

FARINHA DE SEMENTE DE GOIABA (*Psidium guajava*) COMO
SUBSTRATO ALTERNATIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
Aspergillus niger

ARIEL VITORIA GONÇALVES RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

FEVEREIRO-2026

FARINHA DE SEMENTE DE GOIABA (*Psidium guajava*) COMO
SUBSTRATO ALTERNATIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
Aspergillus niger

ARIEL VITORIA GONÇALVES RIBEIRO

“Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientadora: Profa. Dr^a. Luana Pereira de Moraes

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

FEVEREIRO-2026

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R484 Ribeiro, Ariel Vitoria Gonçalves.

FARINHA DE SEMENTE DE GOIABA (*Psidium guajava*) COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Aspergillus niger* / Ariel Vitoria Gonçalves Ribeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

115 f. : il.

Bibliografia: 88 - 115.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2026. Orientadora: Luana Pereira de Moraes.

1. *Aspergillus niger*. 2. Enzimas. 3. Tanase. 4. Fitase. 5. Fermentação em estado sólido. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630


FARINHA DE SEMENTE DE GOIABA (*Psidium guajava*) COMO
SUBSTRATO ALTERNATIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
Aspergillus niger

ARIEL VITORIA GONÇALVES RIBEIRO


“Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em dia 12 de fevereiro de 2026


Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 ERICA CRUZ
Data: 22/04/2026 12:00:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.^a Erica Cruz (D.Sc, Produção Vegetal) - USP

Documento assinado digitalmente
 SILVIA MENEZES DE FARIA PEREIRA
Data: 30/04/2026 12:26:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Silvia Menezes de Faria (D.Sc, Engenharia e Ciência dos Materiais) - UENF

Documento assinado digitalmente
 FABIO DA COSTA HENRY
Data: 04/05/2026 09:27:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Fábio Costa Henry (D.Sc, Medicina Veterinária) - UENF

Documento assinado digitalmente
 LUANA PEREIRA DE MORAES
Data: 07/05/2026 08:48:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Luana Pereira de Moraes (D.Sc, Engenharia de Alimentos) – UENF Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e pela dádiva de concluir mais uma etapa acadêmica. A Nossa Senhora Aparecida, por me guiar e proteger ao longo de toda essa trajetória;

Aos meus pais, Jacimar e Aparecida, que, mesmo diante das dificuldades, jamais desistiram dos filhos e sempre acreditaram em nós, oferecendo amor, apoio incondicional e incentivo constante ao longo de toda a caminhada;

À minha irmã, Aline, que sempre confiou no meu potencial e foi, junto à minha mãe, um grande exemplo de mulher e de força;

Aos meus primos irmãos, Leticia e Deivisson, que sempre me apoiaram;

Aos meus sobrinhos, Miguel, Alice, Gabriel, Davi, Bianca, Heloisa e Bento, que a cada sorriso se tornaram uma fonte diária de motivação para seguir em frente;

Ao meu marido, Ronaldo, por segurar minha mão nos momentos difíceis, enxugar minhas lágrimas e sempre me ajudar a enxergar o melhor de mim;

Aos meus amigos Lucélia, Maria Geovana, Pedro e Daniel por tornarem essa caminhada mais leve, com apoio, companheirismo e amizade;

À minha orientadora, Professora Dra. Luana Pereira de Moraes, pelos valiosos ensinamentos, pela dedicação, paciência e pelas experiências compartilhadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, na pessoa da Professora Dr^a. Daniela Oliveira Barros, pelo acolhimento e suporte durante a realização da pesquisa;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela infraestrutura e pelos recursos disponibilizados para a execução deste trabalho;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	Erro! Indicador não definido.
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Valorização de resíduos agroindustriais	17
3.2	Farinha de semente de goiaba	19
3.3	Enzimas	22
3.4	Enzimas microbianas	24
3.4.1	Aplicações biotecnológicas de <i>Aspergillus niger</i> na síntese enzimática..	25
3.4.2	Processos biotecnológicos aplicados à produção de tanase por <i>Aspergillus niger</i>	27
3.4.3	Processos biotecnológicos aplicados à produção de lacase por <i>Aspergillus niger</i>	29
3.4.4	Processos biotecnológicos aplicados à produção de fitase por <i>Aspergillus niger</i>	31
3.4.5	Fermentação em estado sólido aplicada a processos biotecnológicos fúngicos.....	34
3.5	Delineamento composto central rotacional	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Materiais	39
4.1.1	Microrganismos	39
4.1.2	Semente de goiaba	39
4.2	Métodos	39
4.2.1	Preparação da farinha de semente de goiaba.....	39
4.2.2	Análises físico-químicas	40

4.2.2.1	pH.....	40
4.2.2.2	Umidade	40
4.2.2.3	Cinzas	41
4.2.2.4	Proteínas	42
4.2.2.5	Lipídios.....	43
4.2.2.6	Carboidratos	44
4.2.3	Ensaio de atividade enzimática.....	44
4.2.3.1	Manutenção do microrganismo.....	44
4.2.3.2	Preparo do inóculo.....	45
4.2.3.3	Preparo do meio reacional.....	45
4.2.3.4	Extração do caldo enzimático	46
4.2.3.5	Determinação da atividade enzimática da tanase.....	46
4.2.3.6	Determinação da atividade enzimática da lacase	47
4.2.3.7	Determinação da atividade enzimática da fitase.....	48
4.2.4	Influência da concentração de farinha de semente de goiaba na produção de enzimas	48
4.2.5	Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de tanase, lacase e fitase	49
4.2.6	Avaliação da interação da farinha de semente de goiaba e a ureia na produção de tanase e fitase	49
4.2.7	Produção enzimática a partir de farinha de semente de goiaba em função de diferentes fontes de nitrogênio: ureia versus extrato de levedura.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	Análises físico-químicas.....	52
5.2	Influência da concentração de farinha de semente de goiaba na produção de enzimas	54
5.3	Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de tanase, lacase e fitase	56

5.4	Avaliação da interação da farinha de semente de goiaba e a ureia na produção de tanase e fitase	59
5.4.1	Atividade enzimática da tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia	60
5.4.2	Atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia	62
5.5	Produção enzimática a partir de farinha de semente de goiaba em função de diferentes fontes de nitrogênio: novas concentrações de ureia versus extrato de levedura.....	65
5.5.1	Ensaio utilizando ureia como fonte de nitrogênio.....	65
5.5.1.1	Atividade enzimática da tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.....	66
5.5.1.2	Atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.....	69
5.5.2	Ensaio utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio.....	73
5.5.2.1	Atividade enzimática da tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura	74
5.5.2.2	Atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura	77
6	CONCLUSÕES	81
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da farinha de semente de goiaba (FSG) de acordo com a literatura.....	21
Tabela 2: Concentração dos sais minerais utilizados nos meios reacionais.	46
Tabela 3: Concentrações de farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio.	49
Tabela 4: Concentração da farinha de goiaba e fontes de nitrogênio testadas.	49
Tabela 5: Concentração inicial da farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio após planejamento experimental.	50
Tabela 6: Concentração inicial da Farinha de Semente de Goiaba como fonte de carbono e Ureia e Extrato de Levedura como fonte de nitrogênio após planejamento experimental.....	51
Tabela 7: Composição físico-química da farinha de semente de goiaba.....	52
Tabela 8: Ensaio enzimático testando a farinha de semente de goiaba em diferentes concentrações.	54
Tabela 9: Efeito das fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura) sobre a atividade das enzimas tanase, lacase e fitase.....	58
Tabela 10: DCCR para produção de Tanase e Fitase utilizando farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio.....	59
Tabela 11: DCCR para produção de Tanase e Fitase utilizando farinha de semente de goiaba (FSG) como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio.	66
Tabela 12: Anova da atividade de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.....	69
Tabela 13: DCCR para produção de Tanase e Fitase utilizando farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. .	74
Tabela 14: Anova da atividade de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores preditos e observados da produção de tanase frente a interação da farinha de semente e ureia	60
Figura 2: Diagrama de Pareto da produção de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia	61
Figura 3: Valores Preditos versus Observados da produção de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia	63
Figura 4: Diagrama de Pareto da produção de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia	64
Figura 5: Diagrama de Pareto da produção enzimática da tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.....	67
Figura 6: Gráfico de Valores Previstos versus valores observados da produção de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.....	68
Figura 7: Gráfico de resposta de superfície 3D da atividade da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia	70
Figura 8: Gráfico de contorno da atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.....	71
Figura 9: Valores previstos versus valores observados da atividade da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.....	73
Figura 10: Diagrama de Pareto da atividade de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura	75
Figura 11: Valores Preditos versus Valores Observados da atividade de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura	76
Figura 12: Gráfico de superfície de resposta 3D da atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura	78
Figura 13:Gráfico de contorno da atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura. Fonte: Autoria Própria.....	79
Figura 14: Gráfico de Valores Previstos versus valores observados da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância
ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
C: Carbono
CMcases: Carboximetilcelulases
DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional
DP: Desvio Padrão
EL: Extrato de levedura
EQ: Equação
FES: Fermentação em Estado Sólido
FPases: Filter Paperases
FSG: Farinha de Semente de Goiaba
GL: Grau de Liberdade
GRAS: *Generally Recognized as Safe*
L: Linear
LTA: Laboratório de Alimentos
mM: mol/L
N: Nitrogênio
ND: Não determinado
PA: Puro para Análise
Q: Quadráticos
QM: Quadrados Médios
SA: Sulfato de Amônio
SQ: Soma dos Quadrados
U: Ureia
V.I: Variáveis Independentes

RESUMO

RIBEIRO; Ariel Vitoria Gonçalves; M.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2026 . Farinha de semente de goiaba (*Psidium guajava*) como substrato alternativo na produção de enzimas por *Aspergillus niger* . Orientador: Prof.^a D.Sc. Luana Pereira de Moraes.

O crescimento do setor agroindustrial tem intensificado a geração de resíduos orgânicos, especialmente aqueles oriundos do processamento de frutas, cuja destinação inadequada causa impactos ambientais relevantes. Nesse contexto, a valorização desses subprodutos por meio de processos biotecnológicos surge como alternativa sustentável, alinhada à economia circular. A farinha de semente de goiaba (*Psidium guajava*), rica em fibras, carboidratos estruturais e compostos fenólicos, apresenta elevado potencial fermentativo para produção enzimática. Este estudo avaliou a viabilidade da farinha de semente de goiaba como substrato alternativo para a produção das enzimas tanase, fitase e lacase por *Aspergillus niger*, utilizando fermentação em estado sólido. A farinha foi caracterizada quanto aos parâmetros físico-químicos, apresentando pH 5,58, cinzas 0,20%, umidade 12,58%, lipídios 8,98%, proteínas 10,72% e carboidratos 67,50%, confirmando sua aptidão nutricional e fermentativa. Foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura), sendo selecionadas ureia e extrato de levedura para os ensaios de otimização conduzidos por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). No primeiro DCCR, a farinha foi empregada entre 5 e 25 g e a ureia entre 0 e 4 g, sob pH 5,5, 30 °C e 36 h, não havendo significância estatística para tanase e fitase. Em um segundo DCCR, manteve-se a farinha entre 5 e 25 g, ampliou-se a ureia entre 0 e 8 g, além disso foi realizado um estudo onde substituiu-se a ureia pelo extrato de levedura na faixa de 0 a 6 g. Observou-se que a produção enzimática foi fortemente dependente da fonte e da concentração de nitrogênio, sendo o extrato de levedura determinante para a maximização da fitase. As maiores atividades (10 - 14 U·g⁻¹) ocorreram em baixas concentrações de farinha associadas a cerca de 6 g de extrato de levedura. A tanase apresentou baixa expressividade. A lacase foi descartada nos primeiros ensaios, quando não foi possível detectar atividade. Concluiu-se que a farinha de semente de goiaba constitui um substrato promissor para a produção enzimática por *Aspergillus niger*, com destaque para a fitase em

fermentação em estado sólido, configurando-se como alternativa sustentável para a valorização de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*; enzimas; tanase; fitase; lacase; farinha de semente de goiaba; fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

RIBEIRO; Ariel Vitoria Gonçalves; M.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2026 . *Guava seed flour (Psidium guajava) as an alternative substrate for enzyme production by Aspergillus niger* . Advisor: D.Sc. Luana Pereira de Moraes.

The expansion of the agro-industrial sector has intensified the generation of organic residues, particularly those derived from fruit processing, in which improper disposal may result in significant environmental impacts. In this context, the valorization of such by-products through biotechnological processes emerges as a sustainable alternative aligned with circular economy principles. Guava seed flour (*Psidium guajava*), rich in fibers, structural carbohydrates, and phenolic compounds, presents high fermentative potential for enzyme production. This study evaluated the feasibility of guava seed flour as an alternative substrate for the production of tannase, phytase, and laccase by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. The flour was physicochemically characterized, presenting pH 5.58, ash content of 0.20%, moisture of 12.58%, lipids of 8.98%, proteins of 10.72%, and carbohydrates of 67.50%, confirming its nutritional suitability and fermentative potential. Different nitrogen sources (urea, ammonium sulfate, and yeast extract) were evaluated, and urea and yeast extract were selected for optimization assays using a Central Composite Rotational Design (CCRD). In the first CCRD, flour concentration ranged from 5 to 25 g and urea from 0 to 4 g, under pH 5.5, 30 °C, and 36 h of incubation, with no statistical significance observed for tannase and phytase activities. In a second CCRD, flour concentration was maintained (5–25 g), urea concentration was expanded (0 – 8 g), and yeast extract (0 - 6 g) was included. Enzyme production was strongly dependent on nitrogen source and concentration, with yeast extract being determinant for phytase maximization. The highest activities (10 - 14 U·g⁻¹) were obtained at low flour concentrations associated with approximately 6 g of yeast extract. Tannase showed low expression, while laccase activity was not detected in the initial assays. It is concluded that guava seed flour is a promising substrate for enzyme production by *Aspergillus niger*, particularly for phytase under solid-state fermentation, representing a sustainable strategy for agro-industrial residue valorization.

Keywords: *Aspergillus niger*; enzymes; tannase; phytase; laccase; guava seed flour; solid-state fermentation.

1 INTRODUÇÃO

O setor agroindustrial exerce papel essencial no desenvolvimento econômico brasileiro, porém sua expansão tem intensificado a geração de resíduos orgânicos provenientes do processamento de matérias-primas vegetais, especialmente nas indústrias de frutas (Almeida, 2025). O descarte inadequado desses resíduos pode causar impactos ambientais significativos, tornando necessária a adoção de estratégias sustentáveis para sua valorização, em consonância com os princípios da economia circular (Azevedo et al., 2022; Siqueira et al., 2022; Sharma et al., 2024). Nesse contexto, os processos biotecnológicos destacam-se por possibilitarem a conversão de subprodutos de baixo valor agregado em produtos de interesse industrial, como enzimas e compostos bioativos (Perwez et al., 2024).

Entre as cadeias produtivas relevantes, destaca-se a da goiaba (*Psidium guajava*), cujo processamento gera grandes quantidades de resíduos sólidos, principalmente sementes. A farinha de semente de goiaba apresenta composição rica em fibras e compostos bioativos, o que a torna um substrato promissor para processos fermentativos (Oliveira et al., 2024). Apesar desse potencial, ainda são escassos os estudos que investigam sua aplicação em bioprocessos enzimáticos, especialmente em sistemas de fermentação em estado sólido, evidenciando a necessidade de aprofundamento científico nessa área.

As enzimas desempenham papel central nesses processos, uma vez que são biomoléculas, majoritariamente proteicas, que atuam como catalisadores biológicos, acelerando reações químicas específicas sem serem consumidas durante a reação (Lehninger, 2011). Sua elevada eficiência catalítica está associada à redução da energia de ativação das reações, permitindo que processos metabólicos ocorram sob condições brandas de pH e temperatura, o que confere vantagens técnicas, econômicas e ambientais quando comparadas a catalisadores químicos convencionais (Guengerich, 2018). Devido a essas características, as enzimas apresentam ampla aplicação em diferentes setores industriais, incluindo as indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil, de bebidas, de biocombustíveis e de tratamento de resíduos, consolidando-se como ferramentas essenciais para o desenvolvimento de processos sustentáveis.

Entre as diferentes fontes enzimáticas, os microrganismos destacam-se como os principais produtores industriais, uma vez que permitem a obtenção de enzimas em larga escala, com maior controle das condições de cultivo e menor custo de produção. Fungos filamentosos, leveduras e bactérias são responsáveis pela maior parte das enzimas comercializadas, sendo os fungos filamentosos particularmente relevantes devido à sua elevada capacidade de secreção extracelular e adaptação a substratos complexos (Rigo et al., 2021). A utilização de microrganismos reconhecidos como seguros (Generally Recognized as safe – GRAS) amplia ainda mais o potencial de aplicação dessas enzimas em processos voltados aos setores alimentício e de nutrição animal (Silano et al., 2019). Dentre os microrganismos empregados em fermentações industriais, o fungo filamentoso *Aspergillus niger* destaca-se por sua elevada versatilidade metabólica, robustez fisiológica e expressiva capacidade de secreção extracelular de enzimas. Além disso, essa espécie é reconhecida como organismo GRAS, o que amplia suas possibilidades de aplicação nos setores alimentício, farmacêutico, ambiental e de nutrição animal (Nasser et al., 2003; Li et al., 2020). *Aspergillus niger* é amplamente utilizado na produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas, como tanase, fitase e lacase, devido à sua eficiência produtiva e capacidade de adaptação a diferentes substratos e condições fermentativas (Zhang et al., 2025). Corroborando esses achados, Juliano (2025) comprovou a eficiência de *Aspergillus niger* na produção de tanase e fitase por fermentação em estado sólido a partir da farinha de semente de manga e borra de café.

A tanase (tanino acil-hidrolase) atua na degradação de taninos hidrolisáveis, liberando ácido gálico e glicose, sendo amplamente empregada na clarificação de bebidas, redução da adstringência e obtenção de compostos antioxidantes (Cavalcanti & Guimarães, 2018). As lacases são enzimas multicobre oxidases capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos e aromáticos utilizando o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons, apresentando aplicações relevantes em processos ambientais e industriais (Bail, 2020; Krut et al., 2024). A fitase, por sua vez, catalisa a hidrólise do ácido fítico, promovendo a liberação de fósforo e minerais essenciais, contribuindo para a melhoria da digestibilidade de nutrientes em dietas animais e para a redução da excreção de fósforo no ambiente (Jatuwong et al., 2020).

Nesse cenário, a fermentação em estado sólido (FES) destaca-se como uma tecnologia especialmente adequada para a produção de enzimas microbianas a partir de resíduos agroindustriais. Esse sistema fermentativo caracteriza-se pelo uso de substratos sólidos com baixo teor de umidade, mimetizando o ambiente natural de crescimento de fungos filamentosos e apresentando vantagens como simplicidade operacional, baixo consumo de água, reduzida geração de efluentes e elevada produtividade enzimática (Yafetto, 2022). Além disso, a FES possibilita a utilização direta de resíduos lignocelulósicos como substrato, contribuindo para a redução de custos e para a valorização de biomassas residuais.

Diante desse contexto, tornou-se relevante investigar o potencial biotecnológico da farinha de semente de goiaba como substrato alternativo para a produção de tanase, fitase e lacase por *Aspergillus niger* utilizando a fermentação em estado sólido como estratégia de valorização de resíduos agroindustriais. A compreensão da influência das condições de cultivo, das fontes de nitrogênio e da interação entre parâmetros fermentativos sobre a produção enzimática contribui não apenas para o avanço do conhecimento científico, mas também para o desenvolvimento de processos sustentáveis, eficientes e economicamente viáveis, fortalecendo o aproveitamento integral da cadeia produtiva da goiaba.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da farinha de semente de goiaba como substrato alternativo em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger*, visando à produção e à indução das enzimas tanase, fitase e lacase, com base na composição lignocelulósica e fenólica do resíduo, contribuindo para a valorização biotecnológica sustentável de resíduos agroindustriais.

2.2 Objetivos específicos

- Obter a farinha de semente de goiaba a partir da moagem da semente *in natura*;
- Caracterizar físico-quimicamente a farinha de semente de goiaba, determinando pH, umidade, teor de cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, a fim de avaliar sua aptidão nutricional e potencial fermentativo como substrato em fermentação em estado sólido;
- Investigar o potencial da farinha de semente de goiaba como substrato alternativo para a produção de enzimas tanase, lacase e fitase por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido;
- Avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura) na produção enzimática;
- Otimizar a produção de tanase e fitase através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) considerando as variáveis: concentração de substrato e fonte de nitrogênio;
- Analisar estatisticamente os modelos obtidos por meio de ANOVA, diagramas de Pareto, superfícies de resposta e gráficos de valores preditos versus observados, a fim de verificar a significância dos efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes;
- Determinar as condições experimentais que favorecem a maximização da atividade enzimática, com destaque para a produção de fitase, e discutir a baixa expressividade da tanase nas condições avaliadas;

- Analisar a viabilidade do aproveitamento da farinha de semente de goiaba como matéria-prima em processos biotecnológicos, contribuindo para valorização sustentável de resíduos da cadeia frutícola.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Valorização de resíduos agroindustriais

O setor agroindustrial desempenha um papel fundamental no processamento de produtos e matérias-primas provenientes da agropecuária (Gov,2021), contribuindo com aproximadamente 5,9% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (Embrapa, 2025). No entanto, é também o principal gerador de resíduos orgânicos no país (Vaz, 2022). Dentre os segmentos que mais produzem resíduos, destaca-se a indústria de sucos e polpas, responsável por cerca de 40% de todo o resíduo agroindustrial (Nascimento e Franco, 2015).

Esses resíduos (compostos majoritariamente por cascas, sementes e bagaços) são frequentemente descartados como lixo orgânico, o que representa um risco ambiental, pois o descarte inadequado pode levar à contaminação do solo e da água (Sharma et al.,2024). Para mitigar esses impactos e agregar valor a esses resíduos, diferentes estratégias de reaproveitamento vêm sendo estudadas, como tratamentos hidrotérmicos, enzimáticos, extração com solventes e a aplicação de microrganismos classificados como GRAS (Generally Recognized As Safe) (Gaur et al., 2024). Essas abordagens apresentam amplo potencial de uso em diversas áreas industriais, incluindo setores alimentícios, cosméticos, farmacêuticos, tratamento de efluentes, produções de rações e processos biotecnológicos (Gusmeroti et al., 2018)

A compostagem é o método mais amplamente utilizado e comprovadamente eficiente para o reaproveitamento de resíduos orgânicos, resultando na produção de um adubo natural de alta qualidade (Gimenez et al., 2024). Contudo, seu custo-benefício muitas vezes limita a adoção dessa prática na agricultura familiar e em pequenos estabelecimentos, comprometendo seu potencial como estratégia eficaz na redução de resíduos (Ceregatti, 2022). Portanto, são necessárias outras pesquisas acerca da transformação de resíduos.

Ceregatti (2022) estudou a valorização de resíduos agroindustriais na forma de produtos com alto valor nutricional para implementação em produtos alimentícios.

Souza e colaboradores (2024) investigaram a utilização de resíduos agroindustriais como subprodutos para a produção de proteases coagulantes do leite

por *Trichoderma sp.*, isolado do cerrado piauiense. Foram testados resíduos como casca de arroz, casca de mandioca, casca de laranja, sabugo de milho e farelo de soja. Dentre esses, o farelo de soja, a casca de laranja e a casca de mandioca destacaram-se pela eficiência na produção de proteases, sendo a casca de mandioca especialmente eficaz na produção de proteases coagulantes do leite.

Barbosa (2024) realizou um estudo sobre resíduos agroindustriais de banana aplicados a geração de biocombustíveis, avaliando o efeito do pré-tratamento térmico combinado com hidrólise ácida. A autora observou que o gênero *Clostridium* apresentou excelente desempenho tanto na hidrólise quanto na produção de hidrogênio, enquanto o gênero *Methanotrix* mostrou-se eficiente no processamento de resíduos pré-tratados e na geração de metano. Concluiu-se que os pré-tratamentos ácido e térmico aumentaram a produção de açúcares, podendo ser aplicados a resíduos agroindustriais para potencializar a geração de biogás.

No estudo realizado por Teixeira et al. (2023), os autores investigaram a hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos e a caracterização bromatológica desses materiais com potencial uso na formulação de rações animais. Foram avaliadas a casca de soja, a palha e a espiga de milho, utilizando celulase e pectinase comerciais e não comerciais. Os resultados demonstraram que as enzimas comerciais alcançaram 7,26% e 30% da eficiência de hidrólise obtida com as enzimas comerciais nos mesmos substratos. Observou-se ainda que o pré-tratamento com 7,5% de NaOH e o uso de partículas com tamanho de 0,5 mm aumentaram significativamente a taxa de hidrólise da casca de soja, da palha e da espiga de milho, independente do tipo de enzima utilizada. Em relação às características bromatológicas, o estudo concluiu que a casca de soja hidrolisada com celulase e pectinase comerciais apresenta elevado potencial para aplicação em larga escala na produção de ração animal.

Teles (2025) realizou um estudo bibliográfico sobre o uso de resíduos agroindustriais como subprodutos na fermentação em estado sólido para a produção de enzimas. O autor destaca que essa abordagem representa uma alternativa biotecnológica promissora, capaz de agregar alto valor aos resíduos, contribuindo para o aproveitamento sustentável desses materiais.

Diante desse panorama, os resíduos agroindustriais têm se consolidado como matérias-primas promissoras para o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis,

especialmente no campo da biotecnologia (Shokrollahi et al. 2024). A aplicação de tecnologias como a hidrólise enzimática, fermentações microbianas e pré-tratamentos físico-químicos tem possibilitado a conversão eficiente desses materiais em produtos de alto valor agregado, como enzimas industriais, biofertilizantes, ácidos orgânicos, biocombustíveis e compostos bioativos (Greses et al., 2020).

Tais abordagens biotecnológicas não apenas favorecem o reaproveitamento racional dos resíduos, como também promovem a inovação em diversos setores industriais diversos, contribuindo para uma economia circular e de baixo impacto ambiental (Joshi et al. 2022). A utilização de microrganismos GRAS, por exemplo, tem se mostrado uma alternativa viável e segura para transformar substratos lignocelulósicos em insumos biotecnológicos com aplicabilidade na indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética e na produção de rações (Chen et al. 2025).

Nesse contexto, destaca-se a importância de caracterizar adequadamente os resíduos quanto à sua composição físico-química e potencial fermentativo, a fim de otimizar os parâmetros de bioconversão (Martin e Castro, 2024). Resíduos como a farinha de semente de goiaba, rica em fibras e compostos fenólicos, apresentam grande potencial para serem utilizados como substrato em processos fermentativos conduzidos por microrganismos selecionados, visando à obtenção de enzimas, antioxidantes naturais ou outros metabólitos de interesse industrial (Araújo et al, 2024). Portanto, aprofundar os estudos sobre a caracterização e a aplicação biotecnológica desses resíduos torna-se essencial para o desenvolvimento de soluções sustentáveis e inovadoras no setor agroindustrial.

3.2 Farinha de semente de goiaba

O Brasil destaca-se como terceiro maior produtor mundial de frutas, com aproximadamente 45 milhões de toneladas por ano, sendo a maior parte dessa produção destinada ao consumo interno (Embrapa, 2025). A safra de 2023 produziu 58 milhões de toneladas. O rendimento (toneladas por hectare) aumentou de forma constante, passando de aproximadamente 12 t/ha em 1974 para cerca de 18 t/ha em 2023, e gerou uma receita de R\$ 76,1 bilhões (IBGE,2024).

Entre as principais frutas cultivadas no país, a goiabeira (*Psidium guajava* L.), fruta tropical nativa da América do Sul, tem se destacado. A produção brasileira da goiaba apresentou aumento de 49% entre os anos de 2019 e 2023, resultando em uma receita de R\$1,3 bilhão (IBGE, 2024). No ano de 2024 a produção brasileira chegou a 557.225 Toneladas em uma área de 22.987 Hectares, sendo os Estados de Pernambuco, São Paulo e Paraná os principais produtores (IBGE, 2025).

Comparada a outras frutas tropicais, a goiaba se sobressai por suas qualidades nutricionais e pela versatilidade em diferentes formas de preparo (Oliveira et al., 2024). Embora muito apreciada *in natura*, a fruta é altamente perecível, sendo suscetível a danos mecânicos e a deterioração microbiológica, o que limita sua vida útil como fruta de mesa (Galeno, Vinha & Maestri, 2024).

O processamento da goiaba é uma alternativa viável para reduzir perdas pós-colheita, estender seu consumo além da safra e agregar valor ao produto (Galeno, Vinha & Maestri, 2024). A partir desse processamento são produzidos polpas, néctar, sucos, doces, geleias e sorvetes. No entanto, esse processo gera uma quantidade significativa de resíduos, incluindo cascas, sementes e restos de polpa estimando-se que estes resíduos representam cerca de 25% a 30% do peso total da fruta (Farias et al., 2020).

