o que foi descrito no item 3.2 e, então, foi hidratado com água até se obter o teor de umidade definido. Nesse volume de água, diluiu-se o sulfato de amônia, de forma a se obter as concentrações previamente definidas. Tanto a umidade do meio, quanto a concentração de sulfato de amônio, foi definida segundo o planejamento experimental proposto (item 3.7).

Após preparo do meio, incubaram-se os Erlenmeyers com o meio de cultivo a uma determinada temperatura. Para o processo de fermentação, seguiram-se os passos abaixo:

1) Pesou-se 10 g de meio úmido e transferiu-se para um Erlenmeyer de 250 ml. O meio foi esterilizado a 111 °C por 5 min;

2) Inoculou-se a suspensão de esporos de *Aspergillus niger* CCT 0916 (item 3.6.1) na concentração de 10^7 esporos por grama de substrato sólido. Cobriu-se o frasco com tampão, confeccionado com gaze e algodão, e incubou-se em estufa bacteriológica na temperatura de 30 °C;

3) Retiraram-se amostras em intervalos regulares de tempo durante mais de 72 h de fermentação, e dessas amostras analisou-se a umidade (item 3.3.4), o pH (item 3.3.3) e os açúcares redutores (item 3.3.7);

4) Do meio fermentado, fez-se a extração das enzimas. Após a extração, determinou-se a atividade poligalacturonásica e a atividade pectinolítica.

3.6.3 - EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se 2,5 mL/g de meio fermentado de tampão acetato 200 mM pH 4,5. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho-maria por 1 h a 30 °C e filtradas em papel filtro Wattman 1. O filtrado foi estocado em tubo de ensaio e congelado em freezer (CASTILHO, 1997).

3.6.4 - MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.6.4.1 - ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

A atividade do complexo pectinolítico foi determinada através da medida da redução da viscosidade de uma solução de pectina cítrica 1% (p/v) preparada em tampão acetato de sódio 200 mM pH 4,5.

A unidade pectinolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de reduzir em 50% a viscosidade inicial de uma solução de pectina, em 10 min de reação a 35 °C (ANTIER et al., 1993; DANIEL et al., 1996).

Depois, em tubos de ensaios foram colocados 10 mL da solução de pectina cítrica. A este volume, acrescentaram-se volumes do complexo enzimático. Após banho a 35 °C por 10 min, as soluções foram transferidas para viscosímetro da marca Schott modelo 52013.

Ao tempo de escoamento da solução no viscosímetro, em segundos, multiplicou-se a constante $0,03338 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ para obtenção da viscosidade ν (Equação 18).

$$\nu = \text{const} \times t(\text{s}) \quad (18)$$

Para cada volume de complexo enzimático usado na determinação da viscosidade, foi determinada a viscosidade de uma amostra em branco com mesmo volume, porém usando solução tampão de acetato de sódio 200 mM pH 4,5. A redução da viscosidade foi calculada pela Equação 19.

$$\text{Red}(\%) = \left(\frac{\nu_{\text{Br}} - \nu_{\text{A}}}{\nu_{\text{Br}}} \right) \times 100 \quad (19)$$

Em que: ν_{Br} = viscosidade da amostra em branco;

ν_{A} = viscosidade da amostra com complexo enzimático.

Após a obtenção dos volumes de enzimas que reduziram em 50% a viscosidade das amostras em branco, calculou-se a atividade pectinolítica utilizando a Equação 20.

$$Pt \text{ (U/g)} = \frac{1}{V_{50}} \times 2,5 \quad (20)$$

Em que: Pt = atividade pectinolítica;

V_{50} = volume que reduz a viscosidade da solução de pectina cítrica em 50%.

3.6.4.2 - ATIVIDADE POLIGALACTURONÁSICA

A determinação da atividade poligalacturonásica foi realizada de acordo com protocolo da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro-RJ).

Para análise das amostras, levaram-se ao banho-maria, a 35 °C por 30 min, tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido poligalacturônico 0,25%, em tampão acetato 200 mM, pH 4,5. A esses tubos, foram adicionados 0,25 mL do complexo enzimático. Em seguida, levaram-se os tubos novamente para o banho-maria a 35 °C por 30 min para reagirem. Após a reação, transferiu-se 0,25 mL da mistura para tubos contendo 1 mL de reagente DNS. Adicionou-se 0,75 mL de água destilada aos tubos e foram levados ao aquecimento a 100°C por 5 min, seguido de resfriamento a temperatura ambiente. Adicionou-se 8 mL de água destilada e homogeneizou-se bem. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios foram feitos em duplicata.

Nos ensaios em branco (também realizados em duplicata), a enzima foi adicionada à solução de ácido poligalacturônico e imediatamente transferida para os tubos de ensaios contendo DNS. A curva padrão foi feita com solução de ácido poligalacturônico na faixa de 0 a 1 mg/mL.

Uma unidade de atividade poligalacturonásica corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido poligalacturônico por minuto da reação, nas condições de reação.

Para os cálculos, utilizou-se a Equação 21.

$$PG \text{ (U/g)} = \frac{(ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \times f \times 17 \times 4 \times 2,5}{212,16 \times 30} \quad (21)$$

Em que: PG = atividade poligalacturonásica expressa em unidades de atividade por gramas de meio úmido;

ABS = absorvância;

f = fator de conversão da curva padrão (mg/L);
 17 = diluição da enzima no meio reacional;
 4 = diluição dos grupos redutores no reagente DNS;
 212,16 = peso molecular do ácido poligalacturônico (g/mol);
 30 = tempo de reação (min);
 2,5 = razão da adição da solução de tampão acetato 200 mM pH 4,5 na extração da enzima.

3.7 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL

Os procedimentos descritos nesta seção tiveram por objetivo executar o mínimo de ensaios e determinar o quanto as variáveis de entrada umidade e concentração de nitrogênio influenciam a resposta atividade enzimática no processo de fermentação semi-sólida usando o bagaço do pedúnculo do caju seco como meio sólido e fonte de nutrientes para a produção de pectinases.

Realizou-se um planejamento experimental fatorial 2^2 completo. No planejamento, considerou-se, para cada variável de entrada, um nível inferior (-1), um superior (+1) e um ponto central (0). Foi feita também a matriz de planejamento. Foram feitas 3 repetições no ponto central.

Com os resultados obtidos na execução do planejamento experimental fatorial, foi realizada regressão dos dados para obtenção de um modelo empírico. Fez-se a validação do modelo através do Teste F para verificar se este é significativo ao nível de confiança fixado. Por fim, construiu-se a superfície de resposta. Os cálculos desta seção foram realizados com o auxílio do programa Statistica.

Na Tabela 5 encontram-se os valores dos níveis das variáveis do planejamento experimental.

Tabela 5 – Níveis das variáveis do planejamento experimental fatorial

Variáveis	Nível (-1)	Ponto Central (0)	Nível (+1)
U (% b.u)*	30	40	50
N (% p/p)*	0,5	1,0	1,5

(*) U = umidade inicial do meio e N = concentração de sulfato de amônio

Na Tabela 6 encontra-se a matriz de planejamento.

Tabela 6 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2

Ensaio	N*	U*
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

(*) variáveis codificadas

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO SECO DO PEDÚNCULO DO CAJU

Na Tabela 7 encontram-se os parâmetros observados e os desvios padrão para a caracterização físico-química do bagaço seco do pedúnculo do caju.

Tabela 7 – Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo do caju

Parâmetro	Unidade	Valor
Umidade	% b.s	11,69 ± 0,19
Resíduos minerais	% b.s	1,72 ± 0,085
pH	---	3,66 ± 0,032
SS*	°Brix	25,31 ± 0,025
AR*	g/g	20,26 ± 0,22
ART*	g/g	24,47 ± 1,16
Pectina	%pectato de cálcio	8,39 ± 0,21
Proteína bruta	%	11,54 ± 1,20
D*	g/mL	0,59 ± 0,002

(*) SS = sólidos solúveis; AR = açúcares redutores; ART = açúcares redutores totais; D = densidade aparente

O valor de pH encontrado para o bagaço do caju (Tabela 7) está próximo dos valores citados por SANTOS et al. (2005a): 3,3 e 2,8 para o bagaço seco do pedúnculo do caju comum e da variedade CP76, respectivamente. BRANDÃO et al. (2003) citaram que para o pedúnculo *in natura* da variedade CCP06, o pH foi igual a 4,01. Comparando-se os valores de pH do pedúnculo *in natura* com o valor do pH do pedúnculo seco obtido nesse trabalho, observa-se que houve diminuição do valor. Isto pode ter ocorrido devido à concentração de ácidos durante o processo de secagem (CAMPOS, 2003).

De modo geral, o pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores ótimos para o desenvolvimento de microrganismos. Geralmente, os fungos preferem pH entre 4,5 e 5,0 (TARAGANO & PILOSOF, 1999; FAWOLE & ODUNFA, 2003; SANTOS et al., 2005a). Porém, MAIORANO (1990) observou que pH

inicial de 3,6 proporcionou maior produção de pectinases, usando *Aspergillus sp.* em processo FSS, tendo como substrato farelo de trigo.

Assim, o pH do bagaço caracterizado pode vir a promover a produção de pectinases sem necessitar de ajuste utilizando solução tamponante. Além disso, o pH ácido favorece o armazenamento a temperatura ambiente sem problemas de contaminação.

A umidade obtida (11,69%) com a secagem do bagaço condiz com o reportado por SANTOS et al. (2005a).

A quantidade de água no meio fermentativo semi-sólido é um fator limitante e afeta diretamente as necessidades do microrganismo, além do tipo de produto final.

Para utilizar este resíduo, poderá ser preciso a adaptação do teor de umidade, porque alguns microrganismos produtores de pectinases necessitam de teores mais elevados do que o encontrado no resíduo. Assim provavelmente será necessária adição de água.

Alguns autores (ANTIER et al., 1993; CASTILHO, 1997; TARAGANO & PILOSOFF, 1999) citam a utilização de diversos substratos para produção de pectinases pelo *Aspergillus niger* com atividade de água acima de 0,93.

É importante salientar que baixos níveis de atividade de água significam baixa disponibilidade de moléculas de água nas proximidades das células, dificultando a troca de solutos na fase sólida, diminuindo o metabolismo e gerando menores velocidades de crescimento ou de síntese de metabólitos. Em contrapartida, elevados índices de atividade de água dificultam a difusão de ar pelas partículas sólidas, levando à redução no crescimento microbiano (ABUD et al., 2007).

O teor de sólidos solúveis (SS) obtido para o bagaço seco do pedúnculo do caju foi de 25,31 °Brix, valor maior do que os observados na literatura para o bagaço *in natura*. BRANDÃO et al. (2003) caracterizaram o pedúnculo *in natura* de caju tipo CCP06 e constataram que este possuía 9,8 °Brix. Já os valores de SS do bagaço seco encontrado na literatura diferem de forma drástica em relação aos valores obtidos. MATIAS et al. (2005) obtiveram valor de 2,88 °Brix, enquanto SANTOS et al. (2005a) obtiveram valores de 17,5 °Brix para o bagaço seco do caju comercial e 47,5 °Brix para o bagaço seco do caju CP76.

A concentração de açúcares redutores (glicose e frutose) no bagaço foi em torno de 20,26 g/g (202,6 mg/100g). Os valores de AR encontrados na literatura (MATIAS et al., 2005) tanto para o pedúnculo *in natura* (6,84 mg/100g) quanto para o pedúnculo seco (13,32 mg/100g) foram inferiores.

A presença de pectina no meio fermentativo semi-sólido é importante, uma vez que esta apresenta efeito indutivo e favorece a excreção das pectinases pelos fungos produtores (THAKUR et al., 1997).

O valor de pectina observado (8,39%) encontra-se próximo do relatado por SANTOS et al. (2005b), 6,92% para o pedúnculo seco do caju. Porém, para o bagaço seco do caju CP76, SANTOS et al. (2005a) observaram valor em torno de 24,5%.

Quantitativamente, a literatura indica que altas concentrações de açúcares no meio suprem a necessidade dos microrganismos para seu crescimento e a pectina no meio é pouco utilizada. Porém, quando a concentração de açúcares é menor que a concentração de pectina, ocorre facilmente a quebra das moléculas pécticas, já que devido à abundância são mais consumidas, levando há altas atividades enzimáticas (SOUZA et al., 2007).

Os resultados mostram que é necessária a adição do indutor pectina nessa fração de bagaço de caju a fim de que a atividade enzimática se sobressaia.

FONTANA et al. (2005), utilizando *Aspergillus niger* T0005007-2 como microrganismo e farelo de trigo como meio, constataram que a adição de pectina cítrica em meio sólido, até o limite de 16% (p/p), levou a um aumento da atividade enzimática.

O valor de proteína bruta (11,54%) encontra-se próximo do valor observado por SANTOS et al. (2005a) (10,10%). Entretanto, MATIAS et al. (2005) relataram valor para o bagaço seco de caju igual a 3,25%. Para o pedúnculo fresco, HOLANDA et al. (1998) observaram concentração de proteína bruta em torno de 6,58%.

A caracterização física com relação à morfologia do substrato é essencial, sobretudo, quanto ao tamanho e a porosidade, porque estas propriedades governam a área superficial acessível ao microrganismo (SANTOS et al., 2005a).

Na Figura 4 encontra-se a distribuição granulométrica do resíduo do pedúnculo do caju seco. Observa-se que 60% do bagaço ficaram retidos nas peneiras de 24 e 35 mesh, o que corresponde aos tamanhos 0,7 e 0,42 mm.

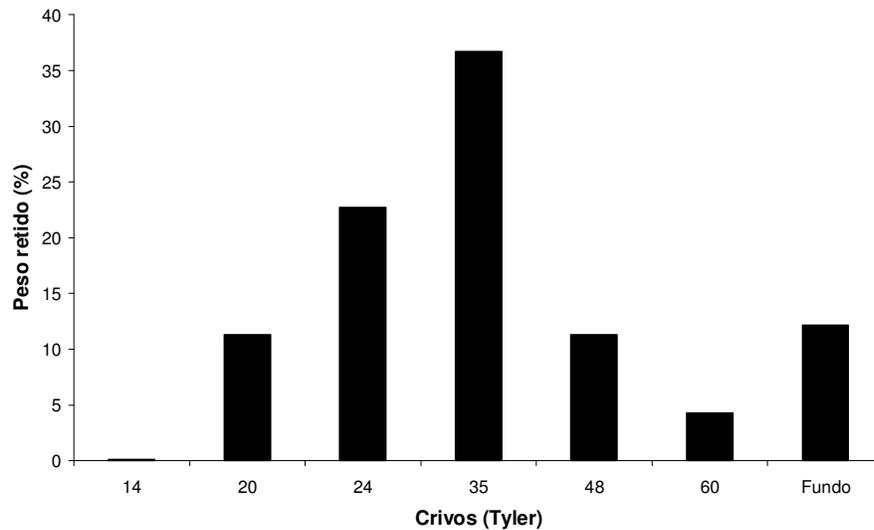


Figura 4 - Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo do caju

Este tamanho de partícula pode ser utilizado em um processo de FSS com *Aspergillus niger*, já que foi descrito na literatura, tamanhos de partículas para produção de pectina entre 0,5 e 0,7 mm (HENNIES, 1996; MARTINS et al., 2005).

O tamanho médio das partículas de resíduo do meio fermentativo deve ser obtido de forma que não se tenha nem partículas grandes, nem pequenas. Partículas de tamanho reduzido promovem área superficial maior, e conseqüentemente maior grau de transformação. Porém, o processo necessita ter uma granulometria própria permitindo a circulação de ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo (DEL BIANCHI et al., 2001). Partículas maiores promovem mais espaço interpartículas, diminuindo o rendimento da absorção dos nutrientes pelos microrganismos (SANTOS et al., 2005a; SOUZA et al., 2007).

Além disso, a análise granulométrica é importante na extração do complexo enzimático, já que sólidos finamente divididos facilitam o acesso por parte do solvente (SOUZA et al., 2007).

É importante lembrar que, de forma geral, a caracterização feita para as culturas pode variar drasticamente dependendo de época de colheita, dos fenômenos e práticas agrícolas relacionados com o plantio. Sendo então de extrema importância a caracterização do substrato para o processo de FSS e, conseqüentemente, o ajuste de determinados parâmetros, o que é também mais um desafio há ser considerado na utilização desse

processo.

4.2 – CONSTRUÇÃO E AJUSTE DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DO PEDÚNCULO DE CAJU SECO

Na Tabela 8 encontram-se os dados de atividade de água (a_w) e os valores médios de umidade de equilíbrio do material (x_{eq}) nas temperaturas estudadas. A estes dados, foram ajustados os modelos de BET, GAB, Oswin, Henderson e Smith. Os dados de pesagem das amostras a cada 24 h, assim como os dados calculados até a obtenção dos valores médios (Tabela 8) para as temperaturas de construção das isotermas, encontram-se em anexo na seção A deste trabalho.

