



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

JULIANA SALES DO NASCIMENTO

FRACIONAMENTO DO BAGAÇO DO CAJU (*Anacardium occidentale L.*)
ASSISTIDO POR MACERAÇÃO ENZIMÁTICA

FORTALEZA

2019

JULIANA SALES DO NASCIMENTO

FRACIONAMENTO DO BAGAÇO DO CAJU (*Anacardium occidentale L.*) ASSISTIDO
POR MACERAÇÃO ENZIMÁTICA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. Jair Mafezoli.

Orientador Profissional: Dr. Edy Sousa de Brito.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N195f Nascimento, Juliana Sales do.
Fracionamento do bagaço do caju (*Anacardium occidentale* L.) assistido por maceração enzimática /
Juliana Sales do Nascimento. – 2019.
41 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Jair Mafezoli.

Coorientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

1. Caju. 2. Hidrólise enzimática. 3. Viscozyme® L. 4. Celluclast®. 5. ácido gálico. I. Título.

CDD 540

JULIANA SALES DO NASCIMENTO

FRACIONAMENTO DO BAGAÇO DO CAJU (*Anacardium occidentale L.*) ASSISTIDO
POR MACERAÇÃO ENZIMÁTICA

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jair Mafezoli (Orientador Pedagógico)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Edy Sousa de Brito (Orientador Profissional)
Embrapa Agroindústria Tropical

Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro (Examinador)
Embrapa Agroindústria Tropical

À Deus.

Aos meus pais, Francisco Juarez e Silvana
Sales.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jair Mafezoli e ao Dr. Edy Sousa de Brito pela excelente orientação.

Ao examinador da banca Dr. Paulo Riceli pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa pela colaboração no trabalho, pelas críticas e sugestões recebidas.

Aos colegas do Laboratório de Bioinorgânica, principalmente, nas pessoas da Prof. Dr^a. Alda Karine Medeiros Holanda e a Msc Auridéia Possidônio de Sousa por toda paciência e conhecimento transmitido ao longo da graduação.

Aos colegas de graduação pela amizade, companheirismo e carinho durante toda a graduação.

Ao meu namorado, Matheus, por todo amor, paciência, compreensão e carinho devotados a mim, principalmente, nos momentos difíceis.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se o estudo de diferentes métodos de pré – tratamento para a fibra de caju, bem como diferentes métodos de hidrólise enzimática utilizando as enzimas Viscozyme® L e Celluclast®. O pedúnculo do caju é utilizado prioritariamente para a extração do suco e preparação de polpa. De modo que o bagaço restante, muitas vezes é descartado de maneira incorreta e acaba por contribuir para a poluição do ambiente. Visando uma forma de utilizar esse bagaço descartado surgiu o interesse na aplicação enzimática na fibra do caju. Atualmente existem diversas formas de hidrólise, sendo a química a mais comumente usada, entretanto esse tipo de hidrólise gera resíduos químicos que são agressivos ao meio ambiente, a hidrólise enzimática, por sua vez, utiliza enzimas que são biologicamente degradáveis. No que diz respeito as análises foram realizados testes de diferentes pré – tratamentos com o intuito de tornar a fibra do caju mais disponível, sendo o método de autoclavagem o melhor sucedido. Realizou-se também comparações entre os valores de massas obtidos após a aplicação enzimática em diferentes condições sendo o método de aplicação com duas enzimas o que apresentou melhor resultado. Os líquidos obtidos após os pré – tratamento sem aplicação enzimática foram analisados por UPLC-MS, e apresentaram em sua composição ácido gálico, ácido málico e ácido cítrico. O líquido obtido após a aplicação enzimática também foi analisado por UPLC-MS e apresentou, basicamente, ácido gálico em sua composição.

Palavras-chave: Caju, hidrólise enzimática, Viscozyme® L, Celluclast®, ácido gálico.

ABSTRACT

In this work, different pre-treatment methods were studied for the cashew fiber pretreatment, as well as different enzymatic hydrolysis methods using the enzymes mixtures Viscozyme® L and Celluclast®. The cashew peduncle is primarily used for the juice extraction and pulp preparation, the remaining bagasse being often incorrectly disposed, contributing to environmental pollution. So as to seek a way to use this discarded bagasse, it is thought that one can use the enzymatic application in cashew fiber. Currently, several methods of hydrolysis are applied, among which the chemical one, which is the most commonly used. Nonetheless, the aforementioned method generates chemical residues that are aggressive to the environment. The enzymatic hydrolysis, in contrast, uses biologically degradable enzymes. Regarding the analyzes, different pretreatment methods were tested in order to make the cashew fiber more available, being the autoclaving one the most successful. Comparisons were made between the mass values obtained after the enzymatic application in different conditions and the method of application with two enzymes, which presented the best result. The liquids obtained after the pretreatment without enzymatic application were analyzed by UPLC - MS and these had in their composition gallic acid, malic acid and citric acid. The liquid obtained after the enzymatic application was also analyzed by UPLC-MS and presented, basically, gallic acid in its composition.

Keywords: cashew, enzymatic hidrolisis, Viscozyme® L, Celluclast®, gallic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Estrutura do caju.	16
Figura 2.Estrutura do ácido gálico.....	18
Figura 3.Conformação do material lignocelulósicos antes e depois do pré – tratamento.	19
Figura 4.Estrutura linear da celulose.	21
Figura 5. Componentes da fração hemicelulósica.	22
Figura 6.Estrutura da lignina.	23
Figura 7.Fluxograma do processo sofrido pela amostra sem adição enzimática.....	26
Figura 8.Fluxograma do processo sofrido pela amostra com adição da enzima viscozyme L.	27
Figura 9.Cromatograma obtido para as amostras após pré – tratamento sem aplicação enzimática (cima) e com aplicação da enzima viscozyme por 3 horas seguidas (baixo).....	34
Figura 10.Comparação das áreas dos picos de ácido gálico em diferentes processos.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores estatísticos de massas obtidos após os pré - tratamentos sem aplicação enzimática.....	29
Tabela 2. Valores estatísticos de massa obtidos após os pré - tratamentos com aplicação da enzima viscozyme por 3 horas seguidas.....	29
Tabela 3. Valores estatísticos de massa obtidos após autoclavagem com aplicação da enzima viscozyme por 6 horas seguidas	30
Tabela 4. Valores estatísticos de massa obtidos após autoclavagem com aplicação de viscozyme L e celluclast por 3 horas seguidas com 24 horas de intervalo entre as aplicações	31
Tabela 5. Valores estatísticos de massa obtidos após o pré - tratamento de autoclave com e sem aplicação enzimática	32
tabela 6. Compostos identificados por UPLC-MS na amostra submetida ao pré - tratamento de autoclavagem sem adição enzimática.....	35

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivo específico.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Caju (<i>Anacardium occidentale L.</i>).....	16
3.2 Compostos fenólicos	17
3.3 Materiais lignocelulósicos	18
3.4 Pré-tratamento	19
3.5 Hidrólise enzimática.....	20
3.6 Celulose, hemicelulose e lignina	20
3.7 Viscozyme L e Celluclast	23
3.8 Técnica de UPLC-MS	23
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
4.1 Obtenção da amostra em pó da fibra de caju.....	25
4.2 Preparação da solução aquosa da enzima Viscozyme L.....	25
4.3 Preparação da solução aquosa da enzima Celluclast	25
4.4 Preparação das amostras sem adição enzimática.....	25
4.5 Preparação das amostras com adição enzimática	26
4.6 Preparação das amostras por autoclavagem e adição da enzima Viscozyme L com duração de 6 horas	27
4.7 Preparação das amostras por autoclavagem e adição das enzimas viscozyme L e celluclast	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

5.2 Comparação dos valores de massas obtidos após os processos de pré – tratamento, com aplicação da enzima viscozyme L por 6 horas	30
5.3 Comparação dos valores de massas obtidos após os processos de pré – tratamento, com duas aplicações enzimáticas e intervalo de 24 horas entre as aplicações	31
5.4 Análise comparativa dos diferentes métodos de hidrólise aplicados	32
5.5 Análises realizadas por UPLC-MS	33
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale*) é uma planta oriunda do nordeste brasileiro, e possui em sua estrutura o caju. Este é constituído pela castanha (fruto verdadeiro) e pelo pedúnculo (pseudofruto). O cajueiro possui elevada capacidade adaptativa a solos de pouca fertilidade, a locais com altas temperaturas e a pouca disponibilidade de água. Por conta disso, se tornou uma importante fonte de renda para os estados nordestinos (ARAÚJO, 2018).

Nos últimos anos, o estado do Ceará produziu 50% do total de castanha de caju produzida no Brasil, sendo seguido pelos estados do Rio Grande do Norte (22%) e Piauí (18%). O principal produto obtido a partir da castanha é a amêndoa que se localiza em seu interior. O pedúnculo do caju, por sua vez, é processado por indústrias e pequenas fábricas para a obtenção do suco ou da polpa congelada (ARAÚJO, 2018). Entretanto, após a obtenção do suco ou da polpa, o bagaço do caju é descartado, muitas vezes de maneira incorreta, contribuindo para a poluição do ambiente.