Esses resíduos são fontes de polissacarídeos, lipídios, minerais, vitaminas, compostos fenólicos, carotenoides e fibras alimentares (Oliveira, 2024), o que os torna promissores como subprodutos para diversos fins industriais. Na tabela 1 são apresentados os valores de composição química da farinha semente de goiaba (FSG).

Tabela 1: Composição química da farinha de semente de goiaba (FSG) de acordo com a literatura.

Nutrientes	FSG*
Matéria seca (%)	90,83
Proteína bruta (%)	10,35
Matéria mineral (%)	3,37
Cálcio (%)	0,06
Fósforo total (%)	0,11
Extrato etéreo (%)	11,71
Fibra Bruta (%)	55,62
Fibra em detergente neutro (%)	72,99
Fibra em detergente ácido (%)	58,30
Hemicelulose (%)	14,69
Lignina (%)	24,53
Pectina (%)	4,61
Carboidratos totais (%)	76,65
Carboidratos não fibrosos (%)	2,18
Energia bruta (kcal/kg)	5181
Energia digestível (kcal/kg)	1740
Energia metabolizável (kcal/kg)	1708
Lisina digestível (%)	1,56
Metionina + Cistina digestível (%)	4,60
Treonina Digestível (%)	2,17

FSG: Farinha de semente de goiaba.

Adaptado de Silva et al. (2009); Lira et al. (2011); Lima de Sá (2018) * Valores em Matéria Natural (MN).

Estudos têm demonstrado o potencial desses resíduos. Costa (2024) investigou a inclusão da farinha de semente de goiaba na formulação de pães doces. Roberto et al. (2015) avaliaram a qualidade nutricional de barras de cereais contendo cascas e sementes de goiaba. Silveira et al. (2016) utilizaram farinha de semente de goiaba na produção de biscoitos, e Souza et al. (2020) desenvolveram materiais encapsulantes a partir do mesmo resíduo.

No setor cosmético, De Pina et al. (2023) demonstraram a eficácia do pó de semente de goiaba como componente esfoliante na fabricação de sabonetes. Já na área de nutrição animal, Gonçalves (2021) avaliou a inclusão da farinha de semente de goiaba na dieta de leitões em fase de creche e observou não apenas a ausência de efeitos negativos no desempenho dos animais, como também a inibição da ocorrência de diarreia- condição comum nesse período.

Além disso, Dos Santos (2021) explorou o uso das sementes de goiaba e cajá na produção de fotocatalisadores à base de óxido de ferro, com aplicação na

degradação de corantes. A pesquisa concluiu que a combinação dos dois resíduos promoveu melhores resultados catalíticos, destacando seu potencial tecnológico.

Os estudos realizados por Sousa e colaboradores (2021) observaram o aumento do teor proteico da farinha de semente de goiaba por meio da fermentação semissólida com o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Pereira et al. (2023) realizaram a produção de xilooligossacarídeos por meio de hidrólise ácida diluída a partir de resíduos agroindustriais, utilizando casca de banana, bagaço de laranja e bagaço de goiaba como matérias-primas.

3.3 Enzimas

As enzimas são biomoléculas, majoritariamente proteínas, que atuam como catalisadores biológicos, ou seja, aumentam a velocidade das reações químicas sem serem consumidas nelas (Lehninger, 2002). Essas moléculas são essenciais para processos metabólicos em organismos vivos, atuando em reações que, sem sua presença, ocorreriam de forma extremamente lenta ou inviável em condições fisiológicas (Guengerich, 2018).

A estrutura enzimática é classificada em diferentes níveis organizacionais, iniciando-se pela sequência linear de aminoácidos formada por aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Essa sequência é responsável por definir as interações químicas que ocorrerão no enovelamento da proteína (Dods, 2020). A estrutura secundária é caracterizada por arranjos regulares da cadeia polipeptídica, como as α -hélices e as folhas β -pregueadas, que são estabilizados por ligações de hidrogênio entre os átomos do esqueleto peptídico (Song et al., 2018). Já a estrutura terciária refere-se à conformação tridimensional global da enzima, resultante do enovelamento das estruturas secundárias. Ela é estabilizada por diferentes tipos de interações, entre eles a ponte de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações iônicas e pontes de dissulfeto (Haim, 2021). É a estrutura terciária que determinará a formação do sítio ativo, região específica responsável pela ligação ao substrato e pela catálise (Smith, 2008). Em alguns casos, pode haver a estrutura quaternária, essa organização envolve a interação entre subunidades proteicas, podendo ser essencial para a atividade catalítica ou regulação alostérica da enzima (Jião, 2017).

O sítio ativo é a região da enzima responsável pela ligação com o substrato durante as reações químicas. Essa interação ocorre devido à proximidade e à complementaridade estrutural entre a enzima e o substrato, permitindo um encaixe preciso entre ambas as moléculas. Essa característica estrutural é o que confere alta especificidade às enzimas, ou seja, elas só atuam sobre determinados subprodutos, não se ligando quimicamente a qualquer composto (Santiago, 2018).

A classificação das enzimas foi estabelecida pela Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia celular, que as organizou em seis grupos principais, de acordo com o tipo de reação química que catalisam: (I) Oxirredutases; (II) Transferases; (III) Hidrolases; (IV) Liases; (V) Isomerases e (VI) Ligases. Essa categorização considera o mecanismo de ação de cada enzima e tipo específico de reação em que está envolvida (Pacheco & Mendes, 2021).

As enzimas possuem ampla aplicação em diversos setores industriais, destacando-se: indústria alimentícia; têxtil; fabricação de detergentes; indústria farmacêutica; setor de bebidas; produção de biocombustíveis; síntese de compostos orgânicos e engenharia genética, dentre outros (Contesini, Melo & Sato 2018).

Estudos têm comprovado a eficácia da utilização de enzimas em diversos setores industriais. No setor de bebidas, Lourenço (2022) avaliou a aplicação de enzimas no processo de fabricação de cervejas. Conto e colaboradores (2025), por sua vez, realizaram uma comparação físico-química entre cervejas do tipo *American Pale Ale*, com e sem adição de enzima clarificante, com objetivo de reduzir o teor de glúten. Em sua conclusão, a autora relata que houve diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos e uma redução efetiva do glúten na amostra com adição enzimática.

Cavalcante et al. (2021) investigaram o uso de lipases imobilizadas na indústria farmacêutica, com propósito de demonstrar o avanço na síntese de derivados farmacológicos por meio da biocatálise. Ao final do estudo, os autores destacam a importância crescente dos processos biocatalíticos como alternativa sustentável e eficiente para produção de fármacos.

Na indústria alimentícia, Tomaz (2023) abordou, em sua revisão, a utilização de proteases, enfatizando seu papel na modificação de proteínas e melhoria das características sensoriais dos alimentos. Oliveira (2022) realizou um levantamento

sobre o uso de enzimas nos processos da indústria têxtil, evidenciando sua contribuição na redução de impactos ambientais e no aumento da eficiência produtiva. Já, Pavan (2024), em seu estudo, apresentou as enzimas como uma alternativa viável para o refinamento e branqueamento da celulose, propondo sua aplicação como uma estratégia sustentável em substituição a métodos químicos convencionais.

Dessa forma, observa-se que a aplicação de enzimas tem se mostrado vantajosa em distintos segmentos industriais, promovendo não apenas ganhos em eficiência, mas também contribuindo para a sustentabilidade dos processos produtivos. A contínua pesquisa e desenvolvimento nessa área reforçam o potencial das enzimas como ferramentas-chave na inovação tecnológica e na transição para uma economia mais verde.

3.4 Enzimas microbianas

As enzimas microbianas são produzidas durante o metabolismo primário ou secundário de fungos e bactérias ao longo do crescimento celular. Os principais microrganismos produtores pertencem ao grupo das leveduras e fungos filamentosos, sendo que apenas cerca de 30% dessas enzimas são obtidas a partir de bactérias (Rigo et al., 2021).

Essas enzimas têm desempenhado um papel central em múltiplas áreas, incluindo aplicações industriais, ambientais e biomédicas, devido a sua elevada especificidade catalítica, eficiência e possibilidade de produção em larga escala (Singh & Bajaj, 2017).

Para que um microrganismo seja considerado adequado à produção de enzimas de interesse biotecnológico, alguns requisitos devem ser atendidos. Do ponto de vista da biossegurança, o organismo deve apresentar o status de GRAS (Generally Recognized As Safe), além de possuir alta capacidade de síntese e secreção enzimática (Silano et al, 2019). Adicionalmente é desejável a resistência a condições ambientais adversas e tolerância a substâncias potencialmente tóxicas produzidas pelo próprio metabolismo (EMBRAPA, 2015).

3.4.1 Aplicações biotecnológicas de *Aspergillus niger* na síntese enzimática

O Reino Fungi compreende organismos eucarióticos, heterotróficos e aclorofilados, amplamente distribuídos em ambientes terrestres e aquáticos (Spatafora et al., 2017; Corbu et al., 2023). Tais organismos desempenham funções ecológicas essenciais, como a decomposição da matéria orgânica, fundamental para o ciclo do carbono, e a formação de simbioses com plantas e animais, que contribuem para a manutenção do equilíbrio ecológico (Corbu et al., 2023). Uma característica distintiva é a presença de parede celular composta predominantemente de quitina, o que os diferencia dos vegetais, cuja parede é formada principalmente por celulose (Naranjo-Ortiz et al., 2019).

Entre os gêneros fúngicos de maior relevância científica e tecnológica, destaca-se o *Aspergillus*, amplamente estudado devido à sua importância ecológica, industrial e clínica (Mohamed, 2021). Esse gênero é classificado como anamórfico, pertencente à família *Trichocomaceae*, e apresenta reprodução predominantemente assexuada, caracterizada pela formação de fiáides que originam cadeias de conídios, estruturas fundamentais para dispersão e colonização de diferentes substratos (Silva et al., 2015).

Dentre as espécies descritas, *Aspergillus niger* é uma das mais representativas. A caracterização morfológica desta espécie, baseada em chaves taxonômicas de Raper & Fennell (1965), descreve-a como filamentos, com conídios de coloração marrom escura a negra, conidióforos hialinos e vesículas globosas, podendo apresentar arranjos unisseriados ou bisseriados (Silva et al., 2011). Essas características permitem sua identificação e diferenciação em estudos taxonômicos aplicados.

Sob a perspectiva de biossegurança, *Aspergillus niger* é uma das poucas espécies de fungos reconhecidas pelo status de GRAS (Generally Regarded As Safe) concedido pela Food and Drug Administration (FDA), devido à sua baixa toxicidade (Nasser et al., 2003). Essa classificação reforça sua segurança de uso e amplia suas possibilidades de exploração em processos industriais e biotecnológicos. De acordo com Li et al. 2020 e Zhang et al., 2025, o *Aspergillus niger* apresenta aplicações que incluem a produção de enzimas (amilases, proteases, fitases), a síntese de ácidos orgânicos (como ácido cítrico e o ácido glicônico), bem como sua utilização em

processos de biorremediação e no desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos.

Diversos estudos recentes evidenciam a versatilidade biotecnológica do *Aspergillus niger*. Latif et al. (2025) realizaram um levantamento bibliográfico sobre a utilização dessa espécie na produção de ácido cítrico, destacando seu papel central como microrganismo mais explorado industrialmente para esse fim. De forma experimental, West (2023) avaliou a produção de ácido cítrico a partir da fermentação em estado sólido de coprodutos do processamento agrícola. O autor observou que resíduos provenientes de frutas apresentam maior eficiência na produção em comparação aos derivados de cereais, concluindo que quanto maior o teor de açúcares do substrato, maior a produtividade do ácido cítrico.

Além da produção de ácidos orgânicos, o *Aspergillus niger* tem se mostrado relevante na síntese enzimática e em processos de biorremediação. Safdar et al. (2024) estudaram a biodegradação de plásticos sintéticos a partir de lipases extracelulares produzidas pelo fungo em fermentação sólida, utilizando farelo de trigo como substrato. Os autores verificaram que as enzimas apresentaram atividade degradativa frente a polímeros de elevada recalcitrância, como polietileno, politereftalato de etileno (PET) e poliestireno. Santos et al. (2023) otimizaram a produção de lipases por fermentação submersa em óleo de fritura residual, obtendo condições ótimas em pH 2, com 1,5% (v/v) de óleo e 24 horas de cultivo, o que resultou em uma atividade enzimática de 141,90 U/mL.

Xavier et al. (2024) avaliaram a viabilidade de *Aspergillus niger* na produção de enzimas pectinolíticas utilizando resíduos de cebola e casca de maçã como substratos, demonstrando o potencial desses subprodutos agroindustriais como fontes alternativas de carbono. De forma semelhante, Juliano (2025) empregou resíduos de manga e borra de café para a produção de tanase e fitase por fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*, reforçando a relevância da utilização de resíduos agroindustriais como estratégia sustentável para a obtenção de enzimas de interesse industrial.

A utilização de *Aspergillus niger* também sendo explorada na nutrição animal. Sousa et al. (2019) avaliaram a inclusão da biomassa seca do fungo em rações extrusadas para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), testando diferentes níveis de

adição (2%, 4% e 8%). Os resultados mostram que a inclusão de 4% foi a mais eficiente, proporcionando melhora significativa na conversão alimentar, ganho de peso e peso final dos peixes.

No tratamento de efluentes, Zareh et al. (2022) analisaram o uso da biomassa seca do *Aspergillus niger* como bioissorvente na remoção de ferro de águas residuais, concluindo que a concentração de 4g/100 mL foi eficaz na redução do metal, confirmando seu potencial como alternativa sustentável em processos de descontaminação.

Dessa forma, o gênero *Aspergillus*, em especial o *Aspergillus niger*, consolida-se como um fungo filamentoso de elevada importância científica, tecnológica e industrial. O reconhecimento de sua segurança (GRAS), aliado à ampla versatilidade metabólica, fundamenta seu expressivo potencial de aplicação em distintas áreas da biotecnologia, incluindo a produção de metabólitos de interesse industrial, bem como o desenvolvimento de estratégias avançadas de biorremediação e suplementação nutricional.

3.4.2 Processos biotecnológicos aplicados à produção de tanase por *Aspergillus niger*

A tanase é uma enzima versátil com ampla aplicação industrial, destacando-se pela degradação eficiente e seletiva de taninos. Produzida por microrganismos, apresenta alta produtividade, estabilidade e facilidade de manipulação, sendo empregada em alimentos, bebidas, rações, produtos farmacêuticos e tratamento de resíduos vegetais, consolidando-se como ferramenta promissora para processos biotecnológicos sustentáveis e eficientes.

A tanase, ou tanino acil-hidrolase, é uma enzima hidrolítica que degrada taninos hidrolisáveis, liberando ácido gálico e glicose. Pode ser obtida de fontes vegetais, animais e microbianas, sendo as microbianas as mais utilizadas em biotecnologia devido a maior estabilidade, facilidade de cultivo e rendimento, produzidas principalmente por leveduras, fungos e bactérias em diferentes sistemas de fermentação (Chávez-González, 2012; Cavalcanti e Guimarães, 2018; Saad et al., 2023; Shah et al., 2023).

A tanase tem despertado interesse por suas aplicações biotecnológicas nos setores alimentício, farmacêutico e ambiental, destacando-se na produção de ácido gálico a partir da hidrólise de ácido tânico. O ácido gálico, por sua vez, é amplamente utilizado na indústria farmacêutica, como reagente químico na síntese de propil galato, e apresenta atividade antioxidante, contribuindo para a estabilidade de corantes naturais em alimentos (Cavalcanti, 2021).

A estrutura da tanase varia de acordo com sua origem, sendo geralmente uma glicoproteína composta por cadeias polipeptídicas globulares (Rivas, 2018). Sua produção ideal ocorre entre 30°C e 50°C, com pH na faixa de 5,5 e 6,5 (Kushwaha, 2025). Durante o processo de produção, o ácido tânico atua como indutor da síntese enzimática e como fonte alternativa de carbono (De Lima, 2022). Fontes de nitrogênio, tanto inorgânicas (nitrato de sódio e sulfato de amônio) quanto orgânicas (como peptona), são utilizadas para promover o crescimento microbiano e aumentar a atividade da enzima (Battestin, 2007).

Jesus Martins e colaboradores (2021) fizeram a seleção e avaliação da produção de tanase por fungos filamentosos em fermentação submersa utilizando resíduos agrícolas. Os autores isolaram 40 espécies fúngicas, entre elas 8 se destacaram na produção da enzima em meio sólido. Após alguns testes de otimização, a atividade máxima encontrada foi de 20,43 U/mL em meio com casca de banana e 3% de ácido tânico no período de cinco dias de fermentação a 30°C utilizando *Aspergillus sp.*

Cavalcanti (2021) comparou a atividade da tanase produzida por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. A enzima solúvel obtida de *Aspergillus niger* apresentou maior atividade a 60 °C, enquanto a forma seca com lactose teve pico a 50 °C. Formulações secas com β -ciclodextrina e maltodextrina apresentaram boa atividade entre 30 °C e 50 °C. Contudo, temperaturas acima de 70 °C resultaram em queda acentuada ou até inibição da atividade enzimática. Quanto ao pH, a enzima demonstrou atuar eficientemente em uma faixa estreita: pH 5 para as formas solúvel e seca com β -ciclodextrina e lactose, e pH 6 para a enzima seca com maltodextrina.

No mesmo estudo, foi avaliada a viabilidade do uso da tanase seca na alimentação animal, após um ano de armazenamento a 28 °C e 4 °C. As espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* foram aplicadas em

substratos como farinha de sorgo, ração para peixes e bagaço de uva. *Aspergillus ochraceus* apresentou as maiores taxas de redução de taninos: 95% na ração de peixe, 94% no bagaço de uva e 90% na farinha de sorgo. *Aspergillus niger* demonstrou redução constante de 90% em todos os substratos, enquanto *Aspergillus carbonarius* obteve os menores índices de redução: 48% na farinha de sorgo, 70% no bagaço de uva e 90% na ração de peixe.

Gouveia et al. (2022) investigaram a aplicação da tanase de *Aspergillus tamarii* URM 7115 em suco de caju integral, observando redução da adstringência, aumento da atividade antioxidante, menor turvação e manutenção das propriedades físico-químicas e nutricionais. Ferreira (2008) avaliou a especificidade da tanase de *Paecilomyces variotti* e sua aplicação na biotransformação de polifenóis do suco de laranja. Nos chás, a tanase é usada para manter a qualidade sensorial da bebida, realçar o sabor, padronizar a coloração e melhorar a extração dos compostos bioativos (Martins et al., 2021). Na fabricação de cervejas, a enzima é aplicada para reduzir os taninos que causam turbidez, resultando em um produto mais límpido e de melhor qualidade (Belmares et al., 2004).

3.4.3 Processos biotecnológicos aplicados à produção de lacase por *Aspergillus niger*

A lacase é uma enzima estratégica na biotecnologia ambiental, industrial e agrícola, devido à sua estabilidade, ampla especificidade e eficiência catalítica. Ela atua na modificação de resíduos lignocelulósicos, facilitando a liberação de açúcares fermentescíveis e metabólitos de interesse, contribuindo para a otimização de bioprocessos, valorização de resíduos agroindustriais e promoção da economia circular. (Pham et al., 2024)

As lacases constituem um grupo de enzimas multicobre oxidases amplamente produzidas por fungos, bactérias, insetos e plantas superiores (Bail, 2020). Sua atividade catalítica consiste na oxidação de compostos fenólicos e aromáticos utilizando oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, gerando água como subproduto (Krut et al., 2024). Essa versatilidade metabólica confere a lacase um papel central em processos de degradação da lignina, detoxificação de compostos

aromáticos e mecanismos de defesa oxidativa dos organismos produtores (Kato et al., 2024).

Em fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus*, a lacase desempenha função de deslignificação de resíduos lignocelulósicos (Loi et al, 2021). Ao oxidar estruturas fenólicas, a enzima promove a abertura parcial da matriz lignina-celulose, facilitando a liberação de carboidratos estruturais que podem ser convertidos em enzimas, ácidos orgânicos ou compostos bioativos durante a fermentação (Loi et al. 2021; Khaswal et al., 2024).

Um levantamento bibliográfico realizado por Cruz et al. (2024) identificou que fungos dos gêneros *Trametes* e *Pleurotus* são amplamente empregados na produção de lacase por fermentação submersa, embora a fermentação em estado sólido venha se mostrando uma alternativa promissora para a obtenção dessa enzima.

Vasudhevan et al. (2024) avaliaram a produção de lacase por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais, utilizando o fungo *Aspergillus oryzae*, demonstrando a viabilidade dessa estratégia como rota sustentável para a obtenção enzimática.

Por sua vez, Huang et al. (2024) investigaram a expressão heteróloga da lacase de *Cerrena unicolor* em *Aspergillus niger*, sendo pioneiros na produção funcional dessa enzima nesse hospedeiro fúngico, o que amplia as possibilidades de aplicação biotecnológica e escalonamento industrial.

Na indústria, a lacase é reconhecida como uma das enzimas mais promissoras devido à sua capacidade de degradar uma ampla variedade de substratos, incluindo fenóis, corantes, metais pesados complexados, pesticidas e fármacos (Braz, 2023). Além de sua atuação em bioprocessos ambientais, a enzima possui aplicações consolidadas no branqueamento de polpa de papel, modificação de fibras têxteis, estabilização de bebidas e desenvolvimento de biossensores (Pavan, 2024), evidenciando seu elevado potencial biotecnológico.

Quando aplicada a resíduos agroindustriais, a lacase apresenta relevância ainda mais expressiva. Cascas, sementes e bagaços possuem matriz lignocelulósica rica em lignina e compostos fenólicos, fatores que limitam a acessibilidade enzimática e reduzem a digestibilidade da biomassa, tanto para fermentações quanto para aplicações nutricionais (Fernandes, 2021). A ação de microrganismos produtores de

lacase, como *Aspergillus spp.*, favorece a bioconversão dessas biomassas ao promover a ruptura de estruturas poliméricas, reduzir compostos antinutricionais e liberar nutrientes essenciais (Sidar et al., 2024). Como consequência, há melhora no valor nutricional e funcional dos ingredientes obtidos, refletindo em maior aplicabilidade em produtos alimentícios e formulações para nutrição animal (Martin et al., 2022; Sath et al., 2025).

No contexto das biorrefinarias, a lacase tem sido apontada como alternativa ecoeficiente para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, substituindo métodos físico-químicos mais agressivos e energeticamente intensivos (Suryadi et al., 2022). Seu emprego favorece a extração de compostos bioativos, como polifenóis antioxidantes, e facilita etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação (Giacobbe et al., 2020).

Estudos recentes reforçam a aplicabilidade dessa enzima. Correa, Fisher e Marques (2022) demonstraram a eficácia da lacase no tratamento de efluentes oriundos do beneficiamento de gemas, enquanto Dos Santos et al. (2022), ao avaliarem sete linhagens fúngicas em fermentação em estado sólido, identificaram *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 como a de maior produção enzimática. Golveia et al. (2021) também confirmaram a viabilidade de resíduos agroindustriais como indutores naturais de lacase, evidenciando o potencial de biomassas lignocelulósicas na produção dessa enzima.

3.4.4 Processos biotecnológicos aplicados à produção de fitase por *Aspergillus niger*

As fitases, também denominadas mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolases, são enzimas responsáveis pela hidrólise do fitato, promovendo a liberação sequencial de mio-inositol penta-, tetra-, tri-, di- e monofosfatos, além de fosfato inorgânico, fósforo e outros minerais essenciais (Jatuwong et al., 2020).

A classificação dessas enzimas pode ser realizada segundo diferentes critérios. Quanto ao pH ótimo de atuação, distinguem-se as fitases ácidas, encontradas predominantemente em fungos, e as fitases alcalinas, produzidas principalmente por bactérias (Singh et al., 2023). Outra forma de classificação baseia-se na posição de ataque no anel do inositol, originando as 3-, 4-, 5- e 6-fitases, cada

uma responsável pela formação de diferentes isômeros de inositol fosfato a partir da desfosforilação do ácido fítico (Simas, 2023).

A produção de fitases pode ocorrer a partir de substratos de origem animal ou vegetal; entretanto, microrganismos fúngicos são considerados mais eficientes, uma vez que apresentam maior estabilidade e ampla faixa de atuação em diferentes condições de pH (Bloot et al., 2021). Nos fungos leveduriformes, a produção ocorre, em geral, por fermentação submersa, utilizando fontes simples de carbono, como glicose e maltose. Em contrapartida, os fungos filamentosos são amplamente explorados em fermentação em estado sólido, empregando substratos complexos e de baixo custo, como resíduos agroindustriais (Borkertas et al., 2025)

Nesse contexto, o gênero *Aspergillus* destaca-se como um dos principais produtores de fitase. Nascimento et al. (2017), ao avaliarem 19 espécies desse gênero, observaram que 17 foram capazes de produzir fitase em meio contendo ácido fítico como fonte de carbono e fósforo, suplementado com sais minerais (NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , Fe_2SO_4 , CaCl_2 e ZnSO_4), evidenciando a importância da formulação adequada do meio de cultivo para maximizar a produção enzimática.

A eficiência produtiva e a atividade catalítica das fitases são fortemente influenciadas por fatores ambientais. Jatuwong et al. (2020) verificaram que fitases fúngicas apresentam estabilidade em ampla faixa de pH (1,3 a 8,0) e temperaturas entre 37 °C e 67 °C. Adicionalmente, Casey e Walsh (2003) demonstraram que a adição de íons metálicos, como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} , pode estimular a atividade de fitases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9142.

Complementando esses achados, Simas (2023) avaliou diferentes resíduos agroindustriais como fontes alternativas de carbono, incluindo farinha de mandioca, farelo de arroz integral, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, constatando que o farelo de arroz integral foi o substrato mais eficiente para espécies como *Aspergillus niveus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus japonicus*.

No campo das aplicações, a fitase possui relevância expressiva na nutrição animal, especialmente em dietas para aves e suínos. Martinelli (2025), ao avaliar a suplementação com fitase em dietas de suínos em fase de crescimento, observou aumento nos coeficientes de digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, energia bruta, proteína bruta, cálcio e fósforo. De forma semelhante, Broch et al.

(2020), em revisão bibliográfica, relataram melhoria no desempenho produtivo e redução da mortalidade em frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com fitase. Varella (2024) demonstrou ainda que o uso de humofosfato de cálcio associado à fitase constitui uma alternativa eficiente como fonte de fósforo em dietas comerciais para frangos de corte.

A fitase tem despertado interesse em aplicações estéticas. Brandão e Castro (2024), em revisão bibliográfica, avaliaram a interação entre o zinco e a fitase na durabilidade da toxina botulínica, concluindo que a associação desses componentes pode potencializar os efeitos estéticos da toxina, configurando uma estratégia promissora para otimização dos resultados clínicos.

No âmbito da produção e caracterização enzimática, Nascimento (2011) estudou a produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. A melhor condição de produção (8,80 U/mL) foi obtida com a combinação de 1,25% de farelo de arroz e 3,0% de milhocina. A fitase apresentou temperatura ótima de 60 °C, mantendo 38,4% da atividade residual após incubação a 90 °C por 120 minutos. O pH ótimo foi 5,0, com manutenção de mais de 80% da atividade residual na faixa de pH 5,0 a 9,0 por 15 horas. A enzima apresentou constante de afinidade de 0,12 μM e velocidade máxima de 7,9 $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$. As melhores condições de extração em sistemas de duas fases aquosas foram obtidas com 26% (m/m) de PEG 8000, pH 8,0 e 12% (m/m) de citrato, resultando em aumento de pureza de 7,58 vezes e recuperação de 113,4%, evidenciando o potencial do sistema PEG/citrato para purificação da fitase e sua aplicação em rações de animais não ruminantes.

Pires (2016) avaliou a produção e caracterização parcial de fitases fúngicas utilizando resíduos agroindustriais, empregando o fungo filamentoso *Acremonium zeae* B e a levedura *Kluyveromyces marxianus*. O *Acremonium zeae* B apresentou maior atividade de fitase em condições de 20% de substrato, pH 4,0 e 28 °C, enquanto o extrato produzido exibiu atividade máxima a 50 °C e pH 7,5, além de elevada estabilidade térmica, indicando potencial aplicação em dietas de monogástricos. Já *Kluyveromyces marxianus* apresentou produção de fitase cerca de 337 vezes superior à do fungo filamentoso, com produção máxima em 48 horas, utilizando 2% (m/v) de substrato, pH 4,0 e temperatura entre 25 e 30 °C. O extrato apresentou picos de atividade a 60 °C e 80 °C, sugerindo a presença de pelo menos duas enzimas, além

de elevada estabilidade em pH ácido, característica desejável para atuação no trato gastrointestinal dos animais.