Tabela 8 - Valores de atividade de água e umidade de equilíbrio do pedúnculo de caju seco

Temperatura (°C)	a_w	x_{eq} (% b.s)	Temperatura (°C)	a_w	x_{eq} (%b.s)
25	0,23	5,75	35	0,23	8,35
	0,33	7,20		0,32	9,66
	0,43	9,21		0,41	11,49
	0,57	12,18		0,57	13,64
	0,75	20,76		0,75	23,20
	0,86	29,42		0,84	30,29
30	0,23	5,31	40	0,23	7,35
	0,32	7,10		0,31	9,04
	0,42	9,22		0,40	11,16
	0,57	11,77		0,57	12,98
	0,75	20,82		0,75	21,86
	0,84	27,95		0,83	28,27

Na Tabela 9, encontram-se os valores dos parâmetros, do desvio percentual médio (P), do coeficiente de determinação (R^2) para cada temperatura, e o resultado da avaliação da distribuição dos valores residuais versus valores preditos para cada modelo. Esta distribuição pode ser observada nas Figuras de 5 a 10.

Tabela 9 - Parâmetros de ajuste das isotermas de adsorção do pedúnculo do caju seco aos modelos testados

Modelo		Temperatura (°C)			
		25	30	35	40
BET	Xm	5,64	5,61	6,33	6,07
	C	12,59	11,28	39,72	49,85
	n	14,39	15,02	13,35	13,18
	R ²	0,9998	0,9986	0,9948	0,9941
	P (%)	0,86	2,70	4,79	4,11
Distribuição		tendenciosa			
GAB	Xm	7,35	6,95	7,14	6,81
	C _G	5,64	6,00	49,22	33,21
	K	0,8886	0,9104	0,9137	0,9180
	R ²	0,9989	0,9983	0,9971	0,9962
	P (%)	1,97	2,34	2,13	3,53
Distribuição		aleatória			
Oswin	a	10,87	10,72	13,41	12,73
	b	0,5539	0,5811	0,4865	0,4946
	R ²	0,9983	0,9979	0,9930	0,9929
	P (%)	2,17	2,63	4,51	4,43
Distribuição		aleatória			
Henderson	a	0,0490	0,0509	0,0217	0,0238
	b	1,10	1,08	1,31	1,31
	R ²	0,9945	0,9926	0,9812	0,9816
	P (%)	5,57	1,94	7,64	7,94
Distribuição		não aleatória			
Smith	a	0,9188	0,7552	2,49	2,28
	b	-33,12	-33,69	-34,82	-33,42
	R ²	0,9947	0,9931	0,9746	0,9744
	P (%)	5,19	6,11	8,00	8,72
Distribuição		não aleatória			
BET linear	Xm	4,48	4,73	5,33	5,19
	C _L	890966	2055171	1703302	7279792
	R ²	0,9665	0,9843	0,9575	0,9697
	P (%)	8,55	7,22	12,05	7,28
Distribuição		tendenciosa			

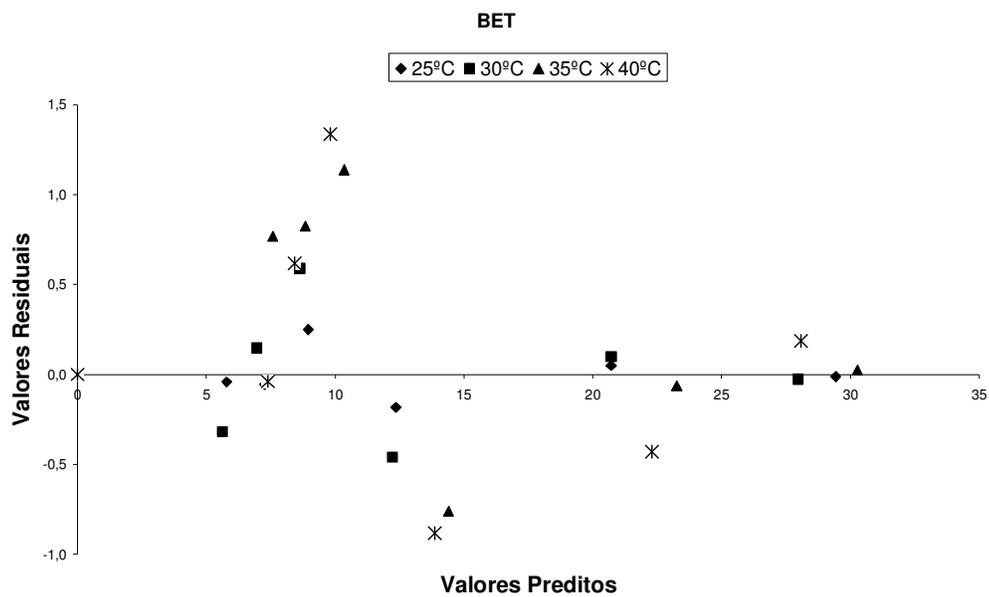


Figura 5 - Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de BET

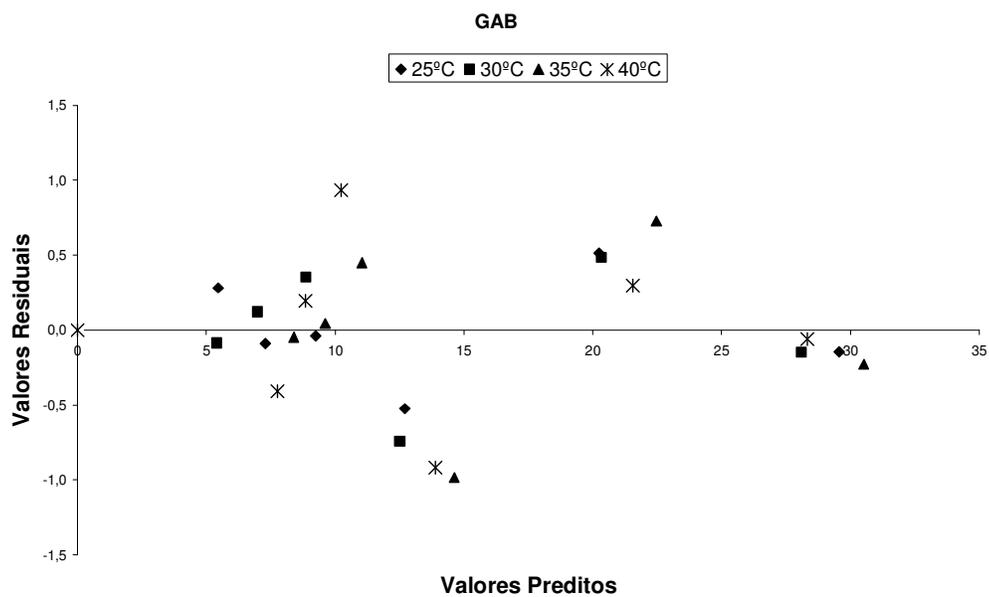


Figura 6 - Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de GAB

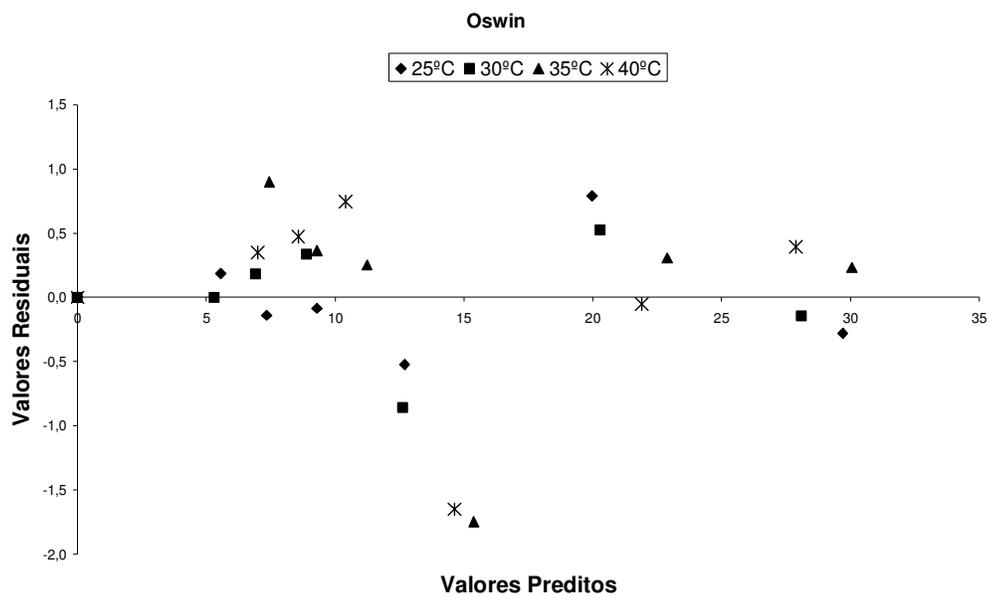


Figura 7 - Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de Oswin

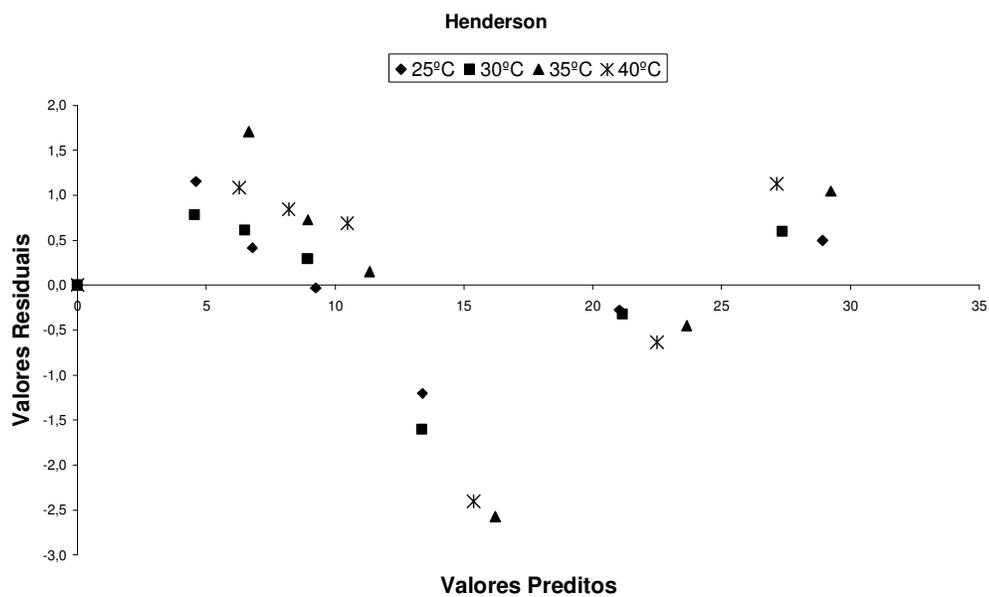


Figura 8 - Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de Henderson

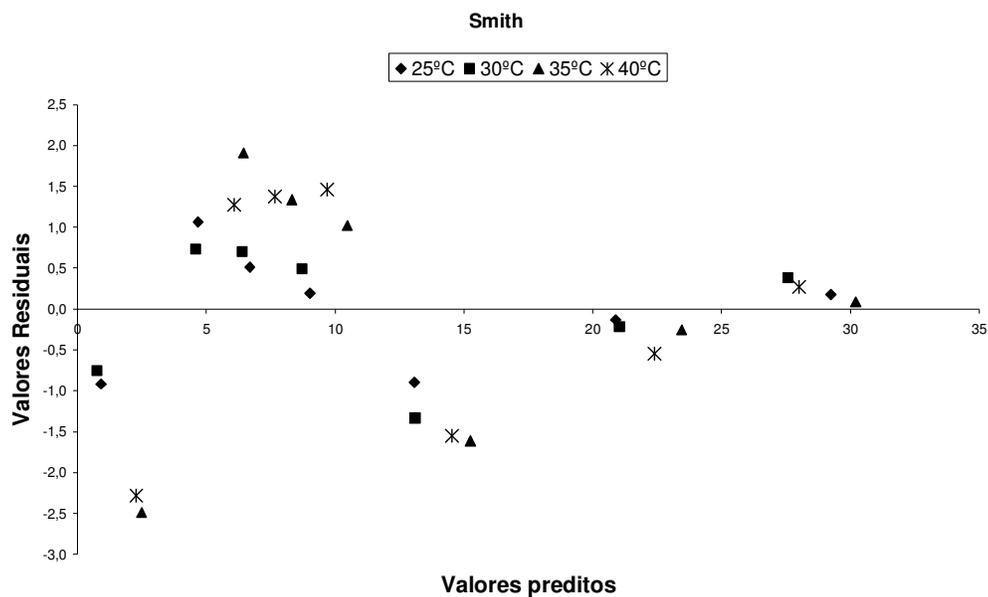


Figura 9 - Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de Smith

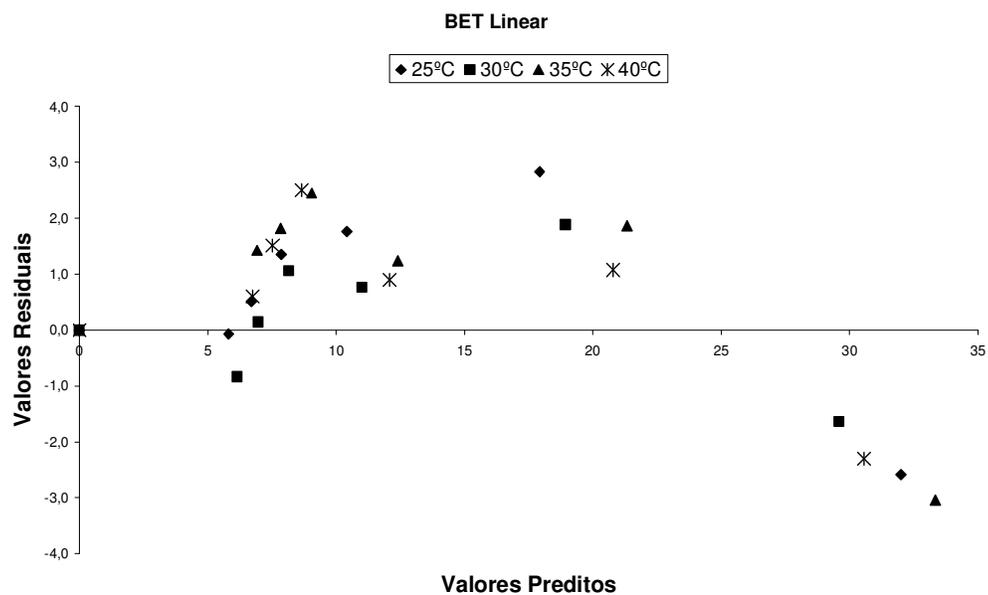


Figura 10 - Valores residuais em função dos valores preditos para o modelo de BET linear

A partir das Figuras 5 a 10, observa-se que a distribuição de resíduos para o modelo de BET (Figura 5) apresenta comportamento tendencioso, devido à distribuição de alguns pontos superiores à esquerda. Logo, este modelo representa os dados experimentais com valores residuais maiores, de modo que se torna pouco satisfatório quanto ao ajuste.

Comportamento tendencioso pode ser observado também para o modelo de BET linear (Figura 10). Para os modelos de Henderson (Figura 8) e Smith (Figura 9) a distribuição não foi aleatória. Para os modelos de GAB (Figura 6) e Oswin (Figura 7), observa-se que estes possuem distribuição aleatória, sendo então confiáveis para representar o ajuste dos dados experimentais.

Na Tabela 9, observa-se que todos os modelos se ajustaram de forma adequada aos dados experimentais, uma vez que o valor de P indica um bom ajuste quando for inferior a 10%, enquanto R^2 deve ser o mais próximo da unidade (LOMAURO et al., 1985). A exceção foi o ajuste do modelo de BET linear a temperatura de 35 °C, onde o valor de P foi igual a 12,05%. O modelo que melhor se ajustou foi o de GAB, seguido pelo de BET. Já o que apresentou maiores valores de P e menores valores de R^2 foi o de Smith.

Observando-se a distribuição de resíduos (Figuras 5 a 10) e a Tabela 9, pode-se afirmar que o modelo que melhor ajusta os dados experimentais das isotermas é o de GAB.

Na Figura 11, encontra-se o gráfico do ajuste do modelo de GAB. Observa-se que as curvas de 25 e 30 °C se sobrepõem, indicando que não há influência da temperatura nestas isotermas. Diferentemente, nas curvas de 35 e 40 °C se observa pequena influência desta variável. Observa-se ainda um efeito maior da temperatura do intervalo de 25-30 °C para o de 35-40 °C, especialmente com a atividade de água entre 0,2 a 0,6.

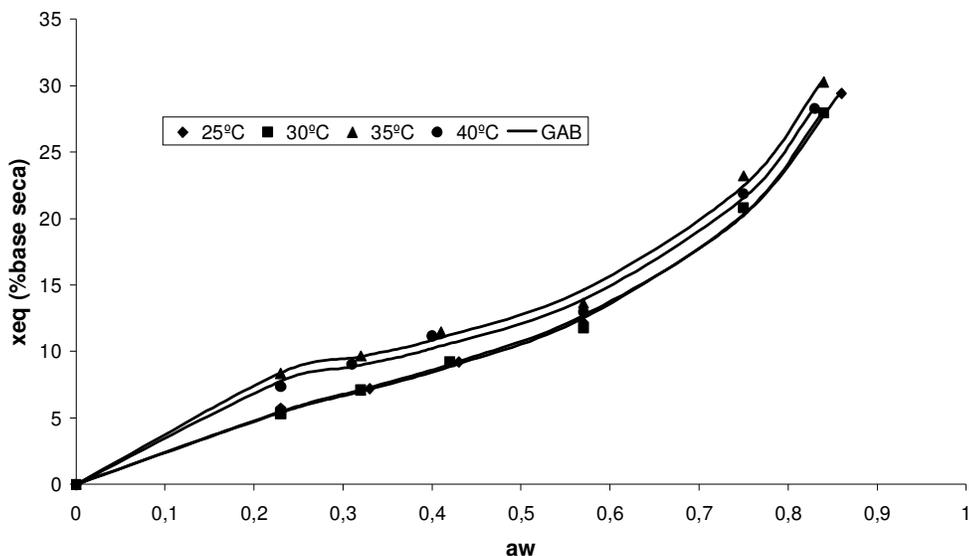


Figura 11 - Modelo de GAB para isotermas de adsorção do pedúnculo de caju seco

Com base na Figura 11, observa-se que para uma mesma atividade de água (a_w), a quantidade de água adsorvida aumenta quando a temperatura passa da faixa de 25-30 °C para 35-40 °C. KAYA & KAHYAOGU (2007) observaram este mesmo comportamento na construção de isotermas de adsorção para pétalas de açafrao nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C.