O caju contém carotenóides e compostos fenólicos, que mesmo após a extração do suco continuam presentes no bagaço (RODRIGUES et al, 2009). Segundo Correia et al. (2013), alguns estudos apontam a fibra de caju como um material lignocelulósico de elevado potencial, devido a presença de açúcares, fibras, proteínas e lipídeos em sua composição. O aproveitamento dessa fibra permite a obtenção de alimentos e biocombustíveis, de modo a aumentar as possibilidades de utilização do rejeito (apud ARAÚJO, 2018).

Os materiais lignocelulósicos são compostos por cadeias de celulose, hemicelulose e lignina, de modo que essa composição pode variar de acordo com a espécie do vegetal e o tipo de crescimento deste (OGEDA & PETRI, 2010). De acordo com Zheng et al. (2009) a hidrólise de biomassa lignocelulósica tem despertado bastante interesse devido à disponibilidade em nível mundial desse material e pelo elevado potencial para transformação em açúcares e, principalmente, em combustíveis alternativos, como o etanol. O uso do etanol como substituto para a gasolina ou misturado com gasolina como álcool anidro, apresenta inúmeras vantagens dentre elas a redução de gases do efeito estufa (ROCHA, 2012).

Diversos métodos de hidrólise têm sido estudados, sendo a hidrólise química um dos mais utilizados, entretanto, com a aplicação desse método ocorre a geração de resíduos químicos que também contribuem para a degradação do meio ambiente. Segundo Clemente (2000), a hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens quando comparada a hidrólise química. Entre elas se pode citar o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, a disponibilidade comercial em larga escala e a formação mínima de subprodutos

(ROCHA, 2012). Como desvantagens temos os elevados custos do complexo enzimático e a necessidade de realização de um pré-tratamento eficaz para alcançar conversões eficientes (CGEE, 2005).

Nesse contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o interesse de utilizar o bagaço de caju como biomassa para o processo de hidrólise enzimática, promovendo a hidrólise em diversas condições de modo a estabelecer a mais efetiva. E, além disso, comparar diversos métodos de pré – tratamentos para a definição do melhor método.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Promover a hidrólise enzimática do bagaço de caju utilizando enzimas sob condições diferentes, de modo a verificar qual o melhor pré – tratamento para a atuação das mesmas.

2.2 Objetivo específico

- ✓ Comparar métodos de pré – tratamentos diferentes para a verificação de qual se adequa melhor a fibra do caju.
- ✓ Comparar a eficiência das enzimas viscozyme L e celluclast na hidrólise.
- ✓ Avaliar por UPLC-MS os compostos liberados após a hidrólise enzimática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Caju (*Anacardium occidentale L.*)

Figura 1. Estrutura do caju.



Fonte: Brasil escola.

Segundo Melo Filho (2002), o cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) pertencente à família Anacardiaceae é, por sua vez, uma planta genuinamente brasileira visto que já se encontrava no nordeste brasileiro, quando chegaram os primeiros colonizadores portugueses, que daqui espalharam suas sementes para África e Ásia. O nome caju é originário da palavra indígena acaiu que, em tupi, quer dizer "noz que se produz" (apud SÁ, 2012).

O cajueiro apresenta considerável capacidade adaptativa a solos de baixa fertilidade, a temperaturas elevadas e a períodos de escassez hídrica. Por conta dessas características, o cajueiro se tornou uma importante fonte de renda para os estados do Nordeste, principalmente para aqueles que possuem regiões com clima semiárido, pois é capaz de sobreviver aos períodos de seca. Além disso, por gerar frutos durante o período de escassez hídrica, a exploração do cajueiro se torna uma importante fonte de empregos tanto no campo quanto nas indústrias (SERRANO & PESSOA, 2016).

O caju é composto por duas partes distintas, correspondendo em média a uma distribuição em peso de 10% de castanha (fruto) e 90% de pedúnculo (pseudofruto). Destas, é o pedúnculo que possui menor percentagem de aproveitamento (SILVA NETO, 2009).

Segundo o IBGE (2009), o Ceará desponta como o maior produtor de caju do Nordeste: anualmente, o Estado colhe 104,421 mil toneladas. O pedúnculo de caju, além de ser consumido *in natura*, é considerado como uma boa fonte de renda, por poder ser utilizado para a produção de diversos produtos: sucos, doces, refrigerantes, vinhos, polpas e outros produtos alimentícios. No entanto apenas o suco de caju integral possui alguma expressão econômica (apud SÁ, 2012).

O caju apresenta uma composição complexa, rica em vitaminas, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos, o que o tornam um alimento importante. Por outro lado, a oxidação dos elevados teores de ácido ascórbico e substâncias fenólicas são responsáveis por causar sua alta perecibilidade, levando a formação de substâncias que ocasionam o escurecimento do suco e a formação de aromas e sabores estranhos (SÁ, 2012). Para Maia, Sousa e Lima (2007), a composição química e físico-química do pedúnculo do caju pode variar de acordo com alguns fatores, dentre eles a variedade, o solo e as condições climáticas (apud SÁ, 2012).

3.2 Compostos fenólicos

Segundo Antunes e Canhos (1984), antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou a propagação das reações de oxidação. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é atribuída principalmente às suas propriedades de óxido-redução, que podem atuar de forma importante na absorção e neutralização de radicais livres (apud DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

De acordo com Moreira e Mancini-Filho (2004), os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: os que apresentam atividade enzimática e os que não possuem essa atividade. Na primeira classe encontram-se os compostos capazes de bloquear o início da oxidação, ou seja, removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão alocadas as moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta segunda classe estão inclusos os antioxidantes naturais e sintéticos como por exemplo os compostos fenólicos (apud ANGELO & JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que contém hidroxilas e anéis aromáticos, que podem estar organizados nas formas simples ou de polímero. A presença das hidroxilas ou dos anéis aromáticos confere a essas moléculas o poder antioxidante. Quando estão presentes em vegetais podem se apresentar na forma livre ou complexada a açúcares e proteínas. Dentre essa classe de compostos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns de fonte natural (ANGELO & JORGE, 2007).

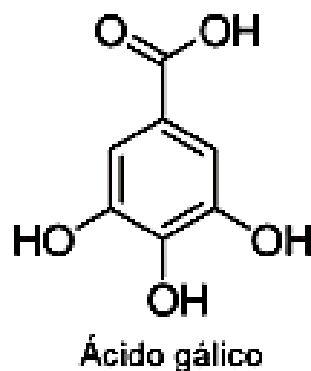
Os compostos fenólicos podem ser encontrados de forma natural, principalmente, em frutas cítricas, como por exemplo o limão, a laranja e a tangerina. Podem também ser encontrados em outros tipos de frutas como a uva, a ameixa, a maçã e o mamão, sendo

encontrados majoritariamente na polpa da fruta (ANGELO & JORGE, 2007).

A vitamina C é o principal antioxidante encontrado no caju, entretanto, no pedúnculo existe uma grande quantidade de compostos fenólicos. Além desses, também são encontrados outros compostos com capacidade antioxidante, como, por exemplo, os carotenóides, os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e o ácido anacárdico (BRIOZINI et al, 2007).

A figura apresenta a estrutura do ácido gálico. Esse ácido é um dos componentes taninos presente no pedúnculo do caju.

Figura 2. Estrutura do ácido gálico.



Fonte: SBQ.

3.3 Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos podem ser considerados uma matéria prima promissora para a produção de biocombustíveis. No Brasil existem diversas fontes de materiais lignocelulósicos, como por exemplo, o bagaço da cana – de – açúcar, o bagaço do caju e a palha do trigo que apresentam uma abundante fonte de carbono na forma de biomassa. Esses materiais são constituídos por três componentes basicamente: celulose, hemicelulose e lignina (REIS, 2016).

Os rejeitos e os resíduos agroindustriais, em sua maioria contém materiais lignocelulósicos. Esses rejeitos e resíduos ganham destaque entre as biomassas disponíveis pois apresentam uma elevada abundância e caráter renovável. Segundo Badhan *et al.* (2007), os materiais lignocelulósicos apresentam uma composição média de 40% a 60% de celulose, 20% a 40% de hemicelulose e 15% a 25% de ligninas (apud REIS, 2016).

Uma grande parcela desses materiais é produzida pelas agroindústrias, indústrias alimentícias, indústrias de madeiras dentre outras que acabam por contribuir com a poluição ambiental gerando resíduos que são eliminados através da queima da biomassa ou como fonte

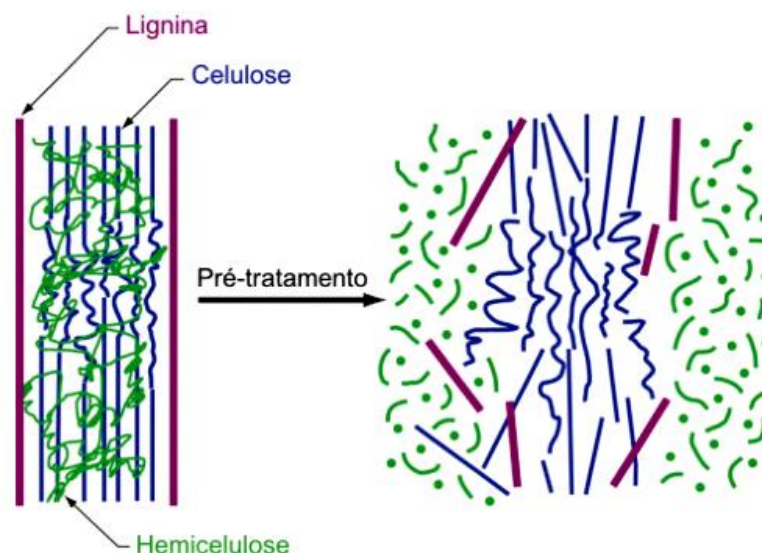
de alimentação animal. Entretanto, a biomassa desperdiçada pode ser utilizada como fonte para obtenção de biocombustíveis, produtos químicos, fonte de energia para a fermentação e nutriente humano (BORTOLAZZO, 2011).

