



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CRISTIANI BARROS DA SILVA ROSA

**NARINGINASE DE *Aspergillus niger*:**  
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO POR METODOLOGIA DE  
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E USO DO ULTRASSOM PARA  
EXTRAÇÃO

CRISTIANI BARROS DA SILVA ROSA

**NARINGINASE DE *Aspergillus niger*:**  
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO POR METODOLOGIA DE  
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E USO DO ULTRASSOM PARA  
EXTRAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Biotecnologia da Universidade  
Estadual de Londrina, como requisito ao Título  
de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: João Batista Buzato  
Co-Orientador: Dionízio Borsato

Londrina  
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R788n Rosa, Cristiani Barros da Silva.  
Naringinase de *Aspergillus niger* : otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração / Cristiani Barros da Silva Rosa. – Londrina, 2009.  
75 f. : il.

Orientador: João Batista Buzato.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.  
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia – Teses. 2. Naringinase – Teses. 3. *Aspergillus niger* – Teses. 4. Superfície de resposta (Estatística) – Teses. 5. Melão – Teses. I. Buzato, João Batista. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

CRISTIANI BARROS DA SILVA ROSA

**NARINGINASE DE *Aspergillus niger*:**  
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE  
DE RESPOSTA E USO DO ULTRASSOM PARA EXTRAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito ao Título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Maria Antonia P. C. Celligoi  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dra. Lúcia Helena Mendonça Vargas  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Orientador João Batista Buzato  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 06 de novembro de 2009.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, por terem acreditado que eu chegaria até aqui. E por saberem que irei além.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo imenso amor.

Ao Professor Doutor Orientador, João B. Buzato, pelo apoio e direção de todas as etapas deste trabalho.

Ao Professor Doutor Co-orientador, Dionísio Borsato, pela amizade e suporte a toda a parte estatística do presente trabalho.

A minha família, pela confiança e motivação, em especial ao meu esposo, Delmindo Luiz Rosa, companheiro e braço amigo em todos os momentos dessa jornada.

Aos professores e colegas de curso, pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Aos que não impediram a finalização dos estudos.

*“Sê firme e corajoso. Não te atemorizes,  
não tenhas medo, porque o Senhor está  
contigo em qualquer parte para onde  
fores.”*

*(Jos 1:9)*

ROSA, Cristiani Barros da Silva. **Naringinase de *Aspergillus niger*: otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e de suco concentrado destinado à exportação. Sucos cítricos concentrados para exportação com níveis elevados de naringina são excessivamente amargos, o que reduz a qualidade e o valor comercial do produto. A redução do amargor pode ser obtida pela naringinase, um complexo enzimático que degrada a naringina. Neste trabalho *Aspergillus niger* 426 foi usado como produtor de naringinase utilizando matérias-primas da agroindústria, melaço como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Naringina foi usada como indutor. Dentre as cinco fontes de nitrogênio pesquisadas, extrato de levedura apresentou o melhor resultado de 225,6 mU/mL de naringinase em 120 horas de cultivo. Para otimização da produção de naringinase, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, com planejamento fatorial incompleto  $2^2$ , obtendo 354,26 mU/mL de atividade de naringinase, tendo como variáveis independentes o extrato de levedura (14,0g/L) e naringina (0,2g/L). Quando aplicadas ondas de ultrassom com intensidade de 20 kHz por 2 minutos na cultura, a atividade de naringinase atingiu o valor máximo de 473,6 mU/mL. Assim, a naringinase, enzima de grande potencial de aplicação biotecnológica, teve a produção aumentada pelo uso do planejamento estatístico e ultrassom.

**Palavras-chave:** Naringinase. Melaço. Metodologia de superfície de resposta. *Aspergillus niger*.



ROSA, Cristiani Barros da Silva. **Naringinase of *Aspergillus niger*: Production optimization by response surface methodology and utilisation of ultrasound for extraction.** 2008. 68f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina.

### ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer of orange and concentrated juice for export. Concentrated juice with high levels of naringin has excessive bitterness, which reduces the quality and value on the market. The debittering can be obtained by using naringinase, an enzymatic complex that degrades naringin. This study reports the production of naringinase by *Aspergillus niger* 426 utilizing both sugar cane molasses as carbon source and yeast extract as nitrogen source. Naringin was used as inducer. Five nitrogen sources were studied and yeast extract was found as the best one as 225.6 mU/mL of naringinase activity at 120 hours of fermentation was achieved. For optimization of naringinase production it was applied response-surface methodology, with 22 incomplete factorial design. An activity value of 354.26 mU/mL of naringinase was achieved when as independent variables yeast extract (14.0g/L) and naringin (0.2g/L) were used. When applied ultrasound waves at 20 kHz of intensity for 2 minutes in the fermented broth, the activity reached the highest value of 473.6 mU/mL. Thus, naringinase, this enzyme of great potential for biotechnological applications, has its production increased by using statistical design and ultrasound.

**Keywords:** Naringinase. Molasses. *Aspergillus niger*. Response-surface methodology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Hidrólise de naringina em prunina, raminose, naringinina e glucose pela naringinase expressando atividades  $\alpha$ -L-raminosidase e  $\beta$ -D-glucosidade. ....17
- Figura 2** – Esquema das etapas de cultivo e de determinação .....30

### ARTIGO

- Figura 1** – Gráfico da superfície de resposta e curvas de contorno resultante da influência da concentração de naringina e extrato de levedura sobre a atividade de naringinase por *A. niger* 426 .....55
- Figura 2** – Efeito da aplicação do ultrassom para liberação de naringinase .....56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Micro-organismos usados para a produção de naringinase .....	18
<b>Tabela 2</b> – Composição do meio de preservação e inóculo de <i>A. niger</i> .....	25
<b>Tabela 3</b> – Composição do meio basal .....	25
<b>Tabela 4</b> – Fontes de nitrogênio analisadas .....	26
<b>Tabela 5</b> – Valores de extrato de levedura e naringina .....	26
<b>Tabela 6</b> – Composição do meio de fermentação otimizado .....	27
<b>Tabela 7</b> – Valores codificados das variáveis usadas no planejamento estatístico .....	32
<b>Tabela 8</b> – Delineamento experimental para a otimização de produção de naringinase .....	33
<b>Tabela 9</b> – Tempo de aplicação do ultrassom .....	34

## ARTIGO

<b>Tabela 1</b> – Influência da fonte de nitrogênio na atividade de naringinase de <i>A. niger</i> .....	52
<b>Tabela 2</b> – Valores das variáveis codificadas e decodificadas, atividade de naringinase e biomassa na fermentação de melão por <i>A. niger</i> 426 em 120 horas .....	54



4.2.3 Preparo de Inóculo .....	28
4.2.4 Fermentações .....	28
4.2.5 Interrupção do Cultivo .....	29
4.2.6 Delineamento Estatístico de Metodologia de Superfície de Resposta (M.S.R) ..	31
4.2.7 Ultrassom .....	33
4.2.8 Determinações Analíticas .....	34
4.2.8.1 Naringinase .....	34
4.2.8.2 Açúcares totais .....	35
4.2.8.3 Biomassa .....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>APENDICES .....</b>	<b>43</b>
APENDICE A – Artigo “Utilização da Metodologia de Superfície de Resposta na Produção e Usos de Ultrassom na Extração de Naringinase por <i>Aspergillus niger</i> ” .....	44
<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>
ANEXO A – Normas para submissão do artigo para a revista Semina: Ciências Agrárias – UEL .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

Frutas cítricas, especialmente a laranja, são as mais produzidas no mundo, e o Brasil é o maior produtor e exportador mundial do suco concentrado. Entretanto, a presença elevada de naringina, composto responsável pelo sabor amargo do suco, deixa-o com sabor desagradável e, conseqüentemente, com pouca aceitação por parte do consumidor, diminuindo, assim, seu valor de mercado. Para remover o amargor, estudos têm sido conduzidos com naringinase, um complexo enzimático com atividade, raminosidase e glucosidase, que hidrolisa a naringina em naringinina, glucose e raminose, reduzindo então o amargor do suco.

