UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINA PINHEIRO

Aplicação da bromelina obtida de resíduos para desfloculação de leveduras na produção de bioetanol

Pirassununga
2022

CAROLINA PINHEIRO

Aplicação da bromelina obtida de resíduos para desfloculação de leveduras na produção de bioetanol

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Mestrado Profissional em Gestão e Inovação na Indústria Animal.

Área de Concentração: Gestão e Inovação na Indústria Animal

Orientador: Prof. Dra. Eliana Setsuko Kamimura

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P654a

Pinheiro, Carolina
Aplicação da bromelina obtida de resíduos para desfloculação de leveduras na produção de bioetanol / Carolina Pinheiro ; orientador Eliana Setsuko Kamimura. -- Pirassununga, 2022.
66 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional Gestão e Inovação na Indústria Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. enzima. 2. fermentação etanólica. 3. levedura floculada. 4. protease vegetal. 5. resíduos de abacaxi. I. Setsuko Kamimura, Eliana, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

Dedicatória

A minha querida e amada filha Helena Guerra ao qual fez me conhecer o mais puro, doce e eterno amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus pela sua infinita bondade.

Ao meu querido e amado esposo Edilson José Guerra que compartilha do mais dócil sentimento de pureza e alegria por meio da nossa filha Helena Guerra.

Aos meus pais, Mauricio Rodrigues Pinheiro e Maria Ivany Pereira Pinheiro (*in memoriam*), pelo amor incondicional, sabedoria e honestidade.

As minhas irmãs Katia Tais Pinheiro e Camila Pinheiro pelo companheirismo, amor e carinho, e aos sobrinhos Lolo e Beben e sobrinhas Juju e Nanda pela alegria, pureza e momentos de felicidades compartilhados.

A minha orientadora, Professora Dra. Eliana Setsuko Kamimura, pela paciência, dedicação e por ter sempre sido acolhedora.

Ao meu amigo Handray Fernandes ao qual foi minha base, companheiro de laboratório compartilhando risadas e incentivando-me a persistir.

Aos meus queridos amigos Fabiana e Alisson ao qual fizeram me sorrir e sentir a vida mais leve, e Samanta do Amaral que me mantém focada e persistente nos desafios da vida.

A técnica de laboratório, Dra. Marina Vieira de Carvalho, pela atenção e disponibilidade em auxiliar na execução dessa pesquisa.

Aos amigos e professores do PPG-GIIA e aos membros da banca examinadora por contribuírem na melhoria da pesquisa.

A presente pesquisa foi realizada com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

Chico Xavier

RESUMO

PINHEIRO, C. **Aplicação da bromelina obtida de resíduos para desfloculação de leveduras na produção de bioetanol**. 2022. 66 f. Dissertação de Mestrado – (Pós-Graduação em Gestão e Inovação na Indústria Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

A bromelina é uma enzima presente em diversas partes do abacaxi sendo amplamente utilizada em várias áreas industriais, por exemplo farmacêuticas, alimentícia, cosmética e têxtil. Até o presente, poucos estudos têm apresentado a aplicação da bromelina comercial como agente desfloculante em fermentações. Contudo, para agregar valor aos resíduos do abacaxi este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do extrato bruto contendo bromelina obtida dos resíduos do fruto. A dinâmica da fermentação consorciada com o extrato bruto contendo bromelina foi avaliada por um delineamento fatorial 2^2 mais 3 pontos centrais, tendo como variáveis independentes a concentração da levedura floculada (2 a 4%), extrato bruto contendo bromelina (12 a 24%) e os ensaio controle sem adição de extrato bruto contendo bromelina. Os parâmetros analíticos que possibilitaram a análise da cinética fermentativa foram a determinação do teor alcoólico (%), decaimento dos sólidos solúveis (°Brix), acidez total (%) e o potencial hidrogeniônico (pH). Foram avaliadas as fermentações conduzidas com e sem a adição de extrato bruto contendo bromelina, a fim de verificar a eficiência de cada uma delas por meio dos resultados analíticos que foram posteriormente comparados. A técnica para avaliação foi a metodologia de superfície de resposta. Os resultados demostraram que as fermentações conduzidas com extrato bruto contendo bromelina obteve melhor desempenho quando comparados com as fermentações sem extrato bruto contendo bromelina. A condição de 4% de levedura e 24% de extrato bruto contendo bromelina proporcionou maior teor alcoólico (4,1%) e a absorbância de 2,287nm. Para o ensaio sem extrato bruto contendo bromelina a condição de 4% de levedura obteve teor alcoólico de 2,5% e absorbância de 0,318nm. Conclui-se que a bromelina obtida dos resíduos do abacaxi é um potencial agente desfloculante.

Palavras-chave: enzima, fermentação etanólica, levedura floculada, protease vegetal, resíduos de abacaxi.

ABSTRACT

PINHEIRO, C. **Application of waste bromelain for yeast deflocculation in bioethanol production**. 2022. 66 f. Dissertation of Master's degree – (Pós-Graduação em Gestão e Inovação na Indústria Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Bromelin is an enzyme present in various parts of the pineapple and is widely used in several industrial areas, for example pharmaceuticals, food, cosmetics and textiles. Until now, few studies have presented the application of commercial bromelain as a deflocculant agent in fermentations. However, to add value to pineapple waste, this study has with objective to evaluate the efficiency of crude extract containing bromelain obtained from pineapple waste. The fermentation consortia with crude extract containing bromelain (CECB) was evaluated by a $2^2 + 3$ center point factorial design, with the concentration of flocculated yeast (2 to 4%), bromelain extract (12 to 24%), and the control trials with no added bromelain as independent variables. The parameters that allowed the analysis of the fermentation kinetics were the determination of the alcohol content (%), decay of soluble solids (°Brix), total acidity (%) and the hydrogen potential (pH). The fermentations conducted with and without the addition of bromelain were evaluated in order to verify the efficiency of each one of them through the analytical results that were subsequently compared. The technique for evaluation was design of experiment and the response surface methodology. The results showed that the fermentations conducted with extract containing bromelain performed better when compared to the fermentations without bromelain. The condition of 4% yeast and 24% bromelain extract was the highest alcohol content (4.1%) and the absorbance of 2.287 nm. For the assay without bromelain extract the 4% yeast condition obtained an alcohol content of 2.5% and an absorbance of 0.318 nm. In conclusion, bromelain obtained from pineapple waste is a potential deflocculant agent.

Keywords: enzyme, ethanolic fermentation, flocculated yeast, plant protease, pineapple waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resíduos do abacaxi coroa (A), casca (B) 22
Figura 2. Floculação (A) bactérias e (B) leveduras.....32
Figura 3. Levedura floculante. 36
Figura 4. Colônias de leveduras em plaqueamento *Spread Plate*.....37
Figura 5. Aspectos da levedura (A) com células livres e não floculadas e (B) leveduras com células agrupadas, floculadas 38
Figura 6. Tubo *Slant* com a levedura floculante 38
Figura 7. Resíduos higienizados (A) resíduos em solução de NaClO (B) 39
Figura 8. Extrato bruto contendo bromelina (EBCB) 40
Figura 9. Curva padrão do BSA.....41
Figura 11. Caldo de cana suplementado CSN (A) leveduras floculadas em meio ...47
CSN (B). 47
Figura 12. Lavagem de células.....47
Figura 13. Ensaios do delineamento fatorial 2^2 + 3 pontos centrais.....48
Figura 14. Ebuliômetro. 49
Figura 15. Titulação das amostras. 50
Figura 17. Cinética fermentativa do segundo ensaio do delineamento fatorial comparado com o segundo ensaio sem EBCB 54
Figura 18. Cinética fermentativa do quarto ensaio do delineamento fatorial comparado com o quarto ensaio sem EBCB 55
Figura 19. Pareto dos efeitos estimados padronizados para (A) Y1, (B) Y3 e (C) Y4 57
Figura 20. Pareto dos efeitos estimados padronizados para (A) Y2 e (B) Y5. 57
Figura 21. Superfícies de resposta (A) Y2: Absorbância (600nm) e (B) Y5: Acidez total (%).....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reaproveitamento de resíduos de frutas 19
Tabela 2. Reaproveitamento de resíduos do abacaxi.....24
Tabela 3. Polpas produzidas pela da empresa 35
Tabela 4. Construção da Curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) 41
Tabela 5. Níveis codificados e reais do fatorial completo 2^2 mais os 3 pontos centrais 44
Tabela 6. Delineamento fatorial completo 2^2 mais 3 pontos centrais.....45
Tabela 7. Preparo do meio CSN 46
Tabela 8. Resultados comparativos das respostas EBCB e sem EBCB 53
Tabela 9. Efeitos principais e de interação para as respostas Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5.. 56
Tabela 10. Coeficientes de regressão do modelo de primeira do fatorial 2^2 para a resposta Y2: absorbância (600nm). 58
Tabela 11. Coeficientes de regressão do modelo de primeira orden do fatorial 2^2 para a resposta Y5: acidez total (%).....58
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) considerando as variáveis respostas Y1, Y2, Y3 Y4 e Y5.....59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVO 15
2.1 OBJETIVO GERAL 15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 15
3. REVISÃO DE LITERATURA 16
3.1 Fruticultura no Brasil 16
3.2 Geração de resíduos na agroindústria 17
3.2.1 Resíduos oriundos do processamento de polpas 18
3.3 Abacaxi 21
3.4 Enzimas 25
3.5 Bromelina 26
3.6 Aplicações da bromelina 27
3.7 Mercado da bromelina 27
3.8 Produção de etanol no Brasil 29
3.9 Floculação: Considerações gerais 30
3.9.1 Causas da floculação 30
3.10 Aplicação da protease na desfloculação de leveduras 32
3.11 Legislação 33
4. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA 34
5. MATERIAL E MÉTODOS 36
5.1 Resíduos vegetais 36
5.1.2 Levedura floculante 36
5.1.3 Verificação da característica floculante da levedura 37
5.1.4 Manutenção da levedura em tubo *Slant* 38
5.2 Extrato bruto contendo bromelina (EBCB) 39
5.2.1 Assepsia das cascas 39
5.2.2 Preparação do extrato bruto contendo bromelina (EBCB) 39

5.2.3 Determinação de proteínas totais pelo método de Biureto.....40

5.2.3 Atividade enzimática (U/mL de EBCB).....42

5.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO EBCB DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA UTILIZANDO CEPA FLOCULADA.....44

5.3.1 Fermentação em escala laboratorial 44

5.3.2 Preparo do mosto.....45

5.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E MEIO DE CULTURA 45

5.4.1 Preparo do meio caldo suplementado nutrientes (CSN) 45

5.4.2 Preparo do pré-inóculo.....46

5.4.3 Fermentação 46

5.4.2 Teor alcoólico (%) 48

5.4.4 Determinação da Acidez Total (%).....50

5.4.5 Determinação da concentração de Sólidos Solúveis (°Brix).....51

5.4.6 Determinação do pH 51

5.4.7 Análises espectrofotométricas.....51

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52

6.1 Análise comparativa 52

6.2 Análise estatística 55

7. CONCLUSÃO 61

REFERÊNCIAS.....62

1. INTRODUÇÃO

O mercado da fruticultura brasileira encontra-se em plena ascensão e com uma expectativa positiva de crescimento para as próximas décadas (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2021). Consequentemente, o aumento de resíduos orgânicos gerados desse tipo de atividade industrial também cresce na mesma proporção tornando-se indispensável o desenvolvimento de pesquisas que gerem tecnologias mais sustentáveis e inovadoras para o correto destino desses resíduos e que tragam benefícios econômicos para o setor industrial.

A fim de agregar valor à gigantesca quantidade de resíduos gerados anualmente pesquisas com propostas inovadoras e sustentáveis tem sido desenvolvida pelo mundo e no país, com o objetivo de minimizar o desperdício e gerarem riquezas com seu reaproveitamento, como por exemplo, a fabricação de subprodutos de interesse industrial obtidas dos resíduos de abacaxi (SEREJO et al., 2021).

Um dos setores que poderia ser beneficiado com o aproveitamento do descarte de resíduos do abacaxi é a indústria alcooleira, que por décadas carece de pesquisas relacionado floculação de leveduras que diminuem sensivelmente o rendimento industrial.

Esses resíduos que em sua maioria são descartados aleatoriamente poderiam ser utilizados para a extração da bromelina que é reconhecidamente um agente natural da desfloculação na fermentação etanólica sem interferir na fisiologia da levedura, ao contrário do que acontece com as técnicas atualmente utilizadas pela maioria das indústrias alcooleira que empregam o ácido sulfúrico na desfloculação, causando estresse nas leveduras e diminuindo a viabilidade celular, refletindo consequentemente em baixos rendimentos industriais (FREGUGLIA, 1998; GUERRA, 1995; GUERRA & ANGELIS, 1998; LUDWIG et al., 2000; ROSA, 2008).

Entretanto, embora o setor sucroalcooleiro apresente décadas de experiência ainda necessita da incorporação de novas tecnologias no processo fermentativo para elevar o potencial de produção do etanol, visto que um dos maiores desafios das indústrias alcooleiras para aumentar a produtividade industrial são as técnicas utilizadas na desfloculação da fermentação que são naturalmente conduzidas por várias espécies de bactérias e até mesmo leveduras selvagens que adentram no processo do caldo-de-cana que é utilizado como principal substrato.

Nesse contexto, a utilização de enzimas papaína, bromelina e a ficina encontrada no grupo das hidrolases de origem vegetal tem demonstrado ações eficientes no processo de desfloculação (OLIVEIRA-FREGUGLIA, 1998; ROSA, 2008).

Dessa forma com o crescimento da frota veicular que utilizam motores *flex* e atualmente com a grande demanda de etanol para a fabricação de álcool em gel, utilizados como antissépticos, principalmente durante a pandemia do Coronavírus, é de suma importância o desenvolvimento de pesquisas que visam o melhoramento dos rendimentos da produção de etanol. Além de propor uma alternativa viável para melhorar os rendimentos industriais na produção do etanol, essa pesquisa também se preocupa com o descarte indiscriminado dos resíduos de frutas que são processadas industrialmente e que tanto oneram os recursos naturais por serem descartados sem nenhum processo prévio de tratamento causando desequilíbrios nos ambientes naturais.

Pesquisas e/ou projetos relacionados à sustentabilidade das indústrias brasileiras, seja ela familiar ou não, devem ter grande significância e importância, quer seja pelo aproveitamento de resíduos, minimizando-se o impacto ambiental, quer seja pela agregação de valores econômicos.

Diante do que foi exposto, a pesquisa descreve uma alternativa para o reaproveitamento dos resíduos de abacaxi no que concerne o uso do extrato bruto contendo bromelina de maneira simples e eficiente a partir de resíduos industriais e, sua utilização como agente desfloculante dos processos fermentativos industriais.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo dessa pesquisa é apresentar a utilização da bromelina obtida de resíduos de abacaxi para desfloculação de leveduras na produção de bioetanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reduzir o processo de floculação de leveduras durante a fermentação etanólica;
- Aumentar o rendimento etanólico;
- Contribuir com a gestão ambiental utilizando os resíduos do processamento de abacaxi;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fruticultura no Brasil

A fruticultura no Brasil, está em crescente expansão no mercado sendo um dos segmentos de maior destaque na economia do país. Em 2018 alcançou uma produção de 44,3 a 44,5 milhões de toneladas de frutas colhidas e encaminhadas principalmente para o setor alimentício, seja na forma *in natura* ou industrializada em forma de polpas, geleias, doces, sucos e uma série de outros aproveitamentos e elaboração (ABRAFRUTAS, 2021; ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTUTRA, 2021).

O crescimento do mercado de fruticultura, segundo dados da FAO (2019), Ferreira (2017) e Oliveira (2018), pode ter sido influenciado pela procura de uma alimentação saudável, aliado a melhoria da renda dos consumidores, níveis de informação e o uso de técnicas modernas no plantio e colheita das frutas, sendo que no Brasil, esse crescimento também está associado à diversidade de fatores climáticos que favorecem o cultivo e consequentemente ascensão desse mercado.

De acordo, com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados (Abrafrutas) a exportação de frutas teve um aumento de 20% em relação ao ano de 2020 e supera US$ 1 bilhão em 2021, espera-se que nos próximos anos esse setor continue em crescimento, o que tornou o Brasil um dos principais países mais promissores no setor de alimentos a partir das frutas face à grande procura pela praticidade e rapidez no preparo dos alimentos como no caso dos sucos preparados de polpas congeladas (ABRAFRUTAS, 2021; MARTINS et al., 2019).