3.4 Pré-tratamento

O processo de hidrólise enzimática tem sido considerado um dos modos mais interessantes para promover a conversão de celulose em glicose. Contudo, a biomassa que não é submetida a algum tipo de tratamento torna-se resistente a este processo. Por conta disso, processos de pré – tratamentos têm sido desenvolvidos de modo a buscar melhorar a digestibilidade da enzima (ROCHA, 2012).

Segundo Gray et al. (2006), o pré – tratamento tem como objetivo promover o rompimento da parede celular da planta, de modo que a enzima tenha maior acesso aos polissacarídeos ali presentes (apud ROCHA, 2012). Para ser considerado efetivo, o pré – tratamento deve apresentar algumas características, como por exemplo, apresentar uma digestibilidade elevada da celulose no processo de hidrólise enzimática subsequente e requerer um baixo custo operacional (ROCHA, 2012). A figura 3 apresenta a conformação do material lignocelulósico antes e após o pré – tratamento.

Figura 3. Conformação do material lignocelulósicos antes e depois do pré – tratamento.



Fonte: Santos, F. A. et al. 2011.

O pré – tratamento, normalmente, é classificado de acordo com o efeito causado sob a matéria – prima. No geral, os pré – tratamentos são classificados como físicos, químicos,

físico-químicos e biológicos. Cada tipo de pré – tratamento apresenta algumas particularidades, de modo que cada um deles difere entre si. Os pré – tratamentos físicos embora sejam simples apresenta um grande gasto de energia. Os pré – tratamentos químicos e físico-químicos apresentam determinada eficiência, contudo a produção de inibidores é elevada. Os biológicos, por sua vez, apresentam um elevado tempo de processo de modo a tornarem-se inviáveis para o uso industrial (ARAÚJO, 2018).

No presente estudo, a fibra de caju foi submetida a três diferentes pré – tratamentos: agitação mecânica por meio de vortex, ultrassom e autoclavagem. De modo que, após a aplicação de cada um desses métodos de maneira individual, seja possível analisar qual deles apresenta o melhor resultado.

3.5 Hidrólise enzimática

Segundo Sun e Cheng (2002), no processo de hidrólise enzimática, a celulose é degradada por enzimas celulasas produzindo açúcares redutores, como a glicose, que podem ser fermentados por leveduras ou bactérias (apud ROCHA, 2012). Entretanto, como as celulasas são proteínas, elas não conseguem penetrar facilmente a barreira de lignina das células vegetais, tornando o processo de hidrólise enzimática mais difícil (RUEGGER & TAUK-TORNISIELO, 2004). Por conta disso, faz-se necessário a aplicação de um pré – tratamento para tornar a fibra do vegetal mais disponível para a enzima.

As enzimas são catalisadores que possuem uma determinada eficiência catalítica e especificidade possibilitando a diferenciação entre a reação e o substrato. Além disso, as enzimas oferecem processos mais competitivos quando comparadas com os catalisadores não – biológicos. Os processos que utilizam ação enzimática apresentam uma diminuição de tempo de processo, quantidade de resíduos e número de etapas de reação. As enzimas normalmente são obtidas a partir de vegetais, animais ou microrganismos (ARAÚJO, 2018).

Segundo Sun e Cheng (2005), a hidrólise enzimática é conduzida em meio aquoso, heterogêneo, através de enzimas celulasas, que são altamente específicas. As celulasas são capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo a hidrólise dos mesmos. Essas enzimas atuam em sinergia para a liberação de açúcares, como a glicose (apud Reis, Carla L. B., 2016).

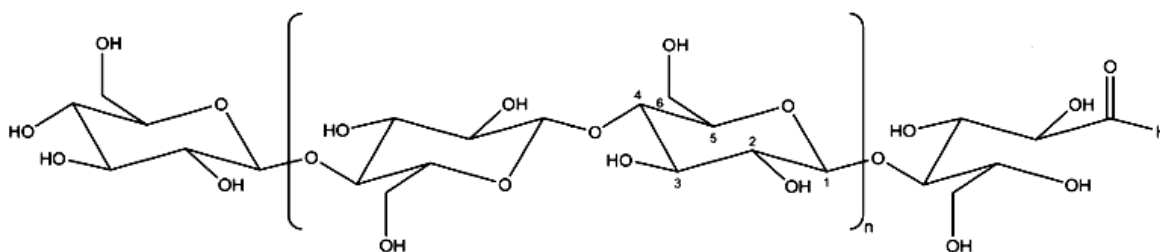
3.6 Celulose, hemicelulose e lignina

A celulose está presente em todos os vegetais desde os mais simples até os mais

complexos e corresponde a, aproximadamente, 40% de toda reserva de carbono presente no vegetal. É o constituinte mais abundante da parede celular do vegetal (OGATA, 2013).

A celulose é definida como um homopolissacarídeo, pois é constituído apenas por unidades de D – glicose unidas entre si por meio de ligações glicosídicas do tipo β 1-4, que fazem com que a celulose seja insolúvel em água. Sua estrutura pode ser linear ou fibrosa, nas quais se formam diversas pontes de hidrogênio entre seus grupos hidroxilas, correspondentes às ligações intermoleculares e intermoleculares entre as diferentes cadeias de glicose (REIS, 2016). A figura 4 apresenta a estrutura da celulose.

Figura 4. Estrutura linear da celulose.



Fonte: adaptado de Gurgel, 2010.

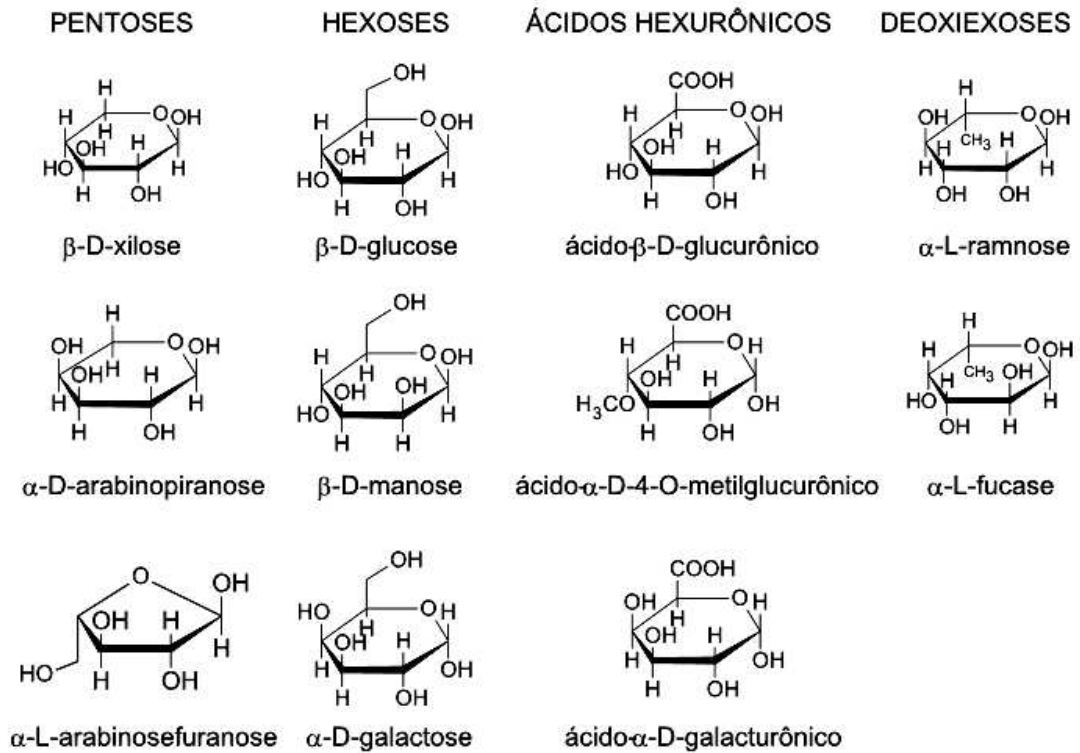
As interações intermoleculares conferem rigidez a celulose. As interações intramoleculares, por sua vez, formam as fibrilas, estruturas ordenadas que se unem formando as fibras de celulose. Devido a presença das fibrilas e da rigidez, a celulose torna-se altamente resistente a hidrólise (REIS, 2016).

A hemicelulose, por sua vez, é constituída por cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem aldopentoses (xilose e arabinose) e aldohexoses (glicose, manose e galactose). A diversidade de ligações e de ramificações contribuem para a complexidade da estrutura e suas variadas conformações (REIS, 2016).