O *Aspergillus niger*, micro-organismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*), destaca-se por produzir uma variedade de enzimas, como protease, celulase, lipase, amilase, invertase e, mais recentemente, naringinase. A produção de naringinase por *Aspergillus* é interessante, pois há possibilidade desse micro-organismo utilizar-se de substratos, como o melaço e o extrato de levedura, que são matérias-primas de baixo custo procedentes da agroindústria.

Em trabalhos de otimização, comumente usam-se metodologias estatísticas, das quais se destaca a metodologia de superfície de resposta (M.S.R). Tal metodologia consiste num conjunto de técnicas de modelagem e otimização, em que, para cada conjunto de condições experimentais, várias respostas podem ser medidas e um modelo matemático pode ser ajustado.

Vários métodos têm sido utilizados para melhorar a extração de produtos microbianos intracelulares. Dentre esses, o ultrassom vem se destacando por apresentar baixo custo de operação, pois não requer equipamento sofisticado e nem treinamento técnico extensivo.

O objetivo do presente trabalho foi otimizar a produção de naringinase, por meio da utilização da metodologia de superfície de resposta em cultivos de *A. niger*, na fermentação de melaço em diferentes fontes de nitrogênio, para, mediante aplicação de ondas ultrassônicas, aumentar a liberação de naringinase.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimização da produção de naringinase por *A. niger* 426 na fermentação de melaço, utilizando metodologia de superfície de resposta.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Testar peptona, peptona soja, extrato de levedura, nitrato de sódio e prolina como fonte de nitrogênio para a produção de naringinase;
- Usar metodologia estatística para estabelecer qual a melhor fonte de nitrogênio;
- Estabelecer a melhor concentração de extrato de levedura e de naringina, utilizando metodologia de superfície de resposta;
- Usar radiação ultrassônica no cultivo de *A. niger* para a liberação de naringinase;
- Determinar os parâmetros da biomassa, dos carboidratos totais, e da naringinase ao término dos cultivos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O SABOR AMARGO NOS CÍTRICOS

A laranja e seu suco são apreciados no mundo todo. Contudo, a produção mundial de suco de laranja concentrado é centralizada no Brasil e nos EUA, que juntos, na safra de 2007/08, produziram 1.320.000 toneladas de suco concentrado.

Possuir um característico sabor amargo leve é aceitável na fruta e no suco, porém o amargor excessivo, especialmente nos sucos concentrados, é um problema considerável na indústria de suco, porque reduz a qualidade e o valor comercial do produto. (MONGKOLKUL et al, 2006). O tambor de 100 litros de suco concentrado tem o valor de US\$ 2.000,00, entretanto, o suco concentrado com sabor amargo acima do normal perde, em média, 50% do seu valor de mercado.

Os principais compostos presentes em sucos cítricos, responsáveis pelo amargor, são: naringina (um flavonoide glicosídeo, maior responsável pelo sabor amargo); limonina (um limonoide triterpeno, altamente oxigenado); e neoesperidina (um flavonoide amargo, que contém raminose). Tais compostos estão presentes em todas as partes das frutas cítricas. (PURI; BANERJEE, 2000; MONGKOLKUL et al, 2006; RIBEIRO; RIBEIRO, 2008).

Os flavonoides são compostos polifenólicos, que constituem uma classe de agentes naturais específico de plantas e estão diretamente envolvidos na nodulação e na proteção contra a radiação ultravioleta das plantas, além de proporcionarem vários efeitos benéficos à saúde dos humanos, tais como: prevenção de doenças cardiovasculares, antitumorAL, inibição da lipoperoxidação enzimática e efeitos anti-inflamatórios e antitrombóticos. São agentes quimiopreventivos em potencial, devido suas atividades inibitórias envolvendo enzimas na biotransformação de pré-carcinógenos. (MARQUES et al. 2007).

Dependendo do tipo de cadeia glicosídica que eles apresentam, podem ou não ser amargos. Como por exemplo, enquanto a naringina e a neoesperidina são muito amargas, a hesperidina não possui sabor. (DEL RIO et al 1998).



### 3.2 NARINGINA

A naringina (4',5,7-triidroxi-flavonona-7- $\beta$ -L-raminoglicosidase-(1,2)- $\alpha$ -D-glucosidase) (Fig. 1) é o componente, abundante em frutos "*in natura*", presente nos tecidos de frutos cítricos, que caracteriza o sabor amargo com maior intensidade (RIBEIRO; RIBEIRO, 2008), especialmente nas espécies de cítricos amargos, tais como: pomelo, laranjas azedas e híbridos de pomelo natsudai. Sua concentração reduz com o amadurecimento do fruto. (HASEGAWA, 1996; BERHOW, 2000; PURI; BANERJEE, 2000). Em virtude disso, vários estudos vêm sendo realizados, sobre a concentração e a possibilidade de neutralização de naringina em produtos alimentícios. (HASEGAWA; HASEGAWA; PETTON; BENNETT, 1983; MONGKOLKUL et al, 2006).

Alguns desses estudos sugerem que a biossíntese da naringina, como em outras flavononas, é influenciada por fatores ambientais e genéticos, determinando, portanto, variações nos níveis de concentração de tal composto, estimada entre 15 e 18g por quilo de casca fresca do fruto (pomelo). Entretanto, a quantidade de naringina na casca varia de maior para menor em frutos verdes e maduros, respectivamente (MONGKOLKUL et al, 2006), sendo as concentrações de naringina mais altas em folhas jovens e no albedo dos frutos imaturos. (DEL RIO et al, 1998). Apesar de certa quantidade de naringina, aproximadamente 0,4g/L, ser comum no suco de laranjas do tipo pomelo, as frutas cítricas colhidas precocemente podem apresentar quantidade a níveis menos aceitáveis de 1,2g/L.

### 3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA REMOÇÃO DO SABOR AMARGO DOS CÍTRICOS

O amargor excessivo traz um impacto negativo para o suco, fazendo com que a sua redução seja uma necessidade a ser incorporada como uma etapa no processo tecnológico industrial. Portanto, alguns métodos têm sido testados, em escala laboratorial.

Convencionalmente, a indústria mistura suco amargo com o suco não amargo, acrescenta adoçante ou outros compostos químicos, bem como conduz

a seleção para a obtenção de variedades menos amargas do fruto. (MONGKOLKUL et al 2006; BERHOW, 2000; HASEGAWA; MAIER, 1983).

Outra abordagem utilizada para evitar o sabor amargo da naringina, em sucos cítricos, é a sua eliminação por meio de técnicas de adsorção; (GRIFFITH, 1969; JOHNSON; CHANDLER, 1988; RIBEIRO; SILVEIRA; FERREIRA-DIAS, 2003); por meio de métodos químicos (KIMBALL, 1987; PRICHET, 1957); e de tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina. (SHAW; WILSON, 1985; WAGNER; WILSON; SHAW, 1988). Embora alcance resultados positivos, quanto à remoção do amargor, essas propostas apresentam custos elevados e alteram as características organolépticas, por esta razão têm pouca eficiência e aplicação limitada.