As isotermas de adsorção do pedúnculo do caju seco são curvas do tipo II, seguindo a classificação de BRUNAUER (BRUNAUER et al., 1938), cuja forma sigmoideal é utilizada principalmente em isotermas de produtos orgânicos.

BLAHOVEC (2004) estudou alguns modelos de isotermas de sorção, realizando um estudo matemático sobre os valores aceitáveis para cada parâmetro. Para o modelo de GAB e para as curvas do tipo II, este autor assegura que $0 < k \leq 1$ e $C_G > 2$. Observa-se que estes parâmetros (Tabela 9) estão dentro do intervalo descrito, tendo assim, a confirmação matemática do tipo de isotermas obtido nesse estudo.

Observa-se que o valor do parâmetro da equação de GAB, X_m , onde representa a umidade na monocamada do material adsorvente, não apresentou tendência definida em relação à temperatura, porém, k teve um pequeno acréscimo com o aumento desta e C_G aumentou quando passou do intervalo de 25-30 °C para 35-40 °C.

Quando se comparam os valores das umidades da monocamada molecular através da equação de BET linear (Tabela 9), observa-se tendência de aumento dos valores com a temperatura. Segundo FERREIRA & PENA (2003), este não é um comportamento comum, mas pode ser justificado através de dois mecanismos: um aumento da temperatura pode provocar modificações na estrutura física do produto, disponibilizando um maior número de sítios ativos com afinidade por moléculas de água, ou pode provocar um aumento na solubilidade de solutos intrínsecos ao produto, fazendo com que um maior número de moléculas de água fique retido na monocamada.

LAHSASNI et al. (2004) também observaram que as umidades na monocamada aumentavam seus valores com o aumento da temperatura, para as isotermas de adsorção da raquete da palma forrageira (*Opuntia ficus indica*) nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C.

Todos os parâmetros mencionados para os modelos de Henderson e Oswin (Tabela 9) encontram-se dentro do esperado, pois BLAHOVEC (2004) afirma que o modelo de Henderson deve apresentar $a > 0$ e $b \geq 1$ e, para o modelo de Oswin, $a > 0$ e $1 \geq b > 0$. Ter esses parâmetros dentro desses intervalos indica que não há ponto de inflexão na curva,

sendo assim, não há mudanças na concavidade das funções, logo estes parâmetros possuem consistência matemática e física.

Na literatura podem ser encontrados diversos trabalhos que relacionam teores iniciais de atividade de água com o desenvolvimento de diversos microrganismos responsáveis pelas sínteses de produtos obtidos em processo de FSS.

Em particular, *Aspergillus niger* é descrito por PINTO et al. (2006) como o microrganismo mais adaptável aos processos fermentativos, sendo em torno de 0,7 o valor da atividade de água mínima para o desenvolvimento de suas atividades metabólicas. Ao se correlacionar esse dado, utilizando o pedúnculo de caju seco no processo de FSS e as isotermas de adsorção obtidas, tem-se um indicativo de que a umidade no substrato, nos intervalos de temperatura de 25-30 °C e 35-40 °C, não deve ser menor que 17,5 e 19,0% b.s, respectivamente.

Para a produção de pectinases por *Aspergillus niger* em FSS, diversos autores descrevem processos (CASTILHO, 1997; ANTIER et al., 1993; TARAGANO & PILOSOFF, 1999) em que se pode constatar que a atividade de água que melhor propicia à síntese do produto pelo microrganismo encontra-se acima de 0,90.

Esta informação é importante, uma vez que para se produzir pectinases utilizando como substrato o pedúnculo de caju seco, e correlacionando a atividade de água e a umidade de equilíbrio através das isotermas obtidas nesse trabalho, a umidade do material deverá estar acima de 35% b.s.

Sendo assim, é de extrema importância o conhecimento do comportamento higroscópico do produto semi-sólido utilizado como substrato em um processo fermentativo, já que a quantidade de água disponível no meio para o microrganismo se desenvolver e sintetizar as reações ao longo do processo de produção é um fator limitante.

4.3 - CALOR ISOSTÉRICO DE ADSORÇÃO

As curvas para obtenção do calor isostérico líquido (q_{st}) foram construídas com base nos dados das isotermas ajustadas através do modelo de GAB, já que este foi o que melhor representou os dados experimentais.

Na Tabela 10, encontram-se os valores usados para construção da curva de $\ln a_w$ em função de $1/T$. Na Figura 12, encontram-se as regressões lineares feitas para a obtenção das inclinações para o cálculo do calor isostérico (Q_{st}).

Tabela 10 - Valores resultantes do cálculo de ln aw para várias umidades de equilíbrio

xeq (b.s)	Temperatura (°C)							
	25		30		35		40	
	aw	ln aw	aw	ln aw	aw	ln aw	aw	ln aw
0,05	0,21	-1,561	0,21	-1,561	0,045	-3,101	0,07	-2,659
0,07	0,31	-1,171	0,325	-1,124	0,13	-2,040	0,18	-1,715
0,10	0,465	-0,766	0,475	-0,744	0,35	-1,050	0,39	-0,942
0,13	0,58	-0,545	0,585	-0,536	0,51	-0,673	0,535	-0,625
0,20	0,75	-0,288	0,745	-0,294	0,71	-0,342	0,725	-0,322
0,30	0,865	-0,145	0,855	-0,157	0,835	-0,180	0,845	-0,168

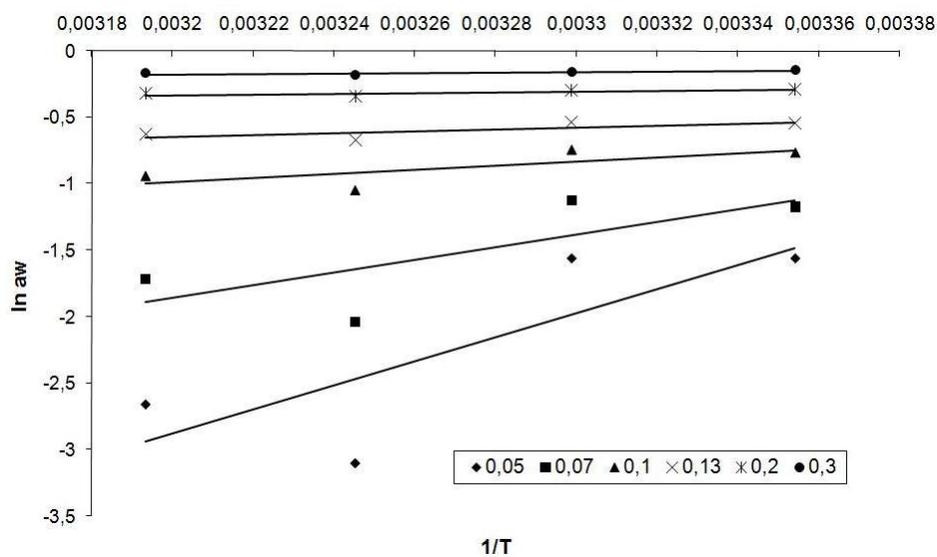


Figura 12 - Curvas de ln aw versus 1/T.

Na Tabela 11, encontram-se os resultados obtidos após a regressão linear para ajuste dos dados de ln aw versus 1/T, ou seja, valores da inclinação das retas, calor isostérico líquido (q_{st}), calor isostérico total (Q_{st}) e coeficiente de determinação (R^2).

Tabela 11 - Resultado das regressões lineares das curvas do calor de adsorção em função das umidades de equilíbrio

xeq (b.s)	Inclinação	R^2	q_{st} (kJ/kg ⁻¹)	Q_{st} (kJ/kg ⁻¹)
0,05	9051,1	0,6394	-4173	-1783,7
0,07	4773,5	0,5569	-2201	188,3
0,10	1562,1	0,5455	-720	1668,8
0,13	706,2	0,5516	-326	2063,4
0,20	281,6	0,5989	-130	2259,1
0,30	173,2	0,6394	-80	2309,0

A partir dos dados da Tabela 11, construiu-se a curva do calor isostérico de adsorção em função da umidade de equilíbrio, representada pela Figura 13.

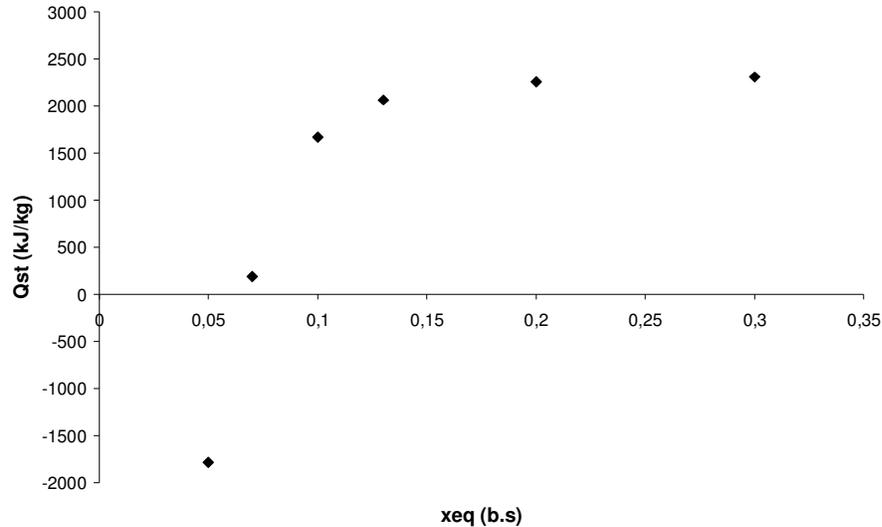


Figura 13 - Calor isostérico de adsorção versus umidade de equilíbrio

Verificando-se a Tabela 11, observa-se que ocorreu aumento nos valores do calor isostérico (Q_{st}) com o aumento da umidade de equilíbrio (x_{eq}).

É importante citar que não foram encontrados na literatura trabalhos que relatassem esse comportamento.

No entanto, diante da justificativa dada para o comportamento da umidade da monocamada (Tabela 9), considera-se que há mais sítios ativos com afinidade por água na monocamada molecular com o aumento da temperatura. Assim, dispõe-se de uma quantidade maior de energia para retirar uma mesma quantidade de água do material à medida que a umidade aumenta, podendo ocorrer também maior resistência ao movimento de água no material a temperaturas mais altas, diferentemente da maioria dos materiais (SALWIN, 1963).

Observa-se também a ocorrência de calor inferior ao calor latente de vaporização da água, sendo este valor não esperado, visto que a menor quantidade de calor necessária para evaporar a água é o calor latente de vaporização. Além disso, os coeficientes de determinação para a regressão linear foram mais baixos do que o recomendado. Contudo, os valores de R^2 observados podem ser justificados pelo acúmulo de erros na regressão

linear feita para os cálculos do calor latente (Figura 12), já que os pontos em questão possuem comportamento mais complexo do que a regressão pode explicar. Porém, ainda assim, é possível à obtenção da indicação dos fenômenos analisados neste trabalho.

4.4 – ESTUDO DA FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA: INFLUÊNCIA DA UMIDADE E DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO NO MEIO

Inicialmente, foram realizados ensaios com o objetivo de se obter os níveis posteriormente utilizados na execução do planejamento experimental fatorial. Em seguida, com a realização dos ensaios do planejamento fatorial, fez-se um estudo das cinéticas de produção enzimática, observando os parâmetros pH, açúcares redutores, umidade do meio, atividade poligalacturonásica e atividade pectinolítica. Com os dados das atividades enzimáticas, analisaram-se os resultados sob a perspectiva do planejamento fatorial, verificando a influência da umidade inicial e a concentração de sulfato de amônio do meio.

4.4.1 - ENSAIOS PRELIMINARES: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Observa-se na Figura 14 o comportamento da umidade em função do tempo de fermentação para o meio com concentrações diferentes de sulfato de amônio.

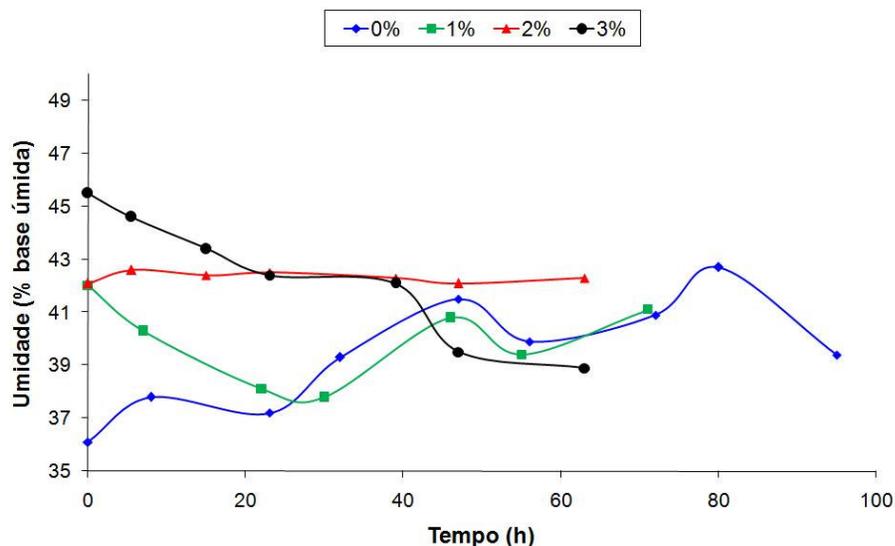


Figura 14 – Efeito da adição da fonte de nitrogênio na umidade durante fermentação

Das amostras retiradas para monitoramento da umidade, não se observou um comportamento definido. Apenas a umidade do ensaio 2 permaneceu constante ao longo da cinética. No ensaio com 3% da fonte de nitrogênio observa-se um decréscimo desta variável. Diferentemente, dos ensaios com 0 e 1% onde se observa um aumento considerável nos valores. Acredita-se que este comportamento foi detectado, porque o aumento na umidade do meio é proveniente da respiração do microrganismo ao metabolizar o substrato.

Na Figura 15 tem-se o comportamento do pH ao longo da fermentação com as quatro concentrações diferentes de sulfato de amônio no meio.

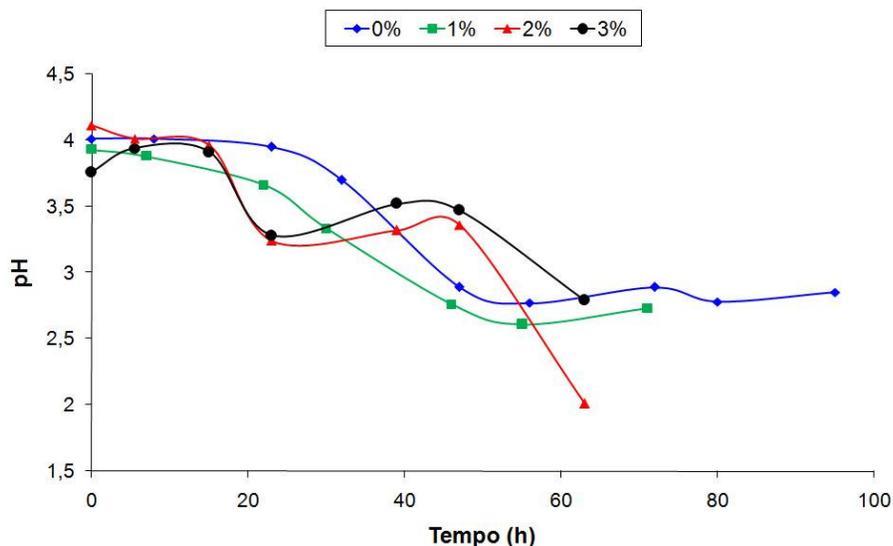


Figura 15 – Efeito da adição da fonte de nitrogênio no pH durante fermentação

Iniciou-se o processo com pH igual a aproximadamente 4,0, porém, ocorreu queda acentuada para o mesmo após 20 h de fermentação para os meios com 0 e 1% e após 15 h para os meios com 2 e 3% de sulfato. Observa-se que o meio com 2% alcançou o menor pH caindo para metade do valor inicial. No entanto, não se observa produção considerável de enzimas com essa concentração. Assim, pode esta ocorrendo a produção de uma substância ácida ao invés de ser produzida a poligalacturonase.