Frutas como Laranja, Banana, Manga, Abacaxi, Mamão e outras diversas, foram as mais movimentadas no mercado em todo o país, sendo elas utilizadas em sua forma fresca ou destinadas às indústrias de alimentos. No entanto, com a alta perecibilidade desses produtos, faz-se com que o uso das frutas seja atribuído novas alternativas que busquem o aproveitamento em outros segmentos alimentícios como, por exemplo, polpas de frutas congeladas, geleias, doces e diversos outros produtos, que possibilitam o processamento, armazenamento e consumo das frutas fora da sua época de safra, para que possa aumentar a durabilidade do produto para comercialização (AMORIN, 2016; OLIVEIRA, 2018).

Quanto à economia da cadeia produtiva de frutas, essa por sua vez, favorece a geração de empregos e riquezas, sendo o setor fruticultor responsável por proporcionar uma média de 5 milhões de empregos gerados dentro do agro, além de ter sido um setor ao qual não foi afetado pela pandemia do COVID-19 (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2021; DONADON; SANTOS, 2018). Contrariamente aos demais setores que sofreram economicamente durante a pandemia o consumo de frutas no Brasil apresentou um aumento significativo o que favoreceu para este setor continuar em alta (STEELE et al., 2020).

3.2 Geração de resíduos na agroindústria

Diante do cenário econômico, produtivo e crescente do setor da fruticultura do país, o Brasil infelizmente não se destaca somente pela produção de frutas, e tristemente está entre os 10 países que mais desperdiçam alimentos no mundo, desde a colheita até o processamento final dos alimentos (MADEIRA, 2017). Estima-se que no país cerca de 26,3 milhões de toneladas de comida são jogadas fora ano a ano, e isso reflete na necessidade de buscarmos novas tecnologias de reuso de alimentos, visto que somando todo desperdício de alimento de um país, esse se torna responsável por ser o 3º maior emissor de gases do efeito estufa, com aproximadamente 3,3 bilhões de toneladas de gases, seguido de China e EUA (CUNHA; NETO, 2020).

Dessa maneira os resíduos industriais oriundos do processamento de frutas tornam-se juntamente com este crescimento avançado do mercado uma problemática ambiental, pois junto com o crescimento dos produtos fabricados a partir das frutas, às indústrias consequentemente ficam responsáveis por gerar toneladas de resíduos que incluem cascas, sementes, caroços e etc., além das outras perdas significativas em toda a cadeia produtiva desde a colheita até o processamento do produto final (AMORIN, 2016; PADILHA, 2015; SOUZA, 2018).

Sendo assim, torna-se essencial e indispensável busca de reaproveitamento dos resíduos agroindustriais gerados pelas indústrias, como por exemplo, as processadoras de polpas de frutas, com o objetivo de conscientizar o reaproveitamento dos resíduos com utilizações viáveis e econômicas e que minimizem os impactos sobre o meio ambiente, principalmente pelo fato dos

problemas ambientais ter se tornado cada vez mais crítico e frequente, e pelas regulamentações ambientais que exigem das empresas conscientização e destino apropriado dos seus resíduos gerados, como, por exemplo Lei n° 12.305, art. 9 da Política Nacional de Resíduos (COELHO, 2014; GREEN PEACE, 2016; SILVA et al., 2018).

Dessa forma, nessa busca crescente de alternativas viáveis de reutilização desses resíduos, tem se tornado de grande valor agregado por outras indústrias com a fabricação de novos produtos como, por exemplo, a produção de enzimas, farinhas, biogás, canudos e plásticos biodegradáveis ou diversos outros produtos oriundos dos resíduos gerados durante o processamento de polpas de frutas.

3.2.1 Resíduos oriundos do processamento de polpas

Nas indústrias alimentícias brasileiras, dentre as diversas utilizações das frutas como seu consumo "*in natura*", principalmente durante o período de safra, novas alternativas viáveis são empregadas para o maior aproveitamento das frutas, como a produção de polpas congeladas. O preparo de polpas de frutas se tornou uma das atividades agroindustrial de grande importância que, além de acrescentar valores econômicos às frutas brasileiras, aumenta muito a conservação dos valores nutricionais, evita o desperdício, otimiza o transporte e diminui possíveis perdas.

Entretanto, a exacerbação dessa atividade acresce na mesma proporção à geração de resíduos, estipulada entre 30 e 40% para resíduos que derivam principalmente da produção de sucos e polpas (RANDOLPHO, 2020). Ademais, o descarte desse subproduto, na maioria das vezes é realizado incorretamente acarretando impactos cada vez mais negativos para o meio ambiente, uma vez que são potencialmente fontes nutritivas para micro-organismos e, também, por provocar perdas de biomassa e energia (ANSILIERO et al., 2020).

Nas indústrias de processamento de frutas, partes da matéria-prima não utilizadas como bagaços, cascas sementes são descartadas durante o processamento e denominados resíduos ou popularmente "lixo" (PADILHA, 2015). Durante as etapas de processamento de polpas desde a seleção e descarte das frutas, em estado de decomposição há uma perda significativa e numerosa de resíduos gerados durante todo o beneficiamento, este que não são aproveitados pelas

agroindústrias na obtenção de novos subprodutos e constituem o descarte inapropriado dos seus rejeitos prejudicando o meio ambiente (MUNIZ et al., 2018).

Porém apesar da potencialidade apresentada pela maioria desses subprodutos oriundos do processamento, existem poucas pesquisas, poucos incentivos e investimentos em tecnologias capazes de agregar valor à enorme quantidade de resíduos gerados pela agricultura e pela agroindústria nacional, mesmo apresentando um grande potencial para reaproveitamento e geração de novos produtos (OLIVEIRA, 2015).

Entretanto, deveria ser uma tendência à utilização e valorização de produtos oriundos da geração de resíduos visto as regulamentações ambientais e escassez de recursos, sendo indispensável às indústrias desenvolverem novas alternativas com técnicas viáveis a fim de reduzir os prejuízos gerados ao meio ambiente, criando alternativas para seus dejetos e conscientização ambiental.

Diante do exposto e da crescente preocupação com o destino correto dos resíduos e sua agregação de valor, propostas de reutilização dos resíduos gerados no processamento de frutas, estão sendo elaborados diversos estudos sobre o assunto. Na literatura consultada podemos observar alternativas para o aproveitamento dos resíduos de frutas conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Reaproveitamento de resíduos de frutas.

Pesquisas com resíduos	**Autores**
Reaproveitamento de resíduos gerados pelas espécies *Persea americana* e *Theobroma grandiflorum*: uma alternativa para a sustentabilidade ambiental.	SEREJO et al. (2021).
Biscoitos tipo cookie com adição de resíduos de farinha de frutas.	DUARTE et al. (2021).
Aproveitamento integral de resíduo de polpa de manga na elaboração e avaliação sensorial de leite fermentado.	AZEVEDO et al., (2020).

(Continuação)

Pesquisas com resíduos	Autores
Estimativa do potencial de geração de biogás oriundos de resíduos de polpa de maracujá e acerola.	BONFIM et al., (2019).
Resíduos da indústria processadora de polpas de frutas: capacidade antioxidante e fatores antinutricionais.	MARTINS et al., (2019).
Aproveitamento integral de resíduo da polpa de manga na elaboração e avaliação sensorial de iogurte.	AZEVEDO (2019).
A compostagem como alternativa para a gestão de resíduos orgânicos resultantes da fabricação de polpa de frutas: descrição e estudo de caso.	CUNHA; NETO (2019).
Extração e separação de flavonoides do extrato da casca do maracujá.	PINTO (2018).
Aplicação de pectina extraída de resíduos de maracujá (*Passiflora edulis)* como agente estabilizante em sorvetes.	UEHARA et al., (2017).
Aplicação das tecnologias supercrítica e convencionais para o reaproveitamento dos resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa).*	OLIVEIRA (2015).
Biscoitos com resíduo de manga, maracujá e jabuticaba.	PADILHA; BASSO; (2015).

Fonte: a autora, 2022.

Azevedo (2020) mencionou que a adição de farinha do resíduo da manga obteve boa aceitação na aplicação em leite fermentado. Entretanto, apesar da utilização da farinha obtida de resíduos ser uma alternativa viável para o reaproveitamento do resíduo quer seja pela capacidade antioxidante ou pelas questões ambientais, ainda são necessários novos estudos (PADILHA; BASSO; 2015; MARTINS, 2019).

Bonfim *et al.* (2019) em seus estudos com geração de biogás obtidos de resíduos de acerola e maracujá trouxe por meio de seus estudos fontes renováveis de energia e novas formas de utilização dos resíduos de polpas.

Pesquisas utilizando resíduos de semente de maracujá como matéria-prima para a obtenção de extratos bioativos antioxidantes e antimicrobianos mencionaram como promissor sua utilização o que ressalta a importância de resíduos como sementes, cascas, caroços, bagaços para continuar alavancando esse mercado promissor e que esses descartes são extremamente valiosos, pois as substâncias como as enzimas, proteínas, e óleos essenciais de grande interesse econômico e industrial em diversos setores (OLIVEIRA, 2015; PINTO, 2018).

Dessa forma sendo a produção de enzimas uma solução econômica e de interesse significativo para às indústrias, como uma alternativa viável para reduzir o descarte de resíduos na natureza, já que frequentemente às indústrias são responsáveis por desenvolver alternativas ecológicas a fim de minimizar os impactos gerados no meio ambiente, enzimas obtidas dos resíduos de abacaxi seriam uma excelente alternativa para reaproveitamento dos resíduos e agregação de valor (BENELLI, 2010; PINTO, 2018).

Abreu (2019) ressalta o potencial de uso dos resíduos de abacaxi pelas suas propriedades valiosas como a bromelina, uma protease, que representa cerca 60% do mercado total de enzimas.

Dessa forma, com a crescente preocupação com os problemas ambientais e a proposta de uma sociedade que busca minimizar os efeitos de poluição do planeta, essa por sua vez nos forçou a procurar recursos alternativos sustentáveis e ecológicos, principalmente porque o descarte representa um elevado montante na natureza. Nesse contexto, a necessidade de implementação de tecnicas alternativas com sistemas de aproveitamento dos resíduos industrial é muito importante não só do ponto de vista econômico como também, ambiental, científico tecnológico e, essencialmente quanto ao desenvolvimento de novos produtos e processos que agreguem novos valores aos subprodutos como, por exemplo, a utilização de enzimas obtidas dos resíduos gerados por essas indústrias.

3.3 Abacaxi

O abacaxi como é popularmente conhecido ou cientificamente chamado de *Ananas comosus (L.) Merr.,* é um fruto característico da América do Sul, sendo um fruto de grande apreciação do paladar e consumo nacional e mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de abacaxi, predominando seu plantio principalmente em regiões tropicais e subtropicais (NASCIMENTO, 2019). Por isso, o Brasil por apresentar essas condições adequadas para cultivo deste fruto, possui participação significativa na produção mundial do fruto com uma produção de 1.637.126, que consequentemente no país apresenta grande contribuição para a fruticultura alavancando a economia (DINIZ, 2017; EMBRAPA, 2020; SILVA et al. 2018).

Esse fruto pertencente à família *Bromeliaceae* é constituído por coroa, casca verde ou amarelada (quando maduro), talo (cilindro central) e polpa (Figura 1), apresentando-se geralmente de forma cilíndrico ou ligeiramente cônico (SOUZA, 2021).

Figura 1. Resíduos do abacaxi coroa (A), casca (B).

Fonte: a autora, 2022.

Segundo o Anuário Brasileiro da Fruticultura (2021) o abacaxi esteve entre as frutas de maior comercialização nas Centrais Estaduais de Abastecimentos do país, com uma contribuição significativa para a economia, ocupando a posição de terceiro lugar na produção mundial e sendo as cinco frutas mais produzida no país ultrapassando 2.000.000 toneladas/ano.

Estima-se que a produção agrícola anual deste fruto ainda se encontra em ascensão e tende a crescer nos próximos anos, sendo que no período de 2007 a 2017 o país ocupava o primeiro lugar com uma produção superior a 27.000.000 toneladas durante esse período (EHRHARDT, 2019; FAO, 2019; IBGE, 2019).

Consequentemente com a alta produção do fruto, o descarte também aumenta significativamente pela não utilização da coroa, casca e talos do fruto pelas indústrias processadoras de alimentos, principalmente as processadoras de polpa do fruto. Estima-se que o descarte varia de 40 a 60% do fruto, pois cerca de 22,5% consideram-se comestível, as demais partes do abacaxi são descartados após o processamento industrial, apesar de apresentarem potencial para elaboração de novos outros produtos (EHRHARDT, 2019; OLIVEIRA, 2018). Dessa forma com a produção de abacaxi aumentando anualmente e consequentemente a geração de resíduos crescendo ano após ano, recentemente o número de estudos realizados na busca de utilização dos resíduos do abacaxi e suas propriedades têm aumentado (EHRHARDT, 2019).

Por isso, com essa grande quantidade de resíduos gerados pelo fruto abacaxi, uma alternativa viável seria agregar valor aos resíduos o que consequentemente minimizaria o descarte no meio ambiente como, por exemplo, no solo (FERREIRA, 2017).

As indústrias responsáveis pela produção das polpas de frutas desconhecem a importância do que caracterizam “lixo” rejeitando partes de extrema importância para demais indústrias de alimentos, cosméticos, têxteis etc.; como, por exemplo, as coroas, cascas e talos, do abacaxi. Essas sobras possuem elevados teores de açúcares, fibras e conteúdo proteico (OLIVEIRA, 2019).

Oliveira (2020) descrevem a importância do aproveitamento dos resíduos que garantem consequentemente a redução dos problemas ambientais, reduzindo descarte inadequado, além de agregar valor ao que era descartado que até então tinha pouco ou nenhum valor econômico.

Por sua vez, recentemente a busca por alternativas viáveis de reutilização e agregação de valor tem crescido constantemente aumentando o número de pesquisas desenvolvidas com os resíduos conforme (Tabela 2).

Tabela 2. Reaproveitamento de resíduos do abacaxi.

Pesquisas com resíduos	Autores
Aproveitamento do resíduo agroindustrial de abacaxi submetido ao processo de secagem para elaboração de barra de cereais.	SOUZA et al., (2021).
Determinação da capacidade antioxidante do extrato em pó da casca do abacaxi aplicando diferentes técnicas de extração.	SOUZA et al., (2021).
Análise sensorial de cookie desenvolvidas com farinha da casca de abacaxi *(Ananas comosus (L.) Merril).*	SOUSA (2020).
Produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando resíduos do processamento do abacaxi (*Ananas comusus*) como substrato.	FERRASSOLI (2019).
Caracterização dos resíduos do abacaxi e sua utilização no processo de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis.*	EHRHARDT (2019).
A utilização de resíduos das agroindústrias de suco de abacaxi para produção de bromelina.	FERREIRA et al., (2017)
Aproveitamento da casca de abacaxi no preparo de fermentado alcoólico.	DINIZ (2017).
Extração da bromelina a partir da casca do abacaxi (*Ananas comosus*) e sua imobilização em esferas de hidrogel para síntese de ésteres de interesse energético.	OLIVEIRA (2016).
Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato.	EHRHARDT et al., (2015).

Fonte: a autora, 2022.

Sousa (2020) relatou uma boa aceitabilidade nos biscoitos elaborados quando acionado farinha obtida das cascas dos resíduos de abacaxi, e que eles possuem valor nutricional atrativo pelo alto teor de fibras, pois observou que os valores obtidos de fibras foram superiores ao exigido pelas legislações.

Ferrassoli (2019) em sua pesquisa elaborada com casca e talos de abacaxi comprovou que os resíduos demonstraram bons substratos para a produção de biossurfactantes pela levedura *Candida tropicalis.*

Em pesquisas com a produção de biossurfactantes *Bacillus subtilis* obtidos de resíduos de abacaxi mostraram-se bons resultados, com rendimentos que minimizam os custos de produção, além de ser de extrema importância o estudo com surfactantes naturais na busca da substituição dos tensoativos químicos que ainda são bastante aplicados (EHRHARDT et al., 2015; EHRHARDT, 2019).

Ferreira *et al.* (2017) ressalta a importância da utilização da bromelina e sua larga utilização nas indústrias, o que vem de encontro com essa pesquisa que assim como o autor descreve a necessidade de obter-se a enzima dos resíduos.