Borges et al. (2017) avaliaram a produção de fitase por *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* em fermentação em estado sólido utilizando resíduos de frutas, como maracujá, umbu e seriguela. Ambas as linhagens produziram fitase; entretanto, apenas *Aspergillus awamori* apresentou diferença significativa de produção quando cultivado em resíduo de seriguela. Os autores concluíram que tanto os fungos quanto os resíduos de frutas constituem alternativas viáveis para a produção biotecnológica da enzima.

Dessa forma, a fitase consolida-se como uma enzima de importância crescente na biotecnologia, seja pela melhoria da digestibilidade de nutrientes em dietas animais, seja pela valorização sustentável de resíduos agroindustriais como substratos fermentativos. Esse conjunto de fatores evidencia o potencial econômico, ambiental e nutricional da enzima, ampliando suas perspectivas de aplicação em diferentes setores industriais.

3.4.5 Fermentação em estado sólido aplicada a processos biotecnológicos fúngicos

A fermentação é um processo metabólico realizado por fungos, bactérias e leveduras, no qual enzimas específicas convertem compostos orgânicos, principalmente carboidratos, em moléculas mais simples, como ácidos orgânicos, etanol e dióxido de carbono, com liberação de energia. Esse processo é influenciado por fatores como o perfil enzimático do microrganismo, as condições ambientais (pH, temperatura e oxigênio) e o método utilizado, permitindo sua classificação em fermentações alcoólica, láctica, acética e butírica. Historicamente associada à produção e conservação de alimentos, a fermentação expandiu sua importância e, atualmente, é amplamente aplicada em processos industriais, biotecnológicos e sustentáveis (Sharma et al., 2020; Tamang, 2020; Detman et al., 2021; Siddiqui, 2023; Praveen & Brogi, 2025).

Aspergillus niger destaca-se por sua notável versatilidade metabólica, sendo capaz de transformar carboidratos em uma ampla variedade de compostos de elevado interesse industrial. Entre os processos biotecnológicos mais explorados está a

fermentação em estado sólido (FES), na qual o fungo cresce sobre substratos agroindustriais, aproveitando-os como fonte de nutrientes para a produção eficiente de ácidos orgânicos e enzimas de alto valor tecnológico (Putri et al., 2020).

A fermentação em estado sólido (FES) destaca-se como um dos processos mais eficientes para o aproveitamento de resíduos agroindustriais, pois utiliza substratos sólidos com baixo teor de umidade, condição que favorece o crescimento de microrganismos adaptados a esse ambiente. Além disso, a FES apresenta vantagens como simplicidade operacional, baixo custo, elevada produtividade, menor suscetibilidade à contaminação e reduzida demanda energética, tornando-se especialmente atrativa para aplicações industriais baseadas no reaproveitamento de resíduos agroindustriais (Keil, 2018; Maran, 2025; Oliveira e Lemes, 2025). Trata-se de uma tecnologia de origem milenar, empregada desde aproximadamente 3000 a.C. por civilizações orientais na produção de alimentos fermentados, como o molho de soja. No entanto, sua aplicação em escala industrial consolidou-se apenas a partir da década de 80, impulsionada pelo avanço da biotecnologia e pela necessidade de processos mais sustentáveis (Teles, 2025).

O processo fermentativo em estado sólido caracteriza-se pela coexistência de três fases distintas: sólida, líquida e gasosa. Os microrganismos colonizam a superfície da partícula sólida umedecida e, à medida que crescem, desenvolvem uma matriz de hifas que conecta a biomassa ao substrato. Esse crescimento promove a formação de espaços intersticiais, os quais são posteriormente preenchidos por gases, permitindo trocas gasosas essenciais ao metabolismo microbiano (Silva et al., 2024).

Estudos recentes comprovam o elevado potencial da FES para a produção de enzimas e outros compostos de interesse industrial. Santos (2025) avaliou a prospecção de celulasas por fungos isolados da Caatinga utilizando resíduos lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo, demonstrando que esses resíduos são eficientes substratos para a síntese enzimática em cultivo sólido. De forma complementar, Maia (2024) simulou a transferência de calor e massa em biorreatores de bandejas durante a produção de celulase por FES, observando que a entrada de ar com 50% de umidade relativa promoveu aumento de temperatura próximo ao bordo de saída e acentuada redução da umidade da matriz sólida nos primeiros 30 cm do leito. Após esse ponto, estabeleceu-se um equilíbrio

entre o ar e o sólido, cessando o processo de secagem. Os resultados indicaram que a limitação da atividade de água foi mais impactante sobre o crescimento fúngico do que o aumento da temperatura, especialmente em cultivos com fungos termofílicos.

Santos et al. (2018) realizaram um levantamento bibliográfico sobre a utilização da fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para produção enzimática, analisando 37 trabalhos científicos, dos quais 49% foram desenvolvidos no Brasil. A partir dessa análise, os autores observaram que a celulase é a enzima mais frequentemente produzida por FES utilizando resíduos agroindustriais, sendo os fungos filamentosos, especialmente *Aspergillus niger*, os microrganismos mais empregados nesses processos.

Rodrigues (2021) avaliou a utilização de subprodutos da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido. Utilizando *Aspergillus niger* e bagaço de malte de cevada como substrato, a autora observou melhores resultados em condições de 50% de umidade, temperatura de 30 °C e tempo de fermentação de 120 horas.

Campos (2022) investigou a produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* CCT-2768 por fermentação em estado sólido, utilizando fibra de coco verde (*Cocos nucifera*) pré-tratada por explosão a vapor. O autor destacou que o pré-tratamento da fibra influenciou significativamente o desempenho fermentativo, sendo observadas as maiores atividades enzimáticas em condições de atividade de água de 0,995, utilizando 5,25 g de substrato, com atividades próximas a 3,0 UI/g para CMCases e 0,31 UI/g para FPases.

Cabral e colaboradores (2024) avaliaram a produção de enzimas por *Paecilomyces* sp. TP08 utilizando engaço de uva e farelo de trigo como substratos em fermentação em estado sólido. O estudo demonstrou que a substituição parcial do farelo de trigo pelo engaço de uva manteve o desempenho fermentativo, evidenciando o potencial de valorização de resíduos vitivinícolas nesse tipo de processo.

A fermentação em estado sólido (FES) se destaca como uma tecnologia sustentável capaz de converter resíduos agroindustriais em produtos de alto valor agregado, como enzimas e ácidos orgânicos. Apesar de desafios técnicos relacionados ao controle de parâmetros e transferência de massa e calor, avanços em modelagem de processos e reatores específicos ampliam sua aplicabilidade,

consolidando a FES como uma estratégia promissora na biotecnologia moderna (Keil, 2018; Perwez, 2024).

3.5 Delineamento composto central rotacional

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2^2 , com três pontos centrais e quatro pontos axiais, consiste em um planejamento experimental amplamente utilizado na Metodologia de Superfície de Resposta (Response Surface Methodology – RSM), sendo particularmente indicado para a avaliação simultânea de dois fatores independentes e para a otimização de processos que apresentam comportamento não linear (Rosa e Pinheiro, 2021).

Nesse delineamento, o termo 2^2 refere-se à presença de dois fatores avaliados em dois níveis codificados (-1 e $+1$), correspondentes aos pontos fatoriais, os quais permitem a estimativa dos efeitos lineares e da interação entre as variáveis (Ugbe et al., 2023). A esses pontos são adicionados quatro pontos axiais ($\pm\alpha$), posicionados a uma distância específica do centro experimental, cuja finalidade é possibilitar a estimação dos efeitos quadráticos, essenciais para a detecção de curvatura na superfície de resposta (Bhattacharya, 2021). Para garantir a rotatibilidade do delineamento, o valor de α é calculado de modo que a variância da resposta estimada seja constante para todos os pontos equidistantes do centro, sendo, para um planejamento 2^2 , comumente adotado o valor $\alpha = 1,41$ (Sasidhar e Saravanan, 2025).

Os três pontos centrais, codificados no nível zero (0,0), são realizados com o objetivo de estimar o erro puro experimental, avaliar a reprodutibilidade dos ensaios e verificar a presença de curvatura no sistema estudado. A repetição desses pontos confere maior robustez estatística ao modelo e aumenta a confiabilidade da análise de variância (ANOVA) (Araújo et al, 2024)

O conjunto experimental resultante totaliza 11 ensaios, permitindo o ajuste de um modelo polinomial de segunda ordem, que descreve a relação entre a variável resposta e os fatores avaliados por meio de termos lineares, quadráticos e de interação (Rosa e Pinheiro, 2021). A análise estatística dos dados obtidos é realizada por regressão múltipla, seguida de ANOVA, complementada por diagramas de Pareto,

superfícies de resposta e gráficos de contorno, ferramentas que auxiliam na identificação das condições ótimas do processo (Sampaio et al.,2024).

Assim, o DCCR apresenta-se como uma abordagem estatística eficiente e economicamente viável, permitindo a compreensão das interações entre os fatores estudados e a otimização do sistema experimental com um número reduzido de ensaios, característica fundamental em estudos biotecnológicos e fermentativos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), no setor de desenvolvimento de produtos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos

Os fungos utilizados neste estudo foram obtidos na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro e armazenados em placas de Petri em temperatura ambiente até a manutenção para os experimentos.

4.1.2 Semente de goiaba

As sementes de goiaba (*Psidium Guajava*) *in natura* foram doadas por um produtor de goiabas da região de São João da Barra - RJ.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da farinha de semente de goiaba

As sementes de goiaba *in natura* foram submetidas ao processo de moagem descrito por Santos e colaboradores (2012), utilizando um moinho de facas com peneira de abertura de 2 mm, da marca Marconni modelo MA048. A farinha de semente de goiaba foi armazenada em geladeira (Electrolux TF56S) a 6°C.

4.2.2 Análises físico-químicas

4.2.2.1 pH

A determinação do pH foi realizada conforme a metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (2008), utilizando o método eletrométrico por meio de um potenciômetro.

Para análise, foram pesados 10g de farinha de semente de goiaba e diluídos em 100 mL de água destilada. A preparação foi feita em triplicata, com agitação adequada para garantir a suspensão homogênea das partículas na solução.

Com o equipamento devidamente calibrado, procedeu-se a leitura do pH de cada amostra. Após as medições, foi calculada a média aritmética simples dos valores obtidos, utilizando a equação 1:

$$pH = \frac{pH_1+pH_2+pH_3}{3} \quad (\text{Eq.1})$$

4.2.2.2 Umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada conforme a metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (2008). A medida foi realizada em triplicata, inicialmente as placas de Petri foram colocadas em estufa por duas horas para remoção de toda umidade residual. Em seguida, foram resfriadas em dessecador e pesadas sem as amostras. Após essa etapa, 2g de farinha de semente de goiaba foram colocados em cada placa, que retornaram a estufa a 105 °C por um período de 8 horas. Após resfriarem em dessecador, as placas foram novamente pesadas, e o peso do recipiente foi descontado. O cálculo de umidade foi feito utilizando as equações 2 e 3.

$$U = (MP + MA) - AS \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\% \text{ de umidade a } 105^{\circ}\text{C} = \frac{U \times 100}{MA} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

U: Umidade

MP: Massa da Placa

MA: Massa da Amostra

AS: Amostra Seca

4.2.2.3 Cinzas

A determinação de cinzas foi adaptada da metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (2008). A preparação foi feita em triplicata, inicialmente levou-se os cadinhos de porcelana em estufa a 105° por duas horas para que não houvesse nenhum resquício de umidade na hora da análise. Após esfriarem em dessecador, pesou-se cada recipiente e em seguida pesou-se 3g da amostra de farinha de semente de goiaba que foi levada a mufla, ajustando a temperatura de 150°C a 150°C até atingir a temperatura de 550°C por 4 horas, em seguida foram levadas ao dessecador para esfriar, pesadas novamente e descontado o peso do cadinho de porcelana.

Para calcular o teor de cinzas utilizou-se a equação 4.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{100 \times N}{P} \quad (\text{EQ. 4})$$

Onde:

N é relativo ao número de cinzas e P à massa da amostra.

4.2.2.4 Proteínas

A determinação do teor de proteínas foi realizada pela quantificação do nitrogênio total, utilizando o método Kjeldahl conforme a metodologia descrita por Galvani e Gaertner (2006). As análises foram feitas em triplicata e compreenderam três etapas: digestão, destilação e titulação.

Na etapa de digestão, os tubos digestores foram previamente pesados, após o que foram adicionados 0,2g da amostra e 2,5g da mistura catalítica. Em seguida, os tubos foram levados para capela de fluxo laminar, onde foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico PA (H_2SO_4). As amostras foram submetidas à digestão em bloco digestor, iniciando a $50^\circ C$ elevando gradualmente a temperatura até $400^\circ C$, onde permaneceram por 1 hora e 30 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram encaminhadas para a etapa de destilação.

Na destilação, adicionaram-se 20 mL de ácido bórico a 0,04% a um frasco Erlenmeyer juntamente com 4 gotas do indicador vermelho de metila a 0,1% e 2 gotas do verde de bromocresol a 0,1%. O tubo contendo a amostra digerida foi acoplado ao destilador de nitrogênio, e 50 mL de hidróxido de sódio a 0,5% (NaOH) foram adicionados para neutralizar os 10 mL de H_2SO_4 PA. O frasco Erlenmeyer permaneceu posicionado até atingir o volume final de 75 mL.

Por último, levou-se a solução destilada presente no frasco Erlenmeyer para titulação com HCl a $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ padronizado até a mudança de cor.

Ao final da análise, foram feitas duas equações, um (equação 5) para determinar a quantidade de nitrogênio presente na amostra:

$$\%N = \frac{V_{HCl} \times F_c \times N \times 1,4007}{m} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

VHCl: Volume de HCl gasto em titulação

Fc: Fator de correção do HCl

N: normalidade do HCl

M: Massa da amostra em g

14,007 = massa atômica do nitrogênio (g/mol), onde 1,4007 é uma constante de conversão do HCl em mL

A outra equação (equação 6) foi feita para determinação da porcentagem de proteína bruta (PB%)

$$\%PB = \%N \times C \quad (\text{Eq. 6})$$

C= valor relativo ao tipo de alimento de acordo com a Legislação RDC 360, que para proteínas vegetais é de 5,75.

4.2.2.5 Lipídios

A análise de lipídios foi realizada segundo a metodologia Bligh & Dyer (1959), conforme descrito por Brum et al. (2009). As determinações foram realizadas em triplicata. Inicialmente, pesaram-se 2 g da amostra sólida em tubos de ensaio grandes (90 mL) com tampa. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de clorofórmio PA, 20 mL de metanol PA e 8 mL de água destilada, procedendo-se à agitação do tubo.

Posteriormente, adicionaram-se mais 10 mL de clorofórmio PA e 10 mL de solução de NaCl a 1,5%, agitando-se vigorosamente por 2 minutos até a completa separação de fases. Após esse processo, as amostras foram deixadas em repouso para permitir a separação total das fases.

Decorrido o período de repouso, aproximadamente 15 mL da fase inferior (orgânica) foram retirados e transferidos para tubos de ensaio menores (30 mL) com tampa. Na fração coletada, adicionou-se 1 g de sulfato de sódio anidro PA, seguido de nova agitação e filtração da solução para outro tubo de 30 mL com tampa.

Do filtrado obtido, retiraram-se 5 mL e transferiram-se para um béquer previamente seco e tarado. Em seguida, o béquer foi levado à estufa a 105°C por 4 horas. Após o período de secagem, o resíduo lipídico foi pesado. A equação 7 determina a porcentagem de lipídios da amostra.

$$\%Lipídios = \frac{Pl \times 4 \times 100}{M} \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:

Pl: massa dos lipídios

M: massa da amostra

4.2.2.6 Carboidratos

A determinação de carboidratos foi feita pela diferença, de acordo com Cavalcante et al. (2019). E, foi feita pela equação 8.

$$\text{Carboidratos} = 100 - (U + C + P + L) \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

U= umidade

C= Cinzas

P= Proteínas

L= Lipídios

4.2.3 Ensaio de atividade enzimática

4.2.3.1 Manutenção do microrganismo

O isolado de *Aspergillus niger* foi cultivado em meio BDA (Ágar Batata Dextrose), preparado conforme as instruções do fabricante, distribuído em placas de Petri estéreis e incubado em temperatura ambiente por 20 dias (Lima, 2012). A manutenção da cultura foi realizada por meio de repicagens a cada novo experimento.

4.2.3.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, seguiu-se a metodologia descrita por Lima (2012). Os esporos de *Aspergillus niger* foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA e incubados a 30°C por dez dias. Após esse período, as placas foram retiradas da incubadora e adicionou-se uma solução de Tween 80 (0,1%) para suspensão dos esporos, que foram então transferidos para tubos Falcon. Em seguida, o inóculo foi encaminhado a Clínica Fitossanitária, onde foram realizadas a contagem dos esporos em câmara de Neubauer e a padronização da concentração a 10^7 esporos por mL (Alfenas e Mafia, 2007).

4.2.3.3 Preparo do meio reacional

Os meios reacionais foram preparados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo as concentrações de farinha de semente de goiaba e fonte de nitrogênio em concentrações determinadas a cada ensaio e/ou experimento, na faixa de 5 a 30 g para farinha de semente de goiaba e de 0 a 8 g para a fonte de nitrogênio. Adicionalmente, foram incorporados 2 mL de uma solução de sais minerais composta por cloreto de potássio (KCl 2mM), sulfato de magnésio ($MgSO_4$ 2 mM), cloreto de cálcio ($CaCl_2$ 25 mM) e sulfato de zinco ($ZnSO_4$ 3mM) (Lima, 2012; Nascimento et al., 2014; Sampaio et al., 2018). Para o preparo de cada solução utilizou as concentrações descritas na tabela 2.

Os meios foram submetidos à esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar, procedeu-se a inoculação com 5 mL da solução de esporos em concentração de 10^7 esporos por mL de *Aspergillus niger* (Simas, 2023). Os meios reacionais foram submetidos à temperatura de 30 °C por 36 horas.

Tabela 2: Concentração dos sais minerais utilizados nos meios reacionais.

Sais	Concentração (g.L ⁻¹)
KCL 2 Mm	0,149 g
MgSO ₄ 2 mM	0,240 g
CaCl ₂ 25 mM	0,362 g
ZnSO ₄ 3 Mm	0,484 g

mM: mol·L⁻¹.

fonte: Autoria Própria.

4.2.3.4 Extração do caldo enzimático

Após 36 horas de fermentação, foram adicionados 50 mL de água deionizada aos meios reacionais. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação em agitador orbital (shaker) a 145 rpm, durante 30 minutos. Após esse processo, as amostras foram filtradas em papel filtro da marca quality e o filtrado transferido para tubos Falcon.

Após a filtração, as amostras foram padronizadas e submetidas à centrifugação em centrífuga Hettich Universal 320 a 2345 rpm, por 8 minutos. Em seguida, foram feitas as determinações de atividade enzimática. Este procedimento foi adaptado da metodologia descrita por Lima (2012).

4.2.3.5 Determinação da atividade enzimática da tanase

A determinação da atividade enzimática foi realizada conforme a metodologia descrita por Sharma (2000), com base no método espectrofotométrico proposto por Lima (2012). Para determinação da atividade enzimática da tanase, foram incubados 100 µL do extrato enzimático bruto com 100 µL de solução de ácido tânico preparada com tampão acetato (pH5,5), durante 30 minutos em estufa a 30°C. Em seguida, adicionaram-se 300 µL de solução metanólica de rodanina a 0,677% e 100 µL de KOH e 900 µL de água destilada. A mistura foi incubada novamente a 30°C por 10 minutos. Para garantir a qualidade e confiabilidade da leitura, foi feito um branco analítico onde os reagentes foram incubados e após a reação foi adicionado o extrato enzimático. Após esse período, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro IL-593-BI, da marca Kasuaki, a 520nm. É fundamental a elaboração de uma curva de calibração utilizando ácido gálico como padrão, uma vez que a quantificação da atividade enzimática se baseia na determinação do ácido gálico liberado durante a reação catalisada pela tanase.

No ensaio, a enzima tanase promove a hidrólise do ácido tânico, liberando ácido gálico, o qual reage com o reagente rodanina, formando um complexo cromogênico mensurável por espectrofotometria. A intensidade da absorvância obtida é proporcional à concentração de ácido gálico presente na amostra, sendo esta determinada por interpolação na curva padrão previamente construída.

A atividade enzimática é expressa em unidades (U), sendo definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido gálico por minuto, sob condições específicas de ensaio (pH, temperatura e tempo de incubação).

4.2.3.6 Determinação da atividade enzimática da lacase

A determinação da atividade da lacase foi realizada conforme adaptação da metodologia descrita por Buswell e Cai (1995). Para cada ensaio, foram adicionados 300 μL do tampão acetato de sódio (pH 5,0), seguidos de 100 μL da solução de ABTS 0,5 mM, 10 μL do extrato enzimático e, por fim, 590 μL de água destilada, totalizando 1 mL de reação. Imediatamente após a homogeneização, procedeu-se à primeira leitura da absorvância a 420 nm em espectrofotômetro IL-593-BI, da marca Kasuaki.

Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio e incubadas por 10 minutos, realizou-se, então, a segunda leitura sob as mesmas condições analíticas.

Para assegurar a confiabilidade das medições, foi preparado um branco analítico, contendo todos os reagentes nas mesmas proporções, com substituição do extrato enzimático pelo tampão, possibilitando correção de possíveis interferências ópticas.

A detecção da atividade da lacase fundamenta-se em sua capacidade de oxidar compostos fenólicos e aromáticos, utilizando o oxigênio molecular comoceptor final de elétrons. A oxidação do ABTS resulta na formação de um produto de coloração característica, cuja intensidade permite o monitoramento espectrofotométrico da reação. A atividade enzimática foi calculada com base na variação da absorvância por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar do radical ABTS a 420 nm ($36.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), considerando caminho óptico de 1 cm. A atividade enzimática foi expressa em $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, sendo uma unidade definida como a

quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto sob as condições experimentais estabelecidas.

4.2.3.7 Determinação da atividade enzimática da fitase

A determinação da atividade da fitase foi realizada com base na metodologia proposta por Greiner et al. (2013). Para isso, foram adicionados 300 μL de solução de fitato de sódio 0,165% preparada em tampão de acetato pH 5,5, seguidos da adição de 10 μL do extrato enzimático bruto. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após esse período, adicionou-se uma solução composta por 0,75 mL de acetona, 0,375 mL de ácido sulfúrico 2,2M e 0,375mL de molibdato 10 mM. A amostra foi agitada, seguida da adição de 100 μL de ácido cítrico 2M, sendo novamente agitada. Para garantir a qualidade e confiabilidade da leitura, foi feito um branco analítico onde os reagentes foram incubados e após a reação foi incluso o extrato enzimático. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 355 nm.

A quantificação do fosfato inorgânico foi realizada por meio de curva de calibração utilizando fosfato monopotássico (KH_2PO_4) como padrão. A atividade da fitase foi calculada com base na concentração de fosfato inorgânico liberado durante o tempo de incubação, sendo expressa em unidades enzimáticas por grama de substrato ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$). A atividade enzimática da fitase é determinada com base na quantidade de fosfato inorgânico liberado por minuto, sendo expressa em unidade enzimática (U) por grama de substrato ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) nas condições estabelecidas.

4.2.4 Influência da concentração de farinha de semente de goiaba na produção de enzimas

A primeira fase do estudo avaliou a produção de fitase, lacase e tanase utilizando a farinha de semente de goiaba (FSG) como substrato em diferentes concentrações. Neste experimento os meios reacionais foram preparados conforme o item 4.2.3.3 e incubados a 30°C por 36 horas (Simas, 2023). A tabela 3 apresenta as concentrações de farinha de semente de goiaba (FSG) utilizadas nos tratamentos, bem como a concentração de ureia empregada como fonte de nitrogênio neste ensaio.

Tabela 3: Concentrações de farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio.

FSG (g)	U (g)
10	2
20	2
30	2

FSG: Farinha de semente de goiaba; U: Ureia.

Fonte: Autoria Própria.

4.2.5 Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de tanase, lacase e fitase

Para identificar a fonte de nitrogênio mais adequada, foram avaliadas três opções distintas, cada uma combinada com três diferentes concentrações de farinha de semente de goiaba. Neste experimento os meios reacionais foram preparados de acordo com o item 4.2.3.3 e foram incubados a 30°C por 36 horas (Simas, 2023). A tabela 4 apresenta as concentrações da farinha de semente de goiaba, as fontes de nitrogênio e suas respectivas concentrações.

Tabela 4: Concentração da farinha de goiaba e fontes de nitrogênio testadas.

Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio
FSG (g)	U (g)
10	2
15	2
20	2
FSG (g)	AS (g)
10	2
15	2
20	2
FSG (g)	EL (g)
10	2
15	2
20	2

FSG: Farinha de semente de goiaba; U: Ureia; EL: Extrato de levedura; SA: Sulfato de Amônio.

Fonte: Autoria própria.

4.2.6 Avaliação da interação da farinha de semente de goiaba e a ureia na produção de tanase e fitase

Após a definição das melhores fontes de nitrogênio, conforme discutido no item 5.3, o estudo avançou para a etapa de avaliação das concentrações de farinha

de semente de goiaba e de ureia, empregada como fonte nitrogenada, bem como da relação entre as fontes de carbono e nitrogênio. A forma como os pontos experimentais foram definidos está apresentada na tabela 5, que descreve o nível avaliado para cada variável.

Tabela 5: Concentração inicial da farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio após planejamento experimental.

*V.I/Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
C	5 g	7,91 g	15 g	22,1 g	25 g
N	0 g	0,58 g	2 g	3,42 g	4 g

*V.I: variáveis independentes.

C: Carbono

N: Nitrogênio

Fonte: Autoria Própria.

4.2.7 Produção enzimática a partir de farinha de semente de goiaba em função de diferentes fontes de nitrogênio: ureia versus extrato de levedura

Nesta etapa, avaliou-se a influência da concentração de farinha de semente de goiaba associada a novas concentrações de ureia como fonte de nitrogênio, bem como a inclusão de extrato de levedura como fonte alternativa. Também foi examinada a relação entre essas variáveis e o desempenho da atividade enzimática.

A forma como os pontos experimentais foram definidos para essa avaliação está apresentada na tabela 6 a seguir, que descreve os níveis estabelecidos para cada variável.

Tabela 6: Concentração inicial da Farinha de Semente de Goiaba como fonte de carbono e Ureia e Extrato de Levedura como fonte de nitrogênio após planejamento experimental.

Ureia					
V.I/Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
C	5 g	7,91 g	15 g	22,1 g	25 g
N	0 g	1,2 g	4 g	6,8 g	8 g

Extrato de levedura					
V.I/Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
C	5 g	7,91g	15 g	22,1 g	25 g
N	0 g	0,9 g	3 g	5,1 g	6 g

*V.I: variáveis independentes.

C: Carbono

N: Nitrogênio

Fonte: Autoria Própria.

Nestes experimentos, os meios reacionais foram preparados conforme o item 4.2.3.3 e incubados a 30° C por 36 horas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas

A caracterização físico-química da farinha de semente de goiaba foi determinante para a interpretação dos resultados de produção enzimática. As análises de umidade, pH, teor de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos permitiram compreender a disponibilidade efetiva de nutrientes no substrato e, conseqüentemente, como esses componentes poderiam influenciar o desempenho metabólico do *Aspergillus niger*. Como descrito por Júnior (2014), a presença e o equilíbrio entre as fontes de carbono e nitrogênio são fundamentais para sustentar o crescimento do microrganismo e regular a síntese das enzimas de interesse.

A caracterização obtida para a farinha de semente de goiaba pode ser observada na Tabela 7.

Tabela 7: Composição físico-química da farinha de semente de goiaba.

Amostras	pH	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)
FSG1	5,56	12,41%	0,14%	12,03%	9,71%	65,71%
FSG2	5,53	12,26%	0,46%	8,94%	10,49%	67,85%
FSG3	5,65	13,08%	0	11,20%	6,74%	68,98%
Média	5,58	12,58%	0,21%	10,72%	8,98%	67,5%
DP	0,06	0,43	0,24	1,60	1,97	1,66

DP: Desvio Padrão, FSG: Farinha de semente de goiaba (Repetição 1, 2 e 3).

Fonte: Autoria Própria.

O pH médio de 5,58 encontrado na farinha de semente de goiaba situa-se dentro da faixa recomendada por Cavalcanti e Guimarães (2018) para a produção de tanase e é considerado adequado para a síntese de fitase ácida, conforme relatado por Simas (2023). Esse pH reforça o potencial da farinha como substrato para produção enzimática, indicando condições naturalmente favoráveis ao metabolismo de *Aspergillus niger*, sem necessidade de ajustes adicionais. Tal característica reduz custos operacionais e simplifica o processo fermentativo, como discutido por Vasundhara e Suryanarayanan (2024).