DANIEL et al. (1996), estudando a influência do pH na produção de pectinases usando como meio semi-sólido a casca de limão, investigaram a possibilidade da utilização de uma fonte de nitrogênio como variável indireta no controle do pH durante o processo. Foram utilizadas como fonte de nitrogênio a uréia e o sulfato de amônio. Considerou-se a possibilidade de haver inibição do crescimento microbiano por queda de pH durante o processo fermentativo e observaram-se que utilizando a uréia (0,27%), obtiveram-se extratos enzimáticos com maiores concentrações (2,32 U/mL) com 46 h de cultivo.

Na Figura 16, encontra-se o comportamento da concentração de açúcares redutores em função do tempo de fermentação.

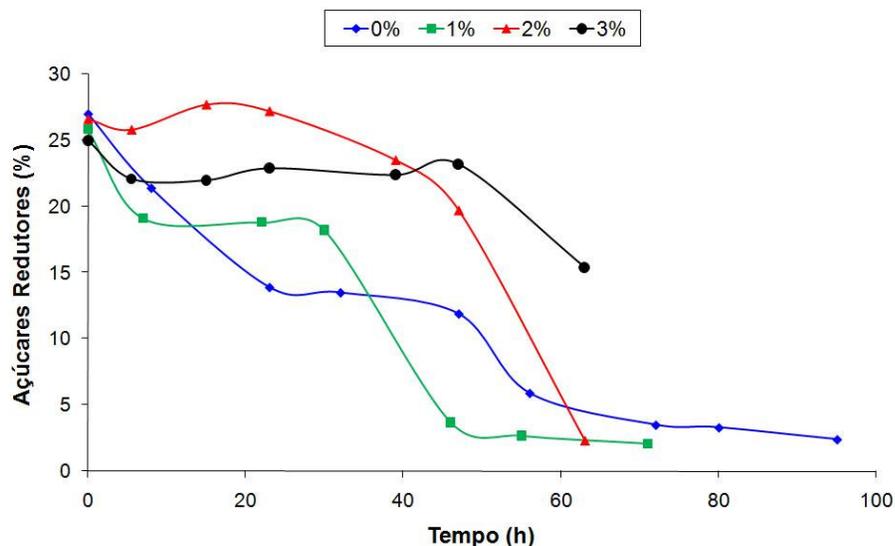


Figura 16 – Efeito da adição da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares redutores (AR) durante fermentação

Observa-se que o consumo de AR é mais rápido no meio sem adição da fonte de nitrogênio, e que à medida que aumenta a concentração este consumo é mais lento. Assim, para os meios com concentrações de sulfato de amônio iguais a 0, 1 e 2%, após 60 h de processo, atingiram-se valores próximos a 2% de AR enquanto no meio com 3% de nitrogênio com o mesmo tempo de processo atingem valores de 15% de AR. Mostrando que não houve consumo considerável dessa concentração e, conseqüentemente, não houve produção de enzimas.

Na Figura 17 tem-se a cinética de produção de pectinase frente à adição de sulfato de amônio nas concentrações de 0, 1, 2 e 3% (p/p) ao resíduo, cultivados com teores de umidade de 40% (b.u.).

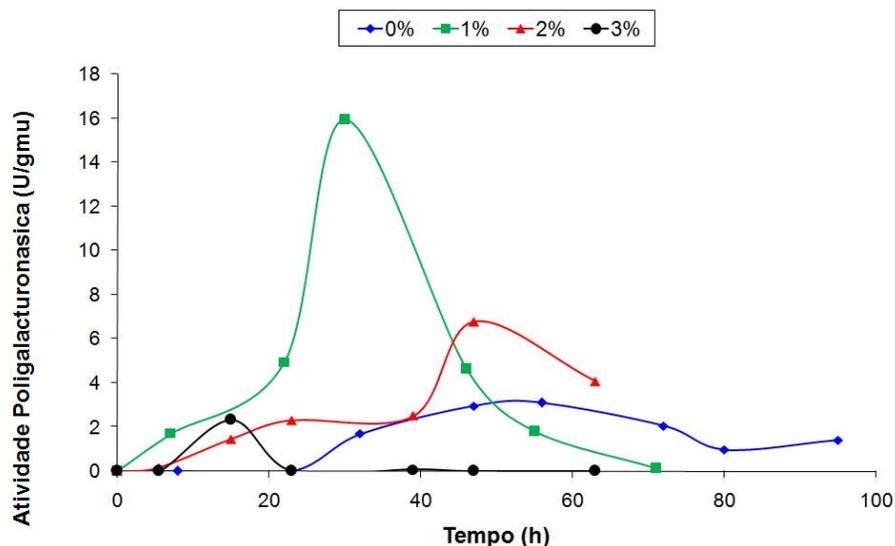


Figura 17 – Efeito da adição da fonte de nitrogênio na atividade poligalacturonásica ao resíduo do caju

A atividade poligalacturonásica no resíduo é fortemente influenciada pela adição da fonte de nitrogênio. Quando se compara a cinética de fermentação sem a adição da fonte com a adição de 1% de sulfato de amônio no meio, observa-se que ocorreu um aumento de 5 vezes do valor da atividade que passa de 3,1 U/g para 15,95 U/g, reduzindo também o tempo de fermentação necessário para o maior pico, passando de 56 para 32 h de fermentação.

Com a adição de 2% da fonte de nitrogênio ao meio, o valor máximo da atividade poligalacturonásica (6,8 U/g) foi maior que a atividade observada para o meio sem adição da fonte e o tempo de fermentação (47 h) para se alcançar o pico de atividade enzimática também foi menor, porém, com valores inferiores aqueles observados para o meio com 1%. Já o meio com 3% não mostrou atividade enzimática considerável. Sendo um indicativo da inibição do microrganismo pelo sulfato de amônio em tal concentração.

TRINDADE et al. (1996) estudando o emprego de diferentes substratos na produção de poligalacturonase, encontraram para o morango atividade de 0,8 U/mL com 160 h de fermentação e para o maracujá e acerola, 0,8 e 1,4 U/mL, respectivamente, com 96 h. Porém, de todos os resíduos analisados nesse estudo, a maçã apresentou a maior atividade 14 U/mL com 22 h. DANIEL et al (1996), usando casca de limão como meio, encontraram 2,3 U/mL com 48 h de processo.

De forma conclusiva, observa-se que o bagaço do pedúnculo de caju pode ser considerado uma fonte viável na produção de poligalacturonases através da fermentação em meio sólido, apresentando inclusive valores competitivos quando comparado com outras fontes de carbono. Já que o valor de atividade poligalacturonásica máxima observados foi 15,95 U/g (6,38 U/mL), com umidade inicial de 40% b.u e 1% (p/p) de sulfato de amônio no meio, em 32 h de fermentação.

Observa-se também que o uso do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio no meio pode incrementar os valores da atividade poligalacturonase em um tempo de fermentação menor do que o meio sem esse aditivo. Porém, o microrganismo possui nível de tolerância quando ao valor de nitrogênio adicionado. Sendo assim, indica-se a investigação mais aprofundada dessa variável, observando seu efeito sinérgico junto à umidade do meio através da aplicação de um planejamento experimental fatorial.

4.4.2 – CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES

Nessa seção serão analisados os resultados das cinéticas para cada ensaio seguindo o planejamento experimental, como descrito no item 3.7. A descrição detalhada dos dados experimentais encontra-se em anexo na seção C deste trabalho.

Tiveram-se como variáveis manipuladas a concentração de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio - N) e a umidade do meio de cultivo (U). Analisaram-se o comportamento da umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (PG) e atividade pectinolítica (Pt) ao longo do tempo para cada ensaio.

A representação gráfica do comportamento cinético da atividade de água (aw) de cada ensaio do processo fermentativo para produção de pectinase encontra-se na Figura 18.

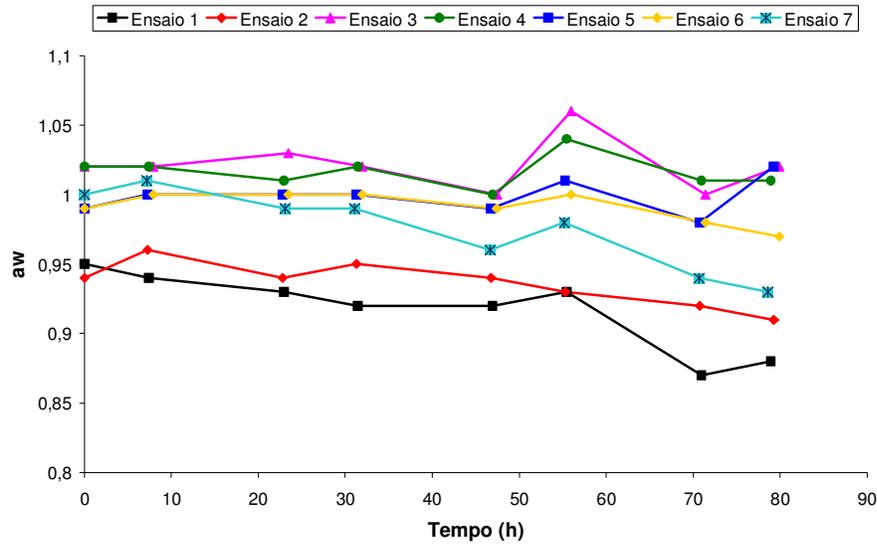


Figura 18 - Comportamento cinético da atividade de água (aw)

Observa-se que ocorreu atividade poligalacturonásica (PG) com aw acima de 0,94, porém, o consumo de açúcares resultando em maiores valores desses parâmetros, apenas ocorreu com aw inicial entre 0,99 e 1,00. Já para atividade pectinolítica (Pt), a produção ocorreu com aw inicial acima de 0,99, obtendo-se as maiores produções também com esse valor de aw inicial.

Esses resultados em relação à atividade de água para produção de enzimas pectinolíticas, usando *Aspergillus niger*, condizem com os observados na literatura. CASTILHO (1997) usando farelo de trigo e soja realizou testes e verificou que atividades de água entre 0,95 e 0,98 foram as mais propícias à síntese pelo fungo. ANTIER et al. (1993) para selecionar linhagens mutantes de *A. niger*, tendo como substrato polpa de café, utilizaram meios com aw igual a 0,96. TARAGANO & PILOSOF (1999) observaram que os maiores valores de atividade pectinolítica foram obtidos com atividade de água inicial entre 0,93 e 0,94, usando farelo de trigo como meio. Assim, de modo geral, os valores de atividade de água descritos pela literatura estão entre 0,93 e 0,98.

Em relação à umidade do meio de cultivo (Figura 19), observa-se que houve variação brusca desta variável apenas nos ensaios 3, 4 e 5, sendo estes os ensaios que tiveram fermentação mais intensa. Este aumento da umidade pode ter ocorrido devido a uma maior evaporação de água, já que as reações de síntese são exotérmicas. Os picos com os maiores valores de umidade observados ocorreram com aproximadamente 55 h de

fermentação.

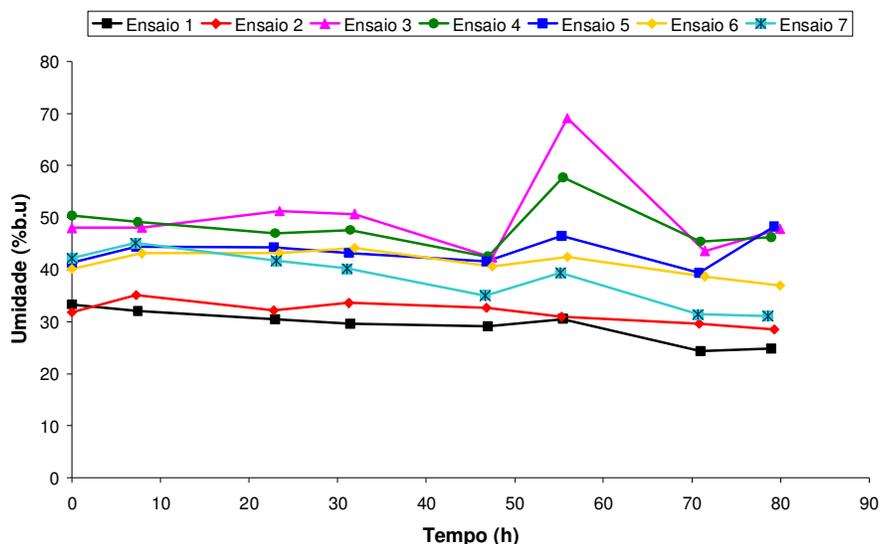


Figura 19 - Comportamento cinético da umidade do meio de cultivo

Os maiores valores de atividade poligalacturonásica foram obtidos nos ensaios com umidade inicial entre 40 e 50% b.u. Para a atividade pectinolítica, os maiores valores foram obtidos com 40% b.u. de umidade inicial.

TERZI et al. (2003) observaram produção máxima de poligalacturonase em meio com farelo de trigo e umidade inicial de 44% b.u. SANTOS (2007), utilizando como meio o bagaço seco do pedúnculo do caju, obteve maiores valores de atividade poligalacturonásica e maior redução de viscosidade, como medida da atividade pectinolítica, com valor inicial de umidade igual a 40% b.u.

Na Figura 20 encontra-se o comportamento dos açúcares redutores (AR) ao longo do tempo para cada ensaio.

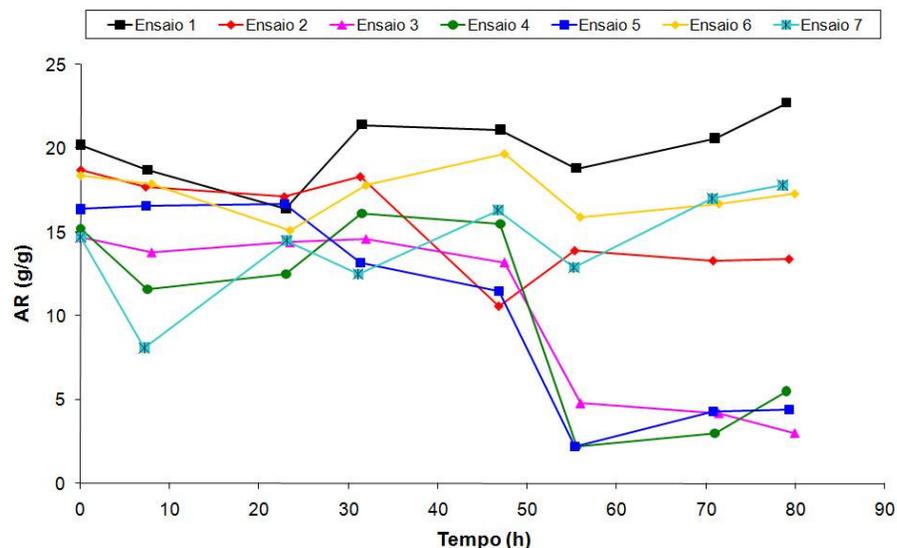


Figura 20 - Comportamento cinético da concentração de açúcares redutores (AR)

Observa-se queda acentuada na concentração de açúcares do meio nos ensaios 3, 4 e 5 a partir das 47 h de fermentação, indicando que houve consumo deste pelos microrganismos. Tais ensaios iniciaram com concentração de açúcares (AR) em torno de 15 g/g e concentração de pectina de 8,4% pectato de cálcio.

SANTOS et al. (2006) também observaram queda acentuada no consumo de AR na produção de pectinases usando pedúnculo seco de caju como substrato e *Aspergillus niger* CCT 0916 como microrganismo agente da fermentação, com apenas 10 h de fermentação, com valores iniciais de 35,45 g/g e 7,31% de AR e pectina, respectivamente, chegando à atividade poligalacturonásica máxima de 2,5 U/g.

O consumo tardio desses açúcares nas cinéticas apresentadas indica uma tendência ao consumo preferencial de pectina pelo microrganismo, diferentemente do exposto por SANTOS et al. (2006).

De fato, diversos trabalhos descrevem que altos rendimentos são obtidos em meios que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina, já que altas concentrações de açúcares desfavorecem o consumo do indutor pectina, inibindo a produção de pectinases (FONTANA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

Os maiores valores de atividade poligalacturonásica (PG) ocorreram próximo às 70 h de fermentação (Figura 21), sendo igual a 10,92 U/g (maior atividade PG encontrada na

realização do planejamento).

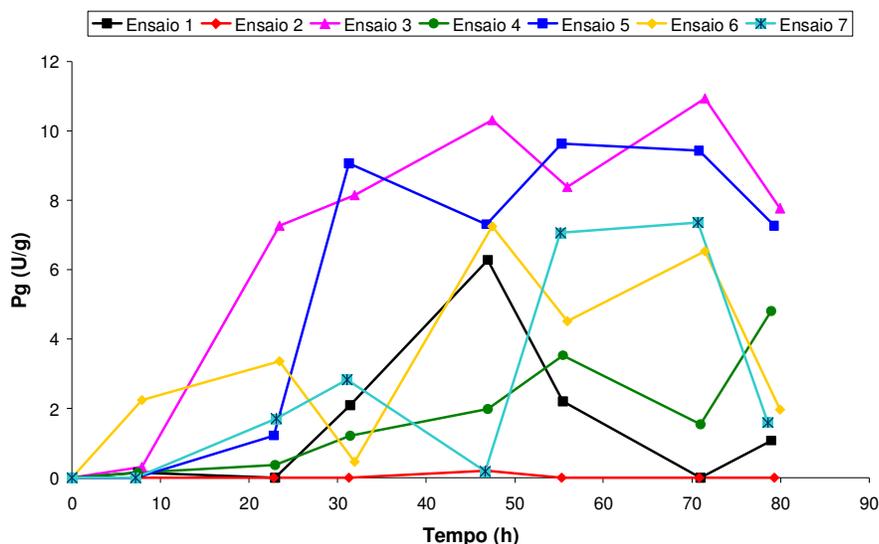


Figura 21 - Comportamento cinético da atividade poligalacturonásica (PG)

Ao se fazer correlação entre o comportamento da atividade poligalacturonásica (Figura 21) com o consumo de açúcares redutores (Figura 20), constata-se que, quantitativamente, o consumo de açúcares dos ensaios 3, 4 e 5 foi equivalente. No entanto, não se observa no ensaio 4 a alta produção de PG observada nos ensaios 3 e 5. Logo, apesar de ter sido consumida grande quantidade de açúcares nesse ensaio, não se observou grandes valores de PG. Diferentemente do ensaio 1, que apesar da produção razoável de PG, não se observa grandes consumos de açúcares.