Diniz (2017) avaliou a agregação de valor comercial com a produção de um fermentado alcoólico a partir casca de abacaxi, agregando valor ao resíduo, visto que antes seria descartado, e que depois passou a ser uma nova geração de renda para o produtor.

Oliveira (2016) reafirmou que as cascas do abacaxi são excelentes fontes de bromelina e que sua imobilização em esferas de hidrogel apresentou-se promissora como biocatalisador na produção de ésteres de interesse comercial.

3.4 Enzimas

O termo enzima remonta ao século XVIII quando se iniciaram os estudos sobre a digestão dos alimentos, sua origem deriva do grego e significa “em levedura” (OLIVEIRA, 2016).

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reações que catalisam, por exemplo, as lipases atuam nos lipídeos decompondo-os em glicerol e ácidos graxos, as amilases decompõem o amido em açúcares mais simples, as celulases decompõem a celulose, as proteases decompõem as proteínas, entre outras (GONÇALVES; FONSECA, 2018).

Quanto às aplicabilidades enzimáticas nos diversos setores industriais encontram-se vinculadas à grande demanda do mercado mundial que podem ser utilizadas tanto no segmento industrial quanto médico e laboratorial. No grupo das enzimas com fins comerciais, as proteases desempenham um papel importantíssimo, pois participam de uma série de reações tecnológicas nas indústrias alimentícias, químicas e têxteis (FERREIRA et al., 2017).

Biotecnologicamente, o mercado dos produtos enzimáticos é muito mais explorado que os produtos antimicrobianos. Portanto, as enzimas obtidas do processamento de resíduos apresentam inúmeras utilizações com um amplo interesse econômico por indústrias de alimentos à base de amido, ração para animais, cosméticos, indústrias têxtis, produtos de limpeza, cervejeira, panificação e suco (EMBRAPA, 2020; FERREIRA et al., 2017).

3.5 Bromelina

As enzimas são classificadas em 6 tipos de reação de acordo com o tipo de reações que catalisam: 1. Oxidorredutase, 2. Transferases, 3. Hidrolases, 4. Liases, 5. Isomerases, 6. Ligases (LIMA, 2019).

A bromelina, enzima presente em diversas partes do abacaxi, é o nome genérico dado às enzimas proteolíticas encontradas nesse fruto sendo, a do caule classificada como EC (3.4.22.32) e do fruto EC (3.4.22.33). (ABREU, 2019 *apud* CORSO; WALISZEWSKI; WELTI- CHANES, 2012; BERNELA; AHUJA; THAKUR, 2016).

Essa enzima na verdade é constituída por um conjunto de enzimas proteolíticas que são sintetizadas por vegetais pertencentes à família das *Bromeliaceae*. Nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto a bromelina não está presente, entretanto, aumenta rapidamente durante o processo de maturação, mantendo-se elevado até o amadurecimento e podendo encontrá-la em diversas partes do fruto como, por exemplo, no caule (ABREU, 2019).

A extração comercial da bromelina se faz a partir do caule e das folhas da espécie *Ananas comosus* após o processo de moagem, prensagem, filtração e precipitação do suco. Pesquisas realizadas nesse segmento revelam que a casca do abacaxi apresenta um grande potencial de fonte de bromelina, o que vem de encontro com as recentes preocupações com o aproveitamento dos resíduos industriais, uma

vez que em indústrias que processam o abacaxi para produção de compotas, geleias e polpas, a casca do abacaxi representa o maior percentual em termos de geração de resíduos (OLIVEIRA, 2016).

A bromelina extraída do caule do abacaxi é muito estável, o que permite que a enzima mantenha sua atividade biológica em temperaturas que variam entre 40 e 60ºC, na qual as maiorias das enzimas são totalmente desnaturadas, quanto ao pH a maior atividade enzimática da bromelina situa-se entre o pH 5,5 a 8,0 (ABREU, 2019).

Por sua vez, cabe ressaltar que a bromelina comercial é um produto de alto valor agregado e isso se deve aos altos custos dos processos atualmente disponíveis para a sua purificação e obtenção, o que tem levado ao desenvolvimento de várias estratégias de purificação como precipitação, extração líquido-líquido, sistemas micelares, técnicas cromatográficas e processos por membranas (ABREU, 2019).

3.6 Aplicações da bromelina

Sendo de grande interesse, essa enzima possui diversas utilidades para às indústrias farmacêuticas, alimentícia, cosmética e têxtil. Devido à diversidade de aplicações nas indústrias alimentícias podem ser utilizadas para amaciar carnes e na clarificação de cervejas, e como suplemento alimentar, além de possuir propriedades diuréticas, depurativas e digestivas (AMORIM, 2016; OLIVEIRA, 2018).

Abreu (2019) ressalta que na indústria cosmética sua aplicação tem gerado interesse na incorporação em formulações cosméticas e esfoliantes químicos, higiene como ingrediente ativo em dentifrícios e produtos de pele no tratamento de acne, rugas e pele seca.

Em farmacologia, quando utilizados como ativo, para o tratamento de doenças inflamatórias, doenças vasculares, ou como agente fibrinolítico no tratamento via oral para queimaduras de terceiro grau, aplicação terapêutica de anticorpos, e para ação mucolítica essa enzima apresenta bons resultados (ABREU, 2019).

Na indústria têxtil, a bromelina também é muito utilizada para melhorar a qualidade dos processos de tingimento proteolíticos (ABREU, 2019).

3.7 Mercado da bromelina

A comercialização de importações no Brasil de enzimas ou preparações enzimáticas no ano de 2019 representou quase 30 mil toneladas, enquanto as exportações representaram 9,3 mil toneladas, as principais enzimas que foram comercializadas no país foram às amilases com um total de aproximadamente 3,5 mil toneladas. Os principais países responsáveis por essa importação incluem China, Estados Unidos e Dinamarca (EMBRAPA, 2020). Dessa maneira publicações na área da enzimologia, em especial nos relatórios referentes ao mercado mundial de enzimas publicados pela Business Communications Company Inc. (BCC Research, 2020) reforçam o constante crescimento deste setor.

Esse mercado já se apresenta promissor desde as décadas passadas movimentando toneladas de importações de enzimas industriais por todo o país na última década, principalmente pelo uso na área de saúde, no setor de alimentos como, por exemplo, carnes e frutos do mar, suplementos dietéticos, padaria, indústrias cosméticos e setores de bebidas em vários países. Nessa expectativa o mercado global de bromelina foi avaliado em US $ 37,6 milhões em 2019 e tendem a aumentar a demanda do produto nesses setores durante o período de previsão (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

Segundo o relatório da Grand View Research (2020) o mercado global de bromelina tem uma expectativa promissora de crescimento devendo atingir cerca de US $ 47,71 bilhões até 2023, enquanto registra-se a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 8,61% durante o período de previsão entre o ano de 2014 a 2023. Os produtos enzimáticos utilizados na fabricação de alimentos e bebidas compreendem a maior parte desse segmento, seguido por indústria têxtil e produtos de limpeza (OLIVEIRA, 2016).

Entretanto, o Brasil ainda carece de estudos e incentivo para extração da bromelina a um custo acessível e competitivo para às indústrias, mesmo o país sendo um importante produtor de abacaxi, neste caso às indústrias importadoras de bromelina acaba pagando valores muito altos, atingindo R$ 14.000,00, o quilo dessa enzima (ABREU, 2019).

Esse cenário de crescimento reitera a necessidade da valorização da bromelina obtida a partir dos resíduos de abacaxi e sua posterior utilização industrial, pois além de otimizar o crescimento econômico também auxilia na redução no descarte incorreto dos resíduos.

3.8 Produção de etanol no Brasil

O Brasil sempre foi destaque no mercado de produção de etanol sendo um dos maiores produtores, Estados Unidos e o país são responsáveis por uma produção significativa mundialmente (BRANDÃO, 2020). Em 2020 a produção total de etanol totalizou 32,8 milhões de m^3, sendo a região sudeste responsável por 18 milhões de m^3 (54,9% da produção brasileira), quanto a importação o Brasil obteve 1 milhão de $m^{3.}$ Entretanto produção total de etanol registrou queda de 7,1% devido ao impacto da queda no preço do petróleo no mercado mundial (ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2021). No entanto, para os próximos anos o mercado mostra-se promissor e em crescimento, porém o país ainda carece de pesquisas que incentivem o aumento na produção de etanol.

De acordo com Guerra (1995) dentre os maiores problemas que ocorrem em fermentações etanólica, destaca-se a floculação induzida por contaminantes bacterianos. Segundo o autor, os contaminantes bacterianos que induzem a floculação das leveduras também produzem um abaixamento do pH, do teor alcoólico (%), das porcentagens final do fermento, elevação do glicerol e acidez total.

Guerra (1995) citou em sua pesquisa o isolamento de quatro linhagens bacterianas capazes de induzir a floculação de levedura e, quando associadas, produzem em 15 horas de fermentação uma diminuição da viabilidade celular (13%), do brotamento (5,9%), viabilidade dos brotos (37,7%) e fermento final (55,7%) em relação ao controle fermentativo sem floculação.

Cabe ressaltar que em suas pesquisas realizadas com floculação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação de etanol nas indústrias alcooleiras brasileiras, também relatou a ação desfloculante das cepas de leveduras floculadas quando em contato com a bromelina o que vem de encontro com a proposta desta pesquisa. Segundo o autor, por ser um desfloculante natural não diminui a viabilidade celular das leveduras durante o processo de desfloculação quando comparado a utilização do ácido sulfúrico, comumentemente utilizado para resolver esse tipo de problema quando se instala nas fermentações industriais. Por isso esse fato reverte tanto em economia no uso de insumos quanto também em produção de etanol, uma vez que a viabilidade celular não é afetada (GUERRA, 1995).

3.9 Floculação: Considerações gerais

As leveduras são organismos essencialmente unicelulares que quando estão em estado de floculação aglomera-se em uma massa coesiva contendo milhares de células, tais agregados são denominados flocos (GUERRA, 1995). A explicação do fenômeno de floculação surgiu após esclarecimentos de análises detalhadas de carboidratos complexos que permitiram conhecer as estruturas específicas dos polissacarídeos com suas funções definidas na identificação e na sua alteração. O estudo da floculação de leveduras, como cita Gilliland (1957), iniciou-se em 1876 com Louis Pasteur, que fez a primeira observação cientifica sobre o fenômeno. Tal estudo prolongou-se por anos com pesquisadores estudiosos da “floculação” (GUERRA, 1995).

Nas indústrias alcooleiras são imensos os problemas gerados pela floculação da levedura, pois interferem no rendimento da produção de etanol, e consequentemente causa prejuízos econômicos (GÓES-FAVONI et al., 2018). Durante o processo fermentativo a floculação das células de levedura faz com que estas se agrupem e se precipitem no fundo das dornas, trazendo consequências no processo fermentativo, visto que para um processo eficiente da total conversão de açúcar em etanol e CO_2, é necessário que as leveduras permaneçam sempre suspensas e livres no líquido de fermentação (ROSA, 2008).

3.9.1 Causas da floculação

Rosa (2008) mencionou que a origem da floculação das células de leveduras pode ser derivada de vários fatores que podem ou não estar relacionadas, conforme a seguem abaixo elencadas:

- Leveduras selvagens floculantes que adentram à fermentação via mosto;
- Bactérias com deficiências nutricionais que aderem à parede celular das leveduras levando a formação de flocos;
- Síntese de metabólitos bacterianos como, por exemplo, a dextrana, que causam entupimentos de boquilhas das centrífugas devido à floculação do

fermento, pois parte dessa dextrana não é eliminada no processo de clarificação;

O processo de floculação de leveduras seja ele por bactérias ou pela presença de leveduras floculantes é um fenômeno considerado complexo que envolve as paredes celulares das leveduras e bactérias.

Ceccato-Antonini (2010) também ressalta os vários fatores que causam a floculação como:

- o contato prévio entre bactérias que induzem o processo da floculação e leveduras selvagens;
- pela presença de dextrana, derivadas do metabolismo bacteriano;
- devido à entrada de leveduras selvagens floculantes pelo do mosto.

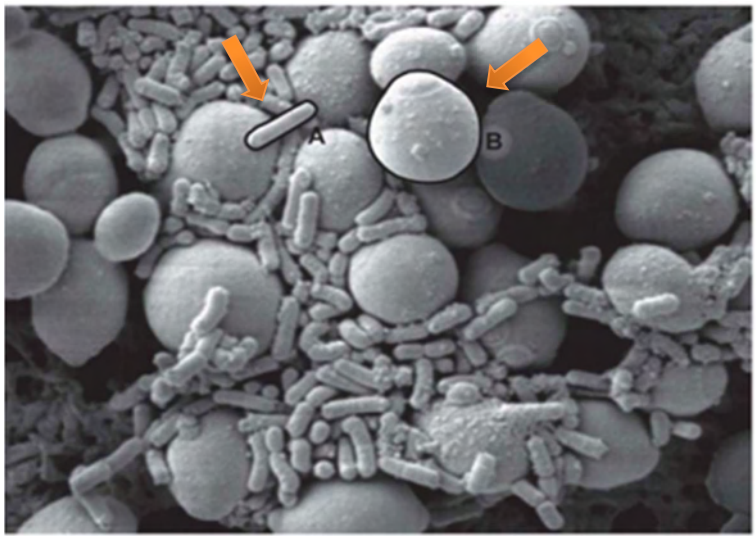
No entanto, independentemente dos fatores que promovem a floculação, para que o fenômeno se estabeleça é fundamental a presença de íons cálcio e da agitação as células, provavelmente devido ao aumento da colisão entre as células, permitindo a adesão. Quanto às bactérias como *Sporolactobacillus* e *Lactobacillus* foram descritas como os agentes causadores da floculação (Ceccato-Antonini, 2010).

Uma fermentação conduzida com leveduras floculantes sempre aumenta o tempo de residência global nas dornas, uma vez que causa a diminuição do tempo em que as leveduras passam em contato com o mosto, refletindo em baixos rendimentos fermentativos além de dificultar a manutenção do processo com consequentes perdas no volume total de fermento disponível para metabolizar os açúcares (SANTOS, 2019).

Rosa (2008) ressalta que a floculação de leveduras também gera outros prejuízos, pois causa entupimento de tubulações e perda de células na centrífuga, esse problema eleva os gastos da produção, pois aumentam o consumo de antiespumantes, ácido, biocidas e reposição celular das leveduras perdidas.

Na (Figura 2) podemos observar as bactérias que induzem a floculação, sendo (A) bactérias (B) leveduras (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Figura 2. Floculação (A) bactérias e (B) leveduras.



Fonte: Ceccato-Antonini (2010, p. 19).

A floculação, além de causar prejuízos enormes no rendimento industrial, também é uma das principais causas do aparecimento de espuma na dorna de fermentação, o que também afeta negativamente no rendimento do processo produtivo já que grande parte do volume da dorna passa a ser ocupada pela espuma, afetando negativamente no brotamento de novas células (SANTOS, 2019).

3.10 Aplicação da protease na desfloculação de leveduras

Pesquisas relacionadas à utilização de enzimas à base de proteases na desfloculação de leveduras durante o processo fermentativo das indústrias alcooleiras, tem-se mostrado eficiente. Entretanto ainda requer pesquisas e investimentos para torná-las eficientes e competitivas quando comparadas com o tratamento ácido (GUERRA, 1995; ROSA, 2008).

A eficiência da desfloculação com a utilização de proteases está relacionada com fatores proteicos associados a sais minerais e às mananas que, parecem estar envolvidos em qualquer tipo de floculação de leveduras (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Oliveira-Freguglia (1998) em leituras espectrofotométricas (Coleman SP35-D, a 600nm) constatou a eficiência das proteases vegetais, a papaína, bromelina e a ficina, apresentando resultados positivos sobre o componente causal da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* causada por *Lactobacillus Fermentum*, onde foram

classificadas como: não floculantes (Abs > 0,65); fracamente floculantes (0,40 < Abs < 0,65); fortemente floculantes (Abs < 0,40).

Rosa (2008) também relatou que a floculação pode ser sanada com tratamento enzimático à base de proteases, que agem na parede celular da levedura, substituindo o tratamento convencional, que emprega ácido sulfúrico.

Até o presente momento, ainda não existe uma solução definitiva para o problema da floculação de leveduras, uma vez que o tratamento usado atualmente, à base de ácido sulfúrico, não é ideal, pois permite novamente a ressurgência do fenômeno durante a fermentação.