Os teores de umidade e cinzas obtidos estão em conformidade com os valores reportados por Assis et al. (2025), demonstrando estabilidade físico-química da

matéria-prima. A umidade adequada contribui para a preservação da integridade estrutural do substrato, enquanto o teor de cinzas reflete a quantidade de minerais presentes. Esses componentes são essenciais para manter o equilíbrio das condições fermentativas, prevenindo tanto problemas associados ao excesso de água que poderia favorecer contaminações quanto a presença excessiva de sais minerais, que pode interferir no crescimento microbiano (Czaja e Szostak, 2020).

O teor médio de proteína bruta obtida reforça o potencial da farinha de semente de goiaba como fonte nutricional relevante, uma vez que o valor encontrado está de acordo com o descrito por Silva et al. (2009). Essa coerência com a literatura confirma a qualidade da matéria-prima e sustenta sua aplicabilidade em processos biotecnológicos.

O teor de lipídios está acima do valor de 5,76 descrito por Assis e colaboradores (2025). É um valor que indica que a matriz possui compostos capazes de atuar como fontes alternativas de energia para o metabolismo microbiano, conforme discutido por Wu et al. (2025).

Por fim, o cálculo por diferença revelou que a farinha de semente de goiaba apresenta um teor expressivo de carboidratos, correspondendo a aproximadamente 67,39% de sua composição. Esse valor é semelhante ao reportado por Assis et al. (2025) e constitui uma vantagem significativa para o processo fermentativo, visto que os carboidratos constituem a principal fonte de carbono para o crescimento fúngico e para a indução da síntese enzimática (Vilas-Franquesa et al., 2024). Assim, a elevada disponibilidade de carboidratos confirma a aptidão da farinha de semente de goiaba como substrato eficiente para a produção de enzimas hidrolíticas.

Em meios convencionais para produção enzimática, a fonte de carbono representa uma das frações de maior custo, com impacto direto no valor final do bioprocessamento (Chen et al, 2025). Assim, a utilização de um resíduo agroindustrial rico em carboidratos permite reduzir significativamente o custo operacional do meio de cultivo, ao mesmo tempo em que mantém a disponibilidade de carbono necessária ao crescimento fúngico e à indução metabólica (Astudillo et al., 2023).

Nesse contexto, a farinha de semente de goiaba não deve ser vista apenas como substrato alternativo, mas como um insumo estratégico de baixo custo, capaz de atender à demanda nutricional do microrganismo e, simultaneamente, promover a

valorização de resíduos e a redução de gastos em processos biotecnológicos. Essa abordagem fortalece o conceito de biorrefinaria e economia circular, ao transformar um passivo ambiental em matéria-prima funcional de alto valor agregado.

5.2 Influência da concentração de farinha de semente de goiaba na produção de enzimas

Avaliou-se o potencial da farinha de semente de goiaba como fonte de carbono para a produção das enzimas tanase, fitase e lacase. Os efeitos observados para as concentrações de 10 a 30 g de substrato, com adição fixa de 2 g de ureia como fonte de nitrogênio, encontram-se na Tabela 8:

Tabela 8: Ensaio enzimático testando a farinha de semente de goiaba em diferentes concentrações.

Ensaio	FSG (g)	Fonte de N (g)	Atividade tanase (U.g ⁻¹)	Atividade lacase (U.g ⁻¹)	Atividade de fitase (U.g ⁻¹)
1	10	2	0,127	3,055	0,008
2	20	2	0,193	ND	0,013
3	30	2	ND	ND	0,005

ND: Não determinado; FSG: Farinha de semente de goiaba; N: Nitrogênio.
Fonte: Autoria Própria.

A utilização da farinha de semente de goiaba demonstrou potencial relevante para a produção das três enzimas avaliadas, destacando que a concentração do substrato exerce influência direta sobre o desempenho metabólico do microrganismo. Os resultados evidenciaram padrões distintos de resposta enzimática, corroborando estudos recentes que descrevem o papel central da fonte de carbono na indução ou repressão das vias associadas à síntese de enzimas extracelulares (Matei et al., 2021).

No caso da tanase, verificou-se que a maior atividade ocorreu na concentração de 20 g, enquanto 10 g resultaram em atividade inferior e 30 g levaram à completa inibição. Esse comportamento sugere a existência de um ponto ótimo entre disponibilidade de carbono e ativação das vias biossintéticas. Concentrações excessivamente elevadas possivelmente desencadeiam repressão catabólica ou saturação metabólica. (Arshad et al., 2021).

A lacase apresentou um padrão distinto, sendo produzida apenas na concentração de 10 g e totalmente inibida nas concentrações de 20 g e 30 g. Essa resposta indica que a enzima é favorecida por condições de menor disponibilidade de carbono, possivelmente devido à indução de vias oxidativas associadas à degradação de lignina e aos compostos aromáticos em ambientes nutricionalmente restritos (Muthukumarasamy et al., 2015; Almeida et al., 2018; Rahayu et al., 2019). Em meios mais ricos em carbono, o microrganismo tende a priorizar o crescimento celular, o que é coerente com estudos que apontam a alta sensibilidade da produção de lacase à composição do substrato (Almeida et al., 2018; Almeida, 2023).

Para a fitase, a concentração de 20 g também foi a mais eficiente, apresentando maior atividade comparada às concentrações de 10 g e 30 g. A produção dessa enzima depende de um balanço nutricional adequado, especialmente da razão C:N:P, a qual precisa estar equilibrada para estimular as vias metabólicas relacionadas ao fosfato (Elkhateeb & Fadel, 2022). Concentrações elevadas de carbono podem desestabilizar esse balanço, reduzindo o estímulo à produção enzimática, conforme relatado em estudos com resíduos frutíferos como substratos fermentativos (Guimarães et al., 2017; Ahmed et al., 2021).

A farinha de semente de goiaba demonstrou ser um substrato promissor para a produção das três enzimas avaliadas, evidenciando que a concentração do substrato exerce influência direta sobre o metabolismo do microrganismo. Os resultados indicam que cada enzima apresenta um ponto ótimo distinto: a tanase e a fitase tiveram maior atividade na concentração de 20 g, enquanto a lacase foi favorecida apenas na concentração de 10 g, sendo inibida em níveis mais elevados de carbono. Esses padrões refletem respostas metabólicas específicas, nas quais a disponibilidade de carbono e o balanço nutricional modulam a ativação ou repressão das vias biossintéticas. Além disso, os achados corroboram estudos anteriores que destacam a sensibilidade da produção enzimática à composição do substrato e à interação entre fatores nutricionais. Assim, a escolha adequada da concentração do substrato é determinante para maximizar a produção enzimática em processos biotecnológicos utilizando farinha de semente de goiaba.

5.3 Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de tanase, lacase e fitase

O estudo teve como objetivo avaliar a produção enzimática utilizando diferentes fontes de nitrogênio — ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura — aplicadas em quantidade fixa de 2 g, combinadas com variadas concentrações de farinha de semente de goiaba (10, 15 e 20 g). A seleção desse intervalo baseou-se nos resultados apresentados no item 5.2, no qual a concentração de 30 g de substrato demonstrou efeito inibitório sobre a síntese de tanase e lacase. A melhor fonte de nitrogênio foi selecionada com base na indução da maior atividade enzimática das enzimas avaliadas. A seleção das fontes de nitrogênio — ureia (U), sulfato de amônio (AS) e extrato de levedura (EL) — bem como a definição de suas respectivas concentrações, foi realizada a partir da adaptação da metodologia descrita por Gonçalves et al. (2020). A Tabela 9 apresenta os valores de atividade enzimática obtidos para cada combinação estudada.

A escolha da fonte de nitrogênio constitui um dos fatores determinantes na produção enzimática por microrganismos filamentosos, como *Aspergillus niger*. Esse nutriente participa diretamente da síntese de proteínas, da formação de aminoácidos e nucleotídeos, além da regulação de vias metabólicas associadas ao crescimento celular e à produção de enzimas extracelulares (Alami et al., 2024). Dessa forma, a disponibilidade e o tipo de nitrogênio influenciam significativamente o desempenho metabólico do microrganismo durante a fermentação. Entre as fontes avaliadas, a ureia apresentou o desempenho mais expressivo, beneficiando particularmente a síntese de tanase e fitase. Os maiores valores observados foram $0,8306 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para tanase (com 15 g de substrato) e $5,5925 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ para fitase (com 10 g de substrato). Esses resultados sugerem que fontes nitrogenadas de assimilação rápida favorecem tanto as rotas metabólicas envolvidas na degradação de compostos fenólicos quanto aquelas relacionadas à mobilização de fósforo orgânico (Jian et al., 2024). Além disso, a combinação de ureia com concentrações intermediárias de carbono parece mitigar efeitos de repressão catabólica, potencializando a síntese de metabólitos secundários e enzimas de relevância biotecnológica (Alami et al., 2024). O extrato de levedura também demonstrou potencial para produção enzimática, com destaque para a fitase, cuja atividade máxima ($5,3459 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi comparável à obtida com ureia. Esse desempenho pode ser atribuído à presença de vitaminas, peptídeos, nucleotídeos e

fatores de crescimento que enriquecem o meio fermentativo e ampliam a eficiência metabólica microbiana, favorecendo as rotas fosfatásicas (Vilanculos et al., 2023). Entretanto, a produção de tanase e lacase foi reduzida nessa condição, indicando que fontes orgânicas mais complexas podem direcionar o metabolismo para rotas primárias, reduzindo o estímulo para vias biossintéticas secundárias (Wu et al., 2018).

Por sua vez, o sulfato de amônio apresentou o menor desempenho entre as fontes avaliadas. A produção de tanase foi praticamente inexistente na maioria das condições, e os valores de lacase foram baixos ou nulos. Embora a fitase tenha sido produzida, suas atividades ($1,0-1,8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foram inferiores às obtidas com as demais fontes. Esses resultados são consistentes com literatura que aponta que fontes inorgânicas de nitrogênio, apesar de amplamente utilizadas, podem limitar a expressão de enzimas associadas à degradação de polímeros complexos, sobretudo em processos conduzidos com resíduos agroindustriais (Miao et al., 2019).

A enzima lacase não apresentou atividade em todas as combinações experimentais. Esse comportamento sugere que as condições avaliadas não foram suficientes para ativar as vias ligninolíticas responsáveis pela síntese dessa enzima. Indica, ainda, que o microrganismo priorizou rotas metabólicas associadas à produção de tanase e fitase, que apresentaram desempenho superior sob as mesmas condições (Umar & Ahmed, 2022).

Em síntese, os resultados demonstram que a ureia e o extrato de levedura constituem as fontes de nitrogênio mais adequadas para a produção das enzimas investigadas, com destaque para a ureia, que apresentou melhor desempenho global. Esses achados reforçam a relevância da seleção criteriosa da fonte nitrogenada na formulação de meios de cultivo, especialmente quando se utilizam substratos agroindustriais, como a farinha de semente de goiaba, cuja interação com o perfil nutricional do meio exerce influência direta sobre a eficiência fermentativa e a produção de enzimas de interesse biotecnológico.

A escolha da fonte de nitrogênio mostrou-se determinante para a produção enzimática por *Aspergillus niger*, influenciando diretamente o metabolismo e a ativação das vias biossintéticas. Entre as fontes avaliadas, a ureia destacou-se pelo melhor desempenho geral, especialmente na síntese de tanase e fitase, enquanto o extrato de levedura apresentou bom resultado para fitase, mas menor estímulo para

tanase e lacase. O sulfato de amônio apresentou desempenho inferior, indicando limitações de fontes inorgânicas para a expressão de enzimas ligadas à degradação de polímeros complexos. A lacase não foi detectada nas condições testadas, sugerindo que as vias ligninolíticas não foram suficientemente induzidas. Em síntese, a ureia e o extrato de levedura são fontes de nitrogênio promissoras para otimizar a produção enzimática em processos biotecnológicos com substratos agroindustriais, destacando a importância de se selecionar criteriosamente a composição do meio para maximizar a eficiência fermentativa.

Tabela 9: Efeito das fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura) sobre a atividade das enzimas tanase, lacase e fitase.

Ureia					
Ensaio	FSG (g)	Fonte de N (g)	Atividade tanase (U.mL⁻¹)	Atividade lacase (U.g⁻¹)	Atividade de fitase (U.g⁻¹)
1	10	2	0,628	ND	5,592
2	15	2	0,830	ND	2,622
3	20	2	0,398	ND	0,616

Sulfato de amônio					
Ensaio	FSG (g)	Fonte de N (g)	Atividade tanase (U.mL⁻¹)	Atividade lacase (U.g⁻¹)	Atividade de fitase (U.g⁻¹)
1	10	2	ND	ND	1,779
2	15	2	ND	ND	1,005
3	20	2	0,08	ND	1,221

Extrato de levedura					
Ensaio	FSG (g)	Fonte de N (g)	Atividade tanase (U.mL⁻¹)	Atividade lacase (U.g⁻¹)	Atividade de fitase (U.g⁻¹)
1	10	2	0,119	ND	5,345
2	15	2	ND	ND	2,950
3	20	2	ND	ND	2,223

ND: Não determinado; N: Nitrogênio.

Fonte: Autoria Própria.

5.4 Avaliação da interação da farinha de semente de goiaba e a ureia na produção de tanase e fitase

Após a definição da ureia como melhor fonte de nitrogênio para a produção enzimática, procedeu-se à etapa de otimização utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes. A fonte de carbono (farinha de semente de goiaba) variou de 5 a 25 g, enquanto a fonte de nitrogênio (ureia) variou de 0 a 4 g. A Tabela 10 apresenta as concentrações utilizadas em cada ensaio e suas respectivas atividades enzimáticas.

Com base nos resultados, os modelos matemáticos ajustados apresentaram R^2 de 0,59 para tanase e 0,52 para fitase. Contudo, ambos foram considerados estatisticamente não significativos em nível de 10% e 5% de probabilidade, respectivamente. Diante disso, recorreu-se ao gráfico de valores preditos *versus* observados e ao Diagrama de Pareto para interpretação dos efeitos das variáveis sobre as respostas avaliadas.

Tabela 10: DCCR para produção de Tanase e Fitase utilizando farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio.

Ensaio	FSG (g)	U (g)	Atividade tanase (U.mL ⁻¹)	Atividade de fitase (U.g ⁻¹)
1	7,91	0,58	ND	ND
2	22,1	0,58	ND	0,0420
3	7,91	3,42	0,138	0,0820
4	22,1	3,42	ND	0,0618
5	5	2	ND	0,2297
6	25	2	0,115	0,0615
7	15	0	ND	0,1171
8	15	4	0,225	0,0744
9	15	2	0,114	ND
10	15	2	0,056	ND
11	15	2	0,039	ND

ND: Não determinado; FSG: Farinha de semente de goiaba; U; Ureia.
Fonte: Autoria própria.

5.4.1 Atividade enzimática da tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia

O gráfico de valores preditos *versus* observados (Figura 1) evidencia que o modelo proposto apresenta baixa capacidade de ajuste para a atividade de tanase, caracterizada pela ampla dispersão dos pontos em relação à reta de regressão. Embora seja observada uma tendência linear positiva, esta é fraca, confirmando o baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,59$) e indicando que o modelo estudado explica apenas uma pequena fração da variabilidade experimental. A ausência de alinhamento consistente dos pontos, incluindo os ensaios realizados no ponto central, demonstra instabilidade preditiva e reforça a inexistência de efeitos significativos das variáveis avaliadas sobre a produção de tanase.

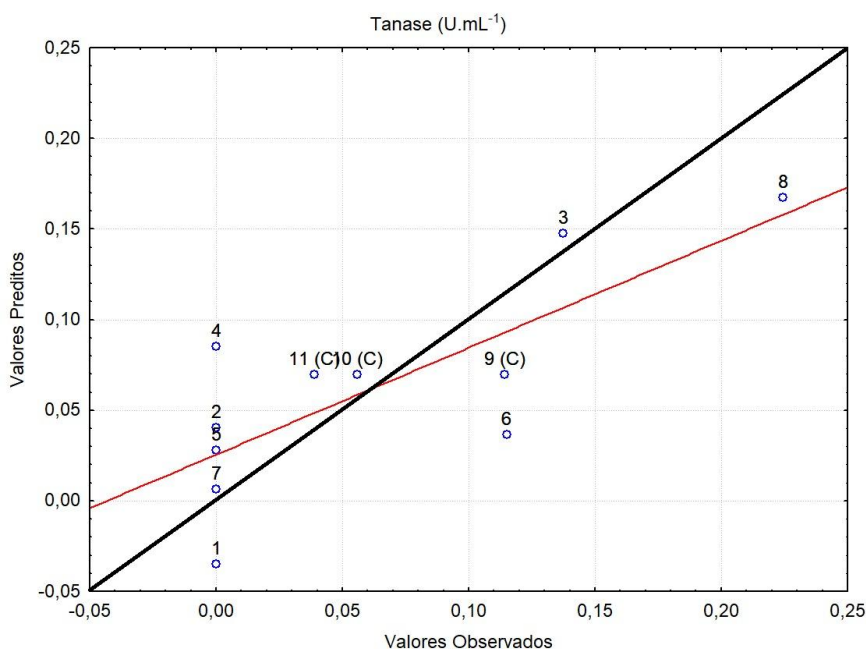


Figura 1: Valores preditos e observados da produção de tanase frente a interação da farinha de semente e ureia. Fonte: Autoria própria.

O Diagrama de Pareto (Figura 2), considerando nível de confiança de 90%, demonstra que somente o termo linear da ureia (U) apresentou efeito significativo (p maior que 0,10) sobre a atividade da tanase, configurando-se como o fator de maior influência no modelo experimental. Esse achado confirma que o incremento de nitrogênio assimilável exerce impacto direto e decisivo na indução da tanase, padrão amplamente descrito na literatura, que relaciona a disponibilidade nitrogenada à ativação de vias biossintéticas e ao aumento da secreção de enzimas extracelulares por *Aspergillus niger* (Dias, 2016; Akhtar et al., 2024).

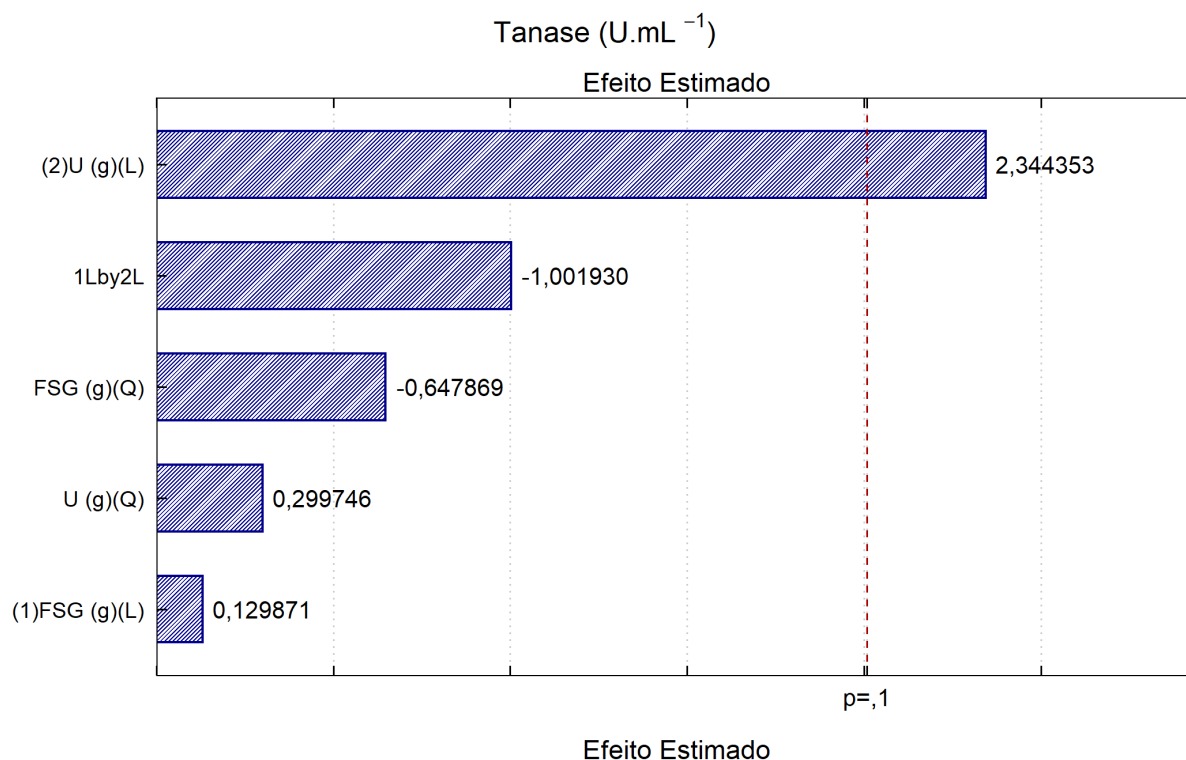


Figura 2: Diagrama de Pareto da produção de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia. Fonte: Autoria Própria.

Em contraposição, a farinha de semente de goiaba (FSG) não apresentou efeito significativo, tanto em seu termo linear (L) quanto quadrático (Q), indicando que, nas condições avaliadas, essa fonte de carbono não foi determinante para a resposta enzimática. Embora substratos ricos em taninos possam modular a produção de tanase, tal resposta depende fortemente da razão C:N, do tipo de composto fenólico e da capacidade metabólica da linhagem utilizada (Franzino et al., 2021; Schafer et al., 2023), o Sque pode explicar a ausência de efeito relevante no presente estudo.

Os termos quadráticos (Q) da ureia (U) e da farinha (FSG) exibiram coeficientes negativos, sugerindo tendência de curvatura compatível com início de saturação metabólica em concentrações superiores. Em níveis elevados, tanto o excesso de nitrogênio quanto o acúmulo de sólidos podem reduzir a eficiência enzimática devido à repressão metabólica, alterações reológicas ou limitação difusional (Guimarães et al., 2017; Heuermann et al., 2021). Contudo, como esses efeitos não alcançaram significância estatística, devem ser interpretados apenas como indicação de tendência.

A interação entre os fatores (1Lby2L) apresentou efeito moderado, porém não significativo, reforçando a ausência de sinergismo entre as fontes de carbono e

nitrogênio no intervalo experimental empregado. Tal comportamento é coerente com estudos que reportam que a resposta da tanase, em planejamentos fatoriais, é predominantemente direcionada pela fonte nitrogenada, exibindo baixa sensibilidade às interações entre variáveis (Naiudu et al., 2008; Kumar et al., 2015; Alfarhan et al., 2024).

Dessa forma, os resultados evidenciam que a ureia constitui o principal fator indutor da produção de tanase por *Aspergillus niger*, enquanto a farinha de semente de goiaba exerce influência secundária e não significativa. A compreensão desse comportamento é essencial para subsidiar etapas subsequentes de otimização, especialmente no que se refere ao ajuste da relação C:N e à definição das condições nutricionais mais adequadas para maximizar o rendimento enzimático.

5.4.2 Atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia

O gráfico de valores observados versus preditos (Figura 3) indica que o modelo ajustado apresenta capacidade limitada de descrever a produção de fitase nas condições avaliadas. Observa-se dispersão considerável dos pontos em relação à reta de identidade ($y = x$), evidenciando discrepâncias entre os valores experimentais e aqueles estimados pelo modelo. Esse comportamento sugere baixo poder explicativo das variáveis independentes incluídas no delineamento.

Apesar disso, os pontos centrais apresentam baixa dispersão, demonstrando boa reprodutibilidade experimental e reduzido erro puro. Tal resultado indica que a variabilidade observada está mais associada à inadequação do modelo estatístico do que a falhas operacionais ou instabilidade do sistema fermentativo. A homogeneidade dos ensaios realizados no nível central reforça a consistência das condições experimentais adotadas.

As atividades enzimáticas obtidas concentraram-se majoritariamente abaixo de $0,15 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, caracterizando desempenho enzimático limitado dentro da faixa experimental estudada. A baixa magnitude da resposta pode ter contribuído para a dificuldade de ajuste do modelo, uma vez que variações pequenas tendem a reduzir a sensibilidade estatística na detecção de efeitos significativos.

Os desvios observados entre valores experimentais e preditos indicam que os fatores avaliados não foram suficientes para explicar adequadamente a resposta da fitase, comprometendo a capacidade preditiva do modelo. Esses resultados sugerem a necessidade de reformulação do delineamento experimental, com inclusão de variáveis mais diretamente associadas à regulação da fitase, como concentração de fósforo inorgânico, presença de indutores específicos ou ajustes no tempo e nas condições de incubação, visando obtenção de respostas mais expressivas e estatisticamente robustas.

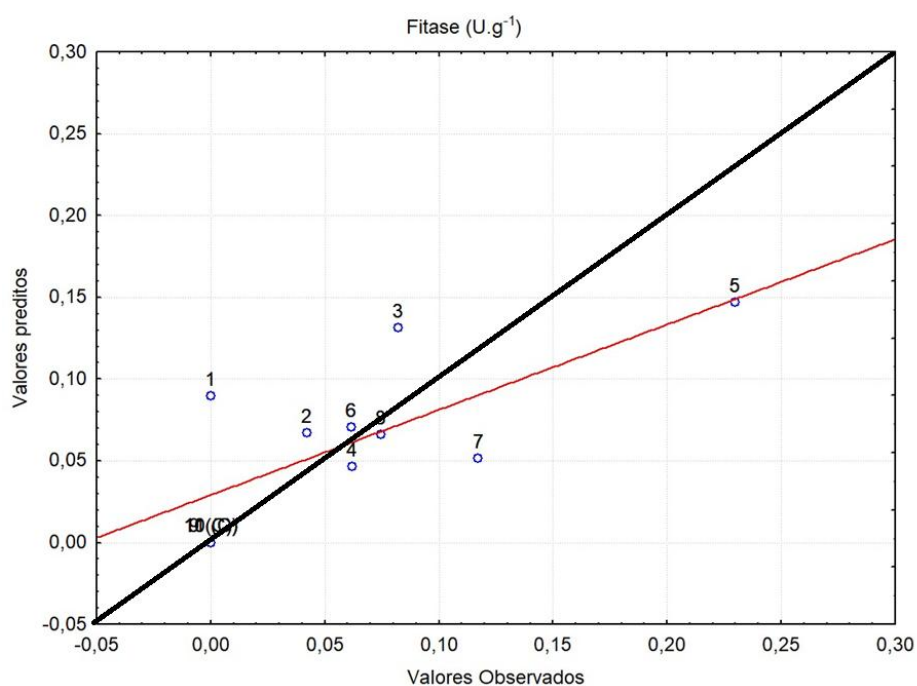


Figura 3: Valores Preditos versus Observados da produção de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia. Fonte: Autoria própria.

Para a atividade de fitase, o Diagrama de Pareto (Figura 4) a 95% de confiança revelou que a farinha de semente de goiaba (FSG) foi a variável de maior influência, destacando-se pelo efeito quadrático (Q) (aproximadamente 1,91). Tal padrão indica comportamento não linear, sugerindo que existe uma concentração ótima do substrato capaz de maximizar a produção da enzima. Como *Aspergillus niger* é altamente sensível à disponibilidade de carbono, concentrações elevadas de substratos complexos podem induzir repressão catabólica ou problemas difusionais (Adnan et al., 2017; Zheng et al., 2023).