Assim, tem-se o indicativo de que no ensaio 4 o consumo preferencial de açúcares não favoreceu a produção de poligalacturonase (PG). Já no ensaio 1, segundo o que se observa na Figura 21, o consumo preferencial de pectina favoreceu a produção de PG. Assim, confirma-se a discussão de que o meio deve apresentar concentrações balanceadas de açúcares e pectina para se obter maiores produções de atividade enzimática (FONTANA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

Comparando os ensaios 1 e 2, ambos com 30% b.u de umidade inicial, observa-se que não ocorreu fermentação no ensaio 2, diferentemente do ensaio 1. Acredita-se que ocorreu inibição pela presença do sulfato de amônio, já que no ensaio 2 a concentração foi igual a 1,5% (p/p) e no ensaio 1, esta concentração foi igual a 0,5% (p/p) (NOOMHORM

et al., 1992).

A atividade pectinolítica máxima observada (Figura 22) foi igual a 11 U/g e foi alcançada em dois ensaios (5 e 7), com tempos de fermentação diferentes (47 e 71 h, respectivamente), porém, sob as mesmas condições iniciais de umidade (40% b.u) e concentração de sulfato de amônio (1,0% p/p).

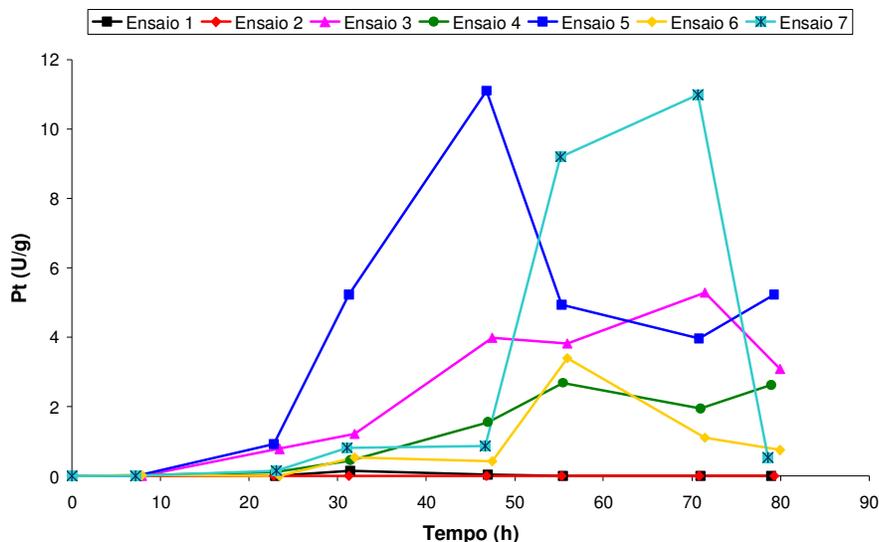


Figura 22 - Comportamento cinético da atividade pectinolítica (Pt)

Não se observa atividade pectinolítica nos ensaios com umidade inicial de 30% b.u. Segundo ACUÑA-ARGUELLES et al. (1994), em meio com baixa quantidade de água disponível ao microrganismo ocorrem modificações em suas membranas, resultando na limitação de transporte e afetando o metabolismo do microrganismo.

É importante visualizar também que no ensaio 5, a queda acentuada da concentração de açúcares redutores (AR) coincidiu com o máximo valor de atividade pectinolítica (Pt) (11,1 U/g).

O pH inicial dos ensaios (Figura 23) foi em torno de 3,5. MAIORANO (1990), estudando a produção de pectinase por *Aspergillus sp.* em FSS, usando farelo de trigo como substrato, observou que o valor de pH inicial do meio que proporcionam a maior produção de pectinase situou-se ao redor de 3,6.

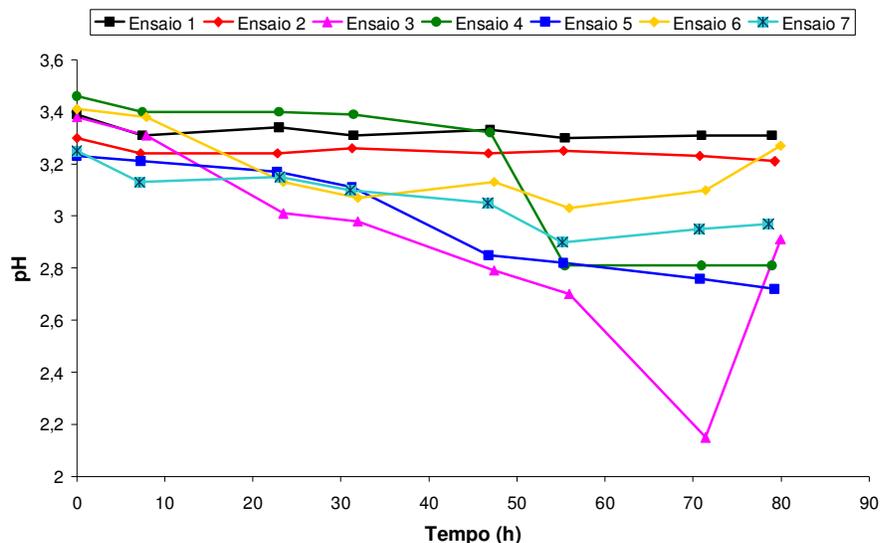


Figura 23 - Comportamento cinético do pH

Não se observaram variações bruscas durante o processo fermentativo, com exceção dos ensaios 3 e 4. O menor valor de pH observado no ensaio 3 (2,15) ocorreu próximo das 70 h de fermentação, correspondendo ao maior valor de PG obtido entre as cinéticas (10,92 U/g). No ensaio 4, a queda de pH coincidiu com o início do máximo consumo de AR.

4.4.3 – VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA UMIDADE INICIAL E CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBSERVADAS

Neste item, o objetivo é observar a influência dos efeitos das variáveis independentes (umidade e fonte de nitrogênio) sobre o processo fermentativo, utilizando a metodologia de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta.

Nas Tabelas 12 e 13 encontram-se os valores obtidos para as atividades poligalacturonásica (PG) e pectinolítica (Pt), assim como as respectivas concentrações de sulfato de amônio (N) e umidades dos meios (U) observados na realização dos ensaios que compõem o planejamento experimental fatorial. As atividades enzimáticas foram observadas em intervalos de tempo de aproximadamente 15 e 8 h alternadamente.

Tabela 12 - Atividade poligalacturonásica dos ensaios realizados segundo planejamento fatorial 2²

Ensaio	Tempo de fermentação (h)						
	7,5	23	31,5	47	55,5	71	79
1	0,15	0,00	2,09	6,28	2,20	0,00	1,07
2	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00
3	0,32	7,26	8,14	10,31	8,38	10,92	7,77
4	0,15	0,37	1,21	1,98	3,53	1,54	4,81
5	0,00	1,22	9,06	7,31	9,62	9,43	7,62
6	2,24	3,36	0,46	7,24	4,51	6,53	1,97
7	0,00	1,70	2,83	0,19	7,06	7,36	1,59

Tabela 13 - Atividade pectinolítica dos ensaios realizados segundo planejamento fatorial 2²

Ensaio	Tempo de fermentação (h)						
	7,5	23	31,5	47	55,5	71	79
1	0,00	0,00	0,15	0,04	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,78	1,22	3,98	3,82	5,28	3,08
4	0,03	0,12	0,45	1,55	2,69	1,94	2,62
5	0,00	0,92	5,23	11,10	4,93	3,97	5,23
6	0,02	0,00	5,44	0,43	3,39	1,10	0,75
7	0,00	0,16	0,82	0,87	9,20	10,98	0,53

O maior valor de atividade poligalacturonásica (10,92 U/g) obtido foi encontrado com o ensaio 3 (U = 50% b.u e N = 0,5%) às 71 h de fermentação. Para a atividade pectinolítica, o maior valor encontrado (11 U/g) foi obtido com os ensaios 5 e 7, sendo estes pontos centrais, foram realizados com os mesmos níveis (U = 40% b.u e N = 1,0%). Porém, os picos de atividade pectinolítica foram encontrados com tempos diferentes de fermentação (47 e 71 h, respectivamente).

A partir das regressões dos dados das atividades enzimáticas e das concentrações das variáveis observadas, construíram-se modelos de primeira ordem para representar esses dados com 95% de confiança. Os modelos observados para cada tempo de fermentação encontram-se nas Tabelas 14 e 15, respectivamente para a atividade poligalacturonásica e

pectinolítica.

Tabela 14 - Modelos empíricos para atividade poligalacturonásica em cada tempo de fermentação

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
PG7,5 =0,41 - 0,08N + 0,08U - 0,003NU	0,0126	0,013	0,0001
PG23=1,99 - 1,72N + 1,91U - 1,72NU	0,9368	14,81	1,60
PG31,5 =3,40 - 2,26N + 15,57U -1,21N	0,4825	0,93	0,93
PG47=4,79 - 3,60N +1,45U - 0,56N	0,6477	1,84	0,20
PG55,5=5,04 - 1,76N + 2,43U - 0,62NU	0,5223	1,09	0,12
PG71=5,11 - 2,53N + 3,12U - 2,35NU	0,6652	1,99	0,21
PG79=3,55 - 1,01N + 2,88U - 0,47NU	0,6235	1,66	0,18

Tabela 15 - Modelos empíricos para atividade pectinolítica em cada tempo de fermentação

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
Pt7,5 = 0,008 + 0,008N + 0,008U + 0,008NU	0,7643	3,24	0,35
Pt23 = 0,22 - 0,17N + 0,23U - 0,17NU	0,4508	0,82	0,09
Pt31,5 = 1,90 - 0,23N + 0,38N -0,15 NU	0,0260	0,026	0,003
Pt47 = 2,57 - 0,62N + 1,37U - 0,60NU	0,1090	0,12	0,01
Pt55,5 = 3,43 - 0,28N + 1,63U - 0,28NU	0,1879	0,23	0,02
Pt71 = 3,32 - 0,84N + 1,80U - 0,84NU	0,2027	0,25	0,03
Pt79 = 1,74 - 0,12N + 1,42U - 0,12NU	0,3537	0,55	0,06

Analisando os coeficientes das equações contidas nas Tabelas 14 e 15, observa-se que todos os coeficientes do termo que contém a influência da concentração do sulfato de amônio (N) apresentaram sinal negativo, com exceção da atividade pectinolítica no tempo de fermentação 7,5 h. Isto implica que esta variável possui efeito negativo sobre as atividades enzimáticas observadas como resposta, ou seja, para se obter atividade enzimática máxima, dentro da faixa estudada, deve-se acrescentar ao meio baixas concentrações de sulfato de amônio. Para a influência da umidade inicial do meio, observa-se efeito contrário. Logo, para se ter alta atividade enzimática, o meio deve ter alta umidade, já que o efeito dessa variável apresenta influência positivo sobre as respostas

observadas.

O valor do Teste F foi obtido dividindo-se o F calculado pelo F tabelado. O F tabelado para 95% de confiança, com v_1 e v_2 iguais a 3, foi igual a 9,28. Sabe-se que o valor de F é uma medida da variação dos dados em relação à média. Geralmente, o valor de F calculado deve ser de 4 a 5 vezes maior que o valor tabelado para que o modelo seja preditivo em relação aos resultados experimentais e para que os efeitos dos fatores estimados sejam reais (DEY et al., 2001).

O teste F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado. Sempre que esta relação for maior que 1 a regressão é estatisticamente significativa havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes (BOX & WELTZ, 1973). Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS NETOS et al., 1996).

Em relação ao coeficiente de determinação, o maior valor possível para R^2 é 1, o que significa que, entre a curva e os pontos experimentais, não houve resíduo algum e que toda a variação em torno da média é explicada pela regressão. Logo, quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste do modelo aos dados.

Assim, diante do exposto, observando as Tabelas 14 e 15, tem-se que a equação que descreve a atividade poligalacturonásica às 23 h de fermentação (Equação 22) é um modelo estatisticamente significativo em relação aos dados experimentais, uma vez que a razão entre o F calculado e F tabelado foi maior que 1.

$$\mathbf{PG23=1,99 - 1,72N + 1,91U - 1,72NU} \quad (22)$$

Observa-se também que o coeficiente de determinação foi igual a 93,68%, o que indica que a curva se ajusta de forma que há pouco resíduos, logo toda variação em torno da média é explicada pela regressão.

Os termos em negrito (Equação 22) são significativos com 95% de confiança, portanto, todos os coeficientes desta equação são significativos.

A Tabela 16 apresenta a tabela da ANOVA para verificação estatística do modelo dado pela Equação 22.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para Equação 22: tempo de fermentação 23 h e atividade poligalacturonásica como resposta observada

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	38,29	3	12,76	14,81
Resíduo	2,58	3	0,86	
F. ajuste	0,06	1	0,06	
Erro puro	2,53	2	1,26	
Total	40,87	6	---	
%R ²	93,68			
F tab _{95%}				9,28

Construiu-se, então, a superfície de resposta (Figura 24) que indica o perfil da curva que representa o efeito sinérgico da umidade inicial (U) e da concentração de sulfato de amônio (N) no meio fermentativo sobre a atividade poligalacturonásica às 23 h de fermentação (PG23).

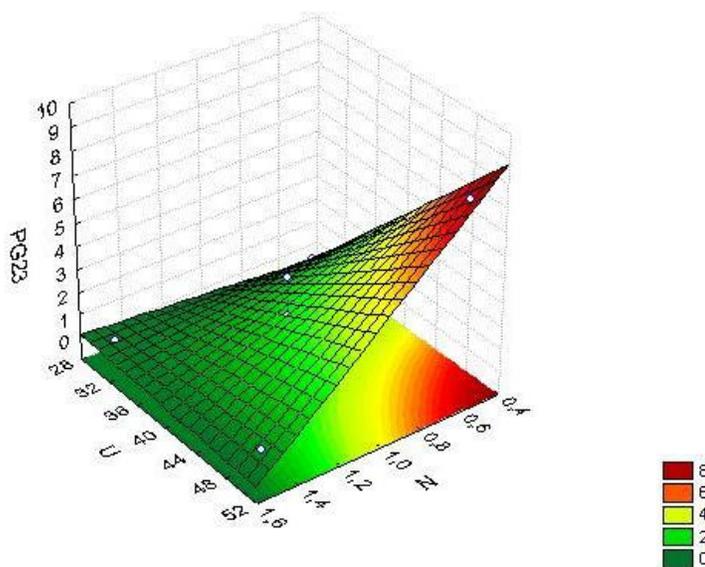


Figura 24 - Superfície de resposta para atividade poligalacturonásica às 23 h de fermentação (PG23)

Para a superfície representada pela Figura 24, o maior pico calculado pelo modelo (8,5 U/g) foi obtido nos níveis inferior da concentração de sulfato de amônio e superior

para a unidade inicial do meio, confirmando assim o que foi discutido ao se analisar os coeficientes dos termos que compõem os modelos obtidos para as atividades enzimáticas observadas (Tabela 14 e 15).

Segundo MONTGOMERY (1997), em um planejamento fatorial 2^k , normalmente ajusta-se um modelo de primeira ordem, porém, deve-se estar atento para a possibilidade de que um modelo de segunda ordem seja mais apropriado. A adição de pontos centrais a esse tipo de planejamento possibilita proteger uma possível curvatura resultante do efeito de um modelo de segunda ordem, e ainda permite uma estimativa independente de erros.

Assim, realizou-se a análise dos modelos obtidos, com exceção do modelo representado pela Equação 22, considerando o efeito da curvatura no ponto central. Os modelos obtidos encontram-se na Tabela 17 e 18, respectivamente para as atividades poligalacturonásica e pectinolítica.