O tratamento do fermento floculado com ácido sulfúrico induz à dispersão das leveduras presentes no floco, no entanto, segundo os autores, esse tipo de tratamento, além de ser agressivo às leveduras, também não consegue eliminar totalmente a floculação, pois, durante o retorno do fermento à dorna de fermentação, ocorre uma alteração do pH para uma faixa de 3,8 a 4,2 com a mistura da suspensão de leveduras com o mosto, voltando o fermento a flocular (GUERRA & ANGELIS, 1998).

Quando o fermento, depois de acidificado (pH igual 2,5), é misturado ao mosto (pH ao redor de 6,0) a floculação novamente é estabelecida. Uma alternativa para solucionar esse problema seria o tratamento enzimático para o controle da floculação, pois esse controle é menos afetado pelo pH do meio, sendo a desfloculação, nesse caso, irreversível (LUDWIG et al., 2000).

Cabe ressaltar que apesar dos desafios enfrentados pela indústria alcooleira com desfloculação, observamos uma lacuna na literatura consultada em relação a artigos científicos que busque trazer soluções à indústria e melhoria no rendimento de produção de etanol.

3.11 Legislação

Visto que a cada dia há um crescente interesse em uma sociedade sustentável, o Brasil dispõe de diversas regulamentações com uma série de leis, decretos e resoluções a respeito dos resíduos orgânicos gerados.

A Lei n° 12.305, 02 de agosto de 2010 regulamentada pelo Decreto Federal nº 7.404/2010, dispõe de uma extensa legislação que visa atender as especificidades de cada contexto do manejo inapropriado dos resíduos sólidos, trazendo os meios e

instrumentos necessários para que o País possa atuar consciente e envolvido com os problemas ambientais (CUNHA, 2019).

De acordo com BRASIL (2010) no art. 9 da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), Lei n° 12.305, declara que:

> “na gestão e gerenciamento de resíduos sólidos, deve ser observada a seguinte ordem de prioridade: não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento dos resíduos sólidos e disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos”. (BRASIL, art. 9, 2010).

Entretanto, dados da Política Nacional de Resíduos Sólidos indicam que há uma geração anual de 800 milhões de toneladas de “resíduos orgânicos”. basicamente definidos por restos de animais ou vegetais descartados de atividades humanas. Porém, o resíduo descartado indevidamente leva a uma serie de malefícios ao meio como, geração de odores, volatilização de gases, atração de agentes transmissores de doenças e diversos (AGOSTINHO, 2019).

Por isso, o Fórum Econômico Mundial tem ressaltado novas propostas de gestão dos resíduos orgânicos e mencionou a “economia circular” como alternativa de reaproveitamento dos resíduos propondo um novo paradigma de reintrodução dos resíduos na cadeia produtiva, com objetivo de reduzir os impactos no meio ambiente e a geração exacerbada do que seria denominado “lixo” (ZAGO, 2019).

Zago (2019) ainda ressaltou que a falta de conhecimento e valorização dos resíduos pela sociedade causam grandes impactos ambientais, e que o desconhecimento de seu potencial de aproveitamento impossibilita a agregação de valor e geração de novos produtos de valor econômico.

A última conferência internacional: Resíduos Orgânicos numa Economia Circular, que ocorreu em dezembro de 2020 em Portugal, debateu soluções de valorização de resíduos orgânicos para a diminuição do descarte e menor procura dos recursos do planeta. Dessa forma é notória a constante preocupação nacional e mundial as exigências ambientais, por isso, cabem às empresas geradoras, sendo elas públicas e privadas atentarem-se as legislações específicas quanto ao reuso desse material e incorporações de técnicas de reutilização sustentáveis.

4. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

A empresa processadora de frutas fornecedora dos resíduos para o desenvolvimento desta pesquisa, caracteriza-se por ser uma empresa familiar de pequeno porte. Atualmente a empresa está localizada na cidade de São José do Rio Pardo – SP. A empresa realiza a distribuição das polpas de frutas principalmente em supermercados, lanchonetes, Buffets, e diversos outros estabelecimentos, atendendo a cidade de São José do Rio Pardo – SP e as cidades da região. A sua produção caracteriza-se na fabricação de 15 sabores de polpas de frutas com fabricação própria.

Tabela 3. Polpas produzidas pela da empresa.

SABORES PRODUZIDOS
Abacaxi (100g)
Abacaxi com hortelã (100g)
Maracujá (100g)
Goiaba (100g)
Morango (100g)
Pêssego (100g)
Caju (100g)
Melão (100g)
Acerola (100g)
Acerola com Laranja (100g)
Melancia (100g)
Frutas Vermelhas (100g)
Manga (100g)
Uva (100g)
Mamão (100g)

Fonte: a autora, 2022.

Os sabores fornecidos pela empresa também incluem 6 sabores de revenda que são coco, açaí, cupuaçu, tamarindo, detox e limão, além da comercialização de frutas congelas como framboesa, amora, morango e mirtilo.

No que se refere a atual política de gestão de resíduos orgânicos, a empresa ainda não possui um procedimento de descarte adequado, os resíduos gerados a partir do processo de fabricação das polpas são lançados diretamente nas plantas do local, sem tratamento prévio.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Resíduos vegetais

A matéria prima para extração do extrato bruto contendo bromelina que foi utilizada nessa pesquisa consistiu-se em resíduos de abacaxi obtida da empresa fornecedora dos resíduos situada no município de São José do Rio Pardo - SP, que processa polpas de frutas. A extração do extrato bruto contendo bromelina dos resíduos vegetais supramencionados foi realizada a partir do cerne, casca, coroa e resíduos do fruto. As amostras residuais foram fornecidas conforme a necessidade logística da pesquisa, as quais foram posteriormente armazenadas em sacos plásticos mantidos sob refrigeração e então acondicionadas em caixas térmicas e encaminhadas até a Universidade de São Paulo - USP, campus Pirassununga - SP. O processamento para obtenção dos resultados foi realizado no departamento de Engenharia de Alimentos, FZEA laboratório de Bioprocessos.

5.1.2 Levedura floculante

As cepas de leveduras com potencialidade para desenvolver a floculação foram obtidas a partir de amostras provenientes de unidades industriais do setor sucroalcooleiro (Figura 3) por intermédio da empresa Microservbio de Pirassununga - SP, que atua no ramo de consultoria de usinas de produção de biocombustíveis.

Figura 3. Levedura floculante.

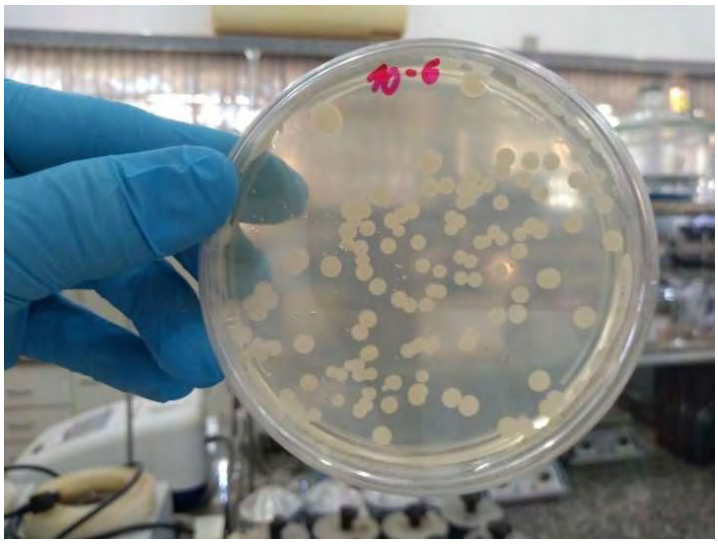
Fonte: a autora, 2022.

5.1.3 Verificação da característica floculante da levedura

Para verificação e constatação da característica floculante da cepa leveduriforme utilizada nos experimentos realizou-se o cultivo das células conforme técnica de plaqueamento *Spread Plate*. Dando seguimento ao protocolo experimental, as células foram serialmente diluídas em solução fisiológica estéril 0,85% em diluições que variaram de 10^{-1} a 10^{-8} para serem posteriormente plaqueadas em meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA). Após o procedimento de diluição seriada, transferiram-se alíquotas de 0,1 mL das diluições sobre a superfície do meio de cultura acondicionado em placas de Petri que em seguida foram espalhados sobre a superfície do meio com o auxílio de uma alça. Esse procedimento analítico foi realizado em triplicata e em seguida as placas foram incubadas invertidas a 28 °C em estufa microbiológica por 48h marca Fanem modelo 347 CD.

Após o período requerido ao desenvolvimento celular, procederam-se as contagens das colônias desenvolvidas sobre a superfície do meio de cultura e seus resultados expressos em UFC/mL (Figura 4). As colônias em condições de cultura pura foram então isoladas, replicadas, incubadas a 28 °C em estufa microbiológica por 48h marca Fanem modelo 347 CD e posteriormente armazenadas sob refrigeração em tubo *slant*.

Figura 4. Colônias de leveduras em plaqueamento *Spread Plate*.

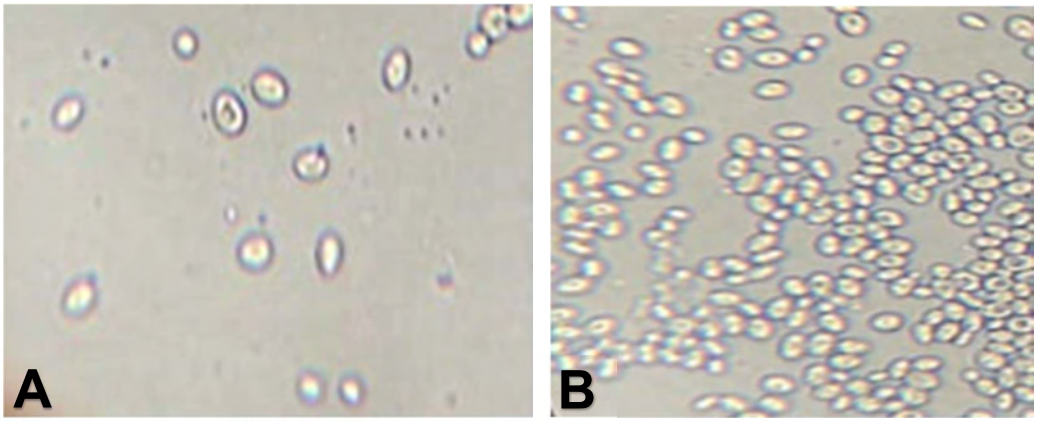


Fonte: a autora, 2022.

A verificação das características floculantes da cepa selecionada foi feita pela observação microscópica de um microscópio binocular marca Nikon, onde, com

auxílio de uma alça de platina transferiu-se uma pequena alíquota da biomassa leveduriforme em uma gota pendente de solução fisiológica 0,85% depositada sobre a superfície de uma lâmina de vidro de microscopia. A constatação da atividade floculante foi confirmada dessa forma com o auxílio de uma lente objetiva de 400x (Figura 5).

Figura 5. Aspectos da levedura (A) com células livres e não floculadas e (B) leveduras com células agrupadas, floculadas.



Fonte: a autora, 2022.

5.1.4 Manutenção da levedura em tubo *Slant*

Após a constatação da característica floculante da levedura, os tubos de cultura contendo o inóculo estriado em meio de armazenamento inclinado (Figura 6) foram conservados sob refrigeração a 5ºC para serem utilizados no decorrer desta pesquisa.

Figura 6. Tubo *Slant* com a levedura floculante.

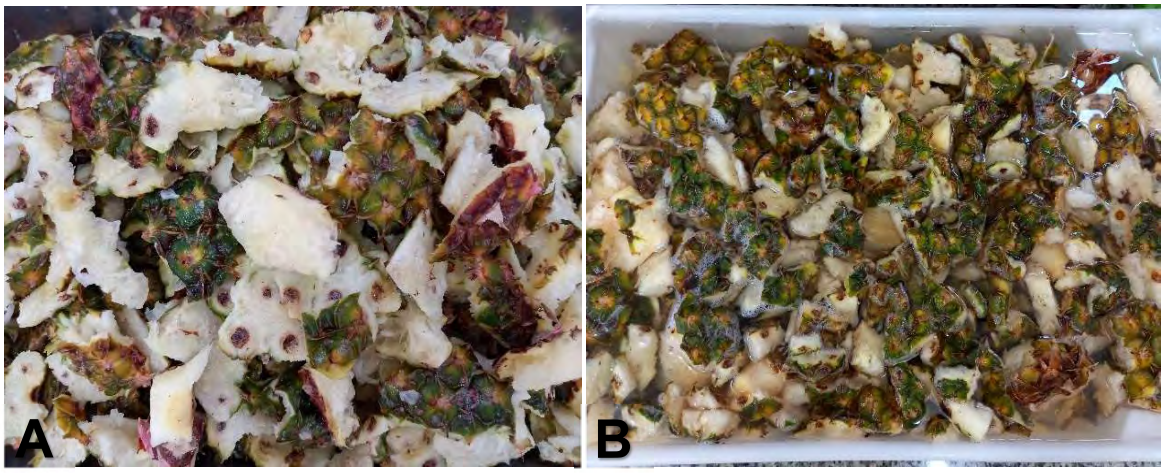
Fonte: a autora, 2022.

5.2 Extrato bruto contendo bromelina (EBCB)

5.2.1 Assepsia das cascas

Seguindo as recomendações de Oliveira (2016) os resíduos de abacaxi foram lavados em água corrente com detergente e posteriormente enxaguados com água corrente e água destilada. As cascas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO 3%) por um período de 15 min (Figura 7B). Após o procedimento de lavagem, os resíduos de abacaxi foram cortados em cubos de aproximadamente 1,5 cm de aresta (Figura 7A).

Figura 7. Resíduos higienizados (A) resíduos em solução de NaClO (B).

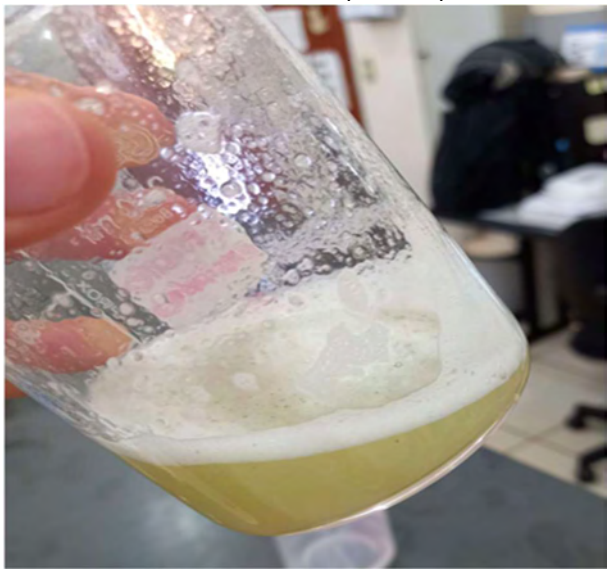


Fonte: a autora, 2022.

5.2.2 Preparação do extrato bruto contendo bromelina (EBCB)

A preparação dos extratos enzimáticos foi adaptada das pesquisas elaboradas por Oliveira (2016) e Feitosa et al. (2013). Dentro desses contextos, pesou-se em balança analítica marca Tecnal 200g de cascas de abacaxi desidratadas e foram adicionadas em 250 mL de água destilada, e posteriormente trituradas em liquidificador convencional em velocidade baixa, por 2 minutos, a temperatura ambiente. Após a trituração, realizou-se o peneiramento para a obtenção do extrato bruto contendo bromelina (Figura 8), os resíduos oriundos do processo de peneiramento foram posteriormente descartados.

Figura 8. Extrato bruto contendo bromelina (EBCB).



Fonte: a autora, 2022.

5.2.3 Determinação de proteínas totais pelo método de Biureto

A determinação da concentração de proteínas totais no extrato bruto contendo bromelina (EBCB) obtido dos resíduos, foi realizada por espectrofotometria com o método colorimétrico do Biureto (adaptado GORNALL, 1949).

Uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) marca Sifma-Aldrich a 500 mg/L de NaOH 1M foi utilizada para a construção da curva padrão (Figura 9), segundo a Tabela 4, sendo que, após a adição do Biureto, os tubos de ensaio foram deixados em repouso, ao abrigo da luz, por 10 minutos. Posteriormente realizou-se a leitura das absorbâncias a 540 nm em espectrofotômetro marca Jenway modelo 7305.