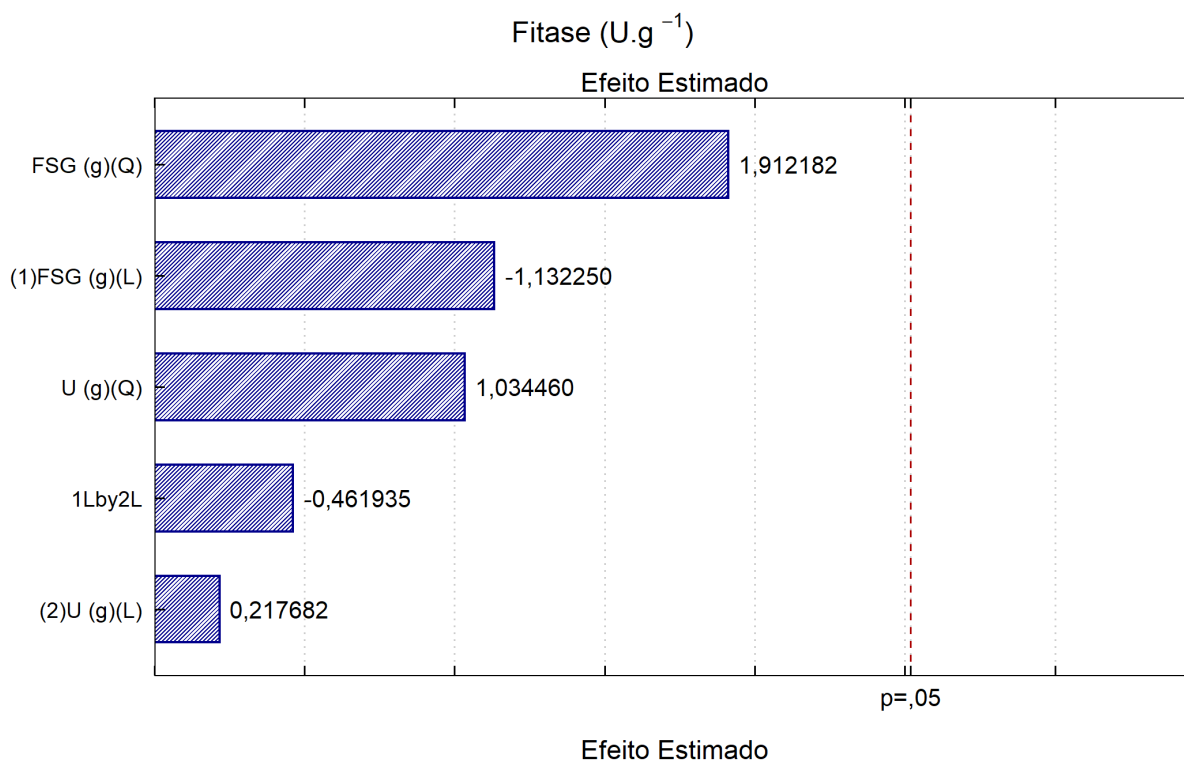


Figura 4: Diagrama de Pareto da produção de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e ureia. Fonte: Autoria própria.

O termo linear (L) da farinha apresentou efeito negativo ($-1,13$), indicando que o simples aumento da concentração do resíduo não promove acréscimo proporcional da atividade. Concentrações excessivas de materiais lignocelulósicos podem causar inibição por sólidos, acúmulo de fenóis ou competição metabólica — fenômenos reconhecidos em fungos filamentosos (Jatuwong et al., 2020; Scroccarello et al., 2021). Para a ureia (U), o efeito quadrático (Q) também não foi significativo (1,03). Como *Aspergillus niger* possui mecanismos de repressão por nitrogênio (NCR) mediados por reguladores como AreA e AreB, concentrações excessivas de ureia podem suprimir a expressão da fitase. Assim, sua atuação se mostra dependente de níveis moderados, o que explica a ausência de significância do termo linear (Michielse et al., 2014; Sadaf et al., 2022).

A interação entre as variáveis (1Lby2L) não foi significativa, indicando que atuam predominantemente de forma independente sobre a resposta.

Em síntese, a produção de fitase foi fortemente modulada pelos termos quadráticos, evidenciando a necessidade de ajuste preciso tanto da concentração da farinha quanto da ureia. Os resultados confirmam que a farinha de semente de goiaba é um substrato eficiente e sustentável para indução da fitase quando utilizada em

concentrações otimizadas, enquanto a ureia contribui para o ajuste metabólico, desde que controlada para evitar repressão nitrogenada.

Esses achados constituem subsídios importantes para etapas futuras de otimização, permitindo estabelecer condições fermentativas mais robustas para a produção de enzimas de interesse biotecnológico a partir de subprodutos agroindustriais.

5.5 Produção enzimática a partir de farinha de semente de goiaba em função de diferentes fontes de nitrogênio: novas concentrações de ureia versus extrato de levedura

Com o intuito de otimizar os resultados obtidos no item 5.4, foi conduzida uma nova etapa de fermentação, na qual se avaliou a influência das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção enzimática. Para isso, manteve-se a farinha de semente de goiaba na faixa de 5 a 25 g como fonte de carbono, enquanto a concentração de ureia foi ampliada de 0 a 8 g. Nesta etapa incluíram-se ensaios utilizando extrato de levedura como fonte alternativa de nitrogênio, testado nas concentrações de 0 a 6 g.

5.5.1 Ensaio utilizando ureia como fonte de nitrogênio

A Tabela 11 apresenta as combinações avaliadas e as respectivas atividades enzimáticas obtidas em cada condição experimental.

Com os resultados demonstrados na tabela 11, pode-se observar que o aumento da concentração da ureia promoveu uma maior atividade enzimática tanto para tanase, quanto para fitase. A tanase aumentou moderadamente, com máximo no ensaio 8 ($0,6248 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), indicando indução nitrogenada limitada por uma faixa ótima C:N, conforme descrito por Schafer et al. (2023) e Akhtar et al. (2024). A fitase, por sua vez, apresentou incremento exponencial, sobretudo quando ureia e farinha de semente de goiaba foram combinadas em proporções extremas (ensaios 3, 5 e 8). A elevação no ensaio 3 evidencia que a fitase depende fortemente da disponibilidade de nitrogênio assimilável, corroborando Franzino et al. (2022). Abaixo serão discutidos os resultados estatísticos de cada enzima.

Tabela 11: DCCR para produção de Tanase e Fitase utilizando farinha de semente de goiaba (FSG) como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio.

Ensaio	FSG (g)	U (g)	Atividade tanase (U·mL ⁻¹)	Atividade de fitase (U·g ⁻¹)
1	7,91	1,2	ND	ND
2	22,1	1,2	ND	0,144
3	7,91	6,8	ND	5,072
4	22,1	6,8	0,319	1,359
5	5	4	ND	4,029
6	25	4	0,152	1,365
7	15	0	ND	ND
8	15	8	0,624	2,843
9	15	4	0,012	2,174
10	15	4	0,178	2,565
11	15	4	ND	1,949

ND: Não determinado; FSG: Farinha de semente de goiaba; U: Ureia.

Fonte: Próprio Autor.

5.5.1.1 Atividade enzimática da tanase frente a interação farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia

A partir desses ensaios, encontrou-se $R^2=0,69$, estatisticamente não significativos em 5% de probabilidade, ainda não possibilitando criação de gráficos pelas análises de ANOVA. Criou-se, então, novamente o Diagrama de Pareto em 95% de confiança (Figura 5).

A análise do Diagrama de Pareto (Figura 5), demonstrou o mesmo padrão discutido no item 5.4.1, em que apenas o termo linear da ureia (U(L)) apresentou impacto estatisticamente significativo (p maior que 0,05) sobre a atividade da tanase produzida por *Aspergillus niger*, com efeito estimado superior a 2,6, o que reforça que a disponibilidade de nitrogênio assimilável é o principal fator regulador da atividade enzimática da tanase no sistema experimental avaliado.

Além disso, a farinha de semente de goiaba (FSG) apresentou um efeito linear (L) positivo, porém não foi significativo, o que indica que a variação isolada da fonte de carbono não influenciou de maneira consistente a síntese da tanase.

Da mesma forma, o termo de interação entre farinha de goiaba e ureia (1Lby2L) não atingiu significância estatística, indicando que as variáveis não atuaram de forma sinérgica na indução da tanase. Os termos quadráticos (U(Q)) e FSG(Q)) apresentaram efeitos moderados, mas não significativos, indicando apenas tendência de curvatura na resposta.

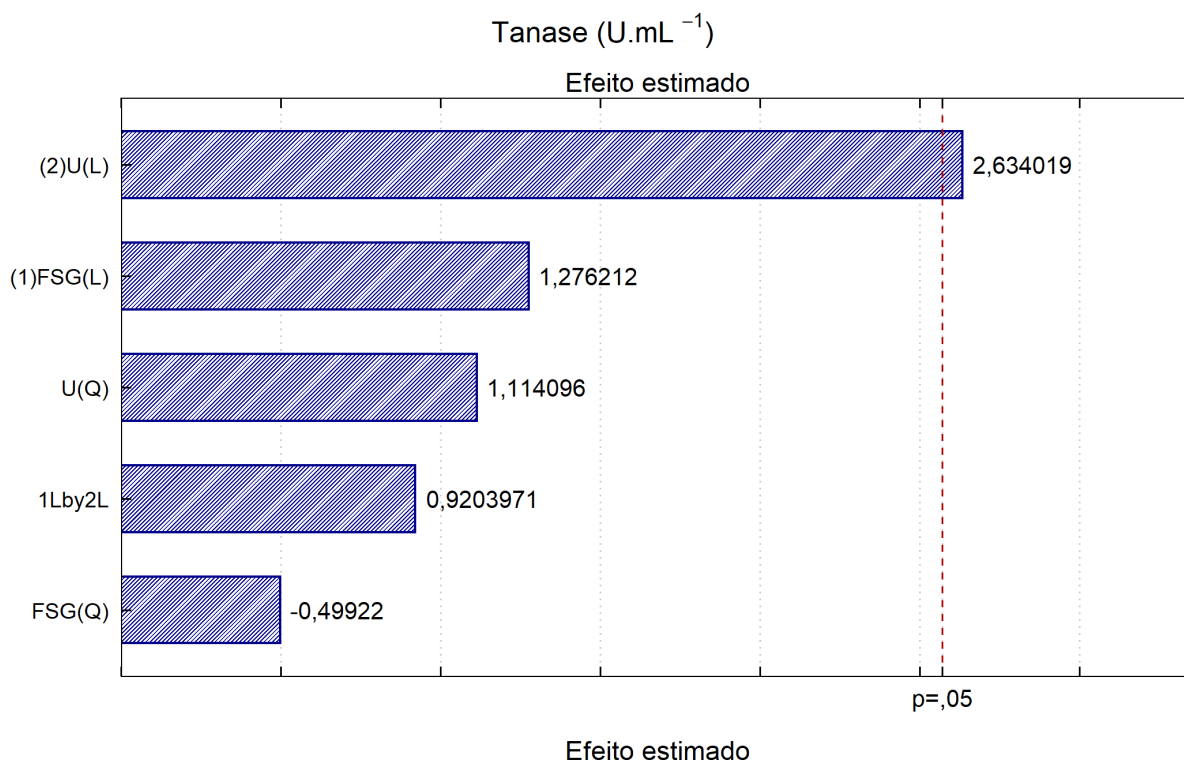


Figura 5: Diagrama de Pareto da produção enzimática da tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia. Fonte: Autoria Própria.

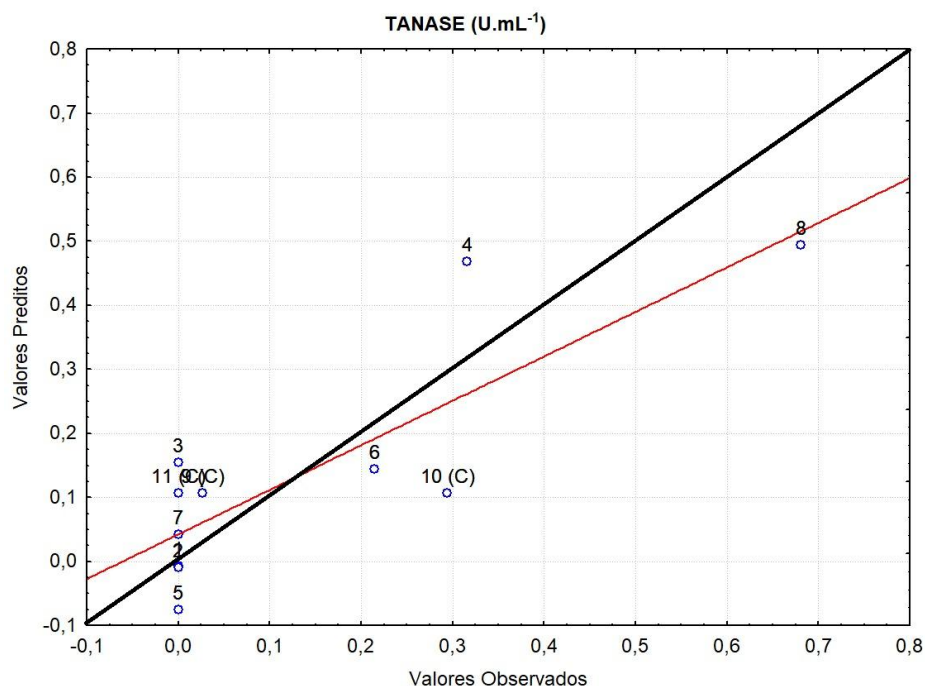
Sendo assim, é possível afirmar o que foi discutido no item 5.4.1, o comportamento do sistema sugere que a síntese enzimática está mais fortemente condicionada à disponibilidade de nitrogênio de que à fonte de carbono.

A análise do gráfico de valores observados versus previstos (Figura 6) reforça as limitações do modelo matemático ajustado utilizado.

Os pontos correspondentes ao nível central (C) apresentam baixa dispersão relativa, demonstrando boa reprodutibilidade experimental e reduzido erro puro. Tal comportamento confirma que a variabilidade observada não está associada a instabilidade operacional ou inconsistências experimentais, mas sim à limitação do modelo em descrever adequadamente a resposta ao longo da faixa experimental, especialmente nas regiões mais extremas do planejamento.

A inclinação positiva da linha de regressão confirma que o modelo capturou corretamente a direção geral do efeito da ureia; entretanto, o baixo ajuste revela que outros fatores — não incluídos no experimento — podem ter exercido influência relevante sobre a atividade de tanase. Entre esses fatores, destacam-se pH, disponibilidade de oxigênio, intensidade da agitação, presença de indutores

específicos (como ácido gálico) e condições de acessibilidade dos taninos presentes na farinha, os quais são reconhecidos como moduladores importantes da síntese de



tanase em *Aspergillus niger* (D'Souza et al., 2022).

Figura 6: Gráfico de Valores Previstos versus valores observados da produção de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia. Fonte: Autoria Própria.

A concentração reduzida de atividade enzimática observada em grande parte dos ensaios, associada à fraca correlação entre observados e previstos, sugere não apenas a predominância do efeito da ureia, mas também a baixa eficiência do substrato de goiaba como indutor no contexto experimental. Isso está alinhado com estudos que demonstram que fontes de carbono complexas podem exigir pré-tratamentos físicos ou químicos para liberar taninos reativos e aumentar sua capacidade indutora (Braghiroli et al., 2019; Islam et al., 2021; Guizani et al., 2023).

Em síntese, os resultados demonstram que a ureia é o principal fator regulador da tanase no sistema avaliado, enquanto a farinha de semente de goiaba, embora bioquimicamente promissora, não exerceu influência significativa nas condições testadas. Além disso, o baixo ajuste do modelo estatístico evidencia a necessidade de incluir outros fatores no processo de otimização ou de explorar delineamentos mais abrangentes, de modo a capturar com maior precisão a complexidade metabólica envolvida na biossíntese da tanase por *Aspergillus niger*. Esses resultados contribuem para delinear estratégias de otimização mais eficientes, priorizando a modulação da

fonte de nitrogênio e a avaliação de potenciais indutores específicos capazes de intensificar a produção enzimática.

5.5.1.2 Atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia

A partir dos novos ensaios, encontrou-se $R^2=0,84$ em nível de 10% de probabilidade, a partir destes dados também foi possível estabelecer um modelo matemático segundo a equação 9. A partir dos valores obtidos pela equação, delimitou-se os resultados do DCCR para dentro das regras da ANOVA. Com os valores de Fc (F calculado) na Tabela 12.

$$Y = 2,40 - 1,31 \times FC + 0,63 \times FC^2 + 1,35 \times FN - 0,75FN^2 - 0,73 \times FN \times FC \text{ (Eq. 9)}$$

Tabela 12: Anova da atividade de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalculado	F tabelado (5, 5, 10%)
Regressão	35,770	5	7,154	5,026	3,453
Resíduos	7,117	5	1,423		F tabelado (3, 2, 10%)
Falta de Ajuste	6,671	3	2,224	9,964	9,162
Erro Puro	0,446	2	0,223		
Total	42,887				

SQ: soma de quadrados.

GL: Graus de liberdade.

QM: quadrados médios.

Fonte: Autoria Própria.

A partir dos dados obtidos pela ANOVA, foram construídos os gráficos de superfície de resposta e de curvas de contorno para a atividade de fitase em função da concentração de farinha de semente de goiaba (FSG) e ureia (U). A análise conjunta da superfície de resposta tridimensional (Figura 7) e do gráfico de contorno (Figura 8) demonstra que a produção de fitase por *Aspergillus niger* é fortemente influenciada pelo aporte nitrogenado e pela quantidade de farinha de semente de goiaba utilizada. Ambos os gráficos apresentam gradientes bem definidos, com zonas

de alta e baixa atividade que caracterizam o comportamento quadrático típico de modelos ajustados via DCCR.

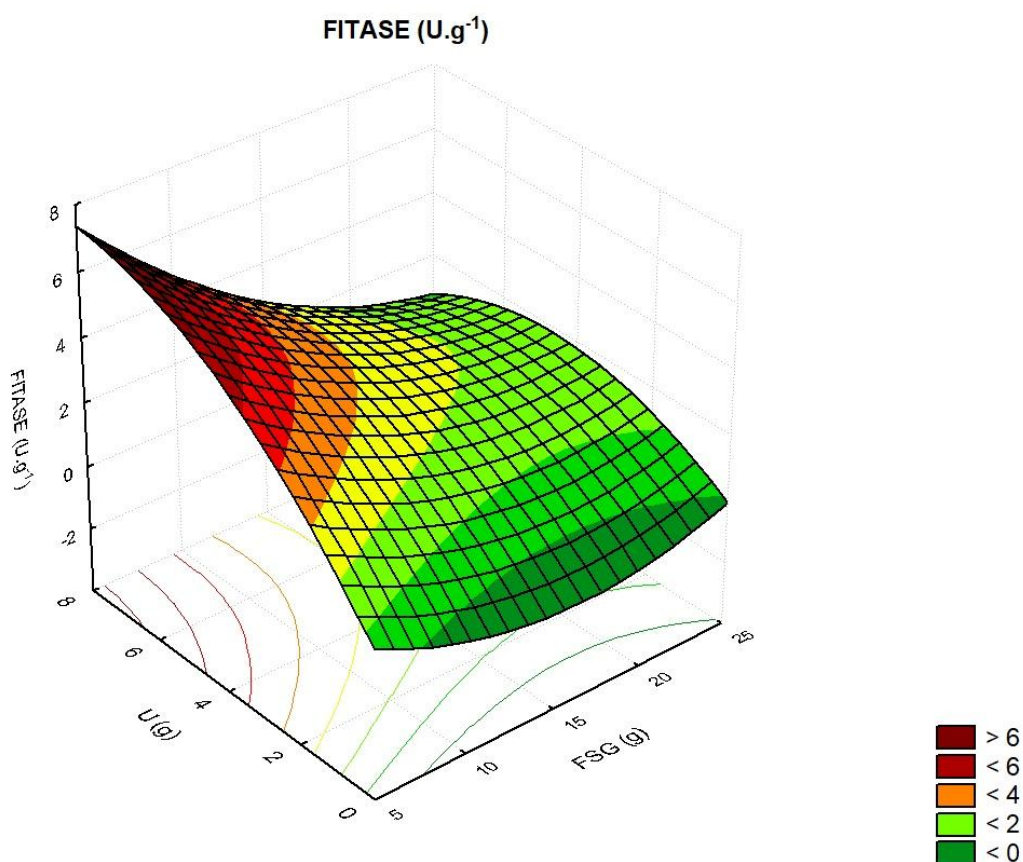


Figura 7: Gráfico de resposta de superfície 3D da atividade da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia. Fonte: Autoria Própria.

A região de maior atividade (aproximadamente $6 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$), destacada em vermelho, concentra-se na combinação entre baixas concentrações de farinha (aproximadamente $7,91 \text{ g}$) e altos níveis de ureia ($6,8 \text{ g}$). Esse padrão reforça o papel determinante do nitrogênio na maximização da resposta enzimática, evidenciado pela acentuada inclinação da superfície 3D e pelo gradiente oblíquo observado no gráfico de contorno. Resultados semelhantes foram reportados por Zailan et al. (2021), que destacam a importância da suplementação nitrogenada na síntese de fitases por fungos filamentosos.

Por outro lado, as regiões de menor atividade (menor que $2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) surgem principalmente sob duas condições: (i) baixa concentração de ureia, independente da quantidade de farinha; e (ii) níveis elevados de farinha (15–25 g), mesmo com nitrogênio disponível. A limitação nitrogenada reduz tanto o crescimento micelial quanto a capacidade biossintética do fungo, prejudicando a expressão da fitase (Maseko et al., 2024). Já o excesso de carbono sugere ocorrência de repressão catabólica, fenômeno clássico em *Aspergillus*, em que a abundância de substratos energéticos reprime a síntese de enzimas hidrolíticas consideradas secundárias (Adnan et al., 2017; De Assis et al., 2021; Tanaka & Gomi, 2021). Essa tendência é coerente com a curvatura negativa do modelo, evidenciada pela persistência das áreas verdes em concentrações elevadas de farinha de semente de goiaba nos dois gráficos.

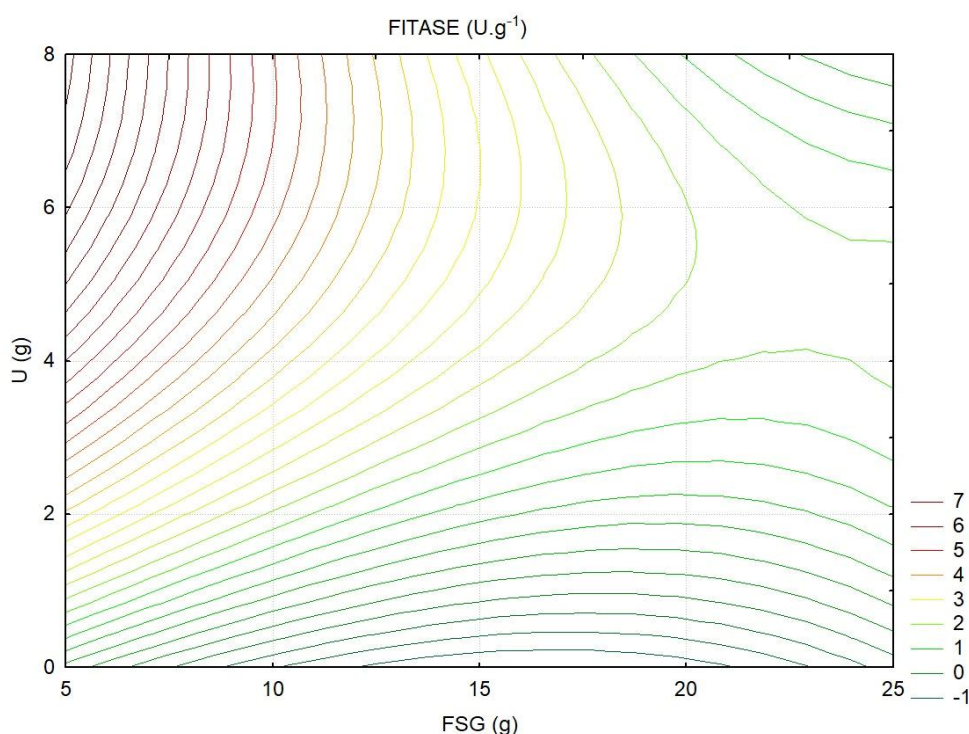


Figura 8: Gráfico de contorno da atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia. Fonte: Autoria Própria.

A interação entre as variáveis também é evidente. A superfície indica que a maximização da atividade enzimática não depende apenas do aumento de ureia ou da redução de farinha isoladamente; a resposta ótima está relacionada ao balanço C:N, que regula a intensidade das rotas biossintéticas envolvidas na produção de fitase (Wang et al., 2023). Tanto o perfil ondulatorio da superfície quanto a inclinação dos contornos demonstram que pequenas variações na proporção entre carbono e

nitrogênio são suficientes para alterar a resposta fisiológica do microrganismo, reforçando o bom ajuste e a coerência biológica do modelo quadrático.

Em síntese, a produção de fitase por *Aspergillus niger* mostrou forte dependência da disponibilidade de ureia, enquanto a farinha de semente de goiaba apresentou efeito positivo apenas em concentrações moderadas. Os gráficos convergem para uma região ótima operacional caracterizada por baixa a média concentração de farinha de semente de goiaba associada a altos níveis de ureia, oferecendo diretrizes úteis para a seleção de condições fermentativas mais eficientes.

Estudos prévios também reforçam a relevância do ajuste nutricional. Tanruean et al. (2021) relataram elevados rendimentos de fitase utilizando farelo de arroz suplementado com sulfato de amônio, enquanto pesquisas envolvendo resíduos de goiaba permanecem escassas. Ali et al. (2023), por exemplo, investigaram a produção de lipases em *Aspergillus niger* utilizando esse resíduo e observaram atividade máxima de 9,1 U/mL, demonstrando seu potencial biotecnológico, embora ainda pouco explorado para fitases.

A adequação do modelo estatístico é reforçada pelo gráfico de valores observados versus valores preditos (Figura 9) da atividade de fitase, o qual evidencia tendência linear positiva, indicando que o modelo descreve satisfatoriamente a tendência global da resposta dentro da faixa estudada. No entanto, a dispersão dos pontos, especialmente nos extremos da faixa experimental, revela ajuste moderado, sugerindo que o modelo é mais apropriado para interpretação de tendências do sistema fermentativo do que para predições exatas de valores absolutos de atividade enzimática. Ainda assim, esse comportamento é comum em sistemas biológicos complexos e não compromete a coerência fisiológica do modelo ajustado.

Assim, embora os resultados do presente estudo sinalizem que a farinha de semente de goiaba pode atuar como substrato promissor em concentrações específicas, o conhecimento disponível ainda é limitado. A variabilidade fisiológica observada, somada à ausência de estudos consolidados sobre sua aplicação na produção de fitases, evidencia a necessidade de investigações adicionais que avaliem diferentes pré-tratamentos, parâmetros fermentativos, suplementações e abordagens multivariadas. Dessa forma, torna-se possível estabelecer protocolos mais robustos e ampliar o aproveitamento biotecnológico desse resíduo agroindustrial.

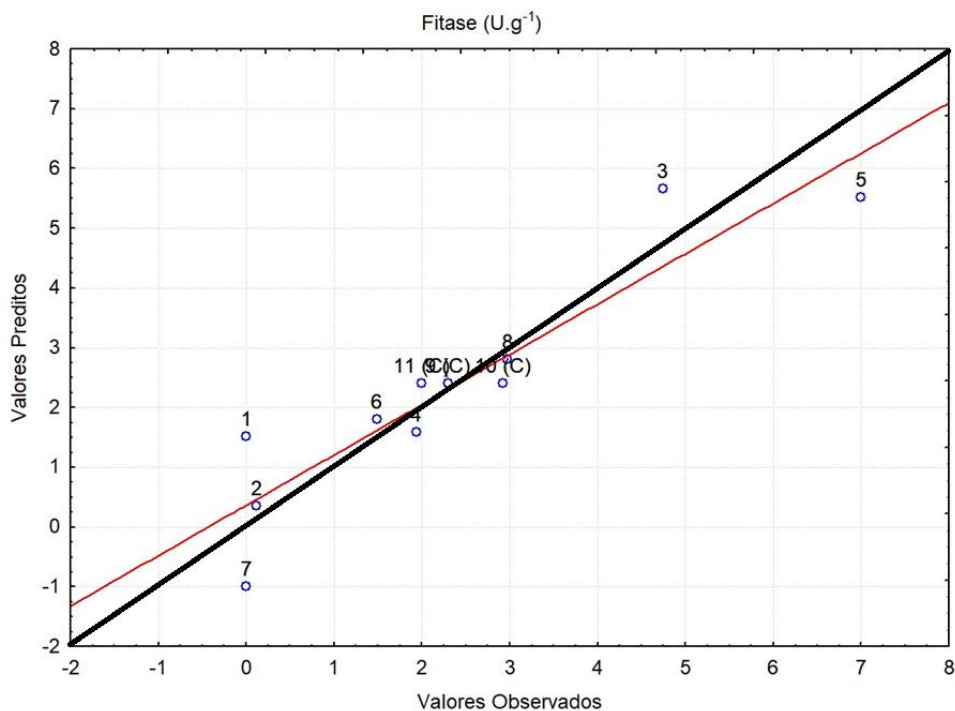


Figura 9: Valores previstos versus valores observados da atividade da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e novas concentrações de ureia. Fonte: Autoria Própria.

5.5.2 Ensaio utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio

A tabela 13 descreve a atividade enzimática frente aos ensaios com as concentrações da fonte de carbono (farinha de semente de goiaba) e a nova fonte de nitrogênio testada (extrato de levedura).

O delineamento experimental avaliou a influência do extrato de levedura como fonte de nitrogênio sobre a produção das enzimas tanase e fitase por *Aspergillus niger*. Observou-se que a atividade de tanase foi praticamente nula em todos os ensaios, indicando que, nas condições avaliadas, o extrato de levedura não atuou como indutor dessa enzima, a qual depende de compostos fenólicos específicos para sua expressão.