Tabela 17 - Modelos empíricos para atividade poligalacturonásica (PG) considerando efeito da curvatura

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
PG7,5 = 0,15 - 0,59curv - 0,08N + 0,08U - 0,004NU	0,1629	0,10	0,005
PG31,5 = 2,16 + 1,26curv - 2,26N + 1,82U - 1,21NU	0,5158	0,53	0,03
PG47 = 4,69 + 0,22curv - 3,60N + 1,45U - 0,56NU	0,6486	0,92	0,05
PG55,5 = 3,53 + 3,54curv - 1,76N + 2,34U - 0,66NU	0,8190	2,26	0,12
PG71 = 3,11 + 4,66curv - 2,35N + 3,12U - 2,35NU	0,9641	13,44	0,70
PG79 = 3,41 + 0,31curv - 1,01N + 2,88U - 0,47NU	0,6262	0,84	0,04

Tabela 18- Modelos empíricos para atividade pectinolítica (Pt) considerando efeito da curvatura

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
Pt7,5 = 0,008 - 0,002curv - 0,008N + 0,008U - 0,008NU	0,7698	1,67	0,09
Pt23 = 0,23 + 0,13curv - 0,17N + 0,23U - 0,17NU	0,4836	0,47	0,02
Pt31,5 = 0,46 + 3,37curv - 0,23N + 0,38U - 0,15NU	0,6001	0,75	0,04
Pt47 = 1,39 + 2,74curv - 0,62N + 1,37U - 0,60NU	0,2429	0,16	0,01
Pt55,5 = 1,63 + 4,21curv - 0,28N + 1,63U - 0,28NU	0,6969	1,15	0,06
Pt71 = 1,81 + 3,55curv - 0,84N + 1,81U - 0,84NU	0,4373	0,39	0,02
Pt79 = 1,43 + 0,74curv - 0,12N + 1,43U - 0,12NU	0,3944	0,33	0,02

O F tabelado para 95% de confiança, considerando a curvatura, com v_1 e v_2 iguais a 4 e 2, respectivamente, foi igual a 19,25. Com isso, os modelos ajustados mais uma vez não se ajustaram aos dados experimentais de forma que estes não são estatisticamente significativos, apesar dos valores dos coeficientes de regressão de alguns modelos como, por exemplo, os modelos para 55,5 e 71 h de fermentação para a atividade poligalacturonásica, terem aumentado até valores próximos à unidade.

Os efeitos da concentração de sulfato de amônio e umidade inicial não se alteraram com o acréscimo do termo referente à curvatura nos modelos. Assim, obteve-se mais uma vez que a concentração de sulfato de amônio (N) possui efeito negativo e a umidade inicial do meio possui efeito positivo.

Diante de todas as análises acerca da utilização do bagaço seco do pedúnculo de caju, pode-se observar que, tendo em vista que as atividades poligalacturonásica e pectinolítica máximas observadas foram de aproximadamente 11 U/g (4,4 U/mL), este resíduo pode ser usado como substrato na síntese desse tipo de enzimas de forma promissora, comparando estes valores com trabalhos observados na literatura (TRINDADE et al., 1996; DANIEL et al., 1996; SANTOS, 2007).

4.4.4 – VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA UMIDADE INICIAL E DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO SOBRE OS PICOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Com os valores dos picos das atividades enzimáticas, fez-se a análise segundo os preceitos do planejamento fatorial. Assim, observaram-se quais os maiores valores de atividades poligalacturonásica e pectinolítica para cada ensaio realizado. As análises foram realizadas como descrito no item 3.7 deste trabalho. Com isso, tem-se um reforço no indicativo do efeito sinérgico da umidade inicial e da concentração de sulfato de amônio no meio.

Nas Tabelas 19 e 20 encontram-se os ensaios, os níveis codificados dos parâmetros concentração de sulfato de amônio (N) e umidade inicial (U), os valores dos picos da atividade poligalacturonásica (PPG) e da atividade pectinolítica (PPt), assim, como os tempos de fermentação (t) em que estes picos foram observados.

Tabela 19 – Picos da atividade poligalacturonásica segundo planejamento experimental fatorial 2^2

Ensaio	N	U	PPG	t (h)
1	-1	-1	6,28	47
2	+1	-1	0,20	47
3	-1	+1	10,92	71
4	+1	+1	4,81	79
5	0	0	9,62	55,5
6	0	0	7,24	47
7	0	0	7,36	71

Tabela 20 – Picos da atividade pectinolítica segundo planejamento experimental fatorial 2²

Ensaio	N	U	PPt	t (h)
1	-1	-1	0,15	31,5
2	+1	-1	0,00	---
3	-1	+1	5,28	71
4	+1	+1	2,69	55,5
5	0	0	11,10	47
6	0	0	5,44	31,5
7	0	0	10,98	71

Na Tabela 19, observa-se que os maiores valores de PPG foram obtidos a partir de 47 h de fermentação. Já na Tabela 20, observa-se que os valores de PPt foram obtidos a partir de 31,5 h até 71 h de fermentação.

Com esses dados, obtiveram-se modelos lineares com 90% de confiança. Estes modelos encontram-se na Tabela 21. Além dos modelos, nessa tabela pode-se encontrar também o coeficiente de determinação R², o F calculado e o Teste F (razão entre F calculado e F tabelado).

Tabela 21 - Modelos empíricos para os picos das atividades poligalacturonásica (PPG) e pectinolítica (PPt)

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
PPG= 6,63 - 3,05N + 2,31U - 0,008NU	0,8016	4,04	0,75
PPt= 5,09 - 0,69N + 1,96U - 0,61NU	0,1468	0,17	0,03

Os modelos empíricos foram obtidos com 90% de confiança. O F tabelado foi igual a 5,39. Como a razão entre o F calculado e o F tabelado mostra valores muito baixos, menores do que 1, nenhum dos modelos ajustou-se aos dados experimentais.

Observando os termos das variáveis independentes (N e U), confirma-se o efeito negativo da concentração de sulfato de amônio e o efeito positivo da umidade inicial do meio sobre as respostas.

SANTOS (2007), que utilizou bagaço seco do pedúnculo do caju como meio,

obteve modelos estatisticamente significativos que mostraram efeito negativo da umidade inicial e efeito positivo da concentração de sulfato de amônio sobre a atividade poligalacturonásica e sobre a redução da viscosidade, como medida da atividade pectinolítica, contrariando o resultado obtido neste trabalho. A caracterização físico-química feita por esse autor tem como resultado uma concentração de proteína igual a 6,83%, valor quase duas vezes inferior ao valor encontrado para o resíduo utilizado nesse trabalho (11,5%). Assim, a influência negativa da concentração de sulfato de amônio observada neste trabalho pode ter ocorrido porque a adição de uma fonte de nitrogênio, devido à alta concentração de proteína, tenha saturado o microrganismo de forma a inibir a produção de enzimas.

Realizou-se a análise dos modelos para os dados dos picos das atividades enzimáticas observadas, porém, considerando o efeito da curvatura no ponto central. Os modelos obtidos encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 - Modelos empíricos para os picos das atividades poligalacturonásica (PPG) e pectinolítica (PPt) considerando efeito da curvatura

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
PPG= 5,55 + 2,52curv - 3,05N + 2,31U - 0,008NU	0,9507	9,64	1,04
PPt= 2,03 + 7,14curv - 0,69N + 1,96U - 0,61NU	0,8354	2,54	0,27

O F tabelado para 90% de confiança, com v_1 e v_2 iguais a 4 e 2, respectivamente, foi igual a 9,24. O modelo empírico para o pico da atividade poligalacturonásica (PPG), considerando a curvatura, se ajustou de forma que este é estatisticamente significativo aos dados experimentais. Já o modelo para o pico da atividade pectinolítica (PPt), também considerando a curvatura, não se ajustou aos dados experimentais uma vez que o Teste F foi inferior a 1.

A Equação 23 descreve o modelo estatisticamente significativo do pico da atividade poligalacturonásica (PPG), já que a razão entre o F calculado e F tabelado foi igual a 1.

$$\mathbf{PPG = 5,55 + 2,52curv - 3,05N + 2,31 - 0,008NU} \quad (23)$$

O coeficiente de determinação foi igual a 95%, o que mostra que a curva se ajusta de forma que há pouco resíduos, logo toda variação em torno da média é explicada pela regressão. Os termos em negrito na Equação 23 são significativos com 90% de confiança.

A Tabela 23 apresenta os dados referentes a ANOVA para verificação estatística do modelo dado pela Equação 23.

Tabela 23 - Análise de variância (ANOVA) para Equação 23: pico da atividade poligalacturonásica

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	69,43	4	17,36	9,64
Resíduo	3,60	2	1,80	
Erro puro	3,60	2	1,80	
Total	73,03	6		
%R ²	95,07			
F tab _{90%}				9,24

A Figura 25 representa a superfície de resposta para o pico da atividade poligalacturonásica em função da concentração de sulfato de amônio (N) e da umidade inicial (U) no meio fermentativo.

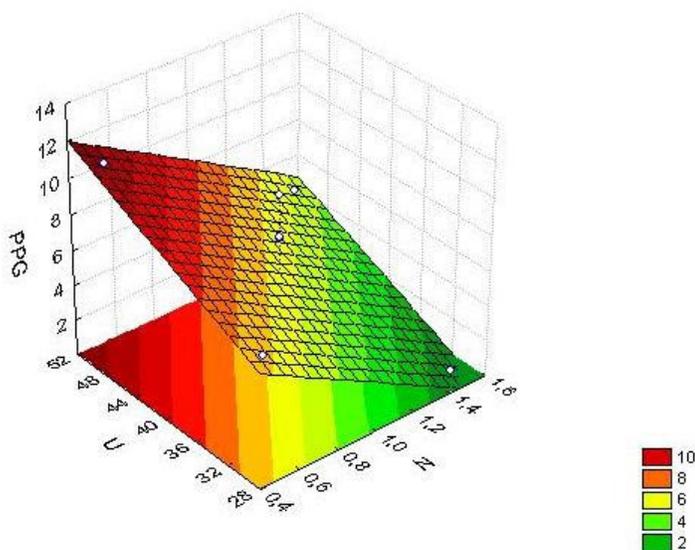


Figura 25 - Superfície de resposta para o pico da atividade poligalacturonásica (PPG)

Para a superfície representada pela Figura 25, o maior pico calculado pelo modelo (12 U/g) foi obtido nos níveis inferior da concentração de sulfato de amônio e superior para a umidade inicial do meio, confirmando resultado do item 4.4.3.

De modo geral, o melhor ajuste do modelo considerando uma curvatura implica que o modelo de primeira ordem não se ajusta aos dados experimentais. Para se obter um modelo mais complexo, deve ser realizada uma ampliação no planejamento fatorial de forma a se realizar uma configuração estrela, acrescentando assim mais experimentos (pontos axiais). Contudo, sendo a proposta desse trabalho a verificação da influência, com os resultados obtidos pode-se ter uma indicação do comportamento fenomenológico, assim como foi descrito.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos pode-se concluir que:

A caracterização físico-química do bagaço seco do pedúnculo do caju indica a necessidade do ajuste das concentrações de açúcares redutores e pectina. No entanto, conduziu-se o processo fermentativo de forma satisfatória sem o ajuste de tais parâmetros.

As isotermas de adsorção do pedúnculo seco do caju são do tipo II. Os modelos aplicados ajustam-se bem aos dados experimentais, sendo o modelo de GAB o que melhor representa estes dados em todas as temperaturas estudadas.

As isotermas de adsorção indicam que para produção de pectinases, utilizando como microrganismo o *Aspergillus niger* e como substrato o pedúnculo de caju previamente seco, a umidade inicial do substrato deve ser ajustada para valores acima de 35% b.s, sendo confirmado com a realização do processo fermentativo semi-sólido.

Os valores da umidade na monocamada molecular apresentam tendência de aumento com o aumento da temperatura e os valores do calor isostérico aumentam com o aumento da umidade de equilíbrio do material.

Constata-se inibição das atividades pectinolítica e poligalacturonásica pela presença do sulfato de amônio no meio de cultivo com concentrações a partir de 1,5% (p/p).

A atividade poligalacturonásica máxima foi obtida com atividade de água no meio entre 0,99 e 1,00 e a atividade pectinolítica máxima foi obtida com atividade de água acima de 0,99.

Os maiores valores de atividade poligalacturonásica (11 U/g) dar-se com umidade inicial de 50% b.u e 0,5% (p/p) de sulfato de amônio no meio e para atividade pectinolítica

(11 U/g) sob as condições de 40% b.u de umidade e 1,0% (p/p) da fonte de nitrogênio.

A concentração de sulfato de amônio influencia de forma negativa as atividades enzimáticas, enquanto a umidade inicial influencia de forma positiva essas respostas.

Com 95% de confiança, o modelo obtido que descreve o comportamento da atividade poligalacturonásica às 23 h de fermentação em relação às variáveis (umidade inicial e concentração de sulfato de amônio no meio) é estatisticamente significativo.

Com 90% de confiança e considerando curvatura no ponto central, o modelo obtido que descreve o comportamento do pico da atividade poligalacturonásica em relação as variáveis (umidade inicial e concentração de sulfato de amônio no meio) é estatisticamente significativo.

As análises acerca da utilização do bagaço seco do pedúnculo de caju e sua utilização em processo de fermentação semi-sólida, conclui-se que este resíduo é uma fonte promissora para produção de pectinases.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, A. K. S.; SILVA, G. F.; NARAIN, N. Caracterização de resíduos de indústria de processamento de frutas visando à produção de pectinases por fermentação semi-sólida. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 2007, Curitiba. **Anais ... Curitiba: ___, 2007.**

ACUÑA-ARGUELLES, M.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E. Effect of water activity on exo-pectinase production by *A. niger CH4* in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 23-28, 1994.

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

ANTIER, P.; MINJARES, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. **Enzyme Microbial Technology**, v. 15, p. 254-260, 1993.

ARAÚJO, L. F.; MEDEIROS, A. N.; PERAZZO NETO, A.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, F. L. H. Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus – indica Mill*) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 161-168, 2005a.

ARAÚJO, L. F.; OLIVEIRA, L. S. C.; PERAZZO NETO, A.; ALSINA, O. L. S.; SILVA, F. L. H. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**, v. 9, p. 379-384, 2005b.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2ª ed., Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.

BLAHOVEC, J. Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical approach. **Journal of Food Engineering**. v. 65, p. 489-495, 2004.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 497-503, 2001.

BOX, G. E. P.; WELTZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. **University of Wisconsin Technical Report**. v. 9, 1973.

BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P. H. M. Análises físico-químicas e sensoriais de pedúnculos de caju submetidos à desidratação osmótico-solar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, p. 139-145, 2003.

BRASIL. Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1015 p.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemical Society**. v. 60, p. 309-319, 1938.

CAMPOS, A. R. N. **Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) por fermentação semi-sólida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFCG, Campina Grande, 2003.

CAMPOS, A. R. N.; SANTANA, R. A. C.; DANTAS, J. P.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, n. 2, 2005.

CASSINI, A.S.; MARCZAK, L. D. F.; NOREÑA, C. P. Z. Water adsorption isotherms of texturized soy protein. **Journal of Food Engineering**. v. 77, p. 194-199, 2005.

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFRJ, Rio de Janeiro, 1997.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. v. 71, p. 45-50, 2000.

CHIRIFE, J; RESNIK, S. L. Unsaturated solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. **Journal of Food Science**. v. 49, p. 1486-1488, 1984.

CLADERA-OLIVEIRA, F.; PETTERMANN, A. C.; NOREÑA, C. P. Z.; WADA, K.; MARCZAK, L. D. F. Isotermas de adsorção, propriedades termodinâmicas e físicoquímicas da farinha de pinhão. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ), 2006, Santos. **Anais...** Santos: ___, 2006.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFRN, Natal, 2004.

COURI, F. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Bioquímicos), UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

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

DANIEL, M. R.; TRINDADE, V.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Influência do pH na produção de pectinases usando

casca de limão como meio semi-sólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS (SHEB), 1996, Maringá. **Anais ...** Maringá: ____, 1996.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., vol. 2, 2001.

DEY, G.; MITRA, A.; BANERJEE, R.; MAITI, B. R. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 227-231, 2001.

DITCHFIELD, C. **Estudo dos métodos para a medida da atividade de água**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2000.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Agroindústria Tropical. Fortaleza. Disponível em: <<http://www.cnptia.embrapa.br/projetos/ipi/ipi/homepage/frutas.html>>. Acesso em: 22 set 2006.

EMPARN, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. Natal. Disponível em <<http://www.emparn.rn.gov.br/Arquivos/Agricultura/Caju.htm>>. Acesso em: 22 set 2006.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 223-227, 2003.

FERREIRA, C. D.; PENA, R. S. Comportamento higroscópico da farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, 251-255, 2003.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. N.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 15, p. 107-115, 2003.

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

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 85-101, 2003.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 21, p. 265-272, 2004.

HENDERSON, S. M. A basic concept of equilibrium moisture. **Agricultural Engineering**. v. 33, 29-32, 1952.

HENNIES, P. T. **Produção de pectinases de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1996.

HESELTINE, C. W. Solid state fermentation. **Biotechnology Bioengineering**. v. 14, p. 517-532, 1972.

HOLANDA, J. S.; OLIVEIRA, J. O.; FERREIRA, A. C. Enriquecimento protéico de pedúnculo de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 787-792, 1998.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 64, p. 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, p. 301-306, 2005.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production purification and characterization of pectinase from a *Bacillus sp DT7*. **World Microbiology Biotechnology**, v.16, p. 277-282, 2000.

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

KAYA, S.; KAHYAOGU, T. Moisture sorption and thermodynamic properties of safflower petals and tarragon. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 413-421, 2007.

KISS, J. Reforma na casa. **Globo Rural**. n. 233, 58-63, 2005.

KUROZAWA, L. E.; EL-AOUAR, Â. A.; MURR, F. E. X. Obtenção de isothermas de dessorção de cogumelo *in natura* e desidratado osmoticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 828-834, 2005.