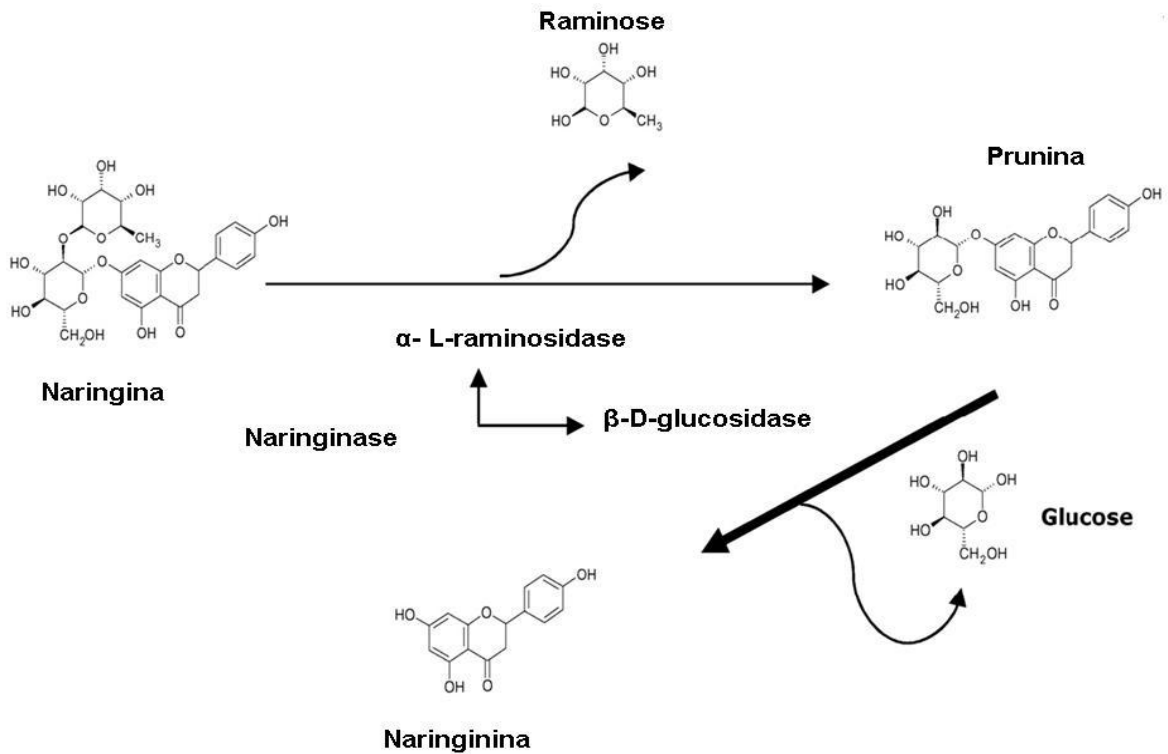
Um adequado e seguro procedimento para reduzir o amargor é a hidrólise enzimática da naringina pelo uso da naringinase. Os processos enzimáticos apresentam algumas vantagens, tais como, condição de trabalho moderada, ausência de formação de produtos secundários, além de minimizar o impacto poluente durante o processamento. (PURI; BANERJEE, 2000; SEKEROGLU; FADILUOLU; GOGUS, 2006).

### 3.3.1 Naringinase

A naringinase (E.C. 3.2.1.40) é um complexo enzimático constituído de  $\alpha$ -L-raminosidase (E.C. 3.2.1.40) e  $\beta$ -D-glucosidade (EC 3.2.1.21), que hidrolisa a naringina em naringinina, glucose e raminose. Primeiramente, a atividade de  $\alpha$ -L-raminosidase hidrolisa naringina em raminose e prunina, que depois é hidrolisada pela atividade  $\beta$ -D-glucosidade em naringinina e glucose. A prunina tem um terço do amargor da naringina, enquanto que a naringinina é insípida. (RIBEIRO; RIBEIRO, 2008). Desta forma, apenas a primeira atividade de hidrólise da naringinase é suficiente para a remoção do sabor amargo. (PURI; MARWAHA; LOTHARI, 1996; PURI; BANERJEE, 2000; YADAV; YADAV, 2000; BUSTO et al 2007). Esta reação é ilustrada na Figura 1.

Inicialmente, a naringinase foi isolada a partir de fontes vegetais, tais como: sementes de aipo e folhas de pomelo (HALL, 1938), e, posteriormente, foram realizados estudos em que cultivo microbiano apresentou atividade enzimática.

(THOMAS; SMYTHE; LABBEE, 1958). A naringinase disponível comercialmente, hoje, é produzida pelo micro-organismo *Penicillium decumbers*. (PURI; BANERJEE, 2000). Devido suas propriedades de reduzir o sabor amargo de sucos de frutas cítricas e da biotransformação de antibióticos e esteroides, esta enzima tem despertado um crescente interesse biotecnológico. (SEKEROGLU; FADILUOLU; GOGUS, 2006; PURI; BANERJEE, 2000). Além disso, os produtos da hidrólise (raminose, prunina e naringinina) mostram atividades biológicas e podem ser usados como precursores na síntese de substâncias de uso na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. (ELLENRIEDER; BLANCO; DAZ, 1998; BUSTO, 2007).



**Figura 1** – Hidrólise da naringina em prunina, raminose, naringinina e glucose pela naringinase expressando atividades  $\alpha$ -L-raminosidase e  $\beta$ -D-glucosidase.

**Fonte:** Ribeiro e Ribeiro (2008).

### 3.4 PRODUÇÃO DE NARINGINASE

O crescimento anual da produção de enzimas industriais está entre 4 e 5% que vem sendo acompanhado pela redução de preços. Entretanto, há ainda algumas enzimas que, pouco estudadas, são difíceis de produzir, logo o seu uso torna-se bastante dispendioso, como por exemplo, a naringinase. (COURI et al., 2008).

Os micro-organismos produtores de naringinase, relatados por diferentes autores estão apresentadas na Tabela 1. Em alguns casos, são métodos patenteados porém pouco detalhados. (PURI; BANERJEE, 2000).

**Tabela 1** – Micro-organismos usados para a produção de naringinase

Micro-organismos	Referências
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 72-4,	Bram e Solomons, 1965;
<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. usamii</i>	Kishi, 1955
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 1344	Puri, M, 2005
<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088	Busto, M. D., 2007
<i>Aspergillus niger</i> 426	Machado, 2007
<i>Aspergillus nidulans</i>	Soria, 1999; Elinbaum, 2002
<i>Aspergillus terreus</i> CECT 2663	Orejas, 1999
<i>Cochiobolus miyabeanus</i>	Ito e Takiguchi, 1970
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	Nomura, 1965
<i>Penicilium decumbens</i>	Fukumoto e Okado, 1973
<i>Phanopsis citri</i>	Ito e Takiguchi, 1970
<i>Rhizotonia solani</i>	Ito e Takiguchi, 1970
<i>Rhizopus nigricans</i>	Shanmugam e Yadav, 1995

Os estudos pioneiros resultaram em registros de patentes. (KISHI, 1955; THOMAS; SMYTHE; LABBEE, 1958). Mais tarde, foi registrada a patente que descreve a produção da enzima em aproximadamente 100U/mL. (SMYTHE; THOMAS, 1960). Há relatos do registro de patentes da produção de naringinase no

Japão (TAKIGUCHI, 1962; FUKUMOTO; OKADA, 1973) e na Alemanha. Atualmente, a naringinase comercializada é produzida por *Penicillium decumbers*. (PURI; BANERJEE, 2000).

A produção microbiana de naringinase por fermentação em estado sólido tem sido pouco investigada. Na produção por *Coniothrium diplodiella*, realizado à temperatura de 23°C, durante oito dias, o micro-organismo foi cultivado em fermentação em estado sólido usando farelo de soja. A produção foi consideravelmente inibida pela sacarose e frutose. (NOMURA, 1965). Elinbaum et al (2002) avaliaram a produção de naringinase por *A. terreus* em estado sólido com diversos suportes, como farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e espuma de poliuretano, tendo a naringina como indutor. Os cultivos foram realizados à temperatura de 30°C, com umidade controlada a 99% e naringina a 5g/L. O melhor resultado foi obtido com bagaço de cana-de-açúcar (1,7U/mL). Um aumento na concentração de naringina para 10g/L elevou a atividade para 4,2U/mL, contudo, a redução da umidade de 99% para 95% provocou a diminuição na produção de naringinase.

A maioria dos estudos sobre a produção de naringinase tem sido utilizada por culturas submersas. Os estudos mais recentes têm focalizado o aumento da produtividade e da atividade enzimática. Porém o primeiro relato da produção de  $\alpha$ -L-raminosidase por *A. terreus* foi estudada tendo como fonte de carbono a raminose e a naringina, e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Os cultivos foram realizados à temperatura de 35°C, agitação de 200rpm em pH inicial de 4,0 a 7,0 e inóculo de  $10^6$  esporos/mL, sendo que no oitavo dia de cultivo foi atingida a atividade de 1,41U/mL, tendo naringina como fonte de carbono com concentração de 5g/L. Com o aumento da concentração de naringina para 20g/L, observou-se um aumento na atividade para 2,84U/mL no décimo dia. No entanto, a raminose na concentração de 5g/L foi a melhor fonte, com atividade de 8,8U/mL no nono dia. (SORIA; CUERVAS; ELLENRIEDER, 1999).