Em contraste, a atividade de fitase apresentou resposta significativa, com valores mais elevados associados a altas concentrações de extrato de levedura e baixas concentrações de farinha de semente de goiaba, evidenciando o papel determinante do nitrogênio orgânico na indução dessa enzima. Os resultados serão mostrados e discutidos nos itens abaixo.

Tabela 13: DCCR para produção de Tanase e Fitase utilizando farinha de semente de goiaba como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Ensaio	FSG (g)	EL (g)	Atividade tanase (U·mL ⁻¹)	Atividade de fitase (U·g ⁻¹)
1	7,91	0,9	ND	ND
2	22,1	0,9	ND	0,184
3	7,91	5,1	ND	10,029
4	22,1	5,1	ND	2,318
5	5	3	ND	8,479
6	25	3	ND	2,386
7	15	0	ND	ND
8	15	6	ND	3,016
9	15	3	0,0125	1,266
10	15	3	0,178	2,435
11	15	3	ND	1,404

ND: Não determinado; FSG: Farinha de semente de goiaba; EL: Extrato de levedura.
Fonte: Autoria própria.

5.5.2.1 Atividade enzimática da tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura

A análise do Diagrama de Pareto (Figura 10) revela que nenhuma das variáveis avaliadas atingiu significância estatística em nível de 90% de confiança, indicando que, dentro do intervalo experimental estudado, o extrato de levedura não exerceu influência determinante sobre a atividade da tanase produzida por *Aspergillus niger*. Embora os termos quadráticos da farinha de semente de goiaba (FSG -1,29) e do extrato de levedura (EL-1,11) tenham apresentado os maiores coeficientes, ambos permaneceram abaixo do limite crítico, demonstrando apenas uma tendência de curvatura, mas sem sustentação estatística no modelo descrito.

Essa limitação do modelo estudado é corroborada pelo gráfico de valores observados *versus* valores preditos (Figura 11), no qual se observa dispersão considerável dos pontos em relação à linha de tendência, especialmente nas faixas de baixa atividade enzimática.

As concentrações de pontos próximos ao eixo de menor resposta e os desvios observados em relação à reta ideal indicam baixa concordância entre os valores experimentais e os estimados pelo modelo, refletindo um baixo poder preditivo, compatível com o reduzido coeficiente de determinação ($R^2=0,31$). Os pontos correspondentes ao nível central (C) apresentam baixa dispersão entre si, evidenciando boa reprodutibilidade experimental e reduzido erro puro. Tal

comportamento confirma que a variabilidade observada não está associada à instabilidade do sistema fermentativo, mas sim à limitação estrutural do modelo em explicar a resposta ao longo da região experimental.

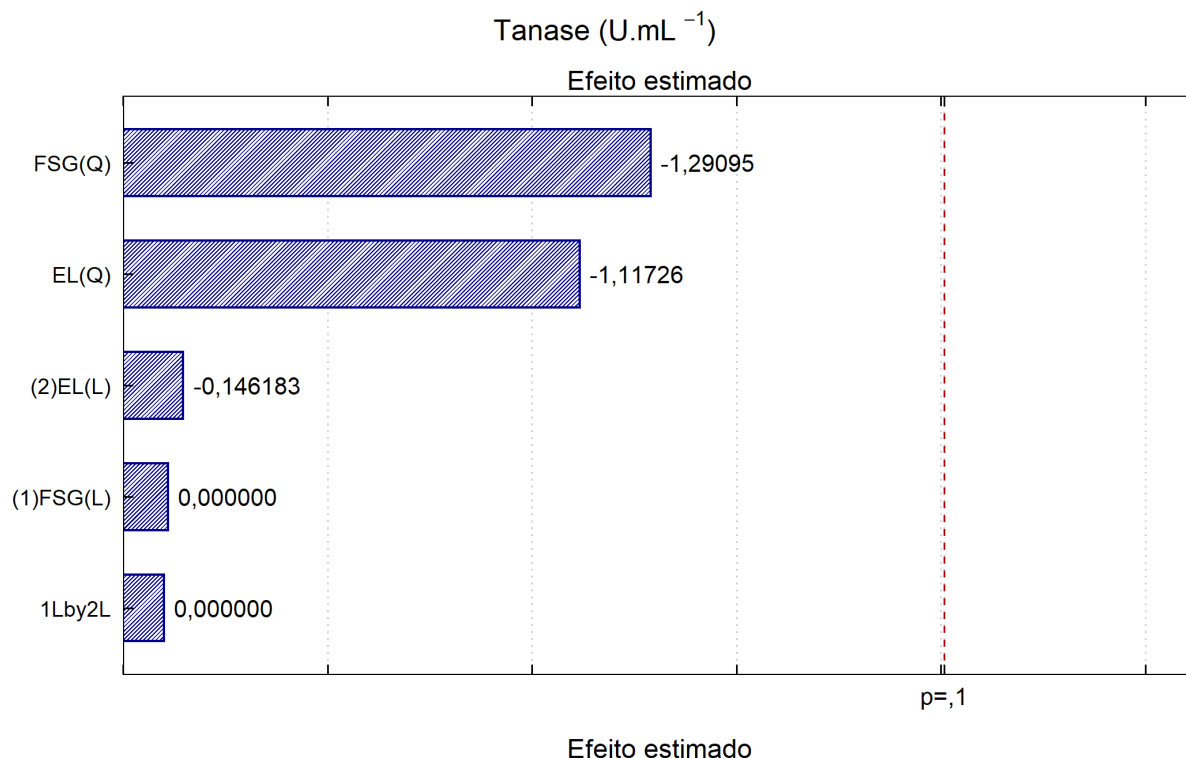


Figura 10: Diagrama de Pareto da atividade de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura. Fonte: Autoria Própria.

A presença de efeitos quadráticos (Q) negativos sugere que níveis muito altos de substrato – tanto da fonte de carbono (FSG) quanto do nitrogênio (EL) – podem gerar diminuição da atividade enzimática, provavelmente em função de mecanismos de repressão metabólica. Em fungos filamentosos, é bem documentado que fontes nitrogenadas ricas em aminoácidos e peptídeos, como o extrato de levedura, tendem a favorecer o crescimento celular, mas não necessariamente a indução de enzimas extracelulares associadas à degradação de compostos fenólicos. Isso ocorre porque a tanase é tipicamente uma enzima de resposta adaptativa, mais fortemente induzida pela presença de taninos do que por nitrogênios facilmente assimiláveis (Franzino et al., 2021; Akhtar et al., 2024).

Assim, os resultados indicam que o extrato de levedura (EL) não representou estímulo efetivo para o aumento da atividade de tanase. O fungo, ao receber uma fonte nitrogenada complexa e abundante, tende a priorizar vias de crescimento

primário, reduzindo a necessidade fisiológica de sintetizar enzimas especializadas como a tanase. Esse comportamento é consistente com relatos de que fontes de nitrogênio mais simples ou moderadamente limitantes, como ureia ou sais amoniacais, promovem melhor resposta enzimática por induzirem leve estresse nutricional, condição frequentemente associada à maior expressão de enzimas relacionadas à degradação de polímeros estruturais e compostos aromáticos (Schaefer et al., 2023).

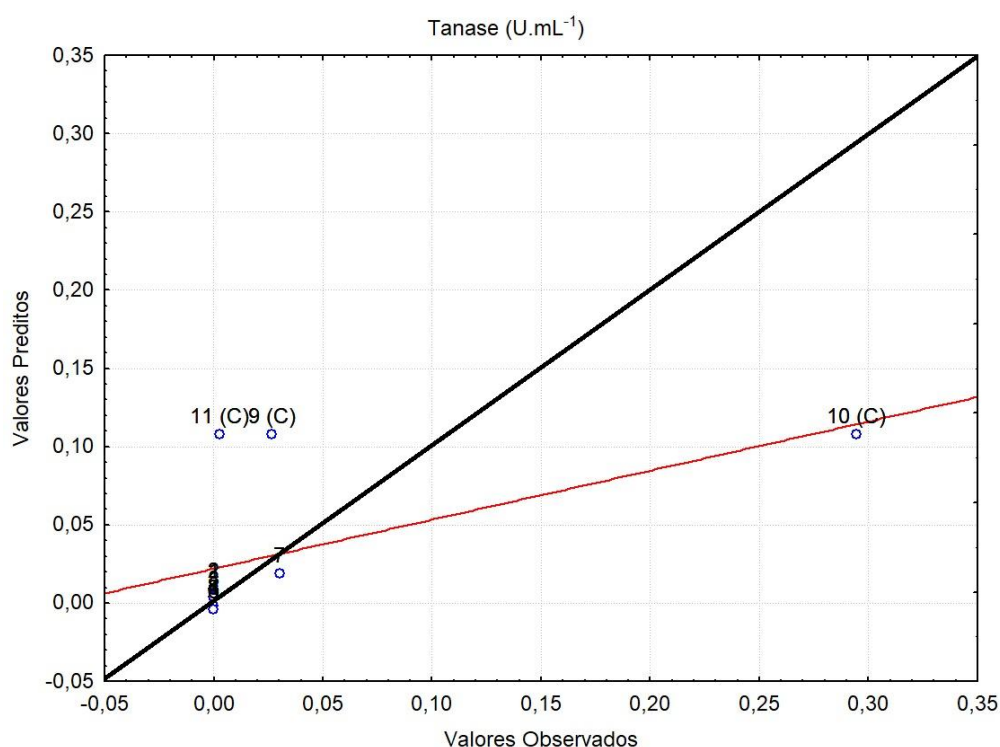


Figura 11: Valores Preditos versus Valores Observados da atividade de tanase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura. Fonte: Autoria Própria.

A ausência de significância nos termos lineares (L) e de interação (1Lby2L) reforça que a variação das concentrações testadas não modulou de forma consistente o metabolismo produtor de tanase, e que a resposta observada foi predominantemente estável. Assim, os resultados permitem concluir que, no contexto experimental aplicado, o extrato de levedura não é uma fonte nitrogenada eficiente para maximizar a produção de tanase, devendo ser consideradas alternativas que promovam maior indução metabólica, como ureia ou combinações C:N mais restritivas.

5.5.2.2 Atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura

A partir dos ensaios com extrato de levedura, encontrou-se $R^2=0,94$ em nível de 5% de probabilidade, a partir destes dados também foi possível estabelecer um modelo matemático segundo a equação 10. A partir dos valores obtidos pela equação, delimitaram-se os resultados do DCCR para dentro das regras da ANOVA. Com os valores de F_c (F calculado) na Tabela 14.

$$Y = 2,38 - 1,97 \times FC + 15,48 \times FC^2 + 2,58 \times FN - 0,08FN^2 - 1,81 \times FN \times FC \text{ (Eq.10)}$$

Tabela 14: Anova da atividade de fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalculado	F tabelado (5,5,5%)
Regressão	109,7129	5	21,94258	17,36293	5,05
Resíduos	6,3188	5	1,26376		F tabelado (3,2, 5%)
Falta de Ajuste	6,2742	3	2,0914	93,78475	19,164
Erro Puro	0,0446	2	0,0223		
Total	6,3188				

SQ: soma de quadrados.

GL: Graus de liberdade.

QM: quadrados médios.

Fonte: Autoria própria.

A superfície de resposta para a atividade de fitase ($U \cdot g^{-1}$) (Figura 12) gerada a partir da ANOVA mostra que o fator determinante para o aumento da resposta é o extrato de levedura, enquanto a farinha de semente de goiaba (FSG) exerce efeito predominantemente negativo quando utilizada em maiores concentrações. Observa-se um claro gradiente ascendente da atividade enzimática ao longo do eixo do extrato de levedura, sobretudo na faixa de menores concentrações de farinha de semente de goiaba (em torno de 5 g). Nessa condição, a elevação do extrato de levedura (EL) até a região próxima de 6 g resulta nas maiores atividades de fitase (em torno de $14 U \cdot g^{-1}$).

O gráfico de contorno (Figura 13) reforça esse comportamento, uma vez que as isolinhas de maior intensidade (tons vermelho/laranja, entre 10 e 14 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) concentram-se no canto superior esquerdo do gráfico, onde o extrato de levedura (EL) se encontra em níveis elevados e a farinha em concentrações reduzidas. À medida que a concentração de farinha de semente de goiaba (FSG) aumenta, principalmente acima de 15–20 g, observa-se queda progressiva da resposta, mesmo sob altos níveis de extrato de levedura (EL).

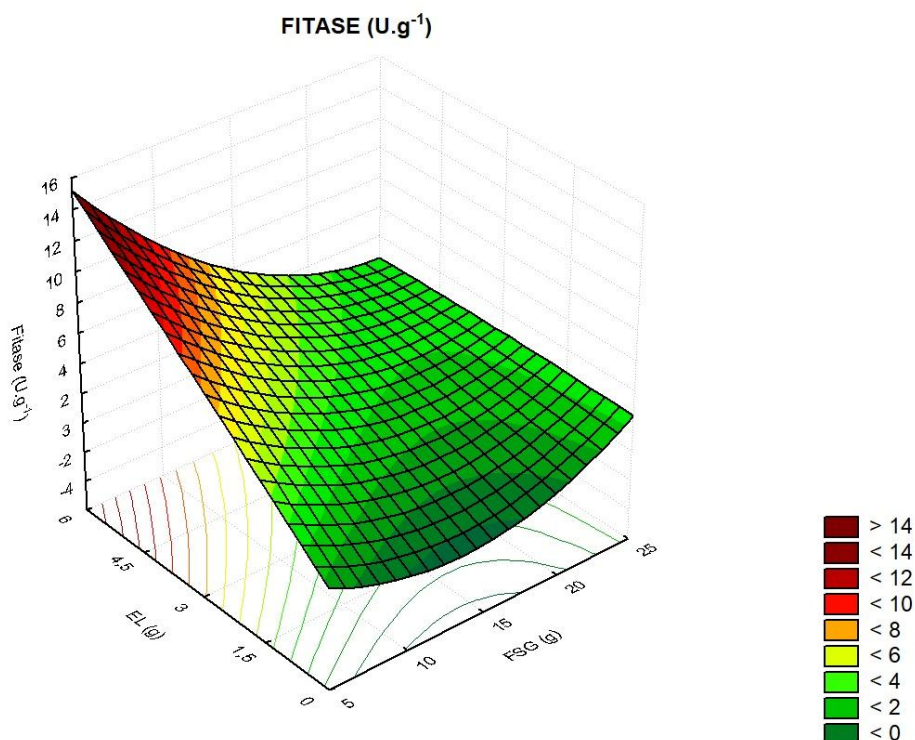


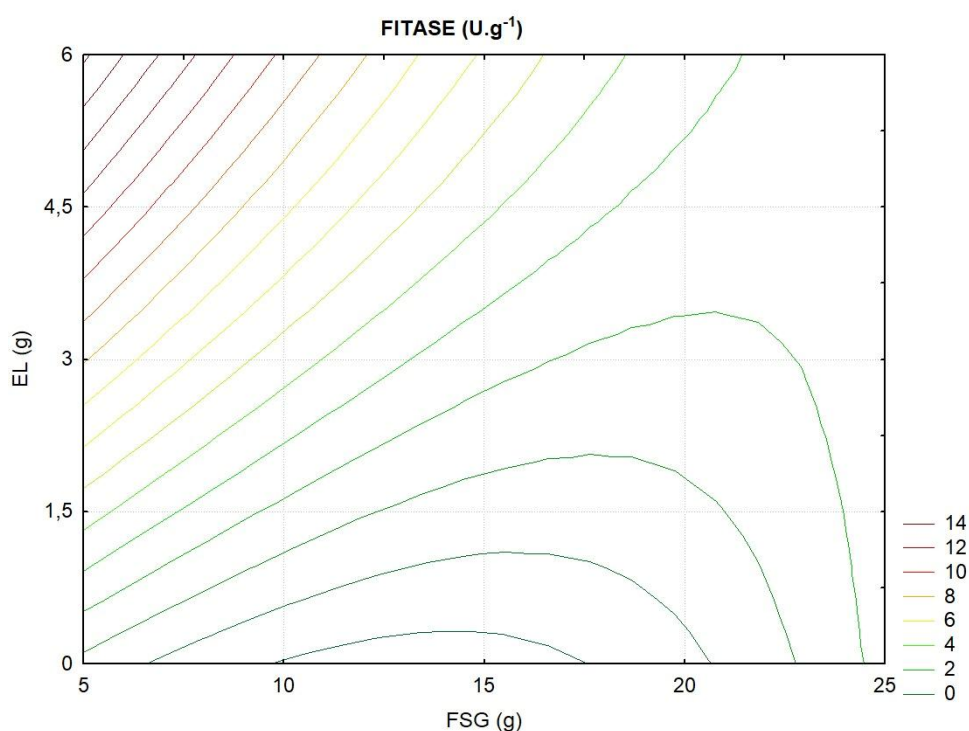
Figura 12: Gráfico de superfície de resposta 3D da atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura. Fonte: Autoria Própria.

Essa tendência sugere que o excesso de substrato carbonado não atua como indutor da fitase e pode ocasionar repressão por carbono e/ou alterações nas condições físicas do meio, como umidade e difusão de oxigênio e nutrientes, comprometendo a eficiência metabólica do fungo (Adnan et al., 2017; Lima et al., 2020; Rüllke et al., 2024).

Adicionalmente, o gráfico de valores observados versus preditos (Figura 14) da atividade de fitase evidencia bom ajuste do modelo quadrático obtido pelo DCCR, com a maioria dos pontos distribuída próxima à reta identidade, indicando adequada capacidade preditiva. O modelo apresenta maior precisão nas faixas intermediárias e elevadas de atividade, enquanto maior dispersão é observada em valores baixos, o que sugere limitações preditivas nas extremidades do domínio experimental, sem

indícios de viés sistemático. Portanto, os resultados indicam que a condição ótima para a produção de fitase situa-se na combinação de alta concentração de extrato de levedura (EL) com baixa a moderada concentração de farinha de semente de goiaba (FSG). Nessa faixa, o microrganismo dispõe de aporte nitrogenado suficiente para sustentar o metabolismo e a biossíntese de enzimas extracelulares, sem sofrer os efeitos inibitórios associados ao excesso de carbono.

Figura 13: Gráfico de contorno da atividade enzimática da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura. Fonte: Autoria Própria.



O aumento simultâneo das duas variáveis desloca a superfície para regiões de menor atividade (menor que $4 U \cdot g^{-1}$), evidenciando que a simples elevação da carga de substrato não se traduz em maior produção enzimática.

Em síntese, os resultados demonstram que, para a produção de fitase por *Aspergillus niger* utilizando farinha de semente de goiaba como fonte de carbono, o extrato de levedura (EL) atua como principal modulador positivo, enquanto a farinha de semente de goiaba (FSG), em níveis elevados, tende a limitar a resposta, reforçando a importância do ajuste da relação C:N para a maximização da atividade enzimática no sistema avaliado.

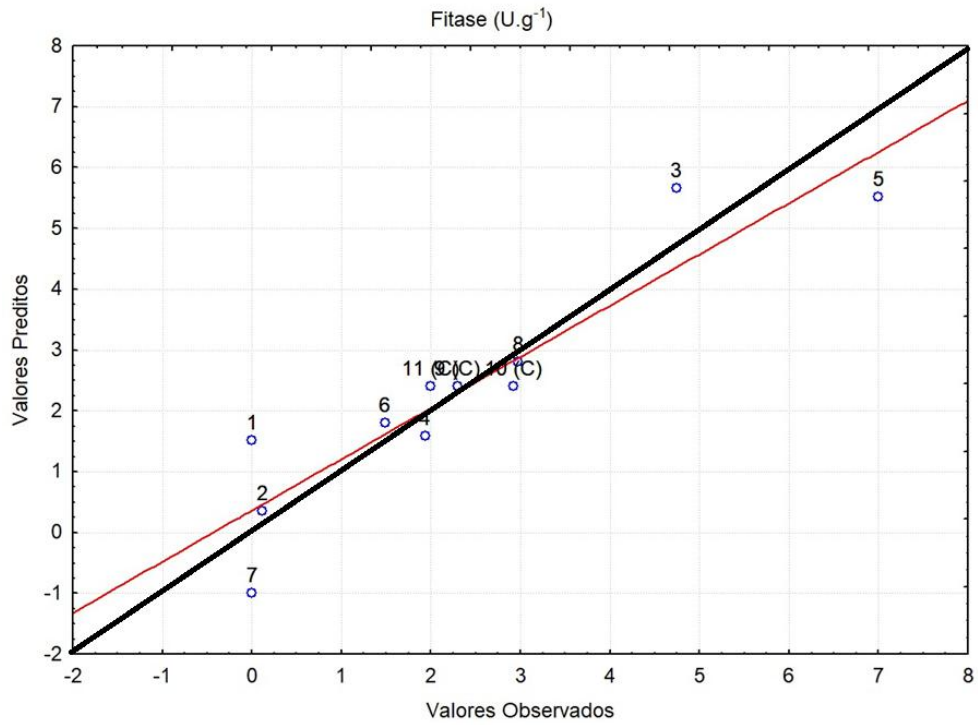


Figura 14: Gráfico de Valores Previstos versus valores observados da fitase frente a interação da farinha de semente de goiaba e extrato de levedura. Fonte: Autoria Própria.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou, de forma consistente, o elevado potencial biotecnológico da farinha de semente de goiaba (*Psidium guajava*) como substrato alternativo para a produção da enzima fitase por *Aspergillus niger*, empregando a fermentação em estado sólido como estratégia de valorização de resíduos agroindustriais, para tanase e lacase novos estudos devem ser levados em consideração. A caracterização físico-química do substrato evidenciou sua composição rica em fibras, carboidratos estruturais e compostos fenólicos, atributos que favorecem o crescimento fúngico e a indução enzimática, confirmando sua viabilidade como matéria-prima fermentativa.

A avaliação das diferentes fontes de nitrogênio revelou que a resposta enzimática é fortemente dependente da natureza e da concentração desse nutriente, sendo observadas diferenças marcantes no desempenho produtivo conforme a enzima avaliada. A aplicação do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) possibilitou a compreensão dos efeitos lineares, quadráticos e das interações entre as variáveis estudadas, permitindo a identificação de regiões ótimas de produção e evidenciando a relevância do planejamento experimental na otimização de bioprocessos.

Os resultados obtidos indicaram que *Aspergillus niger* apresenta elevada capacidade de adaptação à farinha de semente de goiaba, expressando atividades enzimáticas compatíveis com aquelas descritas na literatura para outros substratos convencionais. Destaca-se que, para a produção de fitase, a farinha de semente de goiaba mostrou-se particularmente eficiente quando associada a fontes nitrogenadas adequadas, enquanto a produção de tanase apresentou comportamento mais restritivo, sugerindo a necessidade de indutores específicos ou condições fermentativas mais direcionadas para maximização dessa enzima.

Sob a perspectiva ambiental e socioeconômica, o aproveitamento da farinha de semente de goiaba como substrato fermentativo configura-se como uma alternativa sustentável e alinhada aos princípios da economia circular, ao promover a redução do descarte inadequado de resíduos, a agregação de valor à cadeia produtiva da goiaba e o desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental. Além disso, a fermentação em estado sólido mostrou-se uma tecnologia adequada, de baixo

custo operacional e elevada eficiência, reforçando seu potencial de aplicação em escala industrial.

Dessa forma, conclui-se que a farinha de semente de goiaba constitui uma matéria-prima promissora para a produção de enzimas de interesse industrial por *Aspergillus niger*, contribuindo para o avanço do conhecimento científico na área de biotecnologia de resíduos agroindustriais. Os resultados obtidos fornecem subsídios importantes para o desenvolvimento de estudos futuros voltados à otimização em maior escala, à avaliação da estabilidade e aplicação das enzimas produzidas e à integração desse bioprocessos em cadeias produtivas sustentáveis, fortalecendo o aproveitamento integral dos subprodutos da fruticultura brasileira.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y., Wang, Z., & Lu, G. (2017) Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1):48. DOI doi.org/10.3390/ijms19010048.

Ahmed, N., Salem, S., & Hashem, A. (2021) Statistical Optimization, Partial Purification, and Characterization of Phytase Produced from *Talaromyces purpureogenus* NSA20 Using Potato Peel Waste and its Application in Dyes Decolorization. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(4): 4417 - 4431. DOI doi.org/10.33263/briac124.44174431.

Akhtar, K., Ain, N., Prasad, P., Naz, M., Aslam, M., Djalović, I., Riaz, M., Ahmad, S., Varshney, R., He, B., & Wen, R. (2024) Physiological, molecular, and environmental insights into plant nitrogen uptake, and metabolism under abiotic stresses. *The Plant Genome*, 17(2):20461. DOI doi.org/10.1002/tpg2.20461.

Alami, M., Shu, S., Liu, S., Alami, M., Feng, S., Mei, Z., Yang, G., & Wang, X. (2024) Impact of nitrogen rates on biosynthesis pathways: A comparative study of diterpene synthases in clerodane diterpenoids and enzymes in benzylisoquinoline alkaloids. *International journal of biological macromolecules*, 208(3):135985. DOI doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135985.

Alfarhan, A., Rajagopal, R., & Ponnuswamy, V. (2024) Valorization of unripe banana peel (Robusta) powder for the production of tannase using *Bacillus xiamenensis* in submerged fermentation. *BioResources*, 19(3): 5396–5412. DOI doi.org/10.15376/biores.19.3.5396-5412.

Alfenas, A.C; Mafia, R. G. (2007) *Métodos em Fitopatologia*. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais.

Ali, U., Anwar, Z., Hasan, S., Zafar, M., Zafar, N., Afzal, F., Khalid, W., Rahim, M., Mrabti, H., Al-Farga, A., & Eljeam, H. (2023) Bioprocessing and Screening of Indigenous Wastes for Hyper Production of Fungal Lipase. *Catalysts*, 13(5):853 DOI doi.org/10.3390/catal13050853.

Almeida, E. (2025) A participação das agroindústrias brasileiras e as projeções para 2025. Recuperado em :< <https://agropecfuturo.com.br/impacto-agroindustrias-pib-brasil/>>.

Almeida, K. D. (2023) Produção de lacases utilizando resíduos e coprodutos agroindustriais. Licenciatura em Química – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Apucarana – PR, 37p.

Almeida, P., Oliveira, A., Souza, G., Friedrich, J., Linde, G., Colauto, N., & Valle, J. (2018) Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 90 (4):3463-3473. DOI doi.org/10.1590/0001-3765201820170458.

Alves da Silva, C. J., & do Nascimento Malta, D. J. (2017) A importância dos fungos na biotecnologia. Caderno De Graduação - Ciências Biológicas E Da Saúde - UNIT - Pernambuco, 2(3):49. Recuperado de <https://periodicos.set.edu.br/unitsaude/article/view/3210>.

Andrade, P. M. L., Britto, J. S., Bezerra, C. O., Uetanabaro, A. P. T., & da Costa, A. M. (2016) Influência de Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de Tanase por Fungo Isolado de Cacau no Sul da Bahia. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC.

Angulo-López, J., Flores-Gallegos, A., Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, K., Martínez, G., & Aguilar, C. (2021) Guava (*Psidium guajava* L.) Fruit and Valorization of Industrialization By-Products. Processes, 9:1075. DOI doi.org/10.3390/pr9061075.

Araujo, T., & Silva, L. (2024) The Utilization of Central Composite Design for the Production of Hydrogel Blends for 3D Printing. Coatings, 14(10):1324. DOI doi.org/10.3390/coatings14101324.

Araújo, C., De Albuquerque, T., Sampaio, K., De Oliveira, J., Da Silva, J., Lima, M., Nascimento, Y., Da Silva, E., Da Silva, M., Tavares, J., De Souza, E., & De Oliveira, M. (2024) Fermenting Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and Guava (*Psidium guajava* L.) Fruit Processing Co-Products with Probiotic Lactobacilli to Produce Novel Potentially Synbiotic Circular Ingredients. Foods, 13(9): 1375. DOI doi.org/10.3390/foods13091375.

Arshad, R., Mohyuddin, A., Saeed, S., & Hassan, A. (2021) Optimized production of tannase and gallic acid from fruit seeds by solid state fermentation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18:911-918. DOI doi.org/10.4314/tjpr.v18i5.1.

Ashok, P., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Soccol, V.T. Production, purification and properties of microbial phytases, *Bioresource Technology* 77:203-214, DOI doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00139-5.

Assis, H. F., de Oliveira, D. B., de Moraes, L. P., de Castro Figueiredo, F., & Paixão, M. V. S. (2025) Composição centesimal e principais características químicas da farinha de resíduo do processamento agroindustrial de *Psidium guajava* L. *Aracê*, 7(2):7197-7207.

Astudillo, Á., Rubilar, O., Briceño, G., Diez, M., & Schalchli, H. (2023) Advances in Agroindustrial Waste as a Substrate for Obtaining Eco-Friendly Microbial Products. *Sustainability*, 15:3467. DOI doi.org/10.3390/su15043467.