Para a determinação do teor de proteínas totais no extrato bruto contendo bromelina, adicionou-se em um tubo de ensaio: 0,1 mL da amostra (extrato bruto contendo bromelina), 0,9 mL de água destilada e 2,0 mL do reagente de Biureto.

A reação foi deixada em repouso, ao abrigo da luz, por 10 minutos em temperatura ambiente para desenvolvimento da cor e a absorbância foi lida no espectrofotômetro a 540 nm marca Jenway modelo 7305.

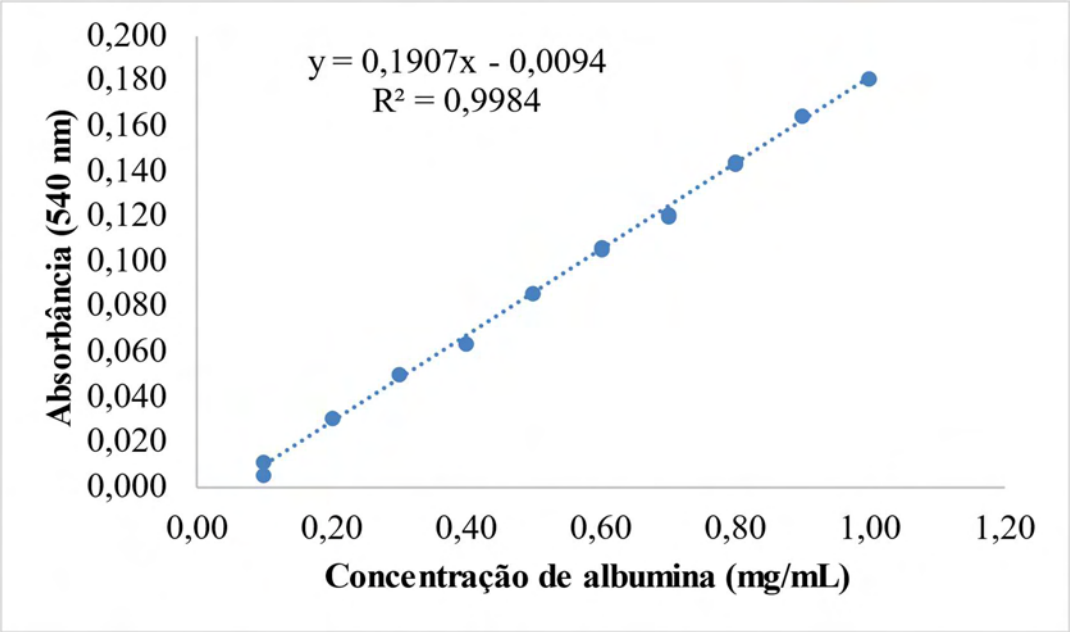
Tabela 4. Reações para construção da curva padrão de BSA.

TUBOS	Solução de Albumina (mL)	H_2O destilada	Biureto (mL)
BRANCO	0	0,50	2
1	0,05	0,45	2
2	0,10	0,40	2
3	0,15	0,35	2
4	0,20	0,30	2
5	0,25	0,25	2
6	0,30	0,20	2
7	0,35	0,15	2
8	0,40	0,10	2
9	0,45	0,05	2
10	0,50	0	2

Fonte: a autora, 2022.

A concentração total de proteínas na amostra foi obtida pela equação da reta da curva padrão (Figura 9), onde “y” é a concentração de proteínas em mg/mL e “x” é a absorbância da amostra.

Figura 9. Curva padrão do BSA.



Fonte: a autora, 2022

5.2.3 Atividade enzimática (U/mL de EBCB)

A atividade enzimática foi determinada segundo método de Silva e Tambourgi (2011) com adaptações, substituindo a caseína por albumina de soro bovino (BSA).

Para a reação de digestão da albumina pelo extrato bruto contendo bromelina, utilizou-se uma proporção substrato-enzima de 5:1.

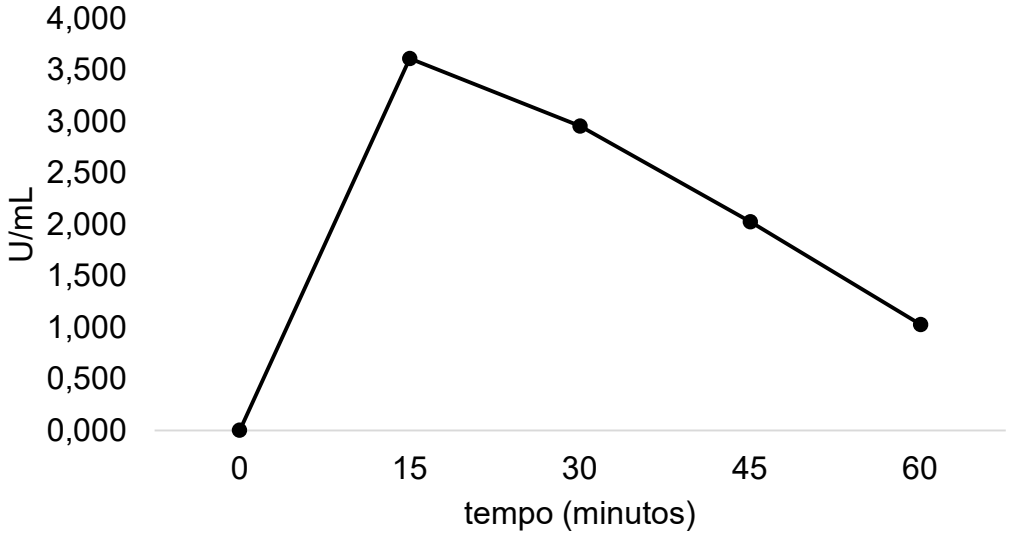
Em primeiro lugar, o espectrofotômetro foi zerado com uma solução de 2,0 mL de água destilada e 4,0 mL de reagente de Biureto. Preparou-se, então, um tubo Padrão, contendo 5,0 mL de solução padrão de BSA (1,0 mg/mL de NaOH) e 1,0 mL de água destilada. Uma alíquota de 2,0 mL foi retirada, adicionada de 4,0 mL de reagente de Biureto e, após um período de repouso de 10 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 540 nm marca Jenway modelo 7305 (absorbância do Padrão).

Para as leituras subsequentes, o espectrofotômetro foi zerado com uma solução de 5,0 mL de água destilada e 1,0 mL de extrato bruto contendo bromelina, de forma a descontar a interferência da cor do extrato, uma vez que a reação com o biureto é colorimétrica.

Em um tubo Falcon de 50 mL, montou-se, então, a reação de digestão da albumina, adicionando-se 30,0 mL de solução padrão de BSA (1,0 mg/mL de NaOH) e 6,0 mL de extrato bruto contendo 0,615 mg/mL de proteínas totais (obtido pela curva padrão – Figura 9). Imediatamente, uma alíquota de 2,0 ml da digestão foi retirada, adicionada de 4,0 mL de reagente de Biureto e, após um período de repouso de 10 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 540 nm marca Jenway modelo 7305 (absorbância no tempo 0).

A reação de digestão foi incubada em banho-maria Marconi modelo NA 093 a 35°C e realizaram-se leituras subsequentes nos tempos 15 minutos (t15), 30 minutos (t30), 45 minutos (t45) e 60 minutos (t60), como descrito acima. Sendo assim a Eq. 1 da atividade enzimática (U/mL) o tempo variou em intervalos de 15 minutos a 60 minutos (Figura 10).

Figura 10. Perfil de atividade enzimática de bromelina em extrato bruto de abacaxi.



Fonte: a autora, 2022

Desta forma, define-se 1U como a quantidade em mmol de BSA hidrolisado pelo tempo (minutos). Para o cálculo da atividade enzimática utilizou a Eq. 1 sendo que o tempo de reação utilizado foi nas condições de 35 °C e 15 minutos.

Eq. 1

$$\boldsymbol{U/ml\ enzima} = \frac{\left(\frac{\boldsymbol{Ab\ tf - Ab\ t0}}{\boldsymbol{Ab\ albumina}} * \frac{\boldsymbol{g/mmol\ albumina * V1}}{\boldsymbol{V2}}\right)/\boldsymbol{t}}{\boldsymbol{V3}}$$

Onde:

Ab tf (tempo reação) = absorbância das alíquotas da reação de digestão obtida nos diversos tempos

Ab t0 = absorbância da alíquota da reação de digestão obtida no tempo 0

Ab albumina = absorbância do Padrão

g/mmol albumina = Concentração da solução padrão de albumina (BSA)

V1 = Volume total da reação de digestão (mL)

V2 = Volume de extrato bruto na reação de digestão (mL)

t = tempo (em minutos) em que foram realizadas as leituras das alíquotas do tempo de reação de digestão
V3 = Volume de EBCB mL utilizado na reação com Biureto.

5.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO EBCB DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA UTILIZANDO CEPA FLOCULADA

5.3.1 Fermentação em escala laboratorial

Para avaliação da eficiência do EBCB obtido dos resíduos de abacaxi e sua aplicação na desfloculação de células de leveduras em fermentação etanólica, inicialmente realizou-se um planejamento com um delineamento fatorial completo com 2^2 pontos fatoriais + 3 pontos centrais para avaliar como as 2 variáveis independentes sendo elas: X1 (concentração de leveduras floculadas) e X2 (concentração de extrato bruto contendo bromelina) e como elas afetam nas respostas durante o decorrer da fermentação. A Tabela 5 apresenta os níveis que foram utilizados com as condições em cada ensaio.

Tabela 5. Níveis codificados e reais do fatorial completo 2^2 mais os 3 pontos centrais.

	Níveis		
Variáveis respostas	-1	0	+1
X1 – Concentração de levedura floculada (%)	2	3	4
X2 – Concentração de EBCB (%)	12	18	24

Fonte: a autora, 2022.

O substrato utilizado para a conversão fermentativa da primeira etapa foi a sacarose, que foi obtida por meio da moagem de cana-de-açúcar, seguida da depuração dos resíduos vegetais e acrescida de nutrientes (meio CSN), onde as concentrações de levedura e do extrato bruto contendo bromelina seguem plotadas na Tabela 6.

Tabela 6. Delineamento fatorial completo 2^2 mais 3 pontos centrais.

	X1 Levedura (%)	X2 EBCB (%)	RESPOSTAS Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
1	**-1 (2)**	**-1 (12)**					
2	**+1 (4)**	**-1 (12)**					
3	**-1 (2)**	**+1 (24)**					
4	**+1 (4)**	**+1 (24)**					
5 pc	**0 (3)**	**0 (18)**					
6 pc	**0 (3)**	**0 (18)**					
7 pc	**0 (3)**	**0 (18)**					

pc: ponto central; Y1: Teor Alcóolico (%); Y2: Absorbância (600nm); Y3: Sólidos Solúveis (°Brix); Y4: pH; Y5: Acidez total (%).
Fonte: a autora, 2022.

Dessa forma os ensaios laboratoriais para constatar a eficiência do extrato bruto contendo bromelina na desfloculação de células de leveduras submetidas à fermentação etanólica foram realizados no laboratório de Bioprocessos do departamento de engenharia de alimentos FZEA/USP.

5.3.2 Preparo do mosto

Com as condições obtidas do delineamento fatorial foi realizado uma fermentação em escala laboratorial utilizando o caldo de cana suplementado (CSN) como substrato (GUERRA, 1995; OLIVEIRA 1998; MESSETTI, 2010). Durante o processo fermentativo, avaliou-se a potencialidade do extrato bruto contendo bromelina (EBCB) em desflocular as células. Para a validação destas condições os ensaios foram conduzidos em triplicatas.

5.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E MEIO DE CULTURA

5.4.1 Preparo do meio caldo suplementado nutrientes (CSN)

Para o preparo do meio caldo suplementado nutrientes (Tabela 7) utilizou-se o caldo de cana fresco que foi extraído por meio de moagem da cana-de-açúcar. Após a extração, o caldo foi acrescido com duas claras de ovo em forma de clarineve (duas claras por litro de substrato). Nessas condições, a mistura foi submetida ao aquecimento e mantido sob fervura durante 10 minutos quando então a mistura foi

filtrada com algodão hidrófilo. Após a filtração, o caldo clarificado foi resfriado à temperatura ambiente e os sólidos solúveis (°Brix) ajustado em 10 com água destilada e monitorada com auxílio de um refratômetro. Em seguida, o meio foi suplementado com 0,5 g/L de extrato de levedura, 0,5g/L de peptona e 0,12g/L de Tween 80 por litro. Após a suplementação, o meio foi esterilizado por autoclavagem a 121ºC durante quinze minutos (GUERRA, 1995; MESSETTI, 2010).

Tabela 7. Preparo do meio CSN.

Meio de caldo suplementado nutrientes (CSN)	
Extrato de levedura	0,50 g/L
Tween 80	0,12 g/L
Peptona	0,50 g/L
Caldo de cana clarificado	1 Litro

Fonte: a autora, 2022.

O meio CSN foi utilizado na forma líquida como substrato para o desenvolvimento inicial das leveduras floculantes e para posterior verificação da eficiência desfloculante do extrato bruto contendo bromelina.

5.4.2 Preparo do pré-inóculo

A biomassa necessária para ser utilizada durante as etapas da pesquisa foi produzido por meio da fermentação com o meio CSN e com auxílio de Shaker marca Tecnal modelo TE – 424 com agitação constante de 120 rpm e temperatura ajustada em 27°C. Utilizando alça de platina, em cabine de segurança biológica marca Pachane retirou-se uma amostra de cultura de leveduras floculantes conservadas em tubo *Slant* onde posteriormente foram deixados em condições de agitação a 120 rpm e 27°C no agitador Shaker contendo 500mL de meio CSN. Tal procedimento permitiu o início do crescimento das células de leveduras e a multiplicação da quantidade de biomassa necessária que foi utilizada no decorrer da pesquisa.

5.4.3 Fermentação

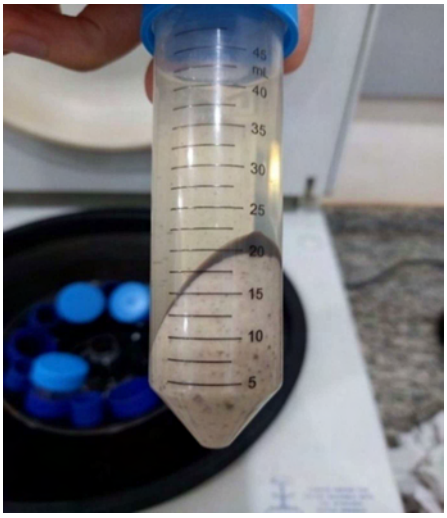
Após o preparo do inóculo inicial foram realizadas novas fermentações em Erlenmeyer contendo 500mL de meio CSN suplementados e esterilizados (Figura 11A) para verificação da ação desfloculante das células de levedura (Figura 11B).

Figura 11. Caldo de cana suplementado CSN (A) leveduras floculadas em meio CSN (B).

Fonte: a autora, 2022.

Em seguida, a biomassa obtida no pré-inóculo foram transferidas para tubos cônicos de centrífuga e submetidas à centrifugação em centrífuga marca Eppendorf modelo 5430R a 7.000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspendida em solução fisiológica 0,85% e novamente centrifugada, esse procedimento foi repetido durante três vezes (Figura 12).

Figura 12. Lavagem de células.



Fonte: a autora, 2022.

Após a centrifugação da biomassa obtida pesou em balança analítica marca Tecnal 5 gramas (2%), 10 (4%) gramas e posteriormente 7,5 (3%) gramas de biomassa conforme planejamento experimental da pesquisa (Figura 13) onde os Erlenmeyer foram inoculados mantendo as condições de temperatura e agitação utilizadas no preparo do pré- inóculo (27°C e 120 rpm, respectivamente).

As fermentações foram nomeadas como amostras 1, 2 e 3 sem EBCB e amostras 1, 2 e 3 com EBCB, ou seja, contendo o extrato bruto contendo bromelina obtido dos resíduos de abacaxi.

Figura 13. Ensaios do delineamento fatorial 2^2 + 3 pontos centrais.

Fonte: a autora, 2022.

5.4.2 Teor alcoólico (%)

Durante a fermentação o teor alcoólico (%) foi monitorado por meio de um ebuliômetro de aço inoxidável da marca Toscola (Figura 14).

Antes do início dos procedimentos analíticos o ebuliômetro sempre era calibrado. A técnica de ebuliometria baseia-se nas propriedades de equilíbrio líquido-vapor de uma mistura homogênea de dois solventes voláteis miscíveis.