Arabinose, glucose, hesperidina, naringina, raminose, rutina e xilose foram investigadas como fontes de carbono e suplementadas a um meio mínimo para a produção de  $\alpha$ -L-raminosidase por *Aspergillus nidulans* em fermentação submersa. Os cultivos foram realizados à temperatura de 37°C, com pH inicial de 5,5 sob agitação. Um pré-inóculo de 18h e, aproximadamente, 1g de peso seco de micélio para 15mL de meio de cultivo, a raminose foi a melhor fonte de carbono, com

atividade de 588,320 mU/mL após 24h de cultivo, a naringina também foi capaz de induzir a produção, mas em menor proporção (30,935mU/mL). As outras fontes de carbono foram repressoras da produção. (OREJAS; IBANEZ; RAMON, 1999).

Foi avaliado o papel indutor da naringina, na produção de naringinase por *A. niger* NRRL 72-4, na fermentação de milhocina, tendo o farelo de soja como fonte de carbono e o extrato de levedura e o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. O experimento foi conduzido à temperatura de 30°C, com agitação de 240rpm e pH inicial de 5,0. A combinação de milhocina, extrato de levedura e o nitrato obtiveram produção de naringinase após 6 dias de cultivo. No entanto, a adição de pequenas quantidades de naringina ao longo da fermentação obteve-se a maior atividade de 440mU/mL. (BRAM; SOLOMONS, 1965).

A produção de naringinase foi conduzida por *A. niger* 1344, usando diferentes fontes de carbono: glucose, frutose, raminose, maltose, sacarose, melaço, amido e milhocina; e como fontes de nitrogênio: extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte e peptona. Alguns íons também foram testados:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . O experimento foi realizado à temperatura de 28°C e agitação de 200rpm. Os resultados mostraram que o melaço, a raminose e a peptona foram os melhores substratos utilizados e com a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  alcançou-se a produção de 8,5U/mL. (PURI; BANERJEE; BANERJEE, 2005). Entretanto, a produção de naringinase diminuiu para 178,6mU/mL quando *Aspergillus niger* 426 foi cultivado em melaço e garapa e utilizada a naringina no meio de cultivo como indutor sem a adição de raminose. (MACHADO, 2007).

### 3.5 USO DO ULTRASSOM PARA LIBERAÇÃO DE ENZIMAS EM CÉLULAS MICROBIANAS

Alguns métodos são utilizados para a recuperação de produtos microbianos intracelulares, entre esses, o ultrassom é empregado por apresentar baixo custo de operação, não requerer equipamento sofisticado e tampouco treinamento técnico extensivo.

A aplicação de ultrassom tem melhorado a produtividade de alguns processos fermentativos. (CHISTI, 2003). O uso de ultrassom com baixa intensidade, em células microbianas, aumenta a permeabilidade da membrana

(efeito fonoforético). De acordo com Lanchun et al. (2003) a aplicação do ultrassom em cultura de *S. cerevisiae*, numa frequência de 24 kHz e potência de 2W, promoveu a alteração da permeabilidade da membrana, portanto, provocando a liberação e elevando assim a atividade de proteinase.

Em outro estudo, foi avaliado o efeito do tempo de sonicação na liberação de invertase por *S. cerevisiae*. A levedura foi cultivada em melaço e peptona, com irradiações ultrassônicas de 20 kHz, amplitude de 40 e intensidade 0,62W/mL em diferentes tempos. Nas condições estudadas, a aplicação do ultrassom de baixa frequência aumentou 3,5 vezes a liberação de invertase, sem ocorrer rompimento celular. Tempos superiores a 5 minutos resultaram em maior atividade enzimática, porém, com alteração da estrutura celular. (VARGAS; CAMPOS; CELLIGOI, 2003).

Bucalon e Palma (1990) também utilizaram a aplicação de ultrassom para extrair e liberar fosfatase ácida e ATPase de *S. cerevisiae*. A irradiação com frequência de 20 kHz, durante 15 minutos, promoveu melhor liberação proteica e elevada atividade dessas enzimas. Os autores atribuíram ao ultrassom os efeitos de ionizar e/ou alterar a conformação das moléculas enzimáticas para, conseqüentemente, favorecer uma elevada atividade. Mais recentemente alterações nas estruturas secundárias e pequena diminuição de atividade da glicose-oxidase foi reportado por Giuseppe-Elie; Choi; Geckeler (2009).

Também, objetivando a liberação de invertase, investigou-se o efeito do ultrassom em cultivo de *S. cerevisiae* livre e imobilizada. O melhor resultado de 29,38U, foi obtido com a aplicação do ultrassom, durante 2 minutos na cultura de células livres. (MARQUES; BUZATO; CELLIGOI, 2006).

A aplicação do ultrassom em cultivos de *A. niger* tem sido pouco investigada. Vargas et al. (2004) avaliaram o efeito do tempo e da amplitude na liberação de invertase por *A. niger*, em meios de cultivo contendo sacarose ou melaço. A melhor condição para produção, extração e ativação de invertase foi no meio de melaço com peptona e irradiação com amplitude de 20 durante 8 minutos. (VARGAS; PIÃO; CARMONA, 2004).

Herrán et al. (2008) otimizaram a produção de lovastatina por *A. terreus* com o uso de ultrassom em intensidade baixa (957 W), média (2870 W) e alta (4783 W) de potência. A sonicação não afetou o crescimento da biomassa,

porém, na intensidade média e alta houve redução da produção de lovastatina e alteração da morfologia do fungo.

### 3.6 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A Metodologia de Superfície de Resposta (M.S.R) resume-se num conjunto de métodos matemáticos e estatísticos. Tais métodos foram desenvolvidos para a modelagem e para a otimização de variáveis múltiplas de pesquisas, com o objetivo de prever melhor condição com um número mínimo de experimentos. (MARQUES et al. 2007).

A M.S.R apresenta ampla aplicação na pesquisa por considerar vários fatores em níveis diferentes, e interações correspondentes entre esses fatores e níveis. (BRITO et al. 2002). Além disso, tem vantagem de ser mais rápida e deter baixo custo quando comparada aos métodos clássicos. (RODRIGUES; LEMMA, 2006).

A despeito da ausência, na literatura, de relatos usando MRS na produção de naringinase, trabalhos com *A. niger* têm aplicado essa metodologia na otimização das condições de cultivo principalmente na produção de enzimas. Lee, Chen (1997) utilizou MRS para a produção de glicosiltransferase usando maltose e extrato de levedura. Sharma, Agarwal, Saxena. (2007) investigaram a otimização das condições de cultivo para a produção de tanase. As variáveis usadas no estudo foram: quantidade de ácido tânico, nitrato de sódio, agitação e inóculo. Zang, Ge, (2006) estudaram *A. niger* SL-09 para produção de inulinase e invertase em diferentes fontes de carbono e nitrogênio como variáveis. O meio otimizado composto de sacarose, peptona e sais aumentaram em sete vezes as atividades de inulinase e invertase. Posteriormente, a mesma linhagem foi empregada em um estudo para otimizar a composição do meio de cultivo. As variáveis usadas foram sacarose, glicose e peptona. A condição otimizada reduziu em 50% o tempo de cultivo e a atividade aumentada em cerca de quatro vezes. (GE; QIAN; ZANG. 2008). Mirón et al. (2008) estudaram o efeito conjunto da fonte de nitrogênio e fosfato na produção de glucose-oxidase. Os resultados indicaram que a peptona foi mais adequada que o uso de nitrato e o fosfato na concentração intermediária das



concentrações testadas. Também a produção de xilanase foi estudada e as variáveis testadas foram a concentração de farelo de trigo, pH e tempo de cultivo (YU et al. 2008) e em outro relato, resíduos da agroindústria foram as variáveis: bagaço de maçã e farelo de algodão. (LIU; SUN; DU, 2008).

Dentre os trabalhos envolvendo o uso da M.S.R na otimização dos meios de cultivo para produção enzimática, encontra-se a produção de tanase. Em um estudo investigando a otimização das condições de cultivo para a produção de tanase, tendo como variáveis a concentração de ácido tânico, o nitrato de sódio, a agitação e o inóculo, na condição de cultivo otimizado obteve-se uma produção de 19,7U/mL. (SHARMA; AGARWAL; SAXENA, 2007).