Azevedo, A., Amin, M., Hadzima-Nyarko, M., Agwa, I., Zeyad, A., Tayeh, B., & Adesina, A. (2022) Possibilities for the application of agro-industrial wastes in cementitious materials: A brief review of the Brazilian perspective. *Cleaner Materials*, 3: 100040. DOI doi.org/10.1016/j.clema.2021.100040.

Bail, J. (2020) Lacase e suas aplicações biotecnológicas: Uma revisão. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, 14:21-30.

Barbosa, I. C. (2024) Resíduos agroindustriais da banana aplicados nas gerações de biocombustíveis: avaliação de pré-tratamento térmico em hidrólise ácida. *Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Rio Claro - SP*, 80p.

Bastos, A. (2015) Enzimas: a chave da biotecnologia. Embrapa: Recuperado em :<
<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8504625/enzimas-a-chave-da-biotecnologia>

Battestin, V. (2007) Produção, purificação, caracterização e aplicação da tanase de *Paecilomyces variotii*. *Doutorado em Ciência de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP*, 99p.

Belmares, R., Contreras-Esquivel, J., Rodriguez-Herrera, R., Coronel, A.R., Aguilar, C.N. (2004) Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 37(8): 857-864. DOI doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.002.

Besen, M., Neto, M., Cassim, B., Minato, E., Inoue, T., & Batista, M. (2021) Potential Waste Application of Several Industries Segments in Brazilian Agriculture: Effects on Physical and Chemical Soil Properties. *Communications*, 52(15):1721–1744. DOI doi.org/10.1080/00103624.2021.1892732

Bhattacharya, S. (2021) Central Composite Design for Response Surface Methodology and Its Application in Pharmacy. *Response Surface Methodology in Engineering Science* [Working Title]. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95835>.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8):911. DOI 10.1139/o59-099.

Bloot, A., Kalschne, D., Amaral, J., Baraldi, I., & Canan, C. (2021) A Review of Phytic Acid Sources, Obtention, and Applications. *Food Reviews International*, 39: 73-92. DOI doi.org/10.1080/87559129.2021.1906697.

Borges, L.R; Guimarães, A.D.B; Batista, F.E.R; Vasconcelos, V.O; Martins, A.F.L; Lima, W.J.N. (2017) Produção de fitase em fermentação sólida por *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* utilizando resíduos de frutas. II Simpósio de Engenharia de Alimentos UFMG, Montes Claros-Minas Gerais.

Borkertas, S., Viškelis, J., Viškelis, P., Štreimikytė, P., Gasiunaite, U., & Urbonavičienė, D. (2025) Fungal Biomass Fermentation: Valorizing the Food Industry's Waste. *Fermentation*, 11:351. DOI doi.org/10.3390/fermentation11060351.

Braghiroli, F., Amaral-Labat, G., Boss, A., Lacoste, C., & Pizzi, A. (2019) Tannin Gels and Their Carbon Derivatives: A Review. *Biomolecules*, 9: 587. DOI doi.org/10.3390/biom9100587.

Brandão, A. P. M. P., & Castro, V. N. B. D. (2024) A importância do zinco e da fitase na durabilidade da toxina botulínica: uma revisão bibliográfica. *Graduação em Biomedicina, Universidade Vila Velha – UVV, Vila Velha, ES.*

Braz, A. K. D. S. (2023) Imobilização de lacase em nanocompósitos magnéticos com potencial aplicação para remoção de corantes em efluente têxtil. Doutorado em Engenharia Civil, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE. 146p.

Broch, J., Sangalli, G. G., Savaris, V. D. L., & Nunes, R. V. (2020) Fitase e seus efeitos extra fosfóricos em dietas para frangos de corte: revisão. *Agropecuária Catarinense*, 33(1): 68–72.

Brum, A.A.S; Arruda,L.F; Regitano-d’Arce, M.A. (2009) Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Quim. Nova*, 32(4):849-854.

Buswell, J.A.; Cai, Y. J.; Chang. S. T. (1995) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus)* edodes. *FEMS Microbiology Letters*, 128(15):81-87.

Cabral, E.V.S; Andrade, E.S.P; Silva, A.S; Morais, M.L.A; Sousa, A.F.A. (2024) Produção de enzimas celulolíticas por *Paecilomyces tp08 sp.* utilizando engaço de uva e farelo de trigo como substratos em cultivo em estado sólido. *Revista de Gestão Social e Ambiental*, 18:1981-982 DOI doi.org/10.24857/rgsa.v18n10-025.

Caetano, L.C.S., Costa, A.F.S., Costa, A.N. 2024. *Tecnologias para a produção de goiaba.. – 2. ed.*, Vitória, ES: Incaper, 368 p.

Campos, A. D. O. (2022) Produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* CCT2768 por fermentação em estado sólido usando fibra de coco verde (*Cocos nucifera*) pré-tratada por explosão a vapor como substrato. Graduação em Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal, RN, 86p.Cavalcante, D. S., Carvalho, T., Pinto, M. C. C., Cipolatti, E. P., & Manoel, E. A. (2021). Utilização de lipases imobilizadas na indústria farmacêutica. *Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente*, 2(3): 12. DOI doi.org/10.51189/rema/1336.

Cavalcante, R.B.M., Ferro, M.L.C.R., Machado, R.S., Dias, T., Ferreira, T.A.P.C.(2019) Composição centesimal determinada e a declarada de pães de queijo de diferentes marcas. *Revista Desafios*, 6:79-85.

Cavalcanti, R.M.F., Guimarães, L.H.S. (2021) Produção e caracterização parcial de tanase pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* ANG18 em fermentação em estado sólido. Revista Saúde e Ciência Online, 7(2):502.

Ceregatti, G. (2022) Valorização de resíduos agroindustriais na forma de produtos com alto valor nutricional. Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC. 34p.

Chauhan, P., Goradia, B., & Saxena, A. (2017) Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. 3 Biotech, 7:1-20. DOI doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7.

Chen, J., Wang, Y., Guo, X., Rao, D., Zhou, W., Zheng, P., Sun, J., & , Y. (2020) Efficient bioproduction of 5-aminolevulinic acid, a promising biostimulant and nutrient, from renewable bioresources by engineered *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnology for Biofuels, 10:13-41. DOI doi.org/10.1186/s13068-020-01685-0.

Chen, M., Li, Q., Liu, C., Meng, E., & Zhang, B. (2025) Microbial Degradation of Lignocellulose for Sustainable Biomass Utilization and Future Research Perspectives, 17(9):4223. Sustainability. DOI doi.org/10.3390/su17094223.

Chen, Y., Dong, L., Alam, M., Pardeshi, L., Miao, Z., Wang, F., Tan, K., Hynes, M., Kelly, J., & Wong, K. (2022) Carbon Catabolite Repression Governs Diverse Physiological Processes and Development in *Aspergillus nidulans*. mBio, 13. DOI doi.org/10.1128/mbio.03734-21.

Chávez-González, M., Rodríguez-Durán, L., Balagurusamy, N., Prado-Barragan, A., Rodríguez, R., Contreras, J., & Aguilar, C. (2012) Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. Food and Bioprocess Technology, 5:445-459. DOI doi.org/10.1007/s11947-011-0608-5.

Conto, L.C; Lovatel, A.C & Lunardi, W. (2025) Comparação físico-química entre cervejas do tipo American Pale Ale com e sem adição de enzima clarificante. RTC – Revista técnico-científica do IFSC, 15. II Simpósio Catarinense do Campo à Mesa. ISSN: 2316-8382

Contesini, F.J., Melo, R.R., Sato, H.H. (2018) An overview of Bacillus proteases: from production to application. Critical Reviews In Biotechnology, 38(3):321:334.

Corbu, V., Gheorghe-Barbu, I., Dumbravă, A., Vrâncianu, C., & Şesan, T. (2023) Current Insights in Fungal Importance-A Comprehensive Review. *Microorganism*, 11. DOI doi.org/10.3390/microorganisms11061384.

Correa, A. D. S., Fischer, J., & Marques, D. O. (2022) Estudo da utilização de lacase no tratamento de efluentes gerados no beneficiamento de gemas: uma revisão Study of the use of laccase in the treatment of effluents generated in the processing of yolks: a review. *Brazilian Journal of Development*, 8(3): 17424-17439.

Costa, K. S. (2024) Elaboração de pão doce com adição do resíduo industrial de polpa de goiaba. *Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, RN*. 65p.

Costa, T., Spencer, P., Souza, M., Rocha, A., Nelson, D., Pinto, N., & Benassi, V. (2021) Standardization of the cultivation of the isolated filamentous fungus a4 for lipase production. *Conhecimentos contemporâneos ligados a ciências agrárias*, 1:139-159. DOI doi.org/10.35587/brj.ed.0000969.

Crescimento da economia brasileira é impulsionado pelo agro no primeiro trimestre (2025). Ministério da Agricultura e pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/crescimento-da-economia-brasileira-e-impulsionado-pelo-agro-no-primeiro-trimestre>. Acesso em 17 de dezembro de 2025.

Cruz, I., Cruz-Magalhães, V., Loguercio, L., Santos, L., Uetanabaro, A., & Costa, A. (2024) A systematic study on the characteristics and applications of laccases produced by fungi: insights on their potential for biotechnologies. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 54: 896 - 909. DOI doi.org/10.1080/10826068.2023.2297697.

Czaja, T., Sobota, A., & Szostak, R. (2020). Quantification of Ash and Moisture in Wheat Flour by Raman Spectroscopy. *Foods*, 9. DOI doi.org/10.3390/foods9030280.

D'Souza, P., K., Mansy., T.C., Preethy., & S., Gunashree. (2022) *Tamarindus indica* seed induced tannase production from *Aspergillus niger*. *Biomedicine*, 42(4):752-756. DOI doi.org/10.51248/.v42i4.1794.

De Alencar Guimarães, N., Glienke, N., Galeano, R., Ruller, R., Zanoelo, F., Masui, D., & Giannesi, G. (2022) Poligalacturonase de *Aspergillus japonicus* (PGAj): Produção de enzima utilizando fonte de carbono de baixo custo, propriedades bioquímicas e aplicação na clarificação de sucos de frutas. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. DOI doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102233.

De Assis, L., Silva, L., Bayram, O., Dowling, P., Kniemeyer, O., Krüger, T., Brakhage, A., Chen, Y., Dong, L., Tan, K., Wong, K., Ries, L., & Goldman, G. (2021) Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi Is Regulated by Phosphorylation of the Transcription Factor CreA. *mBio*, 12. DOI doi.org/10.1128/mbio.03146-20.

De Lima, C., Koelher, B., Da Silva, E., Góes-Neto, A., Rezende, R., Uetanabaro, A., & Da Costa, A. (2022) *Pestalotiopsis mangiferae* isolada de folhas de cacau e produção concomitante de tanase e ácido gálico. *Biologia fúngica*, 126 (8):471-479. DOI doi.org/10.1016/j.funbio.2022.04.001.

De Oliveira, P. V. P., & Damiani, G. V. (2024) Tratamento da vinhaça de cana de açúcar com *Bacillus subtilis* durante 72 horas. *Brazilian Journal of Development*, 10(1): 1012-1020.

De Pina Santos, J. C., Yonemura, C. H., Munhoz, I., & Tescarollo, I. L. (2023) Aproveitamento das sementes de goiaba na produção de cosméticos esfoliantes. *Ensaio USF*, 7(2):34-46. DOI doi.org/10.24933/e-usf.v7i2.354.

Denti, A. F., Polina, C. C., Vanz, J., Bernardi, J. L., Raisel, L. B., Palavicini, S. M. S., & Backes, G. T. (2022) Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. *Revista Perspectiva*, 46(175): 51-68.

Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Kiela, P., Salamon, A., Barberán, A., Chen, Y., Yang, F., Błaszczuk, M., & Sikora, A. (2021) Dynamics of dark fermentation microbial communities in the light of lactate and butyrate production. *Microbiome*, 9. DOI doi.org/10.1186/s40168-021-01105-x.

Dherbassy, Q., Mayer, R., & Moran, J. (2024) Coenzymes in a pre-enzymatic metabolism. *Chemistry*, 10. DOI doi.org/10.1126/sciadv.adr5357.

Dias, A. C. F. (2016) Transformações do nitrogênio no solo. *In: Cardoso, E.J., Andreote, F.D. Microbiologia do solo*. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, 99-109.

Dods, R. (2020) The Amino Acid Sequences of Proteins Determine Folding and Non-folding. *Concepts in Bioscience Engineering*, 37-83. DOI doi.org/10.1007/978-3-030-28303-2_2

Dos Santos Ferreira, J. V., Neves, A. G. D., da Silva Batista, J. M., da Costa, R. M. P. B., & Porto, A. L. F. (2022) Seleção e produção de lacases a partir da fermentação em estado sólido de fungos filamentosos. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 3:1-7.

Dos Santos, T. S. (2021) Aproveitamento de sementes de goiaba e/ou cajá na obtenção de fotocatalisadores baseados em óxido de ferro. Mestrado em Química Aplicada - Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Salvador, BA. 67p.

Elkhateeb, Y., & Fadel, M. (2022) Bioinformatic Studies, Experimental Validation of Phytase Production and Optimization of Fermentation Conditions for Enhancing Phytase Enzyme Production by Different Microorganisms under Solid-State Fermentation. *The Open Microbiology Journal*, 16. DOI doi.org/10.2174/18742858

Fang, X., Du, M., Liu, T., Fang, Q., Liao, Z., Zhong, Q., Chen, J., Meng, X., Zhou, S., & Wang, J. (2019) Changes in the Biotransformation of Green Tea Catechins Induced by Different Carbon and Nitrogen Sources in *Aspergillus niger* RAF106. *Frontiers in Microbiology*, 10. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2019.02521

Farías, S., Gervin, V., Silveira, I., & Amante, E. (2020) Drying and Properties of Solid Residue from Guava (*Psidium guajava*) Pulp Processing. *Journal of Food Nutrition and Metabolism*, 3:2-9. DOI doi.org/10.31487/j.jfnm.2020.02.07

Fernandes, A. L. (2021) Enzimas Lignocelulolíticas e seu Potencial para Tratamento de Biomassa: uma Revisão. Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal da Integração Latino Americana – UNILA – Foz do Iguaçu, PR. 50p.

Ferreira, L. R. (2008) Estudo da especificidade da tanase de *Paecilomyces variotii* e sua aplicação na biotransformação dos polifenóis do suco de laranja. Mestrado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP. 184p.

Franco Denti, A., Chies Polina, C., Vanz, J., Lisboa Bernardi, J., Raisal. L. B., Schenatto Palavicini, S. M., Backes, G. T. (2022) Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. *Revista Perspectiva*, 46(175): 51-68. DOI doi.org/10.31512/persp.v.46.n.175.2022.251.p.51-68

Franzino, T., Boubakri, H., Cernava, T., Abrouk, D., Achouak, W., Reverchon, S., Nasser, W., & Haichar, F. (2021) Implications of carbon catabolite repression for plant-microbe interactions. *Plant Communications*, 3. DOI doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100272.

Galeano, E., Vinha, M., Maestri, D. (2024) Processamento da goiaba na agroindústria familiar. *In: Caetano, L.C.S., Costa, A.F.S., Costa, A.N (ed) Tecnologias para produção de goiaba. Vitória: Incaper, p.327-368.*

Galvani, F; Gaertner. E. (2006) Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. Circular técnica 63 Embrapa Pantanal ,1517-1965.

Gaur, V., Sharma, P., Sirohi, R., Awasthi, M., Dussap, C., & Pandey, A. (2020) Assessing the impact of industrial waste on environment and mitigation strategies: A comprehensive review. *Journal of Hazard Materials*, 398: 123019. DOI doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123019.

Giacobbe, S., Pezzella, C., Sannia, G., & Piscitelli, A. (2020) Old Enzymes at the Forefront of Lignocellulosic Waste Valorization. *Springer Nature*, 33: 57-78. DOI doi.org/10.1007/978-3-030-47906-0_3.

Gimenez, V. U., da Graça, J. L., da Costa, M. A. L., Junior, D. M., de Oliveira Júnior, J. M., & Hanai-Yoshida, V. M. (2024) Compostagem em escala piloto para resíduo sólido orgânico gerando biofertilizantes sólidos e líquidos e material de forração. *Research, Society and Development*, 13(3). DOI doi.org/10.33448/rsd-v13i3.45195

Golveia, J. C. S., SANTIAGO, M. F., BARA, M. T. F., & MEDRADO, L. C. D. L.(2021) Resíduos agroindustriais substituindo indutores sintéticos na produção de lacase fúngica. *In: Schimidt, F., Neto, C.M.S. Meio ambiente e desenvolvimento sustentável. Goiânia: Editora IFG, p 95.*

Gouveia, M.J; Mello, M.R.F; Bernades, T.G; Leite, T.C.C; Sena, A.R. (2022) Aplicação de tanase obtida de *Aspergillus tamaritii* URM 7115 e seu efeito em suco de caju integral. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 10(1): 26-33. DOI doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v10n1.gouveia

Gonçalves, A. S., Nunes, T. R., Pessoa, K. D. A. R., & Oliveira, P. C. C. (2020) II-108- Estudo de diferentes fontes de nitrogênio na produção enzimática de lactase com água residuária sintética da indústria de laticínios por *Aspergillus ax*. Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária, 19, Recife: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Gonçalves, A. V. (2021) Utilização de farelo de goiaba na alimentação de leitões na fase de creche. Graduação em Agronomia – Instituto Federal do Espírito santo – IFES, Colatina, ES. 30p.

Greiner, R. et al. (2013) Production of partially phosphorylated myo-inositol phosphates using phytases immobilised on magnetic nanoparticles. *Bioresource Technology*, 142:375-383. DOI doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.056

Greses, Tomás-Pejó, E., & González-Fernández, C. (2020) Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. *Biouresource Technology*, 122486. DOI doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122486.

Guengerich, F. (2018) Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS Catal*, 8 (12) :10964-10976. DOI doi.org/10.1021/ACSCATAL.8B03401.

Guimarães, A. D. B., Borges, L. L. R., Batista, F. É. R., de Oliveira Vasconcelos, V., Martins, A. F. L., & Lima, W. J. N. (2017) Produção de fitase por fermentação em estado sólido utilizando resíduos de frutas e *Aspergillus awamori*. Simpósio de Engenharia de Alimentos da UFMG-SIMEALI.

Guizani, C., Widsten, P., Siipola, V., Paalijärvi, R., Berg, J., Pasanen, A., Kalliola, A., & Torvinen, K. (2023) New insights into the chemical activation of lignins and tannins using K₂CO₃—a combined thermoanalytical and structural study. *Carbon Letters*, 34: 371-386. DOI doi.org/10.1007/s42823-023-00601-4.

Gusmerotti, N., Corsini, F., Borghini, A., & Frey, M. (2018) Assesing the role of preparation strategies by analytical hierarchical process: suggestions for na management supply chain. *Environment, Development and Sustainability*, 21: 2773-2792. DOI doi.org/10.1007/s10668-018-0160-9.

Haim, A., Neubacher, S., & Grossmann, T. (2021) Protein Macrocyclization for Tertiary Structure Stabilization. *Chembiochem*, 22: 2672-2679. DOI doi.org/10.1002/cbic.202100111.

Heuermann, D., Hahn, H., & Von Wirén, N. (2021). Seed Yield and Nitrogen Efficiency in Oilseed Rape After Ammonium Nitrate or Urea Fertilization. *Frontiers in Plant Science*, 11. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.608785>.

Huang, J., Wang, J., Chen, L., He, J., Wu, Y., Cui, X., Mei, M., & Li, Y. (2024) Improved Expression of *Cerrena unicolor* Laccase in *Aspergillus niger* via Combined Strategies and Its Applications. *Biochemical Engineering Journal*, 209:109371 DOI doi.org/10.1016/j.bej.2024.109371. Produção Agrícola Municipal 2024. IBGE.

Iram, A., Cekmecelioglu, D., & Demirci, A. (2021) Optimization of the fermentation parameters to maximize the production of cellulases and xylanases using DDGS as the main feedstock in stirred tank bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45. DOI doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102514.

Islam, M., Rehman, S., Guan, J., Lau, C., Tse, H., Yeung, C., & Leu, S. (2021) Biphasic pretreatment for energy and carbon efficient conversion of lignocellulose into bioenergy and reactive lignin. *Applied Energy*, 303. DOI doi.org/10.1016/j.apenergy.2021.117653.

Jatuwong, K., Suwannarach, N., Kumla, J., Penkhrue, W., Kakumyan, P., & Lumyong, S. (2020) Bioprocess for Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Fungal Phytases. *Frontiers in Microbiology*, 11. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2020.00188.

Jesus Martins, N., de Araújo, P. H. G., de Souza, T. V. F., Colares, K. T. P., Marinho, B. M., Cardoso, P. G., & da Costa Souza, P. N. (2021) Seleção e avaliação da produção de tanase por fungos filamentosos em fermentação submersa utilizando resíduos agrícolas Selection and evaluation of tannase production by filamentous fungi in submerged fermentation using agricultural residues. *Brazilian Journal of Development*, 7(7):71520-71535.

Jian, S., Wan, S., Lin, Y., & Zhong, C. (2024) Nitrogen Sources Reprogram Carbon and Nitrogen Metabolism to Promote Andrographolide Biosynthesis in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees Seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 25. DOI doi.org/10.3390/ijms25073990.

Jiao, W., Blackmore, N., Nazmi, A., & Parker, E. (2017) Quaternary structure is an essential component that contributes to the sophisticated allosteric regulation mechanism in a key enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE, 12. DOI doi.org/10.1371/journal.pone.0180052.

Joshi, A., Verma, K., Rajput, V., Minkina, T., & Arora, J. (2022) Recent advances in metabolic engineering of microorganisms for advancing lignocellulose-derived biofuels. Bioengineered, 13:8135-8163. DOI doi.org/10.1080/21655979.2022.2051856.

Juliano, L.C.D.V (2025) Potencial de produção de tanase e fitase por *Aspergillus niger* utilizando resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólidos. Mestrado em Ciências Naturais – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 93p.

Júnior, Sérgio Dantas de Oliveira. (2014) Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de de caju como substratos. Mestrado em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal – RN, 121p.

Kato, H., Miura, D., Kato, M., & Shimizu, M. (2024) Metabolic mechanism of lignin-derived aromatics in white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol, 108. DOI doi.org/10.1007/s00253-024-13371-4.

Keil, F. (2018) Molecular Modelling for Reactor Design. Rev Chem Biomol Eng, 9:201-227. DOI doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060817-084141

Khaswal, A., Mishra, S., Chaturvedi, N., Paul, P., Singh, R., Roy, A., Pandit, C., Raja, V., & Verma, D. (2024) Optimization of process parameters using response surface methodology (RSM) for laccase enzyme production using *Aspergillus nidulans* in solid state fermentation utilizing agro-industrial waste. Journal of Integrated Science and Technology, 12:777. DOI https://doi.org/10.62110/sciencein.jist.2024.v12.777.

Krut, UA; Myasoedova, NM; Shaidorova, GM; Radchenko, AI; Kuzubova, EV. (2024) Testing for the ability to modify antibiotics of *Panus tigrinus* 8/18 *Lentinus strigosus* 1566 laccase. Revista Brasileira de Biologia, 84. DOI doi.org/10.1590/1519-6984.257071.

Kumar, M., Rana, S., Beniwal, V., & Salar, R. (2015) Optimization of tannase production by a novel *Klebsiella pneumoniae* KP715242 using central composite design. *Biotechnology Reports*, 7:128 - 134. DOI doi.org/10.1016/j.btre.2015.06.002.

Kushwaha, V., Patil, J., Nikalje, G., & Yadav, L. (2025) Exploration of Mangrove Endophytes as Novel Sources of Tannase Producing Fungi. *Journal of Fungi*, 11. DOI doi.org/10.3390/jof11050366.

Latif A, Ali H, Niazi MBK, Jahan Z, Hassan N, Ghuman IL, et al. (2025) Process evaluation for enhanced production of aflatoxinfree citric acid by food-grade *Aspergillus niger*. *PLoS One* 20(5): 321972. DOI doi.org/10.1371/journal.pone.0321972.

Lehninger, A.L. 2002. *Lehninger principios de bioquímica*. In: Nelson, D.L., Cox, M.M.; traduzido por Simões, A.A., Lodi, W.R.N. 3 ed. São Paulo, 971p.

Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020) Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme Productions. *Biotechnology advances*, 107630. DOI doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630.

Liang, Y., Long, Z., Zhang, Y., Luo, C., Yan, L., Gao, W., & Li, H. (2021) The Chemical mechanisms of the enzymes in the branched-chain amino acids biosynthetic pathway and their applications. *Biochimie*, 184:72-87. DOI doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.008.

Lima, G., Schoenherr, Z., Magalhães, W., Tavares, L., & Helm, C. (2020) Enzymatic activities and analysis of a mycelium-based composite formation using peach palm (*Bactris gasipaes*) residues on *Lentinula edodes*. *Bioresources and Bioprocessing*, 7: 1-17. DOI doi.org/10.1186/s40643-020-00346-2.

Lima de Sá, K.A. (2018) Digestibilidade nutricional e energética do resíduo de goiaba e do feno de *Moringa oleífera* para suínos em crescimento. Mestrado em Zootecnia - Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife-PE, 57p.

Lima, M.B. (2012) Avaliação do efeito da adição de fontes nitrogenadas e de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase por *Aspergillus*. Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP, 80p.

Lira, RC; Rabello, CBV; Pereira da Silva, E.; Vanderlei Ferreira, P.; Mohaupt Marques Ludke, M. do C.; Costa, EV, (2011) Composição química e valor energético de resíduos de goiaba e tomate para frangos de corte de diferentes idades. *Rev. Brás. Zootec.*, 40 (5): 1019-1024

Loi, M., Glazunova, O., Fedorova, T., Logrieco, A., & Mulè, G. (2021) Lacases fúngicas: a vanguarda das enzimas para a sustentabilidade. *Journal of Fungi*, 7. DOI doi.org/10.3390/jof7121048.

Lourenço, J. M. (2022) Utilização de enzimas nos processos industriais para fabricação de cervejas. *Graduação em Biomedicina – Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma – SC, 28p.*

Lutz, A. (2008) Métodos físico-químicos para análise de alimentos. *In: Zenebon, O., Pascuet, N.S., Tiglea, P. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 1000p.*

Macedo, G.A., Matsuda, L.K., Battestin, V. (2005) Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciência e Agrotecnologia*, 29(4).

Maia, M. M. S. (2024) Simulação da transferência de calor e massa na produção de celulases por fermentação em estado sólido em biorreator de bandejas. *Mestrado em Agroenergia – Universidade Federal do Tocantins – UFT, Palmas – TO, 67p.*

Mannaa, M., Han, G., Seo, Y., & Park, I. (2021) Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota. *Foods*, 10. DOI doi.org/10.3390/foods10112861.

Maran, E. M. (2025) Fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais: Aplicação para obtenção de biscoitos. *Graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 81p.*

Martin, José Guilherme Prado; De Dea Lindner, Juliano. (2022) *Microbiologia de alimentos fermentados*. 1. ed. São Paulo: Blucher, 704p.

Martinelli, G. L. (2025) Adição de fitase concentrada na alimentação de suínos na fase de crescimento e terminação (25 a 135 kg). *Mestrado em Zootecnia – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Marechal Candido Randon – PR, 62.*

Martín, C., & Castro, E. (2024) Special Issue "Pretreatment and Bioconversion of Crop Residues II" —Introduction to the Collection. *Agronomy*, 14 (5):962. DOI doi.org/10.3390/agronomy14050962.

Martins, N.J., Araújo, P.H.G., Souza, T.V.F., Colares, K.T.P., Marinho, B.M., Cardoso, P.G., Souza, P.N.C. (2021) Seleção e avaliação da produção de tanase por fungos filamentosos em fermentação submersa utilizando resíduos agrícolas. *Brazilian Journal of Development*, 7(7): 71520-71535.

Maseko, K., Regnier, T., Wokadala, O., Bartels, P., & Meiring, B. (2024) Effect of Culture Media on the Yield and Protein Content of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm Mycelia. *International Journal of Food Science*, 2024(1):14. DOI doi.org/10.1155/ijfo/5562732.

Matei, J. C., Oliveira, J. A. dos S., Pamphile, J. A., & Polonio, J. C. (2021) Agro-industrial wastes for biotechnological production as potential substrates to obtain fungal enzymes. *Ciência e Natura*, 43:72. DOI doi.org/10.5902/2179460X63133

Miao, J., Wang, M., , L., Li, T., Huang, Q., Liu, D., & Shen, Q. (2019) Effects of amino acids on the lignocellulose degradation by *Aspergillus fumigatus* Z5: insights into performance, transcriptional, and proteomic profiles. *Biotechnology for Biofuels*, 12. DOI doi.org/10.1186/s13068-018-1350-2.