A hemicelulose, diferentemente da celulose, apresenta baixa massa molecular e não apresenta regiões cristalinas, de modo a tornar-se mais suscetível à hidrólise química em condições amenas. No entanto, a fermentação dos açúcares pentosídicos não é tão desenvolvida quanto nos processos envolvendo glicose (REIS, 2016).

A figura 5 apresenta os componentes das frações da hemicelulose.

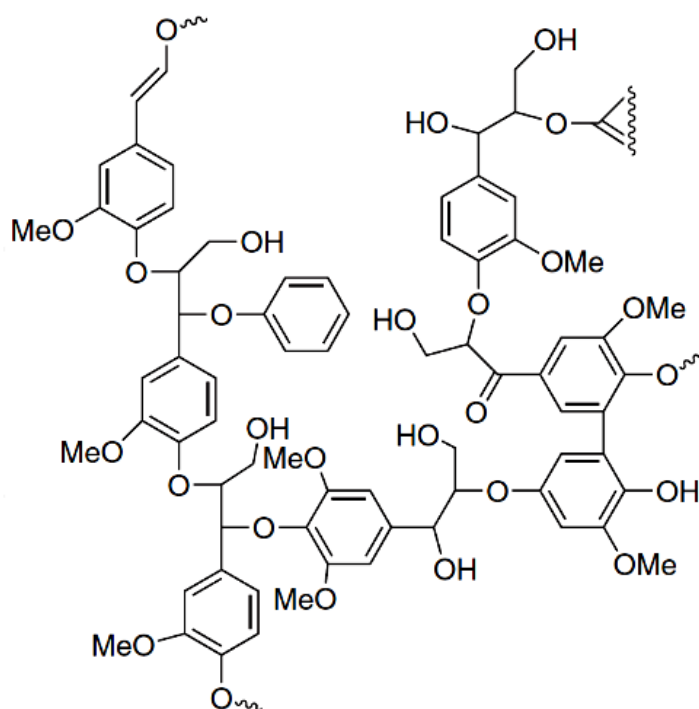
Figura 5. Componentes da fração hemicelulósica.



Fonte: Moraes, et al. 2005

A lignina, por sua vez, é um polímero fenólico que está fortemente unido à celulose na parede celular do vegetal. Devido à sua estrutura química, a lignina é, normalmente, mais resistente à decomposição biológica do que os outros biopolímeros que compõem os materiais lignocelulósicos. A taxa de decomposição da lignina é mais lenta do que a da celulose e da hemicelulose. Mesmo em quantidades menores que a celulose e a hemicelulose, a presença da lignina consegue retardar ou impedir a ação microbiana sobre o material (REIS, 2016). A figura 6 representa a estrutura da lignina.

Figura 6. Estrutura da lignina.



Fonte: Ferreira et al. 2009.

3.7 Viscozyme L e Celluclast

Viscozyme é um complexo multienzimático obtido a partir de uma variedade selecionada do fungo *Aspergillus aculeatus*. Esse complexo contém uma gama de carboidrases incluindo arabanase, celulase, beta-glucanase, hemicelulase e xilanase. Ele também decompõe substâncias semelhantes à pectina ramificadas encontradas nas paredes celulares das plantas. A viscozyme atua, normalmente, reduzindo a viscosidade dos vegetais de modo a melhorar o processo de extração (NATIONAL CENTER FOR BIOTHECNOLOGY EDUCATIONS).

Celluclast é produzido por uma cepa selecionada do fungo *Trichoderma reesei*. A celluclast age catalisando a quebra da celulose em glicose, celobiose, e cadeias mais longas de unidades de glicose. A celluclast também atua promovendo a redução da viscosidade dos vegetais e promove um aumento do rendimento no processo de extração (NATIONAL CENTER FOR BIOTHECNOLOGY EDUCATIONS).

3.8 Técnica de UPLC-MS

Espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica na qual moléculas em uma determinada amostra são convertidas em íons no estado gasoso, e em seguida são separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z (WILSON & WALKER, 2010).

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental muito abrangente que possui diversas aplicações em diferentes áreas da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas (CABRAL, 2010).

UPLC-MS / MS é uma técnica química capaz de combinar o método de separação física da cromatografia líquida com o método de análise de massa da cromatogrametria de massas. Essa técnica é usada para muitas aplicações que exigem alta sensibilidade e seletividade. Sua aplicação, geralmente, é utilizada para a detecção geral e identificação potencial de substâncias químicas presentes em misturas complexas (WAGENINGEN, 2019).

A técnica de UPLC-MS/ MS tem usos qualitativos e quantitativos. Estes usos incluem a identificação de compostos desconhecidos, a determinação da composição isotópica dos elementos de uma molécula e a determinação da estrutura de um composto pela observação da sua fragmentação. Outros usos incluem quantificar a quantidade de um composto em uma amostra (WAGENINGEN, 2019).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Obtenção da amostra em pó da fibra de caju

Inicialmente partiu-se de 140 gramas da fibra do bagaço do caju que foi lavada através de um sistema de soxhler por um período de uma semana, usando como solvente álcool etílico, para promover a retirada da gordura presente na fibra. Após o período de lavagem, a fibra foi posta para a secagem. Com a fibra seca realizou-se então o processo de moagem.

Após a moagem, a amostra em pó foi pesada e obteve-se 57,89 gramas. O bagaço do caju em pó foi utilizado para todas as análises.

4.2 Preparação da solução aquosa da enzima Viscozyme L

Para a preparação da solução enzimática utilizou-se 860 μL de água destilada e 140 μL da enzima viscozyme L.

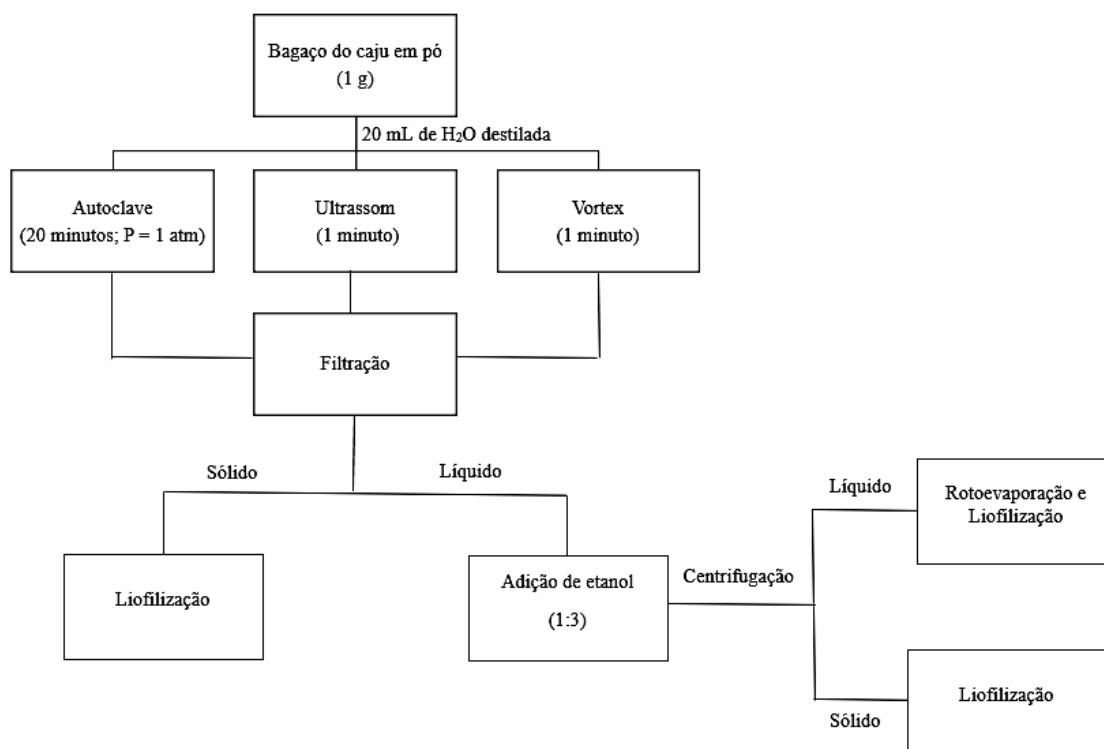
4.3 Preparação da solução aquosa da enzima Celluclast

Para a preparação da solução enzimática utilizou-se 860 μL de água destilada e 140 μL da enzima celluclast.

4.4 Preparação das amostras sem adição enzimática

Pesou-se 1 grama do bagaço de caju em pó e, em seguida a amostra passou pelas etapas apresentadas na figura abaixo:

Figura 7. Fluxograma do processo sofrido pela amostra sem adição enzimática.