Também foram investigadas a produção de inulinase e invertase por *A. niger* SL-09, utilizando-se a M.S.R em diferentes fontes de carbono e de nitrogênio como variáveis. O meio otimizado composto de sacarose, peptona e sais aumentaram em sete vezes as atividades enzimáticas de inulinase e invertase. (ZANG; GE, 2006). Posteriormente, para a mesma cepa, foi empregada a M.S.R para otimizar a composição do meio de cultivo entre as variáveis sacarose, glucose e peptona. A otimização, fazendo uso da peptona como fonte de nitrogênio, e sacarose e glucose como fonte de carbono, reduziu o tempo de fermentação em 50%, tendo atividade elevada em quatro vezes. (GE; QIAN; ZANG, 2008).

Em outro estudo, a M.S.R foi utilizada para analisar a produção de xilanase por *A. niger* NA-13, e as variáveis estudadas constituíam-se de concentração de farelo de trigo, pH e tempo de cultivo. O cultivo das condições ótimas, indicado pela M.S.R, atingiu uma atividade de 125,14 U/mL. (YU et al. 2008). Da mesma forma, para a produção de xilanase, tal metodologia avaliou como variáveis os resíduos de agroindústria, como bagaço de maçã e farelo de algodão, na fermentação por *A. niger* SL-05 (em fermentação em estado sólido). Após a otimização, atingiu uma atividade enzimática de 562U/g em 60h de fermentação. (LIU; SUN; DU, 2008).

No presente trabalho, foi utilizado um delineamento fatorial, tendo como variáveis as concentrações de extrato de levedura, naringina e tempo de cultivo. Os resultados obtidos foram analisados pela M.S.R para otimizar as condições de produção de naringinase.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado para este estudo foi *A. niger* 426, isolado de ameixa seca pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos), identificado e cedido gentilmente pela professora Maria Helena Fungaro, do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### 4.1.2 Melaço de Cana-de-açúcar

O melaço safra 2003, gentilmente cedido pela Usina de Açúcar e Álcool da COROL (Cooperativa Agropecuária de Rolândia Ltda.), contendo 60% de açúcares totais.

#### 4.1.3 Meios de Cultivo

##### 4.1.3.1 Meio de preservação e inóculo

Apresentada na Tabela a seguir, a composição do meio de preservação e inóculo da cepa, meio batata-dextrose-ágar (BDA).

**Tabela 2** – Composição do meio de preservação e inóculo do *Aspergillus niger*.

Componente	Concentração (g/L)
Infusão de batata	4,0
Glucose	20,0
Ágar	15,0

#### 4.1.3.2 Meios de fermentação

O meio basal de fermentação, utilizado em todos os experimentos, está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3** – Composição do meio basal

Composição	Concentração (g/L)
Melaço	3,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,175
KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0

**Fonte:** Machado (2007).

#### 4.1.3.2.1 Meios de Fermentação com Diferentes Fontes de Nitrogênio

O meio basal de fermentação foi acrescido de diferentes fontes de nitrogênio, como indicado na Tabela 4. Utilizando-se como indutor a naringina 0,5 g/L.

**Tabela 4** – Fontes de nitrogênio analisadas

Composição	Meios de cultivo (g/L)				
	I	II	III	IV	V
Peptona Soja	10,0				
Peptona		10,0			
Extrato de Levedura			10,0		
Prolina				10,0	
Nitrato de sódio					10,0

#### 4.1.3.2.2 Meios de Fermentação para Otimização das Concentrações de Extrato de Levedura e Naringina

Na Tabela 5 são apresentadas as concentrações testadas de extrato de levedura e naringina, que foram acrescentadas no meio basal, de acordo com o delineamento estatístico. Mexe com a pág. 23

**Tabela 5** – Valores de extrato de levedura e naringina

Extrato de Levedura (g/L)	4,4342	6	10	14	15,6568
Naringina (g/L)	0,07574	0,2	0,5	0,8	0,9243

#### 4.1.3.2.3 Meio de Fermentação Otimizado

A composição do meio de fermentação otimizado é apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6** – Composição do meio de fermentação otimizado

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extrato de levedura	14,0
naringina	0,2
Melaço	3,0
MgSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,175
KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparo de Meios

#### 4.2.1.1 Meio de preservação e Inóculo

Os componentes da Tabela 2 foram solubilizados em água destilada, nas concentrações indicadas e com alíquotas de 5mL e de 25mL, sendo distribuídas, respectivamente, em tubos de ensaio e em frascos erlenmeyers de 250mL de capacidade. Em seguida, os frascos foram autoclavados por 20 minutos a uma temperatura de 121°C. Os tubos ficaram mantidos inclinados até a solidificação; e os frascos mantidos em repouso sobre a bancada em temperatura ambiente também até a solidificação, para depois serem estocados a 4°C até seu uso.

#### 4.2.1.2 Meio de fermentação

O meio basal, acrescido da fonte de nitrogênio a ser testada, apresentada na Tabela 4, foi solubilizado em água destilada nas concentrações indicadas com pH corrigido para 4,5 com HCl 1M ou NaOH 4M e com alíquotas de 25mL, distribuídos em erlenmeyers de 125mL, posteriormente, autoclavados por 20 minutos a 121°C, resfriados à temperatura ambiente e estocados em câmara fria a 4°C para utilização.

#### 4.2.2 Preservação do Micro-organismo

##### 4.2.2.1 Preservação do *A niger*

A cepa de *A. niger* foi mantida por repicagem, a cada 30 dias, em tubos contendo o meio da Tabela 2. Preparado e incubado a 28°C por 72h, segundo metodologia descrita no item 4.2.1.1. Após o crescimento os tubos foram armazenados a 4°C.

#### 4.2.3 Preparo de Inóculo

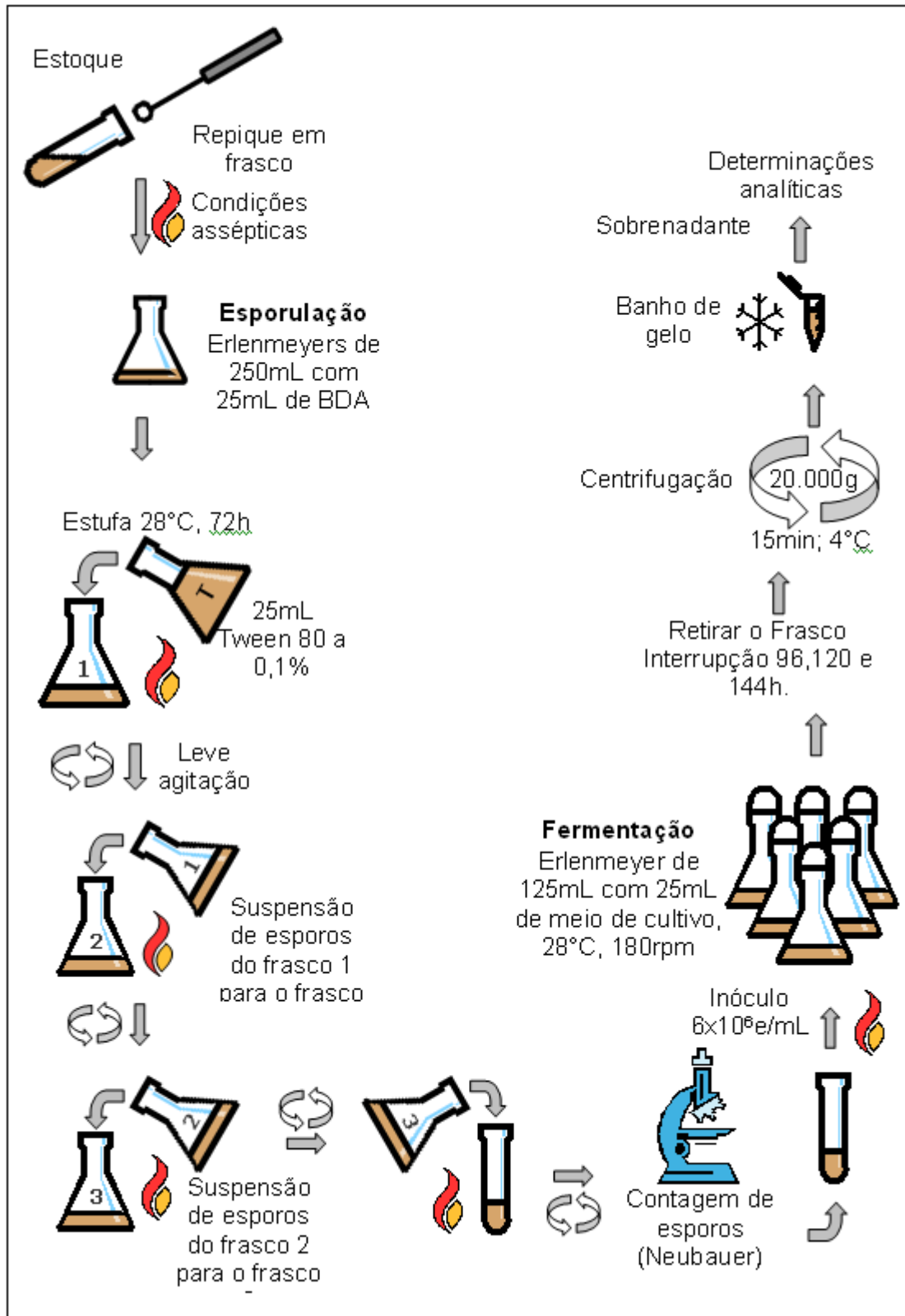
Os fungos foram inoculados em três frascos erlenmeyer de 250mL, contendo 25mL dos meios descritos no item 4.2.1.1, levados à estufa por 72h para a formação de esporos. Após esse tempo, acrescentou-se 25mL de Tween 80 a 0,1% (v/v). Essa suspensão foi deslocada para um tubo de ensaio. Em seguida, foi retirada uma alíquota da suspensão, e iniciada a contagem de esporos em câmara de Neubauer para preparar um volume suficiente da suspensão de *A. niger* até obter  $10^6$  esporos/mL. (Figura 2).