Procedimento analítico

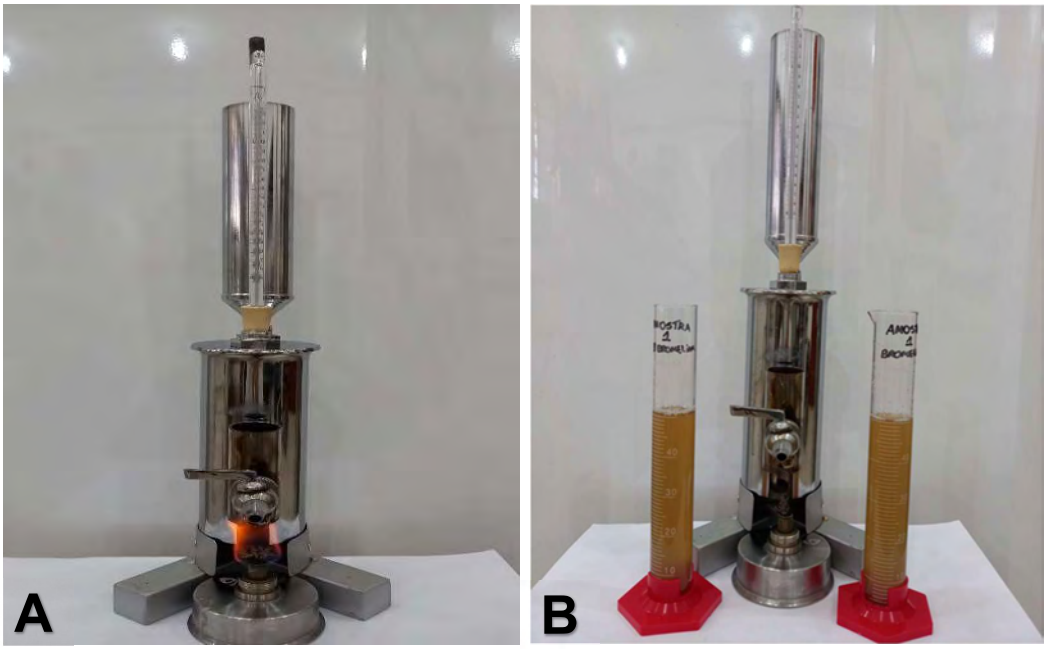
Calibração do ebuliômetro:

- Adicionar 50 mL de água destilada na caldeira do ebuliômetro com o condensador vazio;
- Conectar o termômetro à caldeira do ebuliômetro;
- Acender a lamparina a acompanhar o aumento da temperatura no termômetro;
- Fazer a leitura após a estabilização da temperatura;
- Anotar esse valor no ponto zero da régua de aferição do aparelho de forma que a água pura corresponda a Zero °GL.

Determinação do teor alcoólico (%):

- Lavar a caldeira e o condensador do ebuliômetro;
- Encher o condensador;
- Adicionar 50 mL da amostra a ser analisada na caldeira;
- Conecte o termômetro na caldeira;
- Acender a lamparina;
- Assim que a temperatura estabilizar, anotar o valor;
- Com o auxílio da régua de aferição fazer a determinação da concentração alcoólica.

Figura 14. Ebuliômetro.



Fonte: a autora, 2022.

5.4.4 Determinação da Acidez Total (%)

A acidez total (%) das amostras foi determinada pelo método titulométrico com NaOH 0,1M.

Para a determinação da acidez total (%) transferiu-se 10 mL do material a ser analisado para um Erlenmeyer de 100 mL (Figura 15). Posteriormente adicionou-se 5 gotas do indicador fenolftaleína a 1% e em seguida, procedeu-se a titulação com solução de hidróxido de sódio até o aparecimento da cor rósea, anotando o volume utilizado. Os resultados foram obtidos de acordo com Eq. 1 e expressos em %.

$$\text{ACIDEZ (\%)} = \frac{V \times F \times 0{,}9}{A} \qquad \text{Eq. 1}$$

Onde:

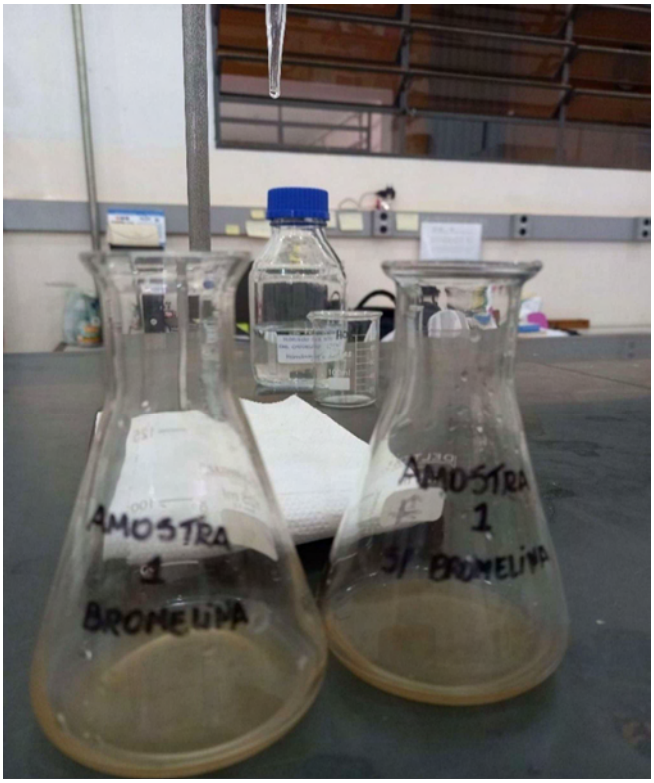
V: Número de solução de NaOH 0,1M gasto na titulação

F: Fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1m

A: Número de mL da amostra

0,9: Fator de conversão para o ácido lático

Figura 15. Titulação das amostras.



Fonte: a autora, 2022.

5.4.5 Determinação da concentração de Sólidos Solúveis (°Brix)

Para a determinação das concentrações de sólidos solúveis (°Brix) utilizou-se refratômetro portátil da marca Grandindex modelo RSG-100/ATC com capacidade de medição na faixa entre 0° a 30° com prévia limpeza com água destilada, e leitura direta. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur era adicionado uma gota do sobrenadante das amostras no prisma do refratômetro e a leitura era realizada.

5.4.6 Determinação do pH

As análises de pH foram realizadas a partir de um potenciômetro digital portátil marca Gehaka modelo PG 1800, previamente calibrado com tampões pH 4,0 e pH 7,0. O eletrodo foi introduzido em um béquer que continha 50 mL da amostra até a submersão total do bulbo de vidro. Com o aparelho devidamente ajustado as leituras foram efetuadas até o aparelho estabilizar.

5.4.7 Análises espectrofotométricas

A determinação da floculação das células de leveduras tanto da fermentação conduzida com extrato bruto contendo bromelina quanto da fermentação desprovida da enzima foi feita por meio de análises espectrofotométricas utilizando a absorbância (600nm) como padrão analítico. Antes de determinar a absorbância das amostras fermentadas, o espectrofotômetro marca Jenway modelo 7305, era zerado (calibrado) com meio de cultura CSN desprovido de inóculo e ajustado a um comprimento de onda igual a 600 nm. Para quantificar a floculação utilizou-se uma alíquota das amostras em cubetas e posteriormente submetidos a leituras espectrofotométricas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em duas etapas sendo (1) a comparação dos resultados das fermentações com e sem EBCB e sua eficiência fermentativa avaliada pelo decaimento das concentrações de sólidos solúveis (°Brix), e elevação do grau alcoólico, e (2) análise estatística.

Na segunda etapa dos resultados para a análise estatística foi utilizado o planejamento fatorial 2^2 + 3 experimentos no ponto central, com o total de 7 ensaios experimentais. As variáveis independentes utilizadas foram: X1: concentração inicial de leveduras (%) e a X2: concentração de EBCB (%) sendo 6,15 mg/mL de proteínas totais e atividade enzimática de 3,612 U/mL de extrato bruto, à temperatura de 35 ºC, por 15 minutos.

As variáveis dependentes (respostas) foram concentração final do Y1: teor alcoólico (%), Y2: absorbância (600nm), Y3: sólidos solúveis (°Brix), Y4: pH e Y5:acidez total (%). Dessa forma foi utilizado o software *Statistica 7.0* para uma melhor análise dos resultados gerados com os sete ensaios contendo extrato bruto contendo bromelina.

6.1 Análise comparativa

A Tabela 8 apresenta as respostas finais (Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5) das fermentações dos sete ensaios sem adição do extrato bruto contendo bromelina (EBCB) e com adição do extrato bruto contendo bromelina (EBCB). As respostas foram analisadas após 13 horas de fermentações e sobre as mesmas condições utilizadas nos ensaios com EBCB e sem EBCB, em ambos a concentração inicial dos sólidos solúveis (°Brix) foi ajustado em 10.

Tabela 8. Resultados comparativos das respostas EBCB e sem EBCB.

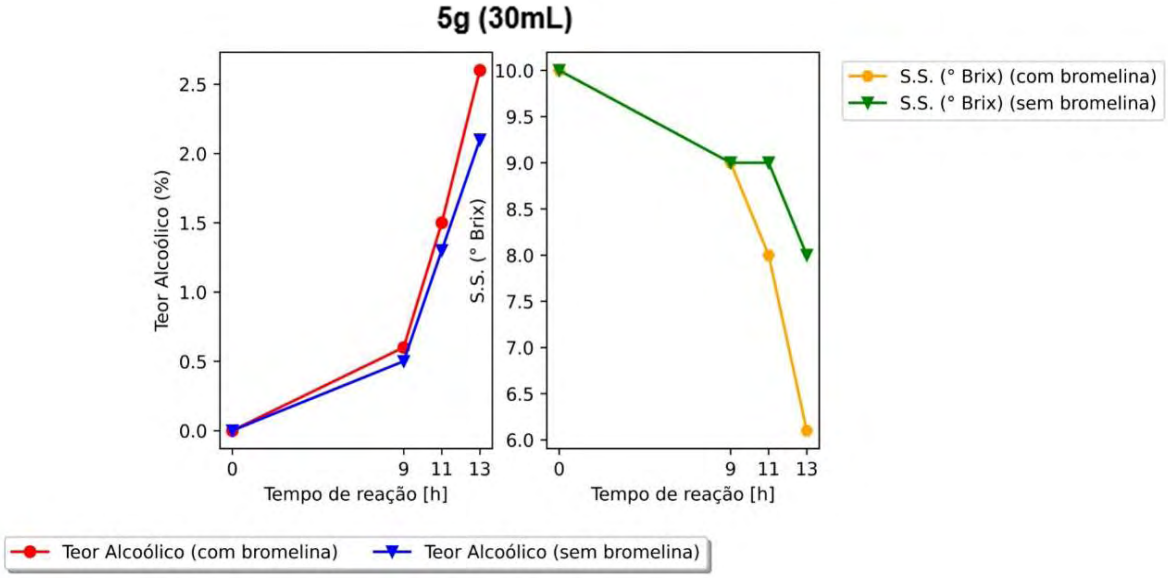
	ENSAIOS	X1	X2	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
	1	-1 (2)	-1 (12)	2,6	1,102	6,1	3,32	2,5
	2	1 (4)	-1 (12)	3,5	1,952	6,0	3,17	2,8
	3	-1 (2)	1 (24)	3,1	1,645	6,1	3,49	2,6
Com EBCB	4	1 (4)	1 (24)	4,1	2,287	6,0	3,32	3,0
Fatorial 2^2 + 3pc	5 Pc	0 (3)	0 (18)	2,5	1,702	6,2	3,23	2,8
SS_i =10(ºBrix)	6 Pc	0 (3)	0 (18)	2,4	1,812	6,1	3,28	2,8
	7 Pc	0 (3)	0 (18)	2,5	1,745	6,1	3,25	2,7
	1	(2)	-	2,1	0,273	8,0	3,92	2,0
	2	(4)	-	2,5	0,318	7,1	3,72	2,3
	3	(2)	-	2,1	0,273	8,0	3,92	2,0
Sem EBCB	4	(4)	-	2,5	0,318	7,1	3,72	2,3
SS_i =10(ºBrix)	5	(3)	-	2,3	0,251	7,0	3,66	2,0
	6	(3)	-	2,3	0,270	7,0	3,72	2,1
	7	(3)	-	2,2	0,262	7,1	3,70	2,0

pc- ponto central; EBCB: extrato bruto contendo bromelina; X1: concentração de levedura (%); X2: concentração EBCB; Y1: Teor Alcoólico final (%); Y2: Absorbância (600nm); Y3: Sólidos solúveis (final) (°Brix); Y4: pH; Y5: Acidez total final (%); SSi: Sólidos solúveis inicial.
Fonte: a autora, 2022.

De acordo com Tabela 8 os ensaios de 1 e 3, 2 e 4 foram realizados em triplicatas para a variável X1: concentração de leveduras, considerando o tratamento sem adição de EBCB. Posteriormente, realizou triplicata para as condições intermediarias (ensaios 5, 6 e 7).

Os resultados obtidos por meio das sete fermentações realizadas em bancada em condições laboratoriais mostram-nos que a eficiência fermentativa daquela conduzida com a adição do EBCB obteve resultados mais favoráveis quando comparadas com aquelas que foram feitos sem EBCB, como pode ser observado na (Figura 16) e (Figura 17). Os parâmetros utilizados para a avaliação da cinética fermentativa foram os decaimentos dos sólidos solúveis (°Brix) e o incremento da concentração de etanol.

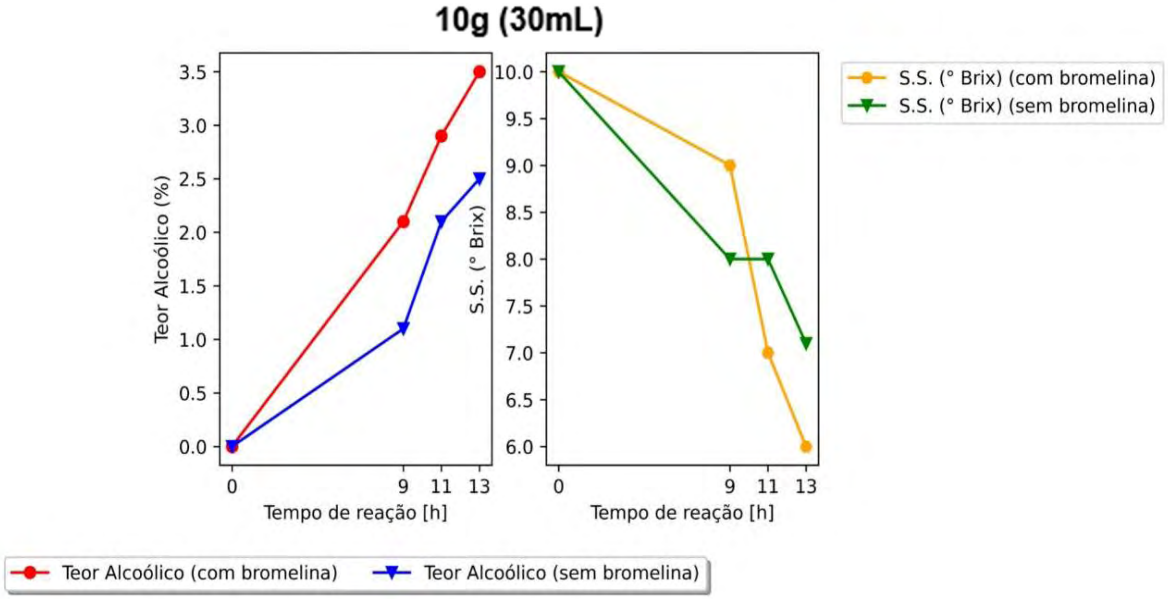
Figura 16. Cinética fermentativa do primeiro ensaio do delineamento fatorial comparado com o primeiro ensaio sem EBCB.



Fonte: a autora, 2022.

Figura 17. Cinética fermentativa do segundo ensaio do delineamento fatorial comparado com o segundo ensaio sem EBCB.

.