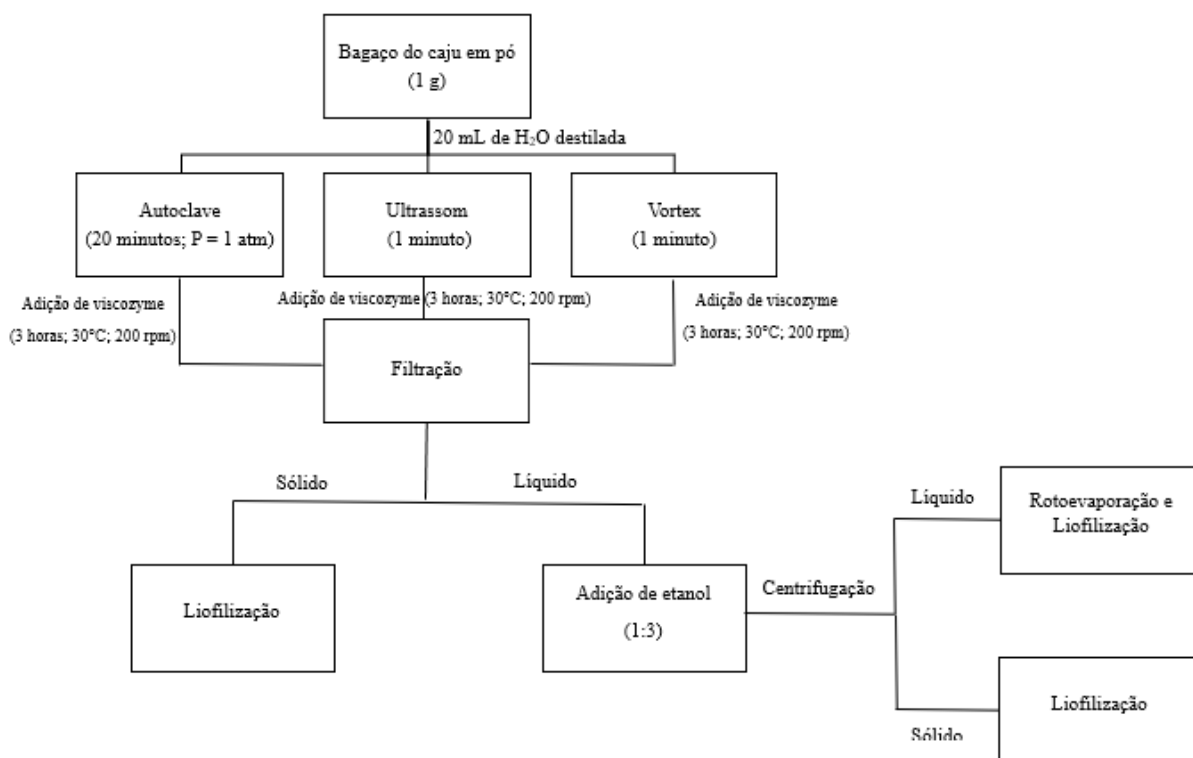
Fonte: Autora

Após a adição de 20 mL de água, a amostra foi submetida aos processos de pré - tratamento: autoclave, vortex ou ultrassom. As amostras que foram autoclavadas, o foram à temperatura de 121°C e 1 atm por 20 minutos. As amostras que passaram pelo ultrassom foram submetidas a essa técnica por 1 minuto à temperatura ambiente. As amostras que foram submetidas ao vortex, o foram por 1 minuto à temperatura ambiente. Após o pré - tratamento, a amostra foi filtrada, o bagaço foi recolhido e liofilizado enquanto que ao filtrado, adicionou-se etanol na proporção de 1:3 (1 mL de água : 3 mL de etanol). A solução etanólica foi guardada na geladeira por 24 horas para promover a precipitação da pectina. Após esse período, a solução foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos, em seguida, a pectina foi recolhida e liofilizada e o líquido foi rotoevaporado em um rotoevaporado Buchini, á 40°C aproximadamente. Após a Rotoevaporação, o líquido foi liofilizado. Esse procedimento foi realizado em triplicata para todos os três métodos de pré - tratamento.

4.5 Preparação das amostras com adição enzimática

Pesou-se, aproximadamente, 1 grama do bagaço de caju em pó e, em seguida adicionou-se 20 mL de água e seguiu-se as etapas apresentadas no fluxograma 2.

Figura 8. Fluxograma do processo sofrido pela amostra com adição da enzima viscozyme L.



Fonte: Autora.

Após a adição da água, a amostra foi submetida aos pré – tratamentos de autoclavagem, ultrassom ou vortex nas mesmas condições das amostras descritas no item 4.4 acima. Após o pré – tratamento, a mistura foi guardada na geladeira por 24 horas e, em seguida, adicionou-se 100 µL da solução enzimática de viscozyme L. A mistura adicionada da enzima foi agitada à 200 rpm em um shaker incubadora por 3 horas à 30°C. Ao final da agitação, a mistura foi submetida aos mesmos processos descritos no item anterior. Esse experimento foi realizado em triplicata para todos os métodos de pré – tratamento.

4.6 Preparação das amostras por autoclavagem e adição da enzima Viscozyme L com duração de 6 horas

Pesou-se, aproximadamente, 1 grama da amostra do bagaço do caju em pó e adicionou-se 20 mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi submetida ao processo de autoclavagem por 20 minutos em uma temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. Em seguida, a mistura foi guardada na geladeira por 24 horas. Após esse período de tempo realizou-se a aplicação de 100 µL da solução aquosa de viscozyme L. A mistura com a enzima foi submetida a agitação de 200 rpm em um shaker por 6 horas a 30°C. Ao fim da agitação, a mistura foi filtrada à vácuo seguindo o mesmo processo descrito no item 4.4. O experimento

foi realizado em triplicata.

4.7 Preparação das amostras por autoclavagem e adição das enzimas viscozyme L e celluclast

Pesou-se, aproximadamente, 1 grama da amostra do bagaço do caju em pó e adicionou-se 20 mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi submetida ao processo de autoclavagem por 20 minutos em uma temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. A mistura foi, então, guardada na geladeira por 24 horas. Após esse período de tempo realizou-se a aplicação de 100 µL da solução aquosa de viscozyme L. A mistura com a enzima foi submetida a agitação de 200 rpm em um shaker por 3 horas a 30°C. Em seguida foi submetida ao mesmo procedimento descrito no item 4.4. O experimento foi realizado 6 (seis) vezes.

Após 24 horas, a parte sólida foi ressuspensa em 20 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 100 µL da solução enzimática de viscozyme L à três das amostras. Adicionou-se também 100 µL da solução enzimática de celluclast à outras três amostras. Em seguida todas as amostras foram deixadas no shaker por 3 horas à 30°C e 200 rpm de agitação. Ao final da agitação, as misturas foram submetidas novamente ao processo descrito no item 4.4.

4.8 Preparação das amostras para análise no espectrômetro de massas

Para a análise no espectrômetro de massas, pesou-se 2 mg do líquido liofilizado das amostras que passaram por agitação mecânica, ultrassom e autoclave, sem enzima e com a enzima Viscozyme L durante 3 horas. Essa massa foi dissolvida em uma mistura de 1 mL de água : 1 mL de acetonitrila. Em seguida, filtrou-se 1 mL da mistura em um microfiltro de 13 mm com microporo de 0,22 µm de diâmetro, e então, as amostras foram analisadas no espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo TQ-S acoplado ao sistema UPLC ACQUITY H-Class, no modo negativo. O experimento foi feito em triplicata.

O sistema utilizado neste trabalho é composto por um sistema de bomba quaternária, amostrador automático com controle de temperatura, forno para colunas e espectrômetro de massas com analisador quadrupolo e tempo de voo (*Tof* do inglês *Time of Flight*). Possui duas fontes para ionização das amostras: ESI (*Electrospray ionization*) e APCI (*Atmospheric pressure chemical ionization*). O controle do equipamento, a aquisição e o tratamento dos dados são realizados pelo software Masslynx (UFJF, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação dos valores de massas obtidos após os processos de agitação, ultrassom e autoclavagem com e sem aplicação da enzima viscozyme L por 3 horas

Após a liofilização, todas as amostras foram pesadas e tiveram a média (μ), o desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV%) associados a cada etapa calculados. Os valores médios de massa encontrados para cada etapa encontram-se especificados nas tabelas 1 e 2 abaixo. Os valores específicos de cada triplicata, tanto para a tabela 1 quanto para a 2, encontram-se em anexo.

Tabela 1. Valores estatísticos de massas obtidos após os pré - tratamentos sem aplicação enzimática

Técnica	Peso inicial (g)			Bagaço liofilizado (g)			Pectina liofilizada (g)		
	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)
Autoclave	1,0006	0,0001	0,0005	0,6396	0,0048	0,7537	0,1004	0,0078	7,7264
Ultrassom	1,0163	0,0074	0,0724	0,7656	0,0195	2,5512	0,0373	0,0009	2,4582
Vortex	1,0023	0,0003	0,0339	0,7699	0,0199	2,5824	0,0413	0,0024	5,7740

Fonte: Autora.

Tabela 2. Valores estatísticos de massa obtidos após os pré - tratamentos com aplicação da enzima viscozyme por 3 horas seguidas

Técnica	Peso inicial (g)			Bagaço liofilizado (g)			Pectina liofilizada (g)		
	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)
Autoclave	1,0004	0,0001	0,0094	0,4898	0,0145	2,9662	0,1112	0,0229	20,6103
Ultrassom	1,0004	0,0001	0,0125	0,6382	0,0127	1,9959	0,0100	0,0022	21,9545
Vortex	1,0004	0,0002	0,0170	0,6171	0,0115	1,8697	0,0084	0,0019	22,0849

Fonte: Autora.

Comparando inicialmente os valores apresentados na tabela 1 observou-se que o pré – tratamento que apresentou melhor resultado foi o de autoclavagem, pois os valores de bagaço liofilizado após este tratamento foi o menor quando comparando com os outros dois métodos.