Michielse, C., Pfanmüller, A., Macios, M., Rengers, P., Dzikowska, A., Dzikowska, A., & Tudzynski, B. (2014) A interação entre os fatores de transcrição GATA AreA, o regulador global de nitrogênio e AreB em *Fusarium fujikuroi*. *Microbiologia Molecular*, 91. DOI doi.org/10.1111/mmi.12472.

Mohamed, A., Balbool, B., & Abdel-Azeem, A. (2021) *Aspergillus* from diferentes habitats and their industrial applications. *In: Abdel-Azeem, AM, Yadav, AN, Yadav, N., Usmani, Z.* 1 ed. *Industrially Important Fungi for Sustainable Development*. Nova York. Spring Nature, p.85-106.

Monteiro, P. S., de Melo, R. R., Tavares, M. P., Falkoski, D. L., Guimarães, V. M., Pereira, O. L., & de Rezende, S. T. (2012) Otimização da produção, caracterização e avaliação da fitase de *Rhizopus stolonifer* na hidrólise de fitato em ração animal. *Current Agricultural Science and Technology*, 18(2): 117-132.

Mora-Gamboa, M., Ferrucho-Calle, M., Ardila-Leal, L., Rojas-Ojeda, L., Galindo, J., Poutou-Piñales, R., Pedroza-Rodríguez, A., & Quevedo-Hidalgo, B. (2023) Statistical Improvement of rGILCC 1 and rPOXA 1B Laccases Activity Assay Conditions Supported by Molecular Dynamics. *Molecules*, 28. DOI doi.org/10.3390/molecules28217263.

Muthukumarasamy, N., Jackson, B., Raj, A., & Sevanan, M. (2015) Production of Extracellular Laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 Using Agroresidues as a Potential Substrate. *Biochemistry Research International*, 2015: 765190. <https://doi.org/10.1155/2015/765190>.

Naidu, R., Saisubramanian, N., Sivasubramanian, S., Selvakumar, D., Janardhanan, S., & Puvanakrishnan, R. (2008) Optimization of tannase production from *Aspergillus foetidus* using statistical design methods. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2:523-530.

Naranjo-Ortiz, M., & Gabaldón, T. (2019) Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 94:1443-1476. DOI doi.org/10.1111/brv.12510.

Narayanan, M., Suresh, K., Obaid, S., Alagarsamy, P., & Nguyen, C. (2024) Statistical optimized production of Phytase from *Hanseniaspora guilliermondii* S1 and studies on purification, homology modelling and growth promotion effect. *Environmental Research*, 118898. DOI doi.org/10.1016/j.envres.2024.118898.

Nascimento, F.W.B; Franco, C.R (2015) Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. *Ver. Virtual Química* 7 (6), 1968-1987.

Nascimento, J.C.S. (2011) Produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. Mestrado em Biociência Animal – Universidade Federal Rural do Pernambuco – UFRPE – Recife – PE, 116p.

Nascimento, J., Da Fonseca Filho, L., Silva, R., De Albuquerque, P., De Sousa Brito Pereira, L., Costa, C., Melo, F., Nascimento, J., Amorim, M., & Porto, A. (2017). Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de fitase para inclusão na alimentação animal. *Pubvet* 12:1-7. DOI doi.org/10.22256/pubvet.v12n3a56.1-7.

Nascimento, K.B., Martins, A.G.R., Takaki, G.M.C., Silva, C.A.A., Okada, k. (2014) Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus sp* isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. *Revista e-xacta*, 7, (1):95-103.

Nasser, PP et al. (2003) Implicações do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *circumdati* e produção de ocratoxina A. *Ciênc. Agrotec*,27(5):1172-1175.

O que é agroindústria? (2021). Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/agroindustria/o-que-e-agroindustria>. Acesso em 17 de dezembro de 2025

Oliveira, A. C. R., & Lemes, F. M. (2025). Fermentação em estado sólido: controle de variáveis sob uma perspectiva biotecnológica. *In*: Martins, W.F., Pinto, E. G., Soares, D.S.B. *Tecnologia de fermentação de alimentos: avanços científicos e inovações tecnológicas*. 1 ed. São Paulo: Editora Científica Digital, p.45-64.

Oliveira, B. L. D. S. (2022) Acompanhamento de tratamentos enzimáticos na indústria têxtil. Mestrado em Engenharia Química e Biológica – Universidade do Minho – MHIP, Braga – Portugal, 76p.

Oliveira, J., Da Silva, J., Lima, M., Nascimento, Y., Da Silva, E., Da Silva, M., Tavares, J., De Souza, E., & De Oliveira, M. (2024) Fermenting Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and Guava (*Psidium guajava* L.) Fruit Processing Co-Products with Probiotic Lactobacilli to Produce Novel Potentially Synbiotic Circular Ingredients. *Foods*, 13. DOI doi.org/10.3390/foods13091375.

Oliveira, L., Oliveira, D., Bezerra, B., Pereira, B., & Battistelle, R. (2017) Análise ambiental do tratamento de resíduos orgânicos com foco em cenários de compostagem. *Journal of Cleaner Production*, 155:229-237. DOI doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2016.08.093.

Oliveira, S.D. (2024) Perfil nutricional e bioativo de subprodutos do processamento de acerola e goiaba fermentados espontaneamente e suas farinhas. Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB, 77p.

Pacheco, T.F., Mendes, T.D. (2021) Guia prático para caracterização de enzimas. 1 ed. Brasília: Embrapa Agroenergia, 58p.

Pannell, D. (2017) Economic perspectives on nitrogen in farming systems: managing trade-offs between production, risk and the environment. *Soil Research*, 55:473-478. DOI doi.org/10.1071/SR16284.

Panwar, V., Lzaod, S., & Dutta, T. (2023) Thermostable Bacterial Laccase: Catalytic Properties and Its Application in Biotransformation of Emerging Pollutants. *ACS Omega*, 8:34710 - 34719. DOI doi.org/10.1021/acsomega.3c03627.

Papadaki, E., & Mantzouridou, F. (2023) Application of *Aspergillus niger* for Extracellular Tannase and Gallic Acid Production in Non-sterile Table Olive Processing Wastewaters. *Waste and Biomass Valorization*, 15(2):1-14. DOI doi.org/10.1007/s12649-023-02242-0.

Pavan, L. G. (2024) Refino de papel e branqueamento de celulose: indústria e biotecnologia. Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara – SP, 51p.

Pereira, B., De Freitas, C., Vieira, R., & Brienzo, M. (2022) Produção de banana, goiaba e laranja brasileiras e seus resíduos como potencial matéria-prima para biorrefinarias. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 24:2126 - 2140. DOI doi.org/10.1007/s10163-022-01495-6.

Pereira, B., Schmatz, A., De Freitas, C., Masarin, F., & Brienzo, M. (2023) Fruit and Restaurant Waste Polysaccharides Recycling Producing Xylooligosaccharides. *Recycling*, 8:16. DOI doi.org/10.3390/recycling8010016.

Perwez, M., & Asheh, S. (2024) Valorization of agro-industrial waste through solid-state fermentation: Mini review. *Biotechnology Reports*, 45. H-DOI doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00873.

Pham, L., Deng, K., Choudhary, H., Northen, T., Singer, S., Adams, P., Simmons, B., & Sale, K. (2024) An Engineered Laccase from *Fomitiporia mediterranea* Accelerates Lignocellulose Degradation. *Biomolecules*, 14. DOI doi.org/10.3390/biom14030324.

Pinto, G. A. S., Couri, S., Leite, S. G. F., & Brito, E. S. (2005) Tanase: conceitos, produção e aplicação. *Bol Cent Pesqui Process Aliment*, 23(2):435-462.

Pires, E. B. E. (2016) Produção e caracterização parcial de fitases fúngicas utilizando resíduos agroindustriais. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa- MG, 66p.

Putri, D., Khootama, A., Perdani, M., Utami, T., & Hermansyah, H. (2020) Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. *Energy Reports*, 6:331-335. DOI doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064.

Praveen, M., & Brogi, S. (2025) Microbial Fermentation in Food and Beverage Industries: Innovations, Challenges, and Opportunities. *Foods*, 14. DOI /doi.org/10.3390/foods14010114.

Produção de Goiaba 2025. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/goiaba/br>. Acesso em 17 de dezembro de 2025.

Produção Agrícola Municipal 2024. IBGE. Disponível em: genciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/44465-pam-2024-com-queda-nos-precos-e-na-safra-de-graos-valor-da-producao-agricola-cai-pelo-segundo-ano-seguido. Acesso em 17 de dezembro de 2025.

Rahayu, A., Utama, P., Nurulita, Y., Miranti, M., & Nugroho, T. (2019) Surfactant, Nitrogen and Carbon Media Optimization for *Trichoderma Asperillum* LBKURCC1 Laccase Production by Flask Solid State Fermentation of Rice Straw. *Journal of Physics: Conference Series*, 1351. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1351/1/012030>.

Raper, B.K; Fenell, D.L. (1965) *The Genus Aspergillus*. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 686p.

Resultados e impactos positivos da pesquisa agropecuária na economia, no meio ambiente e na mesa do brasileiro. Sobre a Embrapa – Ciência que transforma 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira>. Acesso em 15 de dezembro de 2025.

Rigo, D., Gayeski, L., Tres, G. A., Camera, F. D., Zeni, J., Valduga, E., Backes, G. T. (2021) Produção microbiológica de enzimas: Uma revisão. *Brazilian Journal of Development*, 7(1):9232-9254.

Rivas, B., Rodríguez, H., Anguita, J., & Muñoz, R. (2018) Tanases bacterianas: classificação e propriedades bioquímicas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:603-623. DOI doi.org/10.1007/s00253-018-9519-y.

Roberto, B. S., da SILVA, L. P., Macagnan, F. T., Bizzani, M., & Bender, A. B. B. (2015) Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais formuladas com casca e semente de goiaba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 74(1):39-48.

Rodrigues, E. M. G. (2021) Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido. *Bioenergia em Revista: Diálogos*, 11(1):46-57.

Rosa, JMA e Pinheiro, IR (2021) Planejamento Experimental DCCR aplicando a Hidrólise Enzimática do bagaço de Laranja empregando as enzimas Celulases e Pectinases. *Revista Brasileira de Desenvolvimento*, 7 (1):3191-3208.

Rüllke, M., Meyer, F., Schmitz, K., Blase, H., Tamayo, E., & Benz, J. (2024) A novel luciferase-based reporter tool to monitor the dynamics of carbon catabolite repression in filamentous fungi. *Microbial Biotechnology*, 17. DOI doi.org/10.1111/1751-7915.70012.

Saad, M., Saad, A., Hassan, H., Ibrahim, E., Abdelraof, M., & Ali, B. (2023) Optimization of tannase production by *Aspergillus glaucus* in solid-state fermentation of black tea waste. *Bioresources and Bioprocessing*, 10. DOI doi.org/10.1186/s40643-023-00686-9.

Sadaf, N., Haider, M., Iqbal, N., Abualreesh, M., & Alatawi, A. (2022) Harnessing the Phytase Production Potential of Soil-Borne Fungi from Wastewater Irrigated Fields Based on Eco-Cultural Optimization under Shake Flask Method. *Agricultura*, 12:103. DOI doi.org/10.3390/agriculture12010103.

Sadh, P., Duhan, S., & Duhan, J. (2025) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5:1- 15. DOI doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z.

Safdar, A., Ismail, F., & Imran, M. (2024) Biodegradation of synthetic plastics by the extracellular lipase of *Aspergillus niger*. *Environmental Advances*, 17. DOI doi.org/10.1016/j.envadv.2024.100563

Sampaio, N., Júnior, J., Da Glória De Almeida, M., De Abreu, L., & Cardoso, R. (2024) Applications of Factor Analysis and Response Surface Methodology in Chemical Process Optimization Problems. *International Journal of Professional Business Review*, 9:1-14. DOI doi.org/10.26668/businessreview/2024.v9i1.4284.

Sampaio, P. R. (2018) Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção da enzima tanase. *Revista Sinergia*, 19(2):152–156.

Santos, C. J., Cerqueira, K. S., da Silva Rodrigues, J. R., & de Souza, R. R. (2023). Otimização da produção de enzimas lipases a partir de *Aspergillus niger* por fermentação submersa usando Óleo de Fritura Residual (OFR). *Brazilian Journal of Development*, 9(2):6911-6925.

Santos, D.S; Santos, P.R; Priscila, B.F.A (2012).Tecnologia de cereais: produção/moagem de farinhas. Graduação em Tecnologia de Alimentos – Universidade de Brasília – UnB, Ceilândia – DF, 22p.

Santos, L. D. S. (2025) Prospecção de celulase por fungos da caatinga através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos lignocelulósicos. Mestrado em Agricultura e Ambiente – Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Arapiraca – AL, 107p.

Santos, Priscila;Solidade, Lucas;Souza, Juliana;Sampaio, Gabriela;Jr, Antônio; Assis, Fábica; Leal, Patrícia. (2018) Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4. DOI 10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188.

Sasidhar, B., & Saravanan, R. (2025) Comparative Optimization of α -Amylase Production in *Bacillus velezensis* sp. Using Response Surface Methodology and Artificial Neural Networks. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 59:602-625 . DOI doi.org/10.5530/ijper.20254639.

Schäfer, M., Pacheco, A., Künzler, R., Bortfeld-Miller, M., Field, C., Vayena, E., Hatzimanikatis, V., & Vorholt, J. (2023) Metabolic interaction models recapitulate leaf microbiota ecology. *Science*, 381. DOI doi.org/10.1126/science.adf5121.

Scroccarello, A., Molina-Hernández, B., Della Pelle, F., Ciancetta, J., Ferraro, G., Fratini, E., Valbonetti, L., Copez, C., & Compagnone, D. (2021) Effect of phenolic compounds-capped AgNPs on growth inhibition of *Aspergillus niger*. *B, Biointerfaces*, 199:111533. DOI doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111533.

Shah, N., Mansor, A., & Manikam, R. (2023) Systematic Review on Characterization of Tannase from Agricultural By-Products. *Industria: Jurnal Teknologi dan Manajemen Agroindustri*, 12:1-14. DOI doi.org/10.21776/ub.industria.2023.012.01.1.

Sharma, P., Bano, A., Singh, S., Varjani, S., & Tong, Y. (2024) Sustainable Organic Waste Management and Future Directions for Environmental Protection and Techno-Economic Perspectives. *Current Pollution Reports*, 10:1-19. DOI doi.org/10.1007/s40726-024-00317-7.

Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S., & Kulshrestha, S. (2020) Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation*, 6:106. DOI doi.org/10.3390/fermentation6040106.

Sharma, S., Bhat, T.K., Dawra, R.K. (2000) A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. *Analytical Biochemistry*, 279:85-90. DOI doi.org/10.1006/abio.1999.4405.

Shokrollahi, S., Shavandi, A., Okoro, O., Denayer, J., & Karimi, K. (2024) Sustainable biorefinery development for valorizing all wastes from date palm agroindustry. *Fuel*, 358. DOI doi.org/10.1016/j.fuel.2023.130291.

Sidar, A., Voshol, G., El-Masoudi, A., Vijgenboom, E., & Punt, P. (2024) Streptomyces small laccase expressed in *Aspergillus Niger* as a new addition for the lignocellulose bioconversion toolbox. *Fungal Biology and Biotechnology*, 11. DOI doi.org/10.1186/s40694-024-00181-6.

Siddiqui, S., Erol, Z., Rugji, J., Taşçı, F., Kahraman, H., Toppi, V., Musa, L., Di Giacinto, G., Bahmid, N., Mehdizadeh, M., & Castro-Muñoz, R. (2023) An overview of fermentation in the food industry - looking back from a new perspective. *Bioresources and Bioprocessing*, 10. DOI doi.org/10.1186/s40643-023-00702-y.

Silano, V., Baviera, J., Bolognesi, C., Brüscheiler, B., Cocconcelli, P., Crebelli, R., Gott, D., Grob, K., Lampi, E., Mortensen, A., Rivièrè, G., Steffensen, I., Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Glandorf, B., Herman, L., Aguilera, J., Chesson, A. (2019) Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzylphthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials . *EFSA* , 17. DOI doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5741.

Silva, D., Batista, L., Rezende, E., Fungaro, M., Sartori, D., & Alves, E. (2011) Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section nigri using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42:761 - 773. DOI doi.org/10.1590/s1517-838220110002000044.

Silva, E. P. D., Silva, D. A. T. D., Rabello, C. B. V., Lima, R. B., Lima, M. B., & Ludke, J. V. (2009) Composição físico-química e valores energéticos dos resíduos de goiaba e tomate para frangos de corte de crescimento lento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 1051-1058.

Silva, Fernanda Chaves da et al. (2015) Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: uma revisão. *Revista Ifes Ciência*, 1:18-40.

Silva, L. C., da Silva, J. L., Kupski, L., & Barros, B. C. B. (2024) Utilização da fermentação em estado sólido para valorização do bagaço de malte: uma revisão bibliográfica. *Engenharia de alimentos: tópicos físicos, químicos e biológicos*, 1(1):226-240.

Silveira, M. L. R., Santos, C. D., Penna, N. G., Sautter, C. K., Rosa, C. S., & Bertagnolli, S. M. M. (2016) Aproveitamento tecnológico das sementes de goiaba (*Psidium guajava* L.) como farinha na elaboração de biscoitos. *Boletim CEPPA, Curitiba-PR*, 34(1), 1-21.

Silveira, M.L.R. (2014). Aproveitamento tecnológico e compostos bioativos da semente de goiaba (*Psidium guajava*L). Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimenros – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria – RS, 103p.

Simas, A. L. D. O. (2023) Estudo bioquímico de fitase, protease e xilanase produzidas por fungos filamentosos usando fontes de carbono alternativas: comparação com as enzimas comerciais e aplicação na alimentação animal. Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande – MS, 84p.

Singh, B., , P., Tiwari, S., Singh, D., Kumar, S., & Malik, V. (2023) Production of fungal phytases in solid state fermentation and potential biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40. DOI doi.org/10.1007/s11274-023-03783-1.

Singh, S., & Bajaj, B. (2017) Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. , 2:370-386. DOI doi.org/10.1007/S40974-017-0076-5.

Siqueira, M., Contin, B., Fernandes, P., Ruschel-Soares, R., Siqueira, P., & Baruque-Ramos, J. (2022) Brazilian Agro-industrial Wastes as Potential Textile and Other Raw Materials: a Sustainable Approach. *Materials Circular Economy*, 4. DOI doi.org/10.1007/s42824-021-00050-2.

Smith, A., Müller, R., Toscano, M., Kast, P., Hellinga, H., Hilvert, D., & Houk, K. (2008) Structural reorganization and preorganization in enzyme active sites: comparisons of experimental and theoretically ideal active site geometries in the multistep serine esterase reaction cycle. *Journal of the American Chemical Society*, 130(46):15361-15375. DOI doi.org/10.1021/ja803213p.

Song, Z., Fu, H., Wang, R., Pacheco, L., Wang, X., Lin, Y., & Cheng, J. (2018) Secondary structures in synthetic polypeptides from N-carboxyanhydrides: design, modulation, association, and material applications. *Chemical Society reviews*, 47(19):7401-7425. DOI doi.org/10.1039/c8cs00095f.

Sousa, A. A; Emerenciano, M.G.C; Durigon, E.G; Mello, G.L (2019) Biomassa seca de *Aspergillus niger* em rações extrusadas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Agrarian Journal*, 12(45):367-374.

Sousa, S.M.F; Silva, R.S; Silva, O.S; Oliveira, A.S; Nogueira, L.P.S; Lima, M.E.P; Araújo, M.A; Nunes, J.S. (2021) Protein enrichment of guava residue (*Psidium guajava* L.) through semi-solid fermentation. Research, Society and Development, 10(14): e385101422050. DOI: doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22050.85

Souza, G.R; Moulin, E.N; Santos, P. O; Merson, A.A, Souza, J.R.C.L; Marques, F.C; Souza, T.S. (2020) Development of encapsulating material from dry and degreased flour of guaiaba seed. Brazilian Journal of Development Curitiba, 6(12):98027-98037.

Souza, T.O; Ramos, A.V.S; Pinotti, T.I; Santos, A.M.G; Nascimento, T.P. (2024) Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de proteases coagulantes do leite por *Trichoderma* sp. isolado do cerrado piauiense. International Journal Agrarian Sciences, 4:36-53. DOI:10.31692/2764-3425.v4i2.525.

Spatafora, J., Aime, M., Grigoriev, I., Martin, F., Stajich, J., Blackwell, M., Heitman, J., & James, T. (2017) The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. Microbiology Spectrum, 5. DOI doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0053-2016.

Suryadi, H., Judono, J., Putri, M., Eclessia, A., Ulhaq, J., Agustina, D., & Sumiati, T. (2022) Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. Heliyon, 8. DOI doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865.

Sutaoney, P., Akhand, A., Meshram, M., Sinha, S., Joshi, V., & Shahadat, M. (2023) Tannase production using green biotechnology and its applications: A review. Biochemical Engineering Journal, 202. DOI doi.org/10.1016/j.bej.2023.109163.

Tamang, J., Cotter, P., Endo, A., Han, N., Kort, R., Liu, S., Mayo, B., Westerik, N., & Hutkins, R. (2020) Fermented foods in a global age: East meets West. Journal of food Science, 19(1):184-217. DOI doi.org/10.1111/1541-4337.12520.

Tanaka, M., & Gomi, K. (2021) Induction and Repression of Hydrolase Genes in *Aspergillus oryzae*. Frontiers in Microbiology, 12. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2021.677603.

Tanruean, K., Penkhrue, W., Kumla, J., Suwannarach, N., & Lumyong, S. (2021) Valorization of Lignocellulosic Wastes to Produce Phytase and Cellulolytic Enzymes from a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus* SL16W, under Semi-Solid-State Fermentation. *Journal of Fungi*, 7. DOI doi.org/10.3390/jof7040286.

Teixeira, A. J., Menegat, F. D., Weschenfelder, L. M., Oro, C. E. D., Astolfi, V., Valduga, E., ... & Cansian, R. L. (2023) Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos e caracterização bromatológica para ração animal. *Ciência Rural*, 53:e20210720.

Teles, A. S. (2025) Utilização da fermentação em estado sólido (fes) para a produção de enzimas: uma abordagem inovadora na valorização de resíduos agroindustriais. Pós Graduação *latu sensu* em Inovação e Tecnologia em Alimentos e Bebidas – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS, Caxias do Sul – RS, 12p.

Tomaz, L. S. D. S. (2023) Proteases na indústria de alimentos: uma revisão acerca dos tipos, características e aplicações. Graduação em Engenharia de Alimento – Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza- CE, 41p.

Ugbe, T., Akpan, P., Ofonodo, R., & Bassey, E. (2023) On Evaluation of Three Basic Properties of Central Composite Design. *Asian Journal of Probability and Statistics*, 23:1-15. DOI doi.org/10.9734/ajpas/2023/v23i1493.

Umar, A., & Ahmed, S. (2022) Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. *Scientific Reports*, 12. DOI doi.org/10.1038/s41598-022-06111-z.

Varella, G. O. M. (2024) Contribuição fosfórica do humofosfato de cálcio com a suplementação de fitase na alimentação de frangos de corte. Mestrado em Ciência Animal – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal – SP, 61p.

Vasundhara, M., Singh, K., Suryanarayanan, T., & Reddy, M. (2024) Alkaliphilic and thermostable lipase production by leaf litter fungus *Leptosphaerulina trifolii* A SMR-2011. *Archives of microbiology*, 206(6):264. DOI doi.org/10.1007/s00203-024-03997-3.

Vasudhevan, P., Kalaimurugan, D., Ganesan, S., Akbar, N., Dixit, S., & Pu, S. (2024) Enhanced biocatalytic laccase production using agricultural waste in solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* for p-chlorophenol degradation. International journal of biological macromolecules, 136460. DOI doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136460.

Vaz, Junior. (2022) Bioeconomia em progresso: resíduos da agroindústria. Plataforma Visão de futuro do Agro. Disponível em: <https://www.embrapa.br/visao-defuturo/sustentabilidade/sinal-etendencia/bioeconomia-em-progresso-residuosda-agroindustria>. Acesso em 20 de dezembro de 2025.

Vilanculos, S., Svanberg, U., & Andlid, T. (2023) Phytate degradation in composite wheat/cassava/sorghum bread: Effects of phytase-secreting yeasts and addition of yeast extracts. Food Science & Nutrition, 12:216-226. DOI doi.org/10.1002/fsn3.3754.

Vilas-Franquesa, A., Villasante, J., & Fogliano, V. (2024) Fungal fermentation effectively upcycles mango kernel flour into a functional ingredient. LWT, 206:116558 DOI doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116558.

Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., Lagiou, A., & Bezirtzoglou, E. (2020) Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. Foods, 10. DOI doi.org/10.3390/foods10010069.

Wang, G., Wang, Y., Yang, B., Zhang, C., Zhang, H., Xing, F., & Liu, Y. (2020) Carbon Catabolite Repression Gene AoCreA Regulates Morphological Development and Ochratoxin A Biosynthesis Responding to Carbon Sources in *Aspergillus ochraceus*. Toxins, 12. DOI doi.org/10.3390/toxins12110697.

Wang, Q., Wu, S., Chu, G., Zhang, Z., She, Z., Zhao, Y., Guo, L., Jin, C., & Gao, M. (2023) Metagenomic analysis and microbial activity shifts reveal the effect of the carbon/nitrogen ratio on the nitrogen removal performance of a moving bed biofilm reactor treating mariculture wastewater. Journal of Water Process Engineering, 51: 103363. DOI doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103363.

West, T. P. (2023). Citric acid production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation of agricultural processing coproducts. Applied biosciences, 2(1): 1-13.

Wu, C., Zhang, F., Li, L., Jiang, Z., Ni, H., & Xiao, A. (2018) Novel optimization strategy for tannase production through a modified solid-state fermentation system. *Biotechnology for Biofuels*, 11. DOI doi.org/10.1186/s13068-018-1093-0.

Wu, H., Shi, C., Xu, T., Dai, X., & Zhao, D. (2025) Characterization and Optimization of Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from Fecal Samples of *Elaphurus davidianus* Through Response Surface Methodology. *Microorganisms*, 13. DOI doi.org/10.3390/microorganisms13020348.

Xavier, É. L., Silva, R. V. S., Borghi, M. M., & de Jesus Mendes, G. (2024) Produção de enzimas pectinolíticas pelo *Aspergillus niger* isolado de cascas de cebola em ágar. *Acta Biologica Brasiliensia*, 7(2): 292-307.

Yafetto, L. (2022) Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8. DOI doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173.

Yassin, M., Mohsen, E., George, N., Marawan, M., El-Sayed, A., & El-Demerdash, M. (2025) Bioprocessing and characterization of thermostable phytase from *Aspergillus terreus*, an endophyte of *Catharanthus roseus*, with a potential activity to hydrolyze phytic acid in wheat bran. *BMC Biotechnology*, 25. DOI doi.org/10.1186/s12896-025-00988-0.

Zahra, A., & Mateen, A. (2024) Influence of Varied Carbon Sources and Carbon-Nitrogen Ratio on Microbial Community in a Biofloc-Based Culture System and Their Effects on Growth Performance, Proximate Composition, Hematology and Oxidative Stress in Nile Tilapia. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 25(5): 26395. DOI doi.org/10.4194/trjfas26395.

Zailan, N., Zulkifly, N., Alwi, A., Amin, S., & Alias, N. (2021) Effects of Nitrogen Sources in Phytase Production on Bacterial Strains Isolated from Malaysia's Hot Spring. *Journal Of Agrobiotechnology*, 12: 31-39. DOI doi.org/10.37231/jab.2021.12.1s.268.

Zareh, MM, El-Sayed, AS, & El-Hady, DM (2022) Biosorption removal of iron from water by *Aspergillus niger*. *NPJ Clean Water*, 5(1): 58.

Zhang, J., Jin, K., Luo, Y., Du, L., Tian, R., Wang, S., Shen, Y., Zhang, J., Li, N., Shao, W., & Xu, Z. (2023) Responses of Soil Enzyme Activity to Long-Term Nitrogen Enrichment and Water Addition in a Typical Steppe. *Agronomy*, 3(7): 1920. DOI doi.org/10.3390/agronomy13071920.

Zhang, J., Zhuo, X., Wang, Q., Ji, H., Chen, H., & Hao, H. (2023) Effects of Different Nitrogen Levels on Lignocellulolytic Enzyme Production and Gene Expression under Straw-State Cultivation in *Stropharia rugosoannulata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12):10089. DOI doi.org/10.3390/ijms241210089

Zheng, X., Du, P., Gao, K., Du, Y., Cairns, T., Ni, X., Chen, M., Zhao, W., X., Yang, H., Zheng, P., & Sun, J. (2023) Genome-wide transcription landscape of citric acid producing *Aspergillus niger* in response to glucose gradient. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* , 11. DOI doi.org/10.3389/fbioe.2023.1282314.