#### 4.2.4 Fermentações

Os experimentos foram realizados em triplicatas, utilizando-se meios descritos nas tabelas 4, 5 e 6 e preparados segundo metodologia descrita no item 4.2.1.2, com fermentações conduzidas em mesa rotatória tipo shaker, agitação de 180rpm e temperatura controlada a 28°C.

#### 4.2.5 Interrupção do Cultivo

Interromperam-se os cultivos, retirando três frascos em três distintos tempos: 96; 120 e 144 horas de cultivo. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 20.000g e 4°C, sendo utilizado o sobrenadante para as determinações analíticas. (Figura 2).



**Figura 2** – Esquema das etapas de cultivo e de determinação.  
**Fonte:** Machado (2007).



#### 4.2.6 Delineamento Estatístico da Metodologia de Superfície de Resposta (M.S.R.)

Empregou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), consistindo um fatorial de  $2^2$ , com dois níveis equidistantes de variação, codificados em -1 e +1 em dois pontos centrais (0) e quatro pontos axiais ( $+\sqrt{2}$ ); ( $-\sqrt{2}$ ), resultando em 10 experimentos. A codificação das variáveis foi feita com base na equação 1.

$$x_1 = (X_1 - \text{ponto central}) / \text{faixa de variação} \dots \dots \dots (1)$$

$X_1$  = valores reais das variáveis independentes.

$x_1$  = valores codificados das variáveis independentes.

As variáveis independentes foram representadas pelas concentrações de extrato de levedura (g/L) e naringina (g/L), enquanto que as variáveis dependentes (respostas) referiam-se às concentrações a serem analisadas.

A região experimental, ou seja, os limites superior e inferior de cada uma das variáveis independentes podem ser observados nas Tabelas 7 e 8, em que X representa as variáveis independentes originais.

Em cada caso, a atividade da naringinase foi determinada sendo os dados ajustados em um modelo polinomial de segunda ordem, conforme a equação (2):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \dots \dots \dots (2)$$

na qual,

Y é a variável de resposta;

$\beta_0$  é o intercepto;

$\beta_i$  o coeficiente para o efeito linear;

$\beta_{ii}$  o coeficiente para o efeito quadrático;

$\beta_{ij}$  o coeficiente para o efeito de interação das variáveis.

Enquanto que,  $x_i$  e  $x_j$  representam os valores codificados das variáveis  $X_i$  e  $X_j$ .

Utilizou-se a equação quadrática (2) para obter as superfícies de resposta e para otimizar as condições de produção.

**Tabela 7** – Valores codificados das variáveis usadas no planejamento estatístico

Variáveis Originais	Níveis codificados				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$+\sqrt{2}$
Extrato de Levedura(g/L)	4,3432	6	10	14	15,6568
Naringina(g/L)	0,0757	0,2	0,5	0,8	0,9243

As análises referentes à metodologia de superfície de resposta e análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias dos tratamentos avaliadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) foram realizadas utilizando-se o programa Statistic 7.0.

O meio basal, assim como as concentrações de fonte de nitrogênio e de naringina, estabelecidas como ponto central deste experimento, teve como base o trabalho realizado por Machado (2007), que realizou a pesquisa para encontrar a melhor fonte de carbono para produção de naringinase por *A. niger*.

**Tabela 8** – Delineamento experimental para a otimização de produção de naringinase

<b>Ensaio</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>E.L. (g/L)</b>	<b>Nar (g/L)</b>
1	-1	-1	6	0,2
2	-1	1	6	0,8
3	1	-1	14	0,2
4	1	1	14	0,8
5	0	0	10	0,5
6	0	0	10	0,5
7	$-\sqrt{2}$	0	4,3432	0,5
8	$\sqrt{2}$	0	15,65	68
9	0	$-\sqrt{2}$	10	0,0757
10	0	$\sqrt{2}$	10	0,9243

E.L. – extrato de levedura; Nar - naringina

#### 4.2.7 Ultrassom

Com finalidade de aumentar a liberação enzimática, a irradiação ultrassônica nos cultivos foi realizada, ao término, pelo aparelho Ultrasonic Processor 20kHz, modelo GE 130PB/70W da Sonics and Materials, equipado com sonda de 9,5mm de diâmetro, com potência acústica controlada manualmente, abaixo de 40W, sendo o guia de onda imerso numa profundidade de 2cm em 50ml da cultura, com irradiação contínua. A condição otimizada do cultivo foi irradiada por diferentes tempos (Tabela 9), com amplitude estável de 40. Como controle dos experimentos, utilizou-se cultivos sem tratamento (tempo 0).

**Tabela 9** – Tempo de aplicação do ultrassom

<b>Frascos</b>	<b>Aplicação em minutos</b>
1	0
2	0,5
3	1
4	2
5	3

#### 4.2.8 Determinações Analíticas

##### 4.2.8.1 Naringinase

A atividade da naringinase foi determinada segundo uma adaptação do Método de Davis (DAVIS, 1947), em que a mistura de reação foi composta de 0,8mL de naringina na concentração a ser analisada, pipetada em tubo de ensaio contendo previamente 0,5mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 4,0) e 0,1mL de sobrenadante do cultivo. O branco foi composto de 0,8mL de água destilada e 0,6mL do mesmo tampão.

Tais misturas foram, então, incubadas a 50°C por uma hora. Em seguida, transferida uma alíquota de 0,1mL em tubos de ensaio contendo 3mL de dietilenoglicol 90% (v/v), para, então, adicionar 0,1mL de NaOH 4M. Os tubos ficaram em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor, lida em 420nm.

Os resultados de atividade enzimática remeteram-se em mU/mL, considerando-se uma unidade de atividade de naringinase como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1µmol de naringina por minuto, sob as condições descritas. Já os resultados dessa atividade em relação à biomassa (AEB), também foram expressos em mU/g, considerando-se uma unidade de atividade enzimática em relação à biomassa como a atividade enzimática (mU/mL) dividida pela biomassa (g/L). Uma curva padrão foi confeccionada utilizando-se naringina em concentrações variando de 0,25 a 1,0g/L.

#### 4.2.8.2 Açúcares Totais

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método do Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956); com curva padrão elaborada utilizando-se solução padrão de glucose em concentrações variando de 20 a 100µg/mL, mediante leituras das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm.