LAHSASNI, S.; KOUHILA, M.; MAHROUZ, M. Adsorption-desorption isotherms and heat of sorption of prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica*). **Energy Conversion and Management**, v. 45, p. 249-261, 2004.

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. Métodos ou diagnósticos foliar utilizados nas plantações do grupo booken na Guiana Inglesa: amostra geral e técnica de análises. **Fertilité**, n. 21, p. 3-11, 1964.

LOMAURO, C. J.; BAKSHI, A. S.; LABUZA, T. P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. **Lebensmittel – Wissenschaft & Techonologie**. v. 18, 111-117, 1985.

MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido**. Tese (doutorado em Engenharia Química), USP, São Paulo, 1990.

MARTINS, N.; SILVA, D.; MARTINS, E. C.; SILVA, R.; GOMES, E. Seleção de fungos termofílicos produtores de pectinase em fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 2005, Recife. **Anais ... Recife: ____**, 2005.

MATHLOUTHI, M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. **Food Control**. v. 12, p. 409-417, 2001.

MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. A. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale L.*) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 143-150, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, 426-428, 1959.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. United States of America: John Wiley & Sons Ed., 1997.

MOURA, R. S. F. **Estudo da Cinética de Secagem de Caju (*Anacardium occidentale L.*) em um Secador de Leito Fixo**. Dissertação (mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, 2001.

MOURA, R. S. F.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SOUSA, A. G.; SILVA, M. M.; OLIVEIRA, A. M. V. Modelagem matemática para isotermas em polpa de caju. **Revista de Biologia de Ciências da Terra**. v. 4, p. 32-40, 2004.

NOOMHORM, A.; ILANGANTILEKE, S.; BAUTISTA, M. B. Factors in the protein enrichment of cassava by solid state fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, 58, 117-123, 1992.

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

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**. v. 74, p. 17-20, 2006.

RAIMBAULT, M.; DESCHAMPS, A.; MEYER, F.; SENEZ, J. C. Direct protein enrichment of starchy products by fungal solid fermentation. In: Proc. Giam-V, 1977, Marseilles. **Anais ... Marseilles**: ____, 1977.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1979.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 197-203, 2003.

ROCKLAND, L. B. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°C. **Analytical Chemistry**. v. 32, p. 1375-1376, 1960.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed., Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SALWIN, H. Moisture levels required for stability in dehydrated foods. **Food Technology**, v. 17, p. 1114-1121, 1963.

SANTIN, A. P. **Estudo da secagem da inativação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 1996, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), UFSC, Florianópolis, 1996.

SANTOS, F. S. A.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Isotermas de adsorção de umidade de farinhas de mandioca temperadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 6, p. 149-155, 2004.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007, Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFRN, Natal, 2007.

SANTOS, S. F. M.; NOBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju visando sua utilização como substrato para fermentação semi-sólida. In: XV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 2005a, Recife. **Anais...** Recife: __, 2005a.

SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Síntese de poligalacturonase por *Aspergillus niger* CCT0916 por fermentação semi-sólida do pedúnculo de caju. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2006, Santos. **Anais...** Santos: __, 2006.

SANTOS, S. F. M.; WANDERLEY, L. R.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Caracterização físico-química do pedúnculo de caju in natura e do resíduo seco. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-COLHEITA DE FRUTOS TROPICAIS, 2005, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: __, 2005b.

SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T. Influence of temperature on the measurement of water activity of food and salt systems. **Journal of Food Science**. v. 48, p. 552-554, 1983.

SILVA, A. E.; PENA, R. S.; SILVA, L. H. M. Comportamento higroscópico do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em pó. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2006, Santos. **Anais...** Santos: __, 2006.

SILVA, M. E.; TORRES NETO, A. B.; SILVA, W. B.; SILVA, F. L. H.; SWARNAKAR, R. Cashew wine vinegar production: alcoholic and acetic fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 24, p. 163-169, 2007.

SILVA, M. M.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, M. M. Demanda energética envolvida no processo de dessecção de umidade em polpa de manga. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 4, p. 107-117, 2002.

SMITH, S. E. The sorption of water vapour by high polymers. **Journal of the American Chemical Society**. v. 69, 646, 1947.

SOCOL, R. S.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 205-218, 2003.

SOUZA, R. L. A.; AMORIM, B. C.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S. Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: __, 2007.

SPIESS, W. E. L.; WOLF, W. Critical evaluation of methods to determine moisture sorption isotherms. In: ROCKLAND, L. B.; BEUCHAT, L. R. **Water Activity: Theory and Applications to Food**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1987.

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities

production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme Microbial Technology**. v. 25, p. 411-419, 1999.

TERZI, S. C.; CARVALHO, C. V. P.; OLIVEIRA, A. C. P.; COURI, S. Influência da variação da concentração de inoculo do *Aspergillus niger 3T5B8* e da umidade do meio de fermentação sobre a produção da enzima poligalacturonase. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ___, 2003.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; PANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - A review. **Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 47-73, 1997.

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E. da; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale L.*). **Química Nova**. v.29, p.489-492, 2006.

TRINDADE, V.; DANIEL, M. R.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semi-sólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS (SHEB), 1996, Maringá. **Anais...** Maringá: ___, 1996.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

VAN DEN BERG, C. Development of B.E.T. like models for sorption of water of foods: theory and relevance. In: SIMATOS, D.; MILTON, J. L. **Properties of water foods**. Dordrecht: Mastinua Nyhoff Publishers, 1985.

VIVENCIA ANDINA VIAJES. Madrid. Disponível em <<http://www.vivenciaandina.com/viajes-a-brasil/gastronomia.htm>>. Acesso em: 25 nov 2006.

Anexos

Anexo A

Dados de construção das isotermas

Tabela A.1 – Pesagem a cada 24 horas das amostras a $25 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Massa inicial(g)</i>	<i>1ª pesagem</i>	<i>2ª pesagem</i>	<i>3ª pesagem</i>	<i>4ª pesagem</i>	<i>5ª pesagem</i>	<i>6ª pesagem</i>	<i>7ª pesagem</i>	<i>8ª pesagem</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0092	1,0180	1,0157	1,0147	1,0150	---	---	---	---
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9931	0,9995	0,9999	---	---	---	---	---	---
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9724	0,9778	0,9772	---	---	---	---	---	---
R ₁ MgCl ₂	0,9698	0,9844	0,9846	---	---	---	---	---	---
R ₂ MgCl ₂	0,9452	0,9912	0,9905	---	---	---	---	---	---
R ₃ MgCl ₂	1,0076	1,0219	1,0215	---	---	---	---	---	---
R ₁ K ₂ CO ₃	0,9954	1,0256	1,0263	---	---	---	---	---	---
R ₂ K ₂ CO ₃	1,0316	1,0618	1,0632	1,0644	1,0641	---	---	---	---
R ₃ K ₂ CO ₃	0,9784	1,0042	1,0062	1,0076	1,0057	1,0070	1,0075	---	---
R ₁ NaBr	0,9963	1,0537	1,0555	1,0562	---	---	---	---	---
R ₂ NaBr	0,9960	1,0558	1,0578	1,0574	---	---	---	---	---
R ₃ NaBr	1,045	1,1048	1,1104	1,1089	1,1105	---	---	---	---
R ₁ NaCl	1,0296	1,1653	1,1781	1,1777	---	---	---	---	---
R ₂ NaCl	0,9968	1,1264	1,1359	1,1368	---	---	---	---	---
R ₃ NaCl	0,9914	1,1153	1,1273	1,1269	---	---	---	---	---
R ₁ KCl	0,9765	1,1570	1,1777	1,1782	1,1886	1,1863	1,1852	1,1920	1,1921
R ₂ KCl	0,9919	1,1726	1,1940	1,2020	1,2059	1,2022	1,2039	1,2102	1,2105
R ₃ KCl	1,0011	1,1797	1,2015	1,2140	1,2166	1,2138	1,2132	---	---

Tabela A.2 – Massas no equilíbrio (Me), massa seca (Ms), massa de água (Ma) e umidade no equilíbrio (xeq) para cada cadinho na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Me (g)</i>	<i>Ms (g)</i>	<i>Ma (g)</i>	<i>xeq (% b.s)</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,01485	0,9605	0,05435	5,66
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9997	0,9444	0,0553	5,86
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9775	0,9244	0,5310	5,74
R ₁ MgCl ₂	0,9845	0,9178	0,0667	7,27
R ₂ MgCl ₂	0,99085	0,9244	0,6645	7,19
R ₃ MgCl ₂	1,0217	0,9537	0,0680	7,13
R ₁ K ₂ CO ₃	1,02595	0,9406	0,08535	9,07
R ₂ K ₂ CO ₃	1,06425	0,9743	0,08995	9,23
R ₃ K ₂ CO ₃	1,00725	0,9214	0,08585	9,32
R ₁ NaBr	1,05585	0,9399	0,11595	12,34
R ₂ NaBr	1,0576	0,9451	0,1125	11,90
R ₃ NaBr	1,1105	0,9888	0,1217	12,31
R ₁ NaCl	1,1779	0,9727	0,2052	21,10
R ₂ NaCl	1,13635	0,9411	0,19525	20,75
R ₃ NaCl	1,1271	0,9359	0,1912	20,43
R ₁ KCl	1,19205	0,9225	0,26955	29,22
R ₂ KCl	1,21035	0,9316	0,27875	29,92
R ₃ KCl	1,2135	0,9399	0,2736	29,11

Tabela A.3 – Atividade de água (aw), umidade de equilíbrio médio ($\overline{\text{xeq}}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (cv) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>aw</i>	$\overline{\text{xeq}} \pm \sigma$ (%)	<i>cv (%)</i>
K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,23	5,75 ± 0,10	1,75
MgCl ₂	0,33	7,20 ± 0,07	0,98
K ₂ CO ₃	0,43	9,21 ± 0,13	1,37
NaBr	0,57	12,18 ± 0,25	2,02
NaCl	0,75	20,76 ± 0,34	1,61
KCl	0,86	29,42 ± 0,44	1,49

Tabela A.4 – Pesagem a cada 24horas das amostras a $30 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Massa inicial(g)</i>	<i>1ª pesagem</i>	<i>2ª pesagem</i>	<i>3ª pesagem</i>	<i>4ª pesagem</i>	<i>5ª pesagem</i>	<i>6ª pesagem</i>	<i>7ª pesagem</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0259	1,0237	1,0228	1,0216	---	---	---	---
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0457	1,0486	1,0455	1,0445	---	---	---	---
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0009	1,0039	0,9993	0,9992	---	---	---	---
R ₁ MgCl ₂	1,0297	1,0436	1,0457	1,0452	---	---	---	---
R ₂ MgCl ₂	1,0293	1,0441	1,0452	1,0458	---	---	---	---
R ₃ MgCl ₂	1,0209	1,0361	1,0354	---	---	---	---	---
R ₁ K ₂ CO ₃	1,0081	1,0418	1,0435	1,0422	1,0439	1,0434	---	---
R ₂ K ₂ CO ₃	1,0120	1,0435	1,0457	1,0459	---	---	---	---
R ₃ K ₂ CO ₃	1,0073	1,0408	1,0430	1,0425	---	---	---	---
R ₁ NaBr	1,0233	1,0747	1,0770	1,0787	1,0782	---	---	---
R ₂ NaBr	1,0237	1,0777	1,0795	1,0799	---	---	---	---
R ₃ NaBr	1,0046	1,0552	1,0571	1,0578	---	---	---	---
R ₁ NaCl	1,0213	1,1560	1,1629	1,1667	1,1627	1,1650	1,1649	---
R ₂ NaCl	1,0214	1,1545	1,1634	1,1633	---	---	---	---
R ₃ NaCl	1,0104	1,1418	1,1502	1,1507	---	---	---	---
R ₁ KCl	1,0307	1,2255	1,2449	1,2440	---	---	---	---
R ₂ KCl	1,0232	1,2182	1,2382	1,2354	1,2462	1,2388	1,2389	---
R ₃ KCl	1,0094	1,1950	1,2101	1,2119	1,2176	1,2155	1,2125	1,2129

Tabela A.5 – Massas no equilíbrio (Me), massa seca (Ms), massa de água (Ma) e umidade no equilíbrio (xeq) para cada cadinho na temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Me (g)</i>	<i>Ms (g)</i>	<i>Ma (g)</i>	<i>xeq (% b.s)</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,02325	0,9706	0,05265	5,42
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0450	0,9893	0,0557	5,63
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,99925	0,9528	0,04645	4,88
R ₁ MgCl ₂	1,04545	0,9774	0,06805	6,96
R ₂ MgCl ₂	1,0455	0,9760	0,0695	7,12
R ₃ MgCl ₂	1,03575	0,9661	0,06965	7,21
R ₁ K ₂ CO ₃	1,04365	0,9575	0,08615	9,00
R ₂ K ₂ CO ₃	1,0458	0,9566	0,0892	9,32
R ₃ K ₂ CO ₃	1,04275	0,9538	0,08895	9,33
R ₁ NaBr	1,07845	0,9621	0,11635	12,09
R ₂ NaBr	1,0797	0,9663	0,01134	11,74
R ₃ NaBr	1,05745	0,9486	0,10885	11,47
R ₁ NaCl	1,16495	0,9620	0,20295	21,10
R ₂ NaCl	1,16335	0,9636	0,19975	20,73
R ₃ NaCl	1,15045	0,9538	0,19665	20,62
R ₁ KCl	1,24445	0,9740	0,27045	27,77
R ₂ KCl	1,23885	0,9655	0,27335	28,31
R ₃ KCl	1,2127	0,9492	0,2635	27,76

Tabela A.6 – Atividade de água (*aw*), umidade de equilíbrio médio ($\overline{\text{xeq}}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (*cv*) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>aw</i>	$\overline{\text{xeq}} \pm \sigma$ (%)	<i>cv</i> (%)
K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,23	5,31 ± 0,39	7,29
MgCl ₂	0,32	7,10 ± 0,13	1,78
K ₂ CO ₃	0,42	9,22 ± 0,19	2,04
NaBr	0,57	11,77 ± 0,31	2,64
NaCl	0,75	20,82 ± 0,25	1,21
KCl	0,84	27,95 ± 0,31	1,26

Tabela A.7 – Pesagem a cada 24 horas das amostras a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Massa inicial(g)</i>	<i>1ª pesagem</i>	<i>2ª pesagem</i>	<i>3ª pesagem</i>	<i>4ª pesagem</i>	<i>5ª pesagem</i>	<i>6ª pesagem</i>	<i>7ª pesagem</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0081	1,0105	1,0105	---	---	---	---	---
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0183	1,1099	1,0193	---	---	---	---	---
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9927	0,9946	0,9946	---	---	---	---	---
R ₁ MgCl ₂	1,0082	1,0196	1,0205	---	---	---	---	---
R ₂ MgCl ₂	1,0196	1,0298	1,0302	---	---	---	---	---
R ₃ MgCl ₂	1,0168	1,0268	1,0271	---	---	---	---	---
R ₁ K ₂ CO ₃	1,0049	1,0353	1,0364	1,0373	---	---	---	---
R ₂ K ₂ CO ₃	1,0193	1,0504	1,0524	1,0526	---	---	---	---
R ₃ K ₂ CO ₃	0,9999	1,0293	1,0300	---	---	---	---	---
R ₁ NaBr	0,9947	1,0498	1,0492	---	---	---	---	---
R ₂ NaBr	1,0198	1,0717	1,0719	---	---	---	---	---
R ₃ NaBr	1,0212	1,0732	1,0749	1,0747	---	---	---	---
R ₁ NaCl	0,0141	1,1467	1,1576	1,1521	1,1551	1,1556	---	---
R ₂ NaCl	1,0026	1,1379	1,1478	1,1400	1,1446	1,1450	---	---
R ₃ NaCl	0,9979	1,1299	1,1450	1,1400	1,1353	1,1349	---	---
R ₁ KCl	1,0189	1,2097	1,2243	1,2278	1,2275	---	---	---
R ₂ KCl	0,9979	1,1748	1,1887	1,1909	1,1809	1,1949	1,1935	1,1934
R ₃ KCl	1,0023	1,1894	1,1986	1,2007	1,2012	---	---	---

Tabela A.8 – Massas no equilíbrio (Me), massa seca (Ms), massa de água (Ma) e umidade no equilíbrio (xeq) para cada cadinho na temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Me (g)</i>	<i>Ms (g)</i>	<i>Ma (g)</i>	<i>xeq (% b.s)</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0105	0,9344	0,0761	8,14
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	1,0196	0,9383	0,0813	8,66
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9946	0,9188	0,0758	8,25
R ₁ MgCl ₂	1,02005	0,9330	0,08705	9,33
R ₂ MgCl ₂	1,0300	0,9422	0,0878	9,32
R ₃ MgCl ₂	1,02695	0,9308	0,09615	10,33
R ₁ K ₂ CO ₃	1,03685	0,9330	0,10385	11,13
R ₂ K ₂ CO ₃	1,0525	0,9378	0,1147	12,23
R ₃ K ₂ CO ₃	1,02965	0,9267	0,10295	11,11
R ₁ NaBr	1,0495	0,9248	0,1247	13,48
R ₂ NaBr	1,0718	0,9412	0,1306	13,88
R ₃ NaBr	1,0748	0,9465	0,1283	13,56
R ₁ NaCl	1,15535	0,9374	0,21795	23,25
R ₂ NaCl	1,1448	0,9278	0,2170	23,99
R ₃ NaCl	1,1351	0,9232	0,2119	22,95
R ₁ KCl	1,22765	0,9401	0,28755	30,59
R ₂ KCl	1,19345	0,9201	0,27335	29,71
R ₃ KCl	1,20095	0,9197	0,28125	30,58