Comparando os valores de massa apresentados na tabela 2 observou-se que o pré – tratamento de autoclavagem unido à aplicação da enzima viscozyme L apresentou o melhor

resultado, pois os valores de massa de bagaço de caju liofilizados foram os menores.

Analisando as duas tabelas em conjunto percebeu-se que os valores de massa de bagaço liofilizado obtidos após o tratamento com a enzima viscozyme L foram menores do que os valores de massa obtidos para o bagaço após ser submetido apenas aos pré – tratamentos. Os valores de pectina obtidos após o tratamento enzimático também foram menores do que os valores obtidos sem o tratamento, com exceção do pré – tratamento por autoclavagem.

Diante dessas observações é possível afirmar que a aplicação enzimática promove uma digestão na fibra, e modo a diminuir tanto a quantidade de bagaço restante quanto a de pectina.

5.2 Comparação dos valores de massas obtidos após os processos de pré – tratamento, com aplicação da enzima viscozyme L por 6 horas

Após serem liofilizadas, as amostras submetidas a aplicação enzimática por 6 horas foram pesadas e tiveram a média (μ), o desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) associados a cada etapa calculados. Os valores médios de massa encontrados para cada etapa encontram-se especificados na tabela 3. Os valores de massa discriminados das triplicatas encontram-se em anexo.

Tabela 3. Valores estatísticos de massa obtidos após autoclavagem com aplicação da enzima viscozyme por 6 horas seguidas

Técnica	Peso inicial (g)			Bagaço liofilizado (g)			Pectina liofilizada (g)		
	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)
Autoclave	1,0006	0,0001	0,0094	0,4875	0,0090	1,8371	0,0400	0,0134	33,4546

Fonte: Autora.

Analisando os valores obtidos na tabela 3 e comparando-os com os valores obtidos para o pré – tratamento de autoclave mostrados na tabela 2 é possível observar que as massas de bagaço de caju liofilizado sofreram uma pequena diminuição. Entretanto essa diminuição não foi significativa.

Os valores de pectina obtidos para o processo por 6 horas seguidas, apresentou valores consideravelmente menores do que os obtidos para os processos sem enzima e com aplicação enzimática por apenas 3 horas.

5.3 Comparação dos valores de massas obtidos após os processos de pré – tratamento, com duas aplicações enzimáticas e intervalo de 24 horas entre as aplicações

Após serem liofilizadas, as amostras submetidas a aplicação enzimática por 3 horas com intervalo de 24 horas foram pesadas e tiveram a média (μ), o desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) associados a cada etapa calculados. Os valores médios de massa encontrados para cada etapa encontram-se especificados nas tabelas 4. Os valores discriminados de cada triplicata encontram-se em anexo.

Tabela 4. Valores estatísticos de massa obtidos após autoclavagem com aplicação de viscozyme L e celluclast por 3 horas seguidas com 24 horas de intervalo entre as aplicações

Duas aplicações enzimáticas com 24 horas de intervalo									
Técnica	Peso inicial (g)			Bagaço liofilizado (g)			Pectina liofilizada (g)		
	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)
Autoclave viscozyme L + viscozyme L	1,0003	0,0001	0,0082	0,3459	0,0234	6,7633	0,0576	0,0006	9,6600
							0,0010	0,0001	12,0698
Autoclave viscozyme L + celluclast	1,0004	0,0001	0,0094	0,3422	0,0176	5,1493	0,0434	0,0048	11,1507
							0,0013	0,0005	41,1856

Fonte: Autora.

Analisando inicialmente apenas os valores de massa de bagaço liofilizado obtidos e comparando-os com os valores das tabelas 1, 2 e 3, respectivamente, tem-se que a presente etapa em análise apresentou os melhores resultados, dado que foram obtidos os menores valores de massa.

Analisando a tabela 4 de maneira um pouco mais intensa, percebe-se que as amostras que foram tratadas com a enzima viscozyme L e em seguida pela celluclast apresentaram uma média de massa de bagaço um pouco menor do que as amostras que foram tratadas com viscozyme L e em seguida com viscozyme L novamente. Contudo, essa diferença não foi significativa.

Partindo agora para a análise da pectina liofilizada, na tabela 4 tem-se que a primeira linha das estatísticas corresponde aos valores obtidos após a primeira aplicação enzimática, e a segunda linha corresponde aos valores obtidos após a segunda aplicação enzimática. As massas de pectina liofilizada obtidas após a primeira aplicação enzimática apresentaram uma diminuição quando comparados com os valores obtidos após a aplicação da enzima viscozyme L por 3 horas seguidas apresentado no item 5.1. Em contra partida os valores de

pectina da tabela 4 são maiores do que os obtidos após a aplicação de viscozyme L por 6 horas seguidas.

Os valores médios de massa de pectina liofilizada obtidos após a segunda aplicação enzimática para ambos os casos estudados nesse item são bem próximos, de modo que não se pode observar uma diferença significativa entre a aplicação de viscozyme ou celluclast. Assim, é necessário realizar um novo estudo para verificar se a enzima celluclast apresenta resultados melhores do que a viscozyme L.

5.4 Análise comparativa dos diferentes métodos de hidrólise aplicados

A tabela 5 apresenta de maneira mais visual todos os valores médios de massa inicial de bagaço de caju que foram pesadas para a realização dos experimentos, de bagaço de caju liofilizado e de pectina liofilizada obtidas após o final de cada processo, tendo como pré – tratamento a autoclavagem. Os valores descritos para todas as replicatas encontram-se em anexo.

Tabela 5. Valores estatísticos de massa obtidos após o pré - tratamento de autoclave com e sem aplicação enzimática

Técnica	Peso inicial (g)			Bagaço liofilizado (g)			Pectina liofilizada (g)		
	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)	μ	σ	CV (%)
Sem enzima	1,0006	0,0001	0,0005	0,6396	0,0048	0,7537	0,1004	0,0078	7,7264
Enzima viscozyme (3 horas seguidas)	1,0004	0,0001	0,0094	0,4898	0,0145	2,9662	0,1112	0,0229	20,6103
Enzima viscozyme (6 horas seguidas)	1,0006	0,0001	0,0094	0,4875	0,0090	1,8371	0,0400	0,0134	33,4546
viscozyme L + viscozyme L (3 horas seguidas e 24 horas de intervalo)	1,0003	0,0001	0,0082	0,3459	0,0234	6,7633	0,0576	0,0006	9,6600
viscozyme L + celluclast (3 horas seguidas e 24 horas de intervalo)	1,0004	0,0001	0,0094	0,3422	0,0176	5,1493	0,0434	0,0048	11,1507
							0,0013	0,0005	41,1856