#### 4.2.8.3 Biomassa

A biomassa foi determinada, após o último dia de cultivo, por gravimetria. Procedeu-se a filtragem do fermentado e posterior secagem a 80°C até peso constante.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo, intitulado “Naringinase de *Aspergillus niger*: Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração”, que está apresentado no Apêndice A.

O artigo foi elaborado segundo normas da Revista Semina: Ciências Agrárias - UEL, as quais estão apresentadas no Anexo A.

## 6 CONCLUSÃO

Nas diversas fontes de nitrogênio estudadas, o extrato de levedura foi o que apresentou melhor influência na produção enzimática pelo *A. niger*. A análise pela M.S.R identificou a melhor concentração para as variáveis: extrato de levedura, naringina e tempo de fermentação.

A condição ótima encontrada para a produção e a extração de naringinase ocorreu tendo o melão como fonte de carbono a 3,0 g/L, o extrato de levedura como fonte de nitrogênio a 14,0 g/L, a naringina como indutor a 0,2 g/L, com tempo de fermentação de 120 horas e aplicação de ondas ultrassônicas durante 2 minutos para liberação enzimática. A produção otimizada de naringinase foi de 473,6 mU/mL por *A. niger*.

## REFERÊNCIAS

- BANKAR, S.B. et al. Glucose oxidase – an review. **Biotechnology Advances**, v.27, n.4, p.489-501, 2009.
- BARROS, N.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. São Paulo: Unicamp, 2001.
- BERHOW, M.A. Effects of early plant growth regulator treatments on flavonoid levels in grapefruit. **Plant Growth Regul.**, Amsterdam, v.30, p.225, 2000.
- BRAM, B.; SOLOMONS, G. L. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology**, Jerusalem, v.13, p.842-845, fev.1965.
- BRITO, E.S.; PINTO, G.A.S.; BRUNO, L.M.; AZEREDO, H.M.C. A Metodologia de superfície de resposta (MSR) na otimização de processos biológicos: A determinação dos valores de pH e Temperatura ótimos para a atividade enzimática. **Embrapa**, Fortaleza, 2002.
- BUCALON, A.J.; PALMA, M.S. Bioeffects of ultrasound in yeast cells suspensions. **Revista Brasileira de Engenharia**, v.7, p.265-272, 1990.
- BUSTO, M.D., et al. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 (in polyvinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. **Food Chemistry**, v.104, p.117-1182, 2007.
- CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.2, p.89-93, 2003
- FELISMINO, R. **Jornal do Brasil**. Disponível em: <www.convista.com.> Acesso em: 1 set. 2009.
- COURI, S.; PARK, Y.; PASTORE, G; DOMINGOS, A. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. In: ELBA, P. S.B. et al. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p.153-177.
- DAVIS, W.B. Determination of flavanones in citrus fruits. **Analytical Chemistry**, v.19, p.476-478, 1947.
- DEL RIO, J.A. et al. Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. *Sevillano*) fruits. **Planta Medica**, Murcia, v.64, p.575-576, 1998.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
- ELINBAUM, S., et al. Production of *Aspergillus terreus*  $\alpha$ -L-rhamnosidase by solid state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, Salta, v.34, p.67-71, out/2002.



ELLENRIEDER, G.; BLANCO, S.; DAZ, M. Hydrolysis of supersaturated naringin solutions by free and immobilized naringinase. **Biotechnology Techniques**, v.12, p.63-65, 1998.

FRANCKO, D.A. et al. Effect of low-dose ultrasonic treatment on physiological variables in *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum*. **Biotechnology Letters**, v.12, n.3, p.219-224, 2002.

FUKUMOTO, J.; OKADA, S. Naringinase production by fermentation. **Japanese Patent**, v.7, n. 306, p.554, 1973.

GE, X.Y, QIAN, H., ZHANG, W.G. Enhancement of fructanohydrolase synthesis from *Aspergillus niger* by simultaneous in vitro induction and in vivo acid stress using sucrose ester. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v.24, p.133-138, 2008

GUISEPPI-ELIE, A.; CHOI, S.; GECKELER, K. Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.58, n.1-4, p.118-123, 2009.

GOGATE, P.R.; KABADI, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.1, p.60-72, 2009.

GRIFFITH, F.P. Process for reactivating polyamides resins used in debittering citrus juice. **US Patent**, v.3, n. 463, p.763, 1969.

HALL, D.H. A new enzyme of the glycosidase type. **Chemistry Industrial**, v. 57, p.473, 1938.

HASEGAWA, S.; MAIER, V.P. **Food Technology**, v.37, p.855, 1983.

HASEGAWA, S.; PETTON, Y.A.; BENNETT, R.D. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.31, p.1002, 1983.

HASEGAWA, S.; BERHOW, M.A.; FONG, C.H. Modern methods of plant analysis. In: LINSKENS, H-F.; JACKSON, J.F. (Ed.). **Fruit Analysis**, Berlin, v.18, p.59, 1996.

HERRÁN, N.S.; LÓPEZ, J.L.C.; PÉREZ, J.A.S.; CHISHI, Y. Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v.83, n.5, p.593-600, 2008.

JOHNSON, R.L.; CHANDLER, B.V. Addorptive removal of bitter principles and titrable acid from citrus juice. **Food Technology**, v.45, p.130-137, 1988.

KIMBALL, D.A. Debittering of citrus juices using supercritical carbon dioxide. **Journal Food Science**, v.52, p.481-482, 1987.

KISHI, K. Production of naringinase from *Aspergillus niger*. *Kagaru to Kogyo*. **Chemistry and Industry**, Japan, v.29, p.140, 1955.

LANCHUN, S. et al. The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Colloids and surfaces b: Biointerfaces*, v.30, p.61-66, 2003.

LEE, S.; CHEN, W. Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology. *Enzyme and Microbial technology*, v.21, p.436-440, 1997.

LIU, C.; SUN, Z.; DU, J. Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05. *Journal the Microbiology and Biotechnology*, v.35, p.703-711, 2008.

MACHADO, R.A.M. **Produção de naringinase por *Aspergillus niger* na fermentação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MARQUES, J.; VILA-REAL, H.J.; ALFAIA, A.J.; RIBEIRO, M.H.L. Modelling of the high pressure-temperature effects on naringina hydrolysis based on response surface methodology. *Food Chemistry*, v.105, p.504-510, 2007.

MARQUES, L.L.; BUZZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Effects of Raffinose and Ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Sacharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.49, n.6, p.873-880, 2006.

MIRÓN, J. et al. Joint effect of nitrogen and phosphorus on glucose oxidase production by *Aspergillus niger*: Discussion of an experimental design with a risk of co-linearity. *Biochemical Engineering Journal*, v.40, n.1, p.54-63. 2008.

MONGKOLKUL, P.; RODART, P.; PIPATTHITILORN, T.; MEKSUT, L.; SANGUANDEEKUL, R. Debittering of Tangerine Citrus Reticulata Blanco Juice by  $\beta$ -cyclodextrin Polymer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.56, p.167-170, 2006.

MÜLLER, M. S.; CORNELSEN, J. M. **Normas e padrões para teses, dissertações e monografias**. 6.ed. Londrina: EDUEL, 2007.

NOMURA, D. Studies on the naringinase produced by *Coniothyrium diplodiella*. The properties of naringinase and the removal of co-existing pectinase from the enzyme preparation. *Enzymologia*, v.29, p.272-282, 1965.

OREJAS, M.; IBANEZ, E.; RAMON D. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produces an  $\alpha$ -L-rhamnosidase of potential oenological interest. *Letters in Applied Microbiology*, Valencia, v.28, n.5, p.383-388, fev.1999.

OZBEK, B.; ULGEN, K.O. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry*, v.36, n.9, p.1037-1043, 2000.

PINO, J.A. Flavonoids in citrus fruit. *Alimentaria*, Havana, v.10, p.63-79, 1997.

PRITCHET, D.E. Extraction of the bitter principle from navel orange juice. *US Patent* v. 2, n. 816, p.33, 1957.

PURI, M.; BANERJEE, A.; BANERJEE, U.C. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. **Process Biochemistry**, v.40, n.1, 195-201, 2005.

PURI, M., BANERJEE, U. C. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. **Biotechnology Advances**, Chandigarh, v.18, p.207-217, maio 2000.