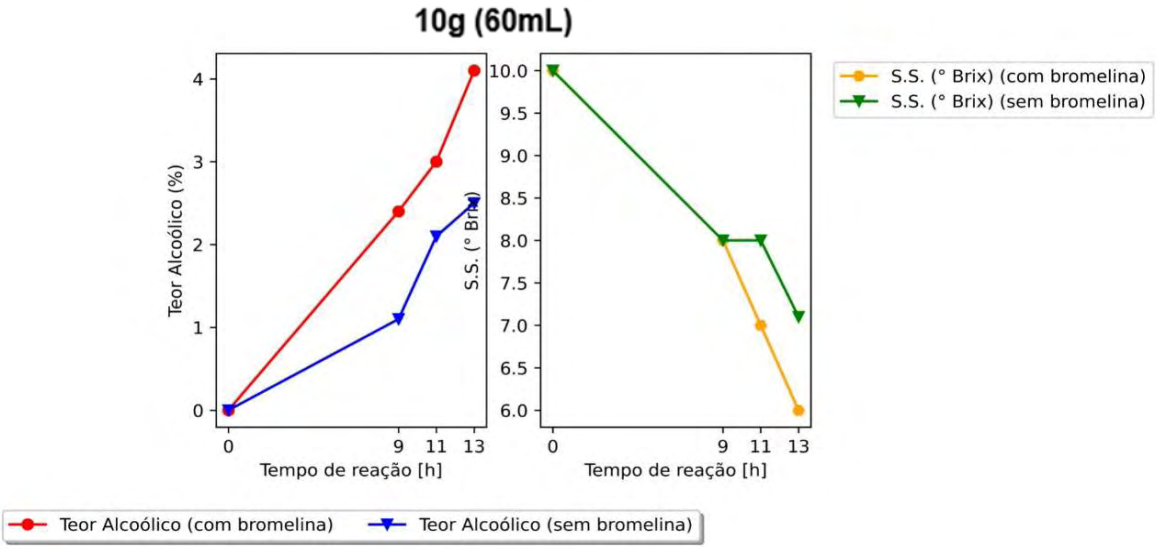


Fonte: a autora, 2022.

Podemos observar pela Tabela 8 que o melhor rendimento do teor alcoólico 4,1% foram na condição do quarto ensaio com 4% de levedura e 24% de extrato bruto contendo bromelina (EBCB). Comparando o segundo e quarto ensaio (Tabela 8) da fermentação sem extrato bruto contendo bromelina (EBCB), observa-se que houve

uma redução do teor alcoólico para 2,5% quando comparado com a fermentação com EBCB (Figura 18).

Figura 18. Cinética fermentativa do quarto ensaio do delineamento fatorial comparado com o quarto ensaio sem EBCB.



Fonte: a autora, 2022.

Diante dos resultados obtidos e interpretação das figuras com a cinética fermentativa dos ensaios podemos comparar que todos ao qual continha extrato brutocontendo EBCB mostraram-se mais eficiente do que as fermentações conduzidas sem EBCB.

6.2 Análise estatística

A análise fatorial 2^2 + 3 pontos centrais foi feita para verificar como a concentração de leveduras (%) e a concentração de extrato bruto contendo extrato bruto contendo bromelina (%) influenciaram no teor alcoólico (%) em escala laboratorial nas condições do ensaio.

De acordo com a Tabela 9 nota-se que os efeitos principais e de interações, de X1: concentração de levedura (%) e X2: concentração de extrato bruto contendo bromelina (%) não foram estatisticamente significativos dentro do intervalo de confiança de 95% para as respostas Y1: teor alcoólico, (%) Y3: sólidos solúveis (°Brix) e Y4: pH, sendo estatisticamente significativo a $p \leq 0,05$ para as respostas Y2: absorbância (600nm) e Y5: acidez total (%).

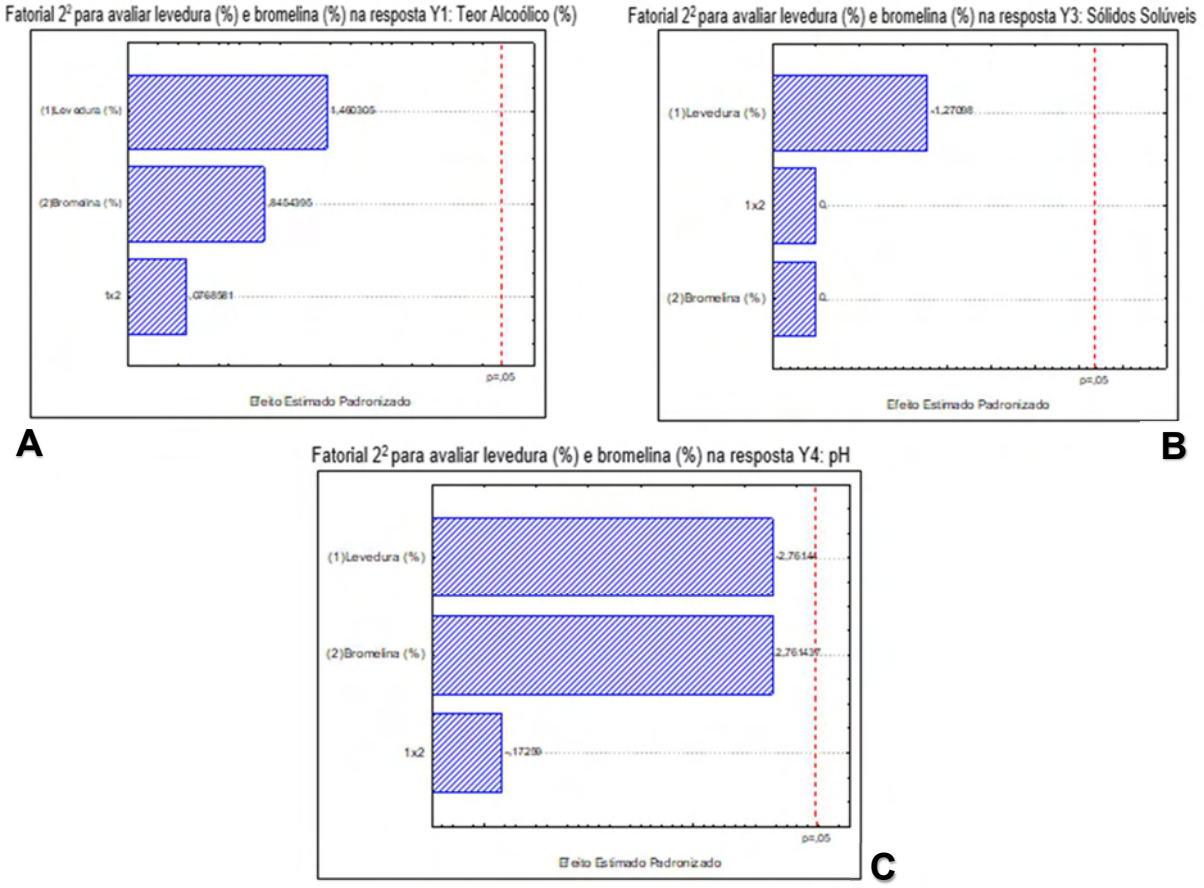
Tabela 9. Efeitos principais e de interação para as respostas Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5.

Resposta	Fator	Efeito (%)	Erro padrão	t (3)	p-valor	LC -95%	LC +95%
Y1	*Média	2,957	0,245	12,026	0,001	2,174	3,739
	(X1) CL (%)	0,950	0,650	1,460	0,240	-1,120	3,020
	(X2) CB (%)	0,550	0,650	0,845	0,459	-1,520	2,620
	X1 por X2	0,050	0,650	0,076	0,943	-2,020	2,120
Y2	*Média	1,749	0,017	101,655	$2x10^{-6}$	1,694	1,804
	*(X1) CL (%)	0,746	0,045	16,385	$4,95x10^{-4}$	0,601	0,890
	*(X2) CB (%)	0,439	0,045	9,642	0,002	0,294	0,583
	X1 por X2	-0,104	0,045	-2,284	0,106	-0,248	0,040
Y3	*Média	6,085	0,029	204,643	<0,001	5,991	6,180
	(X1) CL (%)	<0,001	0,078	<0,001	1,000	-0,250	0,250
	(X2) CB (%)	-0,100	0,078	-1,271	0,293	-0,350	0,150
	X1 por X2	<0,001	0,078	<0,001	1,000	-0,250	0,250
Y4	*Média	3,294	0,021	150,426	$1,00x10^{-6}$	3,224	3,363
	(X1) CL (%)	-0,160	0,057	-2,761	0,070	-0,344	0,024
	(X2) CB (%)	0,160	0,057	2,761	0,070	-0,024	0,344
	X1 por X2	-0,010	0,057	-0,172	0,873	-0,194	0,174
Y5	*Média	2,742	0,021	128,000	$1,00x10^{-6}$	2,674	2,811
	*(X1) CL (%)	0,350	0,056	6,173	0,008	0,169	0,530
	(X2) CB (%)	0,150	0,056	2,645	0,077	-0,030	0,330
	X1 por X2	0,050	0,056	0,881	0,442	-0,130	0,230

*p≤ 0,05; LC = Limite de confiança; CL: concentração de leveduras (%); CB: concentração do EBCB (%); Y1: Teor Alcoólico (%); Y2: Absorbância (600nm); Y3: Sólidos solúveis (°Brix); Y4: pH; Y5: Acidez (%).
Fonte: a autora, 2022.

No Diagrama de Pareto (Figura 19) apresentam os efeitos estimados e de interação do planejamento experimental para as respostas Y1: Teor alcoólico (%), Y3: Sólios solúveis (°Brix), e Y4: pH. As barras horizontais mostram a razão das magnitudes das estimativas de efeitos pelo erro padrão. Dessa forma, as barras que sobrepõe a linha pontilhada (na vertical) representam os efeitos que são estatisticamente significativos a p ≤ 0,05 com confiança de limite de 95%. Nesse sentido os resultados apresentados pelos gráficos de Pareto para as respostas Y1: Teor Alcoólico, (%) Y3: Sólidos solúveis (°Brix) e Y4: pH corroboram com a Tabela 9 sendo o modelo não estatisticamente significativos a p ≤ 0,05.

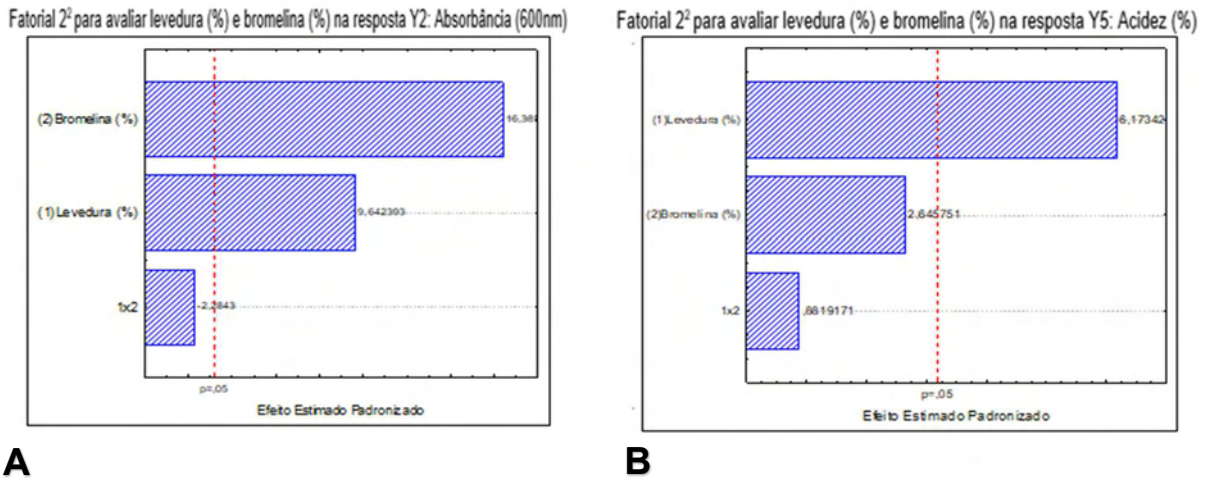
Figura 19. Pareto dos efeitos estimados padronizados para (A) Y1, (B) Y3 e (C) Y4.



Fonte: a autora, 2022.

Para as respostas de Y2: Absorbância (600nm) e Y5: Acidez total (%) o efeito foi estatisticamente significativo com confiança de limite de 95% ou a p≤0,05 conforme Diagrama de Pareto (Figura 20).

Figura 20. Pareto dos efeitos estimados padronizados para (A) Y2 e (B) Y5.



Fonte: a autora, 2022.

A Tabela 10 apresenta o coeficiente da equação de primeira ordem, que representa a resposta Y2: Absorbância (600nm) sendo influenciado pelas variáveis independentes a X1: concentração de leveduras (%) e a X2: concentração do extrato bruto contendo bromelina (%).

Tabela 10. Coeficientes de regressão do modelo de primeira do fatorial 2^2 para a resposta Y2: absorbância (600nm).

Fator	β_i	CR (%)	EP	t (3)	p	LC -95%	LC +95%
*Média	β_0	1,749	0,017	101,655	$2x10^{-6}$	1,694	1,804
*X1: Levedura	β_1	0,373	0,022	16,385	$4,95x10^{-4}$	0,300	0,445
*X2: EBCB	β_2	0,219	0,022	9,642	0,002	0,147	0,291
X1 versus X2	β_{12}	-0,052	0,022	-2,284	0,106	-0,124	0,020

*variáveis estatisticamente significativas a p≤0,05, βi e CR - coeficientes de regressão, EP - Erro padrão, LC-limite de confiança.
Fonte: a autora, 2022.

Por meio dos coeficientes de regressão, pode-se obter a Equação 2 (a) e Equação 2 (b) do modelo completo:

$Y (\%) = \beta_0 + \beta_1.X1 + \beta_2.X2 + \beta_{12}.X1.X2$ ou seja Eq. 2 a

Então substituindo-se, os valores dos coeficientes de regressão Tabela 10 absorbância (600nm) = 1,749* + 0,186*.X1 + 0,109.X2 – 0,026. X1.X2 Eq. 2 b

*estatisticamente significativo a 95% do limite de confiança

Para resposta Y5: Acidez total (%) nota-se o coeficiente de regressão de primeira ordem (Tabela 11).

Tabela 11. Coeficientes de regressão do modelo de primeira orden do fatorial 2^2 para a resposta Y5: acidez total (%).

Fator	β_i	CR (%)	EP	t (3)	p	LC -95%	LC +95%
*Média	β_0	2,742	0,021	128,000	$1,00x10^{-6}$	2,674	2,811
*X1: Levedura	β_1	0,175	0,028	6,173	0,008	0,084	0,265
X2: EBCB	β_2	0,075	0,028	2,645	0,077	-0,015	0,165
X1 versus X2	β_{12}	0,025	0,028	0,881	0,442	-0,065	0,115

*variáveis estatisticamente significativas a p≤0,05, βi, e CR – coeficientes de regressão, EP – Erro padrão, LC-limite de confiança.
Fonte: a autora, 2022.

Por meio dos coeficientes de regressão, pode-se obter a Equação 3 (a) e Equação 3 (b) do modelo completo:

$Y\ (\%) = \beta_0 + \beta_1.X1 + \beta_2.X2 + \beta_{12}.X1.X2$ ou seja Eq. 3 a

Então substituindo-se, os valores dos coeficientes de regressão Tabela 11

acidez total (%) = 2,742* + 0,087*.X1 +0,037 X2 + 0,012.X1.X2 Eq. 3 b

*estatisticamente significativo a 95% do limite de confiança

Na Tabela 12 está apresentada a análise de variância (ANOVA) onde o modelo é estatisticamente significativo a 95% do limite de confiança e preditivo para as variáveis Y2: Absorbância (600nm) e Y5: Acidez (%).

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) considerando as variáveis respostas Y1, Y2, Y3 Y4 e Y5.