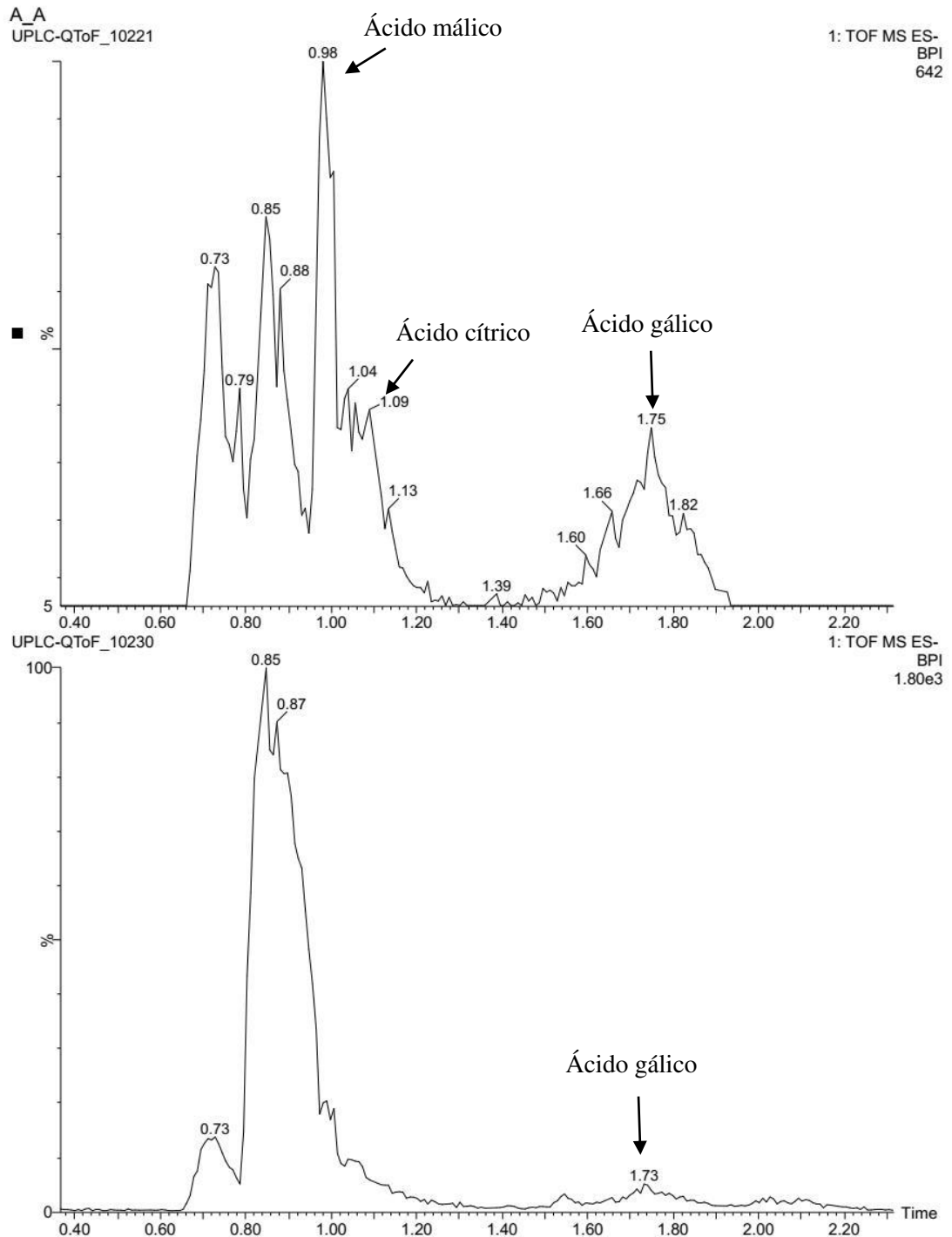
Fonte: Autora

Assim, é possível realizar uma melhor comparação entre os valores obtidos após os diferentes métodos de aplicação enzimática. Comparando todos os valores de bagaço liofilizado tem-se que o método que apresentou o menor valor, ou seja, o método no qual houve melhor digestão enzimática foi o de aplicação enzimática por 3 horas com intervalo de 24 horas utilizando duas enzimas.

5.5 Análises realizadas por UPLC-MS

Após a análise no UPLC-MS foram obtidos cromatogramas para as amostras de pré – tratamento sem aplicação de enzima e com aplicação enzimática da solução de viscozyme L por 3 horas.

Figura 9. Cromatograma obtido para as amostras após pré – tratamento sem aplicação enzimática (cima) e com aplicação da enzima viscozyme por 3 horas seguidas (baixo).



Fonte: Autora.

Na tabela 6 estão sumarizados os compostos representados na figura 9 identificados na

amostra submetida ao pré – tratamento de autoclavagem sem adição enzimática (cromatograma de cima).

tabela 6. Compostos identificados por UPLC-MS na amostra submetida ao pré - tratamento de autoclavagem sem adição enzimática.

Pico N°	TR min	[M-H] ⁻ observado	[M-H] ⁻ calculado	Íons produzidos (MS/MS)	Fórmula Empírica	ppm (erro)	Nome Provável	Referências
1	0,98	133,0132	133,0137	-	C ₄ H ₅ O ₅	-3,8	Ácido málico	Spínola et al, 2015
2	1,09	191,0188	191,0192	111,0114	C ₆ H ₇ O ₇	-2,1	Ácido cítrico	Spínola et al, 2015
3	1,75	169,0136	169,0137	125,0254	C ₇ H ₅ O ₅	-0,6	Ácido gálico	Flamini, 2013

Fonte: Autora.

No cromatograma de cima observa-se a presença de um pico no tempo de retenção de 1,75, com m/z 169,01 que, segundo Flamini (2013) representa o ácido gálico. Além disso, observa-se a presença de um pico no tempo de retenção de 1,09 com m/z de 191,01 e fragmento em m/z 111, que segundo Spínola et al (2015) representa o ácido cítrico. De acordo também com Spínola et al (2015), o pico observado no tempo de retenção de 0,98 com m/z 133,01 corresponde ao ácido málico. Os pré – tratamentos de vortex e ultrassom apresentaram cromatogramas semelhantes ao do autoclave.

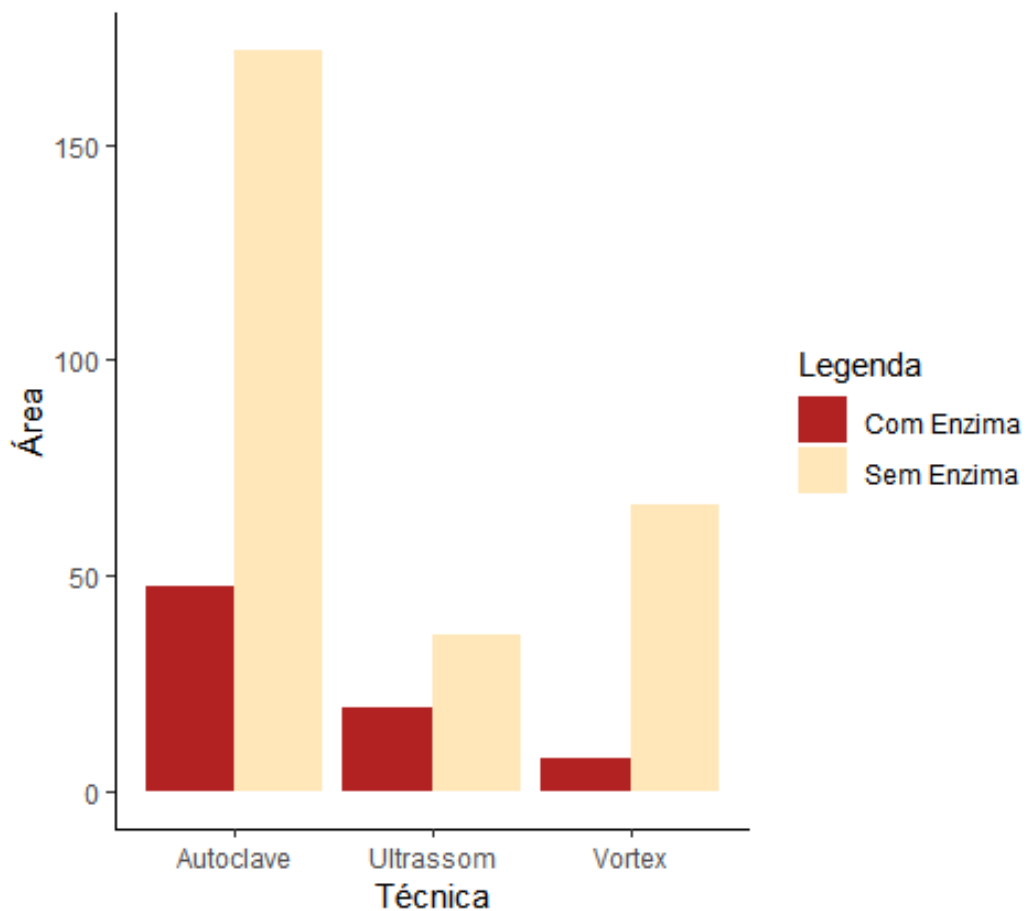
O cromatograma debaixo apresenta um pico no tempo de retenção de 1,73 que, segundo Flamini (2013) indica a presença de ácido gálico, m/z 169. Observa-se que não há nenhum pico evidente na região de 1,09, indicando que talvez não aja a presença de uma quantidade considerável de ácido cítrico após a aplicação enzimática. O pico em 0,93 representando o ácido málico também não aparece de forma evidente, indicando que a quantidade desse ácido após a aplicação enzimática tenha diminuído. Os cromatogramas para os pré – tratamentos de ultrassom e vortex com aplicação enzimática apresentam perfil semelhante.

Comparando os dois cromatogramas obtidos percebe-se que aparentemente, o pico referente ao ácido gálico sofreu uma diminuição após passar pelo processo de hidrólise. Realizou-se então uma comparação entre os valores de área de pico de ácido gálico presentes nas amostras com e sem aplicação enzimática com o intuito de verificar qual processo

apresenta maior quantidade de ácido gálico.

O gráfico abaixo apresenta a comparação da área dos picos de ácido gálico após os pré – tratamentos com e sem aplicação enzimática.

Figura 10.Comparação das áreas dos picos de ácido gálico em diferentes processos.



Fonte: Autora.

Comparando as áreas percebe-se que após o pré – tratamento de autoclavagem com aplicação enzimática e sem aplicação, o ácido gálico aparece em maior quantidade, ou seja, a autoclavagem conseguiu retirar a maior quantidade de ácido gálico da parede celular do caju. Percebe-se também que após processo de hidrólise enzimática, ocorre uma diminuição dos valores de ácido gálico para todos os pré – tratamentos.

As mesmas análises comparativas foram feitas para o ácido málico e o ácido cítrico, contudo, não foi encontrado valor relevante de área para essas substâncias, indicando que provavelmente, a enzima as degradou.

6. CONCLUSÃO

Levando em consideração a massa de bagaço obtido após liofilização do material resultante dos pré-tratamentos (autoclave, ultrassom e vortex), pode-se concluir que o processo de autoclavagem foi o mais eficiente, sendo, desta forma, utilizado como pré-tratamento padrão do bagaço de caju em pó.

A análise comparativa dos três pré-tratamentos com e sem o uso da enzima viscozyme L comprovou que o processo enzimático foi mais eficiente na redução da massa de bagaço residual liofilizado (16,6% a 23,4%). O melhor resultado obtido ocorreu no pré-tratamento com autoclavagem/viscozyme L, onde houve uma redução de massa de bagaço de aproximadamente 23,4%.

A modificação do tempo de atuação da enzima no processo de quebra do bagaço de caju em pó, de três para seis horas, não apresentou diferença estatística na massa de bagaço obtida ao final do tratamento. Assim, pode-se concluir que no período de três horas degradação enzimática máxima do bagaço de caju foi alcançada. Estudos variando a concentração de enzima tornam-se necessários para otimização do processo.