Tabela A.9 – Atividade de água (*aw*), umidade de equilíbrio médio ($\overline{\text{xeq}}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (*cv*) a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>aw</i>	$\overline{\text{xeq}} \pm \sigma$ (%)	<i>cv</i> (%)
K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,23	8,35 ± 0,27	3,28
MgCl ₂	0,32	9,66 ± 0,58	6,01
K ₂ CO ₃	0,41	11,49 ± 0,64	5,77
NaBr	0,57	13,64 ± 0,21	1,55
NaCl	0,75	23,20 ± 0,22	0,97
KCl	0,85	30,29 ± 0,51	1,67

Tabela A.10 – Pesagem a cada 24 horas das amostras a $40 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Massa inicial(g)</i>	<i>1ª pesagem</i>	<i>2ª pesagem</i>	<i>3ª pesagem</i>	<i>4ª pesagem</i>	<i>5ª pesagem</i>	<i>6ª pesagem</i>	<i>7ª pesagem</i>	<i>8ª pesagem</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9997	0,9977	0,9952	0,9951	---	---	---	---	---
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9924	0,9919	0,9770	0,9749	0,9746	---	---	---	---
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9990	0,9979	0,9953	0,9940	0,9936	---	---	---	---
R ₁ MgCl ₂	0,9974	0,9986	0,9977	---	---	---	---	---	---
R ₂ MgCl ₂	1,0047	1,0084	1,0077	---	---	---	---	---	---
R ₃ MgCl ₂	1,0075	1,0114	1,0105	1,0096	---	---	---	---	---
R ₁ K ₂ CO ₃	0,9966	1,0196	1,0184	1,0176	---	---	---	---	---
R ₂ K ₂ CO ₃	1,0080	1,0295	1,0283	1,0280	---	---	---	---	---
R ₃ K ₂ CO ₃	0,9958	1,0164	1,0160	---	---	---	---	---	---
R ₁ NaBr	1,0106	1,0532	1,0490	1,0466	1,0491	1,0488	---	---	---
R ₂ NaBr	1,0121	1,0546	1,0506	1,0484	1,0502	1,0494	---	---	---
R ₃ NaBr	1,0103	1,0515	1,0467	1,0452	1,0460	---	---	---	---
R ₁ NaCl	1,0109	1,1368	1,1155	1,1119	1,1255	1,1251	---	---	---
R ₂ NaCl	1,0042	1,1301	1,1114	1,1077	1,1203	1,1210	---	---	---
R ₃ NaCl	0,9984	1,1215	1,1006	1,0984	1,1102	1,1096	---	---	---
R ₁ KCl	1,0026	1,1792	1,1617	1,1502	1,1683	1,1809	1,1786	1,1744	1,1786
R ₂ KCl	0,9974	1,1744	1,1596	1,1474	1,1630	1,1805	1,1791	1,1805	---
R ₃ KCl	1,0042	1,1867	1,1651	1,1551	1,1720	1,1819	1,1817	---	---

Tabela A.11 – Massas no equilíbrio (Me), massa seca (Ms), massa de água (Ma) e umidade no equilíbrio (xeq) para cada cadinho na temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>Me (g)</i>	<i>Ms (g)</i>	<i>Ma (g)</i>	<i>xeq (% b.s)</i>
R ₁ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,99515	0,9246	0,07055	7,63
R ₂ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,97475	0,9088	0,06595	7,26
R ₃ K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,9938	0,9275	0,0663	7,15
R ₁ MgCl ₂	0,99815	0,9179	0,08025	8,74
R ₂ MgCl ₂	1,00805	0,9219	0,08615	9,34
R ₃ MgCl ₂	1,01005	0,9263	0,08375	9,04
R ₁ K ₂ CO ₃	1,0180	0,9188	0,0992	10,80
R ₂ K ₂ CO ₃	1,02815	0,9288	0,09935	10,70
R ₃ K ₂ CO ₃	1,0162	0,9142	0,1020	11,16
R ₁ NaBr	1,04895	0,9296	0,11935	12,85
R ₂ NaBr	1,0498	0,9277	0,1221	13,16
R ₃ NaBr	1,0456	0,9259	0,1197	12,93
R ₁ NaCl	1,1253	0,9226	0,2027	21,97
R ₂ NaCl	1,12065	0,9173	0,20335	22,17
R ₃ NaCl	1,1099	0,9140	0,1959	21,44
R ₁ KCl	1,1786	0,9186	0,2600	28,30
R ₂ KCl	1,1805	0,9167	0,2638	28,78
R ₃ KCl	1,1818	0,9253	0,2565	27,72

Tabela A.12 – Atividade de água (aw), umidade de equilíbrio médio (\overline{xeq}), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (cv) a $40 \pm 1^\circ\text{C}$

<i>Sais</i>	<i>aw</i>	$\overline{xeq} \pm \sigma$ (%)	<i>cv (%)</i>
K(C ₂ H ₃ O ₂)	0,23	7,35 ± 0,25	3,42
MgCl ₂	0,31	9,04 ± 0,30	3,32
K ₂ CO ₃	0,40	11,16 ± 0,24	2,17
NaBr	0,57	12,98 ± 0,16	1,24
NaCl	0,75	21,86 ± 0,38	1,73
KCl	0,83	28,27 ± 0,53	1,88

Anexo B

**Dados dos ensaios preliminares realizados
para determinação dos níveis do
planejamento fatorial 2^2**

Tabela B.1 - Ensaio com 0% de sulfato de amônio no meio de cultivo

t (h)	Umidade (%b.u)	pH	AR (g)	
			açúcares/g amostra)	Pg (U/g)
0	36,1	4,01	27,0	0
8	37,8	4,01	21,4	0
23	37,2	3,95	13,9	0
32	39,3	3,7	13,5	1,69
47	41,5	2,89	11,9	2,96
56	39,9	2,77	5,9	3,1
72	40,9	2,89	3,5	2,06
80	42,7	2,78	3,3	0,98
95	39,4	2,85	2,4	1,40

Tabela B.2 - Ensaio com 1% de sulfato de amônio no meio de cultivo

t (h)	Umidade (%b.u)	pH	AR (g)	
			açúcares/g amostra)	Pg (U/g)
0	42,0	3,93	25,8	0
7	40,3	3,88	19,1	1,69
22	38,1	3,66	18,8	4,92
30	37,8	3,33	18,2	15,95
46	40,8	2,76	3,7	4,65
55	39,4	2,61	2,7	1,81
71	41,1	2,73	2,1	0,14

Tabela B.3 - Ensaio com 2% de sulfato de amônio no meio de cultivo

t (h)	Umidade (%b.u)	pH	AR (g)	
			açúcares/g amostra)	Pg (U/g)
0	42,1	4,11	26,6	0
5,5	42,6	4,01	25,8	0,17
15	42,4	3,96	27,7	1,44
23	42,5	3,24	27,2	2,31
39	42,3	3,32	23,5	2,51
47	42,1	3,36	19,7	6,77
63	42,3	2,01	2,3	4,07

Tabela B.4 - Ensaio com 3% de sulfato de amônio no meio de cultivo

t (h)	Umidade (%b.u)	pH	AR (g)	
			açúcares/g amostra)	Pg (U/g)
0	45,5	3,76	25,0	0
5,5	44,6	3,94	22,1	0
15	43,4	3,91	22,0	2,34
23	42,4	3,28	22,9	0
39	42,1	3,52	22,4	0,07
47	39,5	3,47	23,2	0
63	38,9	2,79	15,4	0

Anexo C

**Dados dos ensaios realizados para o
planejamento fatorial 2^2**

Tabela C.1 - Ensaio 1 (N = 0,5% e U = 30%): tempo de fermentação, umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (Pg) e atividade pectinolítica (Pt)

t (h)	Umidade		pH	AR (g)		
	(%b.u)	aw		açúcares/g amostra	Pg (U/g)	Pt (U/g)
0	33,3	0,95	3,39	20,23	0	0
7,45	32	0,94	3,31	18,7	0,151	0
22,95	30,4	0,93	3,34	16,43	0	0
31,45	29,6	0,923	3,31	21,4	2,09	0,1545
46,95	29,1	0,92	3,33	21,1	6,28	0,040
55,45	30,5	0,93	3,3	18,84	2,2	0
70,95	24,3	0,87	3,31	20,57	0	0
78,95	24,8	0,876	3,31	22,72	1,07	0

Tabela C.2 - Ensaio 2 (N = 1,5% e U = 30%): tempo de fermentação, umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (Pg) e atividade pectinolítica (Pt)

t (h)	Umidade		pH	AR (g)		
	(%b.u)	aw		açúcares/g amostra	Pg (U/g)	Pt (U/g)
0	31,8	0,94	3,3	18,71	0	0
7,28	35,1	0,96	3,24	17,68	0	0
22,78	32,2	0,942	3,24	17,14	0	0
31,28	33,6	0,95	3,26	18,34	0	0
46,78	32,6	0,945	3,24	10,62	0,195	0
55,28	31	0,933	3,25	13,93	0	0
70,78	29,6	0,923	3,23	13,28	0	0
79,28	28,5	0,913	3,21	13,44	0	0

Tabela C.3 - Ensaio 3 (N = 0,5% e U = 50%): tempo de fermentação, umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (Pg) e atividade pectinolítica (Pt)

t (h)	Umidade (%b.u)	aw	pH	AR (g)		
				açúcares/g amostra	Pg (U/g)	Pt (U/g)
0	48	1,017	3,38	14,74	0	0
7,93	48,1	1,017	3,31	13,83	0,317	0
23,43	51,2	1,026	3,01	14,35	7,26	0,782
31,93	50,7	1,025	2,98	14,63	8,14	1,22
47,43	42,3	0,996	2,79	13,21	10,31	3,98
55,93	69,12	1,06	2,7	4,83	8,38	3,82
71,43	43,6	1	2,15	4,18	10,92	5,28
79,93	47,8	1,016	2,91	3,02	7,77	3,08

* visualização de fungos

Tabela C.4 - Ensaio 4 (N = 1,5% e U = 50%): tempo de fermentação, umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (Pg) e atividade pectinolítica (Pt)

t (h)	Umidade (%b.u)	aw	pH	AR (g)		
				açúcares/g amostra	Pg (U/g)	Pt (U/g)
0	50,4	1,024	3,46	15,19	0	0
7,45	49,1	1,02	3,4	11,62	0,151	0,0335
22,95	47	1,013	3,4	12,51	0,371	0,1215
31,45	47,6	1,015	3,39	16,06	1,21	0,4495
46,95	42,5	0,997	3,32	15,51	1,98	1,55
55,45	57,7	1,043	2,81	2,23	3,53	2,69
70,95	45,4	1,008	2,81	2,97	1,54	1,94
78,95	46,2	1,0108	2,81	5,52	4,81	2,62

* visualização de fungos

Tabela C.5 - Ensaio 5 (N = 1,0% e U = 40%): tempo de fermentação, umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (Pg) e atividade pectinolítica (Pt)

t (h)	Umidade (%b.u)	aw	pH	AR (g)		
				açúcares/g amostra)	Pg (U/g)	Pt (U/g)
0	41,3	0,99	3,23	16,4	0	0
7,28	44,4	1,00	3,21	16,6	0	0
22,78	44,3	1,00	3,17	16,7	1,22	0,92
31,28	43,2	1,00	3,11	13,2	9,06	5,23
46,78	41,6	0,99	2,85	11,5	7,31	11,10
55,28	46,4	1,01	2,82	2,2	9,62	4,93
70,78	39,4	0,98	2,76	4,3	9,43	3,97
79,28	48,3	1,02	2,72	4,4	7,26	5,23

* visualização de fungos

Tabela C.6 - Ensaio 6 (N = 1,0% e U = 40%): tempo de fermentação, umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (Pg) e atividade pectinolítica (Pt)

t (h)	Umidade (%b.u)	aw	pH	AR (g)		
				açúcares/g amostra)	Pg (U/g)	Pt (U/g)
0	40,1	0,99	3,41	18,4	0	0
7,93	43,1	1,00	3,38	17,9	2,24	0,02
23,43	43,2	1,00	3,13	15,1	3,36	0
31,93	44,1	1,00	3,07	17,8	0,46	0,54
47,43	40,6	0,99	3,13	19,7	7,24	0,43
55,93	42,4	1,00	3,03	15,9	4,51	3,39
71,43	38,7	0,98	3,1	16,7	6,53	1,10
79,93	36,9	0,97	3,27	17,3	1,97	0,75

* visualização de fungos

Tabela C.7 - Ensaio 7 (N = 1,0% e U = 40%): tempo de fermentação, umidade do meio, atividade de água (aw), pH, açúcares redutores (AR), atividade poligalacturonásica (Pg) e atividade pectinolítica (Pt)

t (h)	Umidade (%b.u)	aw	pH	AR (g)		
				açúcares/g amostra)	Pg (U/g)	Pt (U/g)
0	42,2	1,00	3,25	14,7	0	0
7,15	45,1	1,01	3,13	8,1	0	0
23,07	41,7	0,99	3,15	14,5	1,70	0,16
31,07	40,2	0,99	3,10	12,5	2,83	0,82
46,69	35,0	0,96	3,05	16,3	0,19	0,87
55,17	39,4	0,98	2,9	12,9	7,06	9,20
70,69	31,4	0,94	2,95	17,0	7,36	10,98
78,57	31,1	0,93	2,97	17,8	1,59	0,53

* visualização de fungos

Anexo D

Exemplos de cálculo

D.1 – Concentração de açúcares redutores (AR)

Dados experimentais:

$$m = 0,5080 \text{ g}$$

$$V = 200 \text{ mL}$$

$$f = 2,1356$$

$$ABS = 0,174$$

$$AR(\text{g/g}) = \frac{ABS \times f \times V}{m \times 10} = \frac{0,174 \times 2,1356 \times 200 \text{ mL}}{0,5080 \text{ g} \times 10} = 14,63 \text{ g/g}$$

D.2 – Concentração de açúcares redutores totais (ART)

Dados experimentais:

$$m = 0,5059 \text{ g}$$

$$V = 100 \text{ mL}$$

$$fd = 5 \text{ (1 mL diluição + 1 mL HCL + 3 mL NaOH)}$$

$$f = 1,4762$$

$$ABS = 0,164$$

$$ART(\text{g/g}) = \frac{ABS \times f \times fd \times V}{m \times 10} = \frac{0,164 \times 1,4762 \times 5 \times 100 \text{ mL}}{0,5059 \text{ g} \times 10} = 23,93 \text{ g/g}$$

D.3 – Atividade pectinolítica (Pt)

Dados experimentais:

Para 1 mL de enzima acrescentada a solução de pectina:

$$t(\text{s}) - \text{Branco (Br)} = 156,70 \text{ s}$$

$$t(\text{s}) - \text{Amostra (A1)} = 68,75 \text{ s}$$

$$v_{\text{Br}} = \text{const} \times t(\text{s}) = 0,03338 \text{ mm}^2/\text{s}^2 \times 156,70 \text{ s} = 5,23 \text{ mm}^2/\text{s}$$

$$v_{\text{A1}} = \text{const} \times t(\text{s}) = 0,03338 \text{ mm}^2/\text{s}^2 \times 68,75 \text{ s} = 2,29 \text{ mm}^2/\text{s}$$

$$\text{Red}_1(\%) = \left(\frac{v_{\text{Br}} - v_{\text{A}}}{v_{\text{Br}}} \right) \times 100 = \left(\frac{5,23 - 2,29}{5,23} \right) \times 100 = 56,21\%$$

Para 0,5 mL de enzima acrescentada a solução de pectina:

$$t(s) - \text{Branco (Br)} = 171,24 \text{ s}$$

$$t(s) - \text{Amostra (A1)} = 103,22 \text{ s}$$

$$v_{\text{Br}} = \text{const} \times t(s) = 0,03338 \text{ mm}^2/\text{s}^2 \times 171,24 \text{ s} = 5,72 \text{ mm}^2/\text{s}$$

$$v_{\text{A}_2} = \text{const} \times t(s) = 0,03338 \text{ mm}^2/\text{s}^2 \times 103,22 \text{ s} = 3,45 \text{ mm}^2/\text{s}$$

$$\text{Red}_2(\%) = \left(\frac{v_{\text{Br}} - v_{\text{A}}}{v_{\text{Br}}} \right) \times 100 = \left(\frac{5,72 - 3,45}{3,45} \right) \times 100 = 39,69\%$$

$$\begin{cases} 0,5 \text{ mL} \rightarrow 39,69\% \\ V_{50} \rightarrow 50,00\% \\ 1 \text{ mL} \rightarrow 56,21\% \end{cases} \Rightarrow \frac{V_{50} - 1 \text{ mL}}{50\% - 56,21\%} = \frac{0,5 \text{ mL} - 1 \text{ mL}}{39,69\% - 56,21\%} \Rightarrow V_{50} = 0,8120 \text{ mL}$$

$$\text{Pt (U/g)} = \frac{1}{V_{50}} \times 2,5 = \frac{1}{0,8120 \text{ mL}} \times 2,5 = 3,08 \text{ U/g}$$

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)