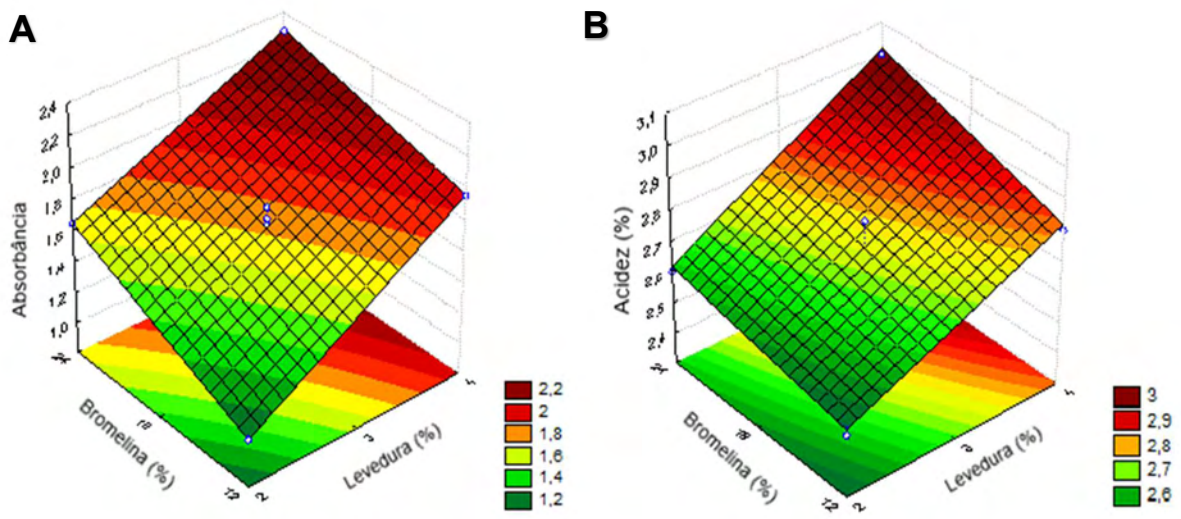
Resposta	Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft	p-valor	R^2
Y1	Regressão	1,210	p-1 (4-1)= 3	0,403	0,952	9,277	0,513	0,487
	Resíduo	1,270	n-p (7-4)= 3	0,423				
	Total	2,480	n-1 (7-1)= 6					
***Y2**	Regressão	0,760	p-1 (4-1)= 3	0,253	126,5	9,277	0,001	0,992
	Resíduo	0,006	n-p (7-4)= 3	$2,0x10^{-3}$				
	Total	0,766	n-1 (7-1)= 6					
Y3	Regressão	0,01	p-1 (4-1)= 3	$3,333x10^{-3}$	0,555	9,277	0,679	0,357
	Resíduo	0,018	n-p (7-4)= 3	$6,0x10^{-3}$				
	Total	0,028	n-1 (7-1)= 6					
Y4	Regressão	0,051	p-1 (4-1)= 3	0,017	0,952	9,277	0,518	0,836
	Resíduo	0,010	n-p (7-4)= 3	0,003				
	Total	0,061	n-1 (7-1)= 6					
***Y5**	Regressão	0,148	p-1 (4-1)= 3	0,049	16,333	9,277	0,009	0,942
	Resíduo	0,009	n-p (7-4)= 3	0,003				
	Total	0,157	n-1 (7-1)= 6					

*p≤ 0,05; SQ: Soma de quadrados; GL = Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; Fc: Fcalculado; Ft: Ftabelado; p: número de parâmetros do modelo; n: número de ensaios totais; Y1: Teor Alcoólico (%); Y2: Absorbância (600nm); Y3: Sólidos solúveis (°Brix); Y4: pH; Y5: Acidez (%).

Fonte: a autora, 2022.

Desta forma, pode se obter superfície de resposta para Y2 e Y5, pois o modelo de primeira ordem da resposta demonstrou que o Fcalculado foi maior que o Ftabelado (Tabela 12) sendo o valor de R^2 para Y2: absorbância (600nm) de 0,992 e para Y5: acidez total (%) R^2 de 0,942 (Figura 21). E, portanto, os modelos de primeira ordem para as respostas Y2: absorbância (600 nm) e Y5(%) são estatisticamente significativos e preditivos a p ≤ a 0,05.

Figura 21. Superfícies de resposta (A) Y2: Absorbância (600nm) e (B) Y5: Acidez total (%).



Fonte: a autora, 2022.

De acordo com a Figura 22 observa que o aumento da X1: concentração de leveduras (2% a 4%) e da concentração de extrato bruto contendo bromelina (12% a 24%), proporcionam um efeito positivo na resposta Y2: Absorbância (600nm). Conforme ressalta Oliveira-Freguglia (1998) maiores valores de absorbância indicam melhor desfloculaçao das células de leveduras. Porém para Y4: Acidez (B) as concentrações de X1: concentração de levedura (%) e X2: concentração de extrato bruto contendo bromelina (%) exercem um efeito cumulativo sobre acidez produzida gerando uma condição não atrativa para o setor sucroalcooleiro, uma vez que tais condições levariam à produção de um etanol mais ácido, portanto, de qualidade inferior e não aceito pelo mercado consumidor.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, as fermentações conduzidas com extrato bruto contendo bromelina (EBCB) forneceram melhores resultados quando comparadas com as fermentações sem extrato bruto contendo bromelina (EBCB). A adição de EBCB às fermentações proporciona um aumento de 1,6% no teor alcoólico (%) com diferença significativa a 95% de confiança. Ademais, proporciona um decaimento de sólidos solúveis de 6,0 (°Brix) indicando uma eficiência fermentativa. Assim, os nossos resultados demonstraram que aplicação do extrato bruto contendo bromelina mostra-se promissor na desfloculação das leveduras, trazendo um estudo preliminar e importante para novas pesquisas, e consequentemente contribuindo para a redução de resíduos descartados pelas indústrias de processamento de polpas de fruta, além de propiciar valor agregado a estes resíduos na indústria sucroalcooleiras.

REFERÊNCIAS

ABREU, D. C. A.; FIGUEIREDO, K. C. de S. Bromelain separation and purification processes from pineapple extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 1029-1039, 2019.

AGOSTINHO, G. M.; DIAS, A. P. V. Resíduos sólidos orgânicos e suas possiblidades: uma análise bibliográfica, **Engenharia Sanitária e Ambiental.** vol.24 n .2 Rio de Janeiro, 2019.

AMORIM, Q. S. **Resíduos da indústria processadora de polpas de frutas: capacidade antioxidante e fatores antinutricionais.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016.

ANSILIERO, R.; CANDIAGO, N. T.; COMUNELLO, H. H.; MORAES, J. D.; SIMON, G.; SOUZA, E. L. Alternativas para aproveitamento de resíduos de frutas? uma revisão. **Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc Videira**, v. 5, 06 ago. 2020.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p.15, 2021.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 11, 51 p, 2019.

Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados. ABRAFRUTAS. **Estatística de exportações de frutas.** Disponível em: https://abrafrutas.org/2019/09/13/paraiba-e-o-segundo-maior-produtor-de-abacaxi-do-brasil-diz-ibge/. Acesso em: 12 de dez de 2021.

BERNELA, M., AHUJA, M., THAKUR, R. Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles, **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 18-24, 2016.

BRANDÃO, Ana Carolina Tolentino; DE RESENDE, Miriam Maria; RIBEIRO, Eloízio Júlio. Alcoholic fermentation with high sugar and cell concentration at moderate temperatures using flocculant yeasts. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 10, p. 1717-1725, 2020.

CECCATO-ANTONINI, SR. **Microbiologia da fermentação alcoólica. A importância do monitoramento microbiológico em destilarias.** 1ª ed. São Carlos: EduFSCar, 2010.

COELHO, E. M., VIANA, A. C., AZEVEDO, L. C. Prospecção Tecnológica para o aproveitamento de resíduos industriais, com foco na indústria de processamento de manga. **Cadernos de Prospecção,** 7(4), 550-560. 2014.

CORSO, C.A.; WALISZEWSKI, K.N.; WELTI-CHANES, J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates, **Fruit Chemistry**, v.133, p. 631-635, 2012.

DA SILVA SOUZA, Louranilde et al. Aproveitamento do resíduo agroindustrial de abacaxi submetido ao processo de secagem para elaboração de barra de cereais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e33101421713-e33101421713, 2021.

SOUZA, M. E. A. O. DE.; GOMES, M. R.; CANDEIAS, V. M. S.; ALBUQUERQUE J.; NAILTON M.; JANUÁRIO, E. T. F.; LIMA, D. A.; VILAR, S. B. O. Determinação da capacidade antioxidante do extrato do pó da casca do abacaxi aplicando diferentes técnicas de extração. **Research, Society and Development**, v. 10, 2021.

DINIZ, M. P. F. **Aproveitamento da casca de abacaxi no preparo de fermentado alcoólico.** Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe. 2017.

DONADON, F. A. B.; SANTOS, D. F. L. The relevance of eco-innovation for solid waste in the fruit agri-food. **Revista Gestao & Tecnologia-Journal Of Management And Technology** 18(3) 225-46, 2018.

DUARTE, S. G.; DE ALMEIDA, F. V.; RABELO, G. B.; VALÉRIO, L. F. D.; GOMES, V. M.; MARQUES, S.; COSTA, M. R. U. Biscoito tipo cookie com adição de farinha de resíduos de frutas. **Exatas Online**, v.12, n.1, p. 23-37.

EHRHARDT, D. D. **Caracterização do resíduo do abacaxi e sua utilização no processo de produção de biossurfactantes por Bacillus subtilis.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, 2019.

EHRHARDT, D. D.; SECATO J.F.F.; TAMBOURGI, E.B. Biosurfactant production by bacillus subtilis using the residue from processing of pineapple, enriched with glycerol, as substrate. **Chemical engineering transactions,** 43:277–282, 2015.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, T. V. **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde.** Brasília: EMBRAPA, 2016.

FERRASSOLI, K. P. **Produção de biossurfactantes por Candida tropicalis utilizando resíduos do processamento do abacaxi (Ananas comosus) como substrato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2019.

FERREIRA, J. F. **Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia química). Unicamp, Campinas. 2007.

FERREIRA, L. A.; A utilização de resíduos das agroindústrias de suco de abacaxi para a produção de bromelina. **Revista Sítio Novo,** v. 1, p. 247-257, 2017.

GILLILAND, R. B. **The floculation of brewing yeast.** Wallerstein Lab. Comm., 20: 41-71, 1957.

GÓES-FAVONI, S. P.; MONTEIRO, A. C. C.; DORTA, C.; CRIPPA, M. G.; SHIGEMATSU, E. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.4, p.285-296, 2018.

Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. J. **Biol. Chem**. V. 188, p. 751-766, 1949.

GRAND VIEW RESEARCH. Disponível em: www.grandviewresearch.com. Acesso em: 18 de dez de 2020.

GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. Floculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica: I. método de detecção preventiva e estudos para o controle. **STAB,** Piracicaba, v. 16, n. 6, p. 25-27, 1998.

GUERRA, E.J. **Isolamento de bactérias contaminantes da fermentação etanólica que induzem a floculação de Saccharomyces cerevisiae e sua sensibilidade a agentes antimicrobianos.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro, 1995.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola (culturas temporárias e permanentes).** 2019.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E. BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. 2019. **Biotecnología Industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** 2 ed. São Paulo, Editora Edgard Blucher Ltda., vol. 3,595 p.

LUDWIG, K. M. **Floculação de *Saccharomyces cerevisiae* – caracterização e ação de enzimas desfloculantes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MADEIRA, P. M. R. **Agregação de valor ao resíduo de melão: caracterização, avaliação de atividade antioxidante, antiproliferativa, potencial prebiótico e produção de enzimas.** Tese (Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Rio Grande do Norte - RN, 2017.

MESSETTI M.A, SANTOS A. M; ANGELIS D.F, CHIERICE G.O; CLARO NETO S.; Estudo do derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por Leuconostoc mesenteroides em indústrias sucroalcooleiras. **Arquivos do Institudo de Biologia,** 77(2):301-8, 2010.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N.; Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos. ***Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI*** Roberto Mange. Goiânia, v.3, n.5, ano 3, 2009.

MUNIZ, C. E.; ABREU, P. M. S.; SANTIAGO, Â. M.; CONRADO, L. S.; NASCIMENTO, J. A. R Avaliação da potencialidade de resíduos agroindustriais para serem utilizados em processos biotecnológicos. **GESTÃO INTEGRADA DE RESÍDUOS: Universidade & Comunidade.** v. 3, p. 85-88. Universidade Federal de Campina Grande. 2018.

NASCIMENTO, R. S. **Qualidade e metabolismo antioxidante durante a maturação e inovação na conservação pós-colheita de cultivares de abacaxi.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Paraíba, 2019.

OLIVEIRA, D. A. de. **Aplicação das tecnologias supercrítica e convencionais para o reaproveitamento dos resíduos do processamento de maracujá (Passiflora edulis f. flavicarpa)**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2015.

OLIVEIRA, J. de S. **Aplicação dos resíduos industriais do processamento de polpa de frutas na formulação de cosmético esfoliante**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2018.

OLIVEIRA, M. de M. **Extração da Bromelina a partir da casca do Abacaxi (*Ananas comosus*) e sua imobilização em esferas de hidrogel para síntese de ésteres de interesse energético.** Dissertação (Mestrado em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis) - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Redenção, 2016.

OLIVEIRA, P. D. de F. **Elaboração de sobremesa láctea do tipo mousse adicionada de farinha do resíduo de frutas: análise física e sensorial.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Campina Grande, Cuieté, 2019.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Cellular viability of Saccharomyces cerevisiae in mixed culture with Lactobacillus fermentum. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 3, p. 520-527, 1998.

PADILHA, T.; BASSO, C. Biscoitos com resíduo de manga, maracujá e jabuticaba. **Disciplinarum Scientia**, V. 16, P.79-88, 2015.

PINTO, P. L. Extração e separação de flavonoides do extrato da casca do maracujá. **Embrapa Agroindústria Tropical-Tese/dissertação (ALICE)**, 2018.

RANDOLPHO, Gabriela Arelhano et al. Resíduos de frutas transformados em novos produtos alimentícios: uma revisão sistemática. **Multitemas**, p. 297-311, 2020.

ROSA, H. **Técnicas de reciclo de protease visando a desfloculação celular de *Saccharomyces cerevisiae.*** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro, 2008.

SANTOS, E. R., OLIVEIRA, T. F., SILVA, D. M., SILVA, E. T. Gestão da qualidade e controle microbiológico na fermentação etanólica: estudo de caso em uma usina sucroenergética. **Anais do XI SIMPROD**, 2019.

SEREJO, Ana Paula Muniz et al. Reaproveitamento de resíduos gerados pelas espécies *Persea americana* e *Theobroma grandiflorum*: Uma alternativa para

sustentabilidade ambiental. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e89101321053-e89101321053, 2021.

SEREJO, A. P. M.; OLIVEIRA, A. C. DA S.; COSTA, I. C.; NOGUEIRA, A. J. L.; LACERDA, H. C. C.; DIAS, A. A. S.; COUTINHO, D. F. Reaproveitamento de resíduos gerados pelas espécies *Persea americana* e *Theobroma grandiflorum*: Uma alternativa para sustentabilidade ambiental. **Research, Society and Development**, v. 10, 2021.

SILVA, N. F. I.; SANTOS, F. S.; LIMA, A. R. C.; PEREIRA, P. K. G.; SILVA, M. J. S. Aproveitamento de resíduos de abacaxi (ananas comosus) para elaboração de muffins. **GESTÃO INTEGRADA DE RESÍDUOS: Universidade & Comunidade.** v. 3, p. 53-55. Universidade Federal de Campina Grande. 2018.

SOUZA, E. S. **Estudo do poder absortivo do resíduo gerado do processamento de polpas da acerola.** Trabalho de Conclusão de Curso. 2018. 52 folhas Universidade Federal da Paraiba – UFPB. Campina Grande. 2018.

SOUZA, Fernanda Vidigal Duarte et al. Manual de gestão do banco ativo de germoplasma de abacaxi. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Documentos (INFOTECA-E)**, 2021.

STEELE, E.M.; RAUBER, F.; COSTA C.D.S.; LEITE, M.A.; GABE, K.T.; LOUZADA, M.L.D.C.; Levy, R.B.; MONTEIRO, C.A. Mudanças alimentares na coorte NutriNet Brasil durante a pandemia de covid-19. **Revista Saúde Pública**, 54.91, 2020.

UEHARA, K. S.; BARBOZA, R. A.; NASCIMENTO, R. F.; BENINCA, C.; CANTERI, M.H.G. Aplicação de pectina extraída de resíduos de maracujá (passiflora edulis) como agente estabilizante em sorvetes. **Revista Inova Ciência & Tecnologia**, v. 03, p. 29-35, 2017.

VASCONCELOS, T. S. **Resíduo de abacaxi em programa de restrição alimentar qualitativa para suínos pesados.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Dracena, 2014.

ZAGO, V.C.P.; BARROS, R.T.V. Management of solid organic waste in brazil: From legal ordinance to reality. **Engenharia Sanitaria e Ambiental.** v. 24, n.2, p. 219-228, 2019.