A utilização de dois tipos diferentes de enzimas concomitantemente (viscosyme L e celluclast) também foi avaliado em relação ao uso de apenas um tipo de enzima (viscozyme L). Com resultados semelhantes estatisticamente, pode-se concluir que o uso de somente uma enzima torna o processo mais prático e com a mesma eficiência.

Com a aplicação da técnica UPLC-MS foi possível identificar os componentes principais da fração líquida após os pré-tratamentos sem adição de enzima como sendo o ácido gálico, o ácido málico e o ácido cítrico. Constatou-se também que após a aplicação enzimática, apenas o ácido gálico continua presente de maneira significativa, mas em quantidade consideravelmente reduzida quando comparado aos pré-tratamentos normais.

REFERÊNCIAS

Ácido gálico. Disponível em: < http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=zSWyvIMTmjYy0Er35Dc0YEIyZ28ul2LA5Rgl5pUzpkXUy91BtQw8z9_HXIU_OgTUppom_3nTYKClRK-RnfOmpg== >. Acesso em: 14/06/2019.

Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1), 1–9.

Araújo, Layanne Guedes Silva de. Hidrólise enzimática da fibra de caju submetida a diferentes pré – tratamentos: recuperação e reuso do complexo enzimático. 2018.

Bolelli Broinizi, Priscila Regina et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, 2007.

Bortolazzo, Nara Gustinelli. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para a hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar. 2011.

Cabral, Elaine Cristina. Utilização da técnica de Fingerprinting por Cromatogrametria de Massas para a Análise de Extratos de Produtos Naturais. 2010.

CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo. Relatório final, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos CGEENipe/Unicamp, dezembro de 2005.

Clemente, Alfonso. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

Degáspari, Cláudia Helena; Waszczynskyj, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

Estrutura do caju. Disponível em: < <https://brasilecola.uol.com.br/frutas/caju.htm> >. Acesso em: 14/06/2019.

Flamini, Riccardo. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. **ISRN spectroscopy**, v. 2013, 2013.

Ferreira, V. F.; Rocha, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.623-638, 2009.

Gurgel, Leandro Vinícius Alves. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE BIOPRODUTOS E BIOPROCESSOS. CentralBio.

Universidade Federal de Juiz de Fora. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/centralbio/laboratorio/equipamentos/uplc-ms/>>. Acesso em: 13/06/2019.

Morais, Sérgio Antônio Lemos de; Nascimento, Evandro Afonso do; Melo, Dárley Carrijo de. Análise da madeira de Pinus oocarpa parte I-estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTHECNOLOGY EDUCATIONS. University of Reading. Disponível em: <<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/viscozyme.html>>. Acesso em: 07/06/2019.

NATIONAL CENTER FOR BIOTHECNOLOGY EDUCATIONS. University of Reading. Disponível em: <<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/celluclast.html>>. Acesso em: 07/06/2019.

Ogata, Bruna Harumi. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos da cana – de – açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. 2013.

Ogeda, Thais Lucy; Petri, Denise FS. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

Reis, Carla Luzia Borges. Estudos de pré – tratamentos do bagaço de caju utilizando líquido iônico prótico visando a obtenção de produtos de valor agregado. 2016.

Rocha, Aleksandra Silva. Processo de obtenção de etanol por hidrólise enzimática do bagaço do pedúnculo do caju (*Anacardium Occidentale L.*). 2012.

Rodrigues, R. D. P. et al. Avaliação do efeito da adição de enzimas comerciais sobre o extrato de bagaço de caju. In: **Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2009, Natal. Anais... Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009., 2009.

Ruegger, Marcelo JS; TAU-K-TORNISIELO, Sâmia M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, p. 205-211, 2004.

Sá, Nádia Maria dos Santos Matos. Efeito do processamento sobre a composição de compostos fenólicos presentes no suco de caju. 2012.

Santos, A. L. F.; Kawase, K. Y. F.; Coelho, G. V. Enzymatic Saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, p.277-282, 2011.

Serrano, L. A. L.; Pessoa, P. F. A. P. Sistemas de produção do caju: aspectos econômicos da cultura do cajueiro. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, julho 2016. 2 ed.

Silva Neto, R. M. da; Abreu; F. A. P. de; Paiva, F. F. de A. **Processamento do pedúnculo de caju: cajuína**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.

Spínola, Vítor; Pinto, Joana; Castilho, Paula C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 173, p. 14-30, 2015.

WAGENINGEN UNIVERSITY & RESERACH. Ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometer. Disponível em: <<https://www.wur.nl/en/show/Ultra-performanceliquid-chromatography-tandem-mass-spectrometer-UPLCMSMS.htm>>. Acesso em: 13/06/2019.

WILSON, Keith; WALKER, John (Ed.). **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. Cambridge university press, 2010.

Zheng, Yi et al. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. In: **2009 Reno, Nevada, June 21-June 24, 2009**. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. p. 1.

ANEXO

Tabela I. Valores de massas discriminados de todas as triplicatas realizadas para os métodos de pré – tratamento sem aplicação enzimática

Sem Enzima										
Técnica	Amostra	Peso Inicial (g)			Bagaço Liofilizado (g)			Pectina Liofilizada (g)		
Ultrassom	A	1,0172			0,7689			0,0361		
	B	1,0154			0,7402			0,0383		
	C	1,0164			0,7877			0,0376		
	Estatísticas	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)
		1,0163	0,0074	0,0724	0,7656	0,0195	2,5512	0,0373	0,0009	2,4582
Autoclave	A	1,0007			0,6399			0,1024		
	B	1,0006			0,6336			0,1088		
	C	1,0007			0,6454			0,0901		
	Estatísticas	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)
		1,0006	0,0001	0,0005	0,6396	0,0048	0,7537	0,1004	0,0078	7,7264
Vortex	A	1,0028			0,7465			0,0409		
	B	1,0022			0,7951			0,0386		
	C	1,0020			0,7681			0,0444		
	Estatísticas	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)
		1,0023	0,0003	0,0339	0,7699	0,0199	2,5824	0,0413	0,0024	5,7740

Tabela II. Valores de massas discriminados de todas as triplicatas realizadas para os métodos de pré – tratamento com aplicação enzimática.

Com Enzima										
Técnica	Amostra	Peso Inicial (g)			Bagaço Liofilizado (g)			Pectina Liofilizada (g)		
Ultrassom	A	1,0004			0,6537			0,0086		
	B	1,0002			0,6225			0,0131		
	C	1,0005			0,6384			0,0083		
	Estatísticas	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)
		1,0004	0,0001	0,0125	0,6382	0,0127	1,9959	0,0100	0,0022	21,9545
Autoclave	A	1,0003			0,5102			0,1410		
	B	1,0003			0,4814			0,0853		
	C	1,0005			0,4777			0,1072		
	Estatísticas	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)
		1,0004	0,0001	0,0094	0,4898	0,0145	2,9662	0,1112	0,0229	20,6103
Vortex	A	1,0006			0,6017			0,0097		
	B	1,0002			0,6295			0,0098		
	C	1,0005			0,6200			0,0058		
	Estatísticas	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)
		1,0004	0,0002	0,0170	0,6171	0,0115	1,8697	0,0084	0,0019	22,0849

Tabela III. Valores de massas das triplicatas realizadas para o experimento com aplicação enzimática com duração de 6 horas seguidas.

Com Enzima – 6 horas seguidas										
Técnica	Amostra	Peso Inicial (g)			Bagaço Liofilizado (g)			Pectina Liofilizada (g)		
Autoclave	A	1,0005			0,4912			0,0271		
	B	1,0007			0,4962			0,0584		
	C	1,0005			0,4752			0,0344		
	Estatísticas	M	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)	μ	σ	CV(%)
		1,0006	0,0001	0,0094	0,4875	0,0090	1,8371	0,0400	0,0134	33,4546

Tabela IV. Valores de massas discriminados para as replicatas obtidos após o experimento com aplicação de enzimas diferentes.

Com Enzima – 3 horas com intervalo de 24 horas

Técnica	Amostra	Peso Inicial (g)			Bagaço Liofilizado (g)			Pectina Liofilizada (g)		
Autoclave viscozyme L + viscozyme L	A	1,0003			0,3783			0,0528	0,0009	
	B	1,0004			0,3357			0,0546	0,0012	
	C	1,0002			0,3238			0,0654	0,0010	
	Estatísticas	<i>M</i>	Σ	<i>CV</i> (%)	<i>M</i>	σ	<i>CV</i> (%)	μ	σ	<i>CV</i> (%)
	1,0003	0,0001	0,0082	0,3459	0,0234	6,7633	0,0576	0,0006	9,6600	
							0,0010	0,0001	12,0698	
Autoclave viscozyme L + Celluclast	A	1,0002			0,3623			0,0498	0,0012	
	B	1,0003			0,3450			0,0423	0,0020	
	C	1,0006			0,3194			0,0381	0,0007	
	Estatísticas	<i>M</i>	σ	<i>CV</i> (%)	<i>M</i>	σ	<i>CV</i> (%)	μ	σ	<i>CV</i> (%)
	1,0004	0,0001	0,0094	0,3422	0,0176	5,1493	0,0434	0,0048	11,1507	
							0,0013	0,0005	41,1856	