PURI, M.; MARWAHA, S.S.; LOTHARI, R.M. Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of know juice. **Enzyme Microbiology Technolpgy**, v.18, mar.1996.

RIBEIRO, I.A.; ROCHA, J.; SEPODES,B.; MOTA-FILIFE,H.; RIBEIRO, M.H. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. **Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.52-53, p.13-18. 2008.

RIBEIRO, I.A.; RIBEIRO, M.H.L. Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan. **Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.51, p.10-18, 2008.a.

\_\_\_\_\_. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. **Food control**, v.19, p.432-438, 2008b.

RIBEIRO, M. H. L.; SILVEIRA, D.; FERREIRA-DIAS, S. Response surface modelling of the consumption of bitter compounds from orange juice by acinetobacter calcoaceticus. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.21, p.81-88, 2003.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2006.

ROKHINA, E.V.; LENS, P.; VIRKUTITE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.5, p.298-306, 2009.

SAERENS, K. et al. Production of glucolipids and specialtry fatty acids from sophorolipds by *Penicillium decumbers* naringinase: Optimazation and kinects. **Biotechnology Journal**, v.4, n.4, p.517-524, 2009.

SANKYO. Preparation of antibiotic chloropolysporin- C. **Japanese Patente**, v.63, n.146, p.797,1988.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Darmstadt, v.59, p.426-435, abr. 2002.

SEKEROGLU, G.;FADILOGLU, S.; GOGUS, F. Immobilization and caracterizatio of naringinase for the hydrolysis of naringin. **Europe food technology**, v.224, p.55-60, 2006.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R.K. Statistical optimization for tannase production from *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Journal the Microbiology Indian**, v.47, p.132-138, 2007.

SHAW P. E.; WILSON, C.W. Reduction in bitterness in grapefruit citrus juices with  $\beta$ -cyclodext in polymer in a continuous flow process. **Journal of Food Science**, v.50, p.1205-1207, 1985.

SMYTHE, C.W.; THOMAS, D.W. Conversion of flavonoid glycosides. **US Patent**, v. 2, n.950, p.974; 1960.

SORIA, F.F.; CUEVAS, C.; ELLENRIEDER, G. Purification and some properties of a  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *Aspergillus terreus*. **Applied Biological Science**, Salta, v.5, p.109-120, maio1999.

TAKIGUCHI, Y. Annual Reports of takamine institute, Tolyo. **Agriculture Sociedad Japan**, v.14, p.101, 1962.

THOMAS, D. W.;SMYTHE, C. V.; LABBEE, M. D. Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruit. **Food Research**, v.23, p.591-598, 1958.

VARGAS, L.H.M.; CAMPOS, V.E.; CELLIGOI, M.A.P.C. Avaliação do tempo de sonicação na liberação de invertase por *Saccharomyces cerevisiae*. In: **SINAFERM**, Florianópolis, 2003. CD-ROM.

VARGAS, L.H.M; PIÃO, A.C.S.; CARMONA, E.C. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.2, p.137-142, 2004

WAGNER, C.J.; WILSON C.W.; SHAW P.E. Reduction of grapefruit bitter componentes in a fruited  $\beta$ -cyclodextrin polymer bed. **Journal of Food Science**, v.53, p.516-518, 1988.

XU, Y. et al. Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.9, n.7, p.558-566, 2008.

YADAV, S.;YADAV, K.D.S. Secretion of  $\alpha$ -L-rhamnosidase by *Aspergillus terreus* and Its Role in Debittering of Orange Juice. **Journal of Scientific & Industrial Research**, Gorakhpur, v.59, p.1032-1037, ago. 2000.

YU, C.; MENG, D.; LU,J.; LONG, J. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus nige* AN-13 under submerged fermentation using. **Response surface methodology**, v.7, p.631-638, 2008.

ZANG, W.; GE, X.Y. Improvement of fructanohydrolase production in *Aspergillus niger* SL-09 by sucrose ester. **Food technology and Biotechnology**, v.44, p.59-64, 2006.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A

Artigo “Naringinase de *Aspergillus niger*. Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração

### **Título:**

“Naringinase de *Aspergillus niger*. Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração”.

“Naringinase of *Aspergillus niger*. Production optimization by response surface methodology and utilisation of ultrasound for extraction”.

### **Autores:**

Cristiani Barros da Silva Rosa<sup>1</sup>, Dionisio Borsato<sup>2</sup>, João Batista Buzato<sup>1</sup>, Maria Antonia P. C. Celligoi<sup>1</sup>.

### **Afiliação:**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

### **Correspondência do autor:**

João Batista Buzato<sup>1</sup>

E-mail: buzato@uel.br Tel: +55 43 3371-4270 – Fax: + 55 43 3371-4054

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e de suco concentrado destinado à exportação. Sucos cítricos concentrados para exportação com níveis elevados de naringina são excessivamente amargos, o que reduz a qualidade e o valor comercial do produto. A redução do amargor pode ser obtida pela naringinase, um complexo enzimático que degrada a naringina. Neste trabalho *Aspergillus niger* 426 foi usado como produtor de naringinase utilizando matérias-primas da agroindústria, melaço como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Naringina foi usada como indutor. Dentre as cinco fontes de nitrogênio pesquisadas, extrato de levedura apresentou o melhor resultado de 225,6 mU/mL de naringinase em 120 horas de cultivo. Para otimização da produção de naringinase, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, com planejamento fatorial incompleto 2<sup>2</sup>, obtendo 354,26 mU/mL de atividade de naringinase, tendo como variáveis independentes o extrato de levedura (14,0g/L) e naringina (0,2g/L). Quando aplicadas ondas de ultrassom com intensidade de 20 kHz por 2 minutos na cultura, a atividade de naringinase atingiu o valor máximo de 473,6 mU/mL. Assim, a naringinase, enzima de grande potencial de aplicação biotecnológica, teve a produção aumentada pelo uso do planejamento estatístico e ultrassom.

**Palavras-chave:** Naringinase. Melaço. Metodologia de superfície de resposta. *Aspergillus niger*.

## ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer of orange and concentrated juice for export. Concentrated juice with high levels of naringin has excessive bitterness, which reduces the quality and value on the market. The debittering can be obtained by using naringinase, an enzymatic complex that degrades naringin. This study reports the production of naringinase by *Aspergillus niger* 426 utilizing both sugar cane molasses as carbon source and yeast extract as nitrogen source. Naringin was used as inducer. Five nitrogen sources were studied and yeast extract was found as the best one as 225.6 mU/mL of naringinase activity at 120 hours of fermentation was achieved. For optimization of naringinase production it was applied response-surface methodology, with  $2^2$  incomplete factorial design. An activity value of 354.26 mU/mL of naringinase was achieved when as independent variables yeast extract (14.0g/L) and naringin (0.2g/L) were used. When applied ultrasound waves at 20 kHz of intensity for 2 minutes in the fermented broth, the activity reached the highest value of 473.6 mU/mL. Thus, naringinase, this enzyme of great potential for biotechnological applications, has its production increased by using statistical design and ultrasound.

**Keywords:** Naringinase. Molasses. *Aspergillus niger*. Response-surface methodology.



## INTRODUÇÃO

Frutas cítricas, especialmente a laranja, são as mais produzidas no mundo e o Brasil é o maior produtor de suco concentrado destinado à exportação. (FELISMINO, 2009). Sucos cítricos concentrados com níveis elevados de naringina, flavonoide responsável pelo amargor característico do suco, são excessivamente amargos, o que reduz a qualidade e o valor comercial do produto. Diversas tecnologias têm sido propostas para remoção do amargor, mas estas alteram as características organolépticas dos sucos e assim têm aplicação limitada. (RIBEIRO; RIBEIRO, 2008). Entretanto, destaca-se a técnica enzimática para a remoção do amargor, pela adição de naringinase ao processamento da fruta. Naringinase é um complexo enzimático constituído de  $\alpha$ -L-raminosidase (EC 3.2.1.40) e  $\beta$ -D-glucosidade (EC 3.2.1.21), que hidrolisa a naringina em naringinina, glucose e raminose. Além do interesse na indústria cítrica, a naringinase tem potencial de aplicação na indústria farmacêutica, na produção de anti-inflamatórios (RIBEIRO; RIBEIRO, 2008), e química na produção de biosurfatantes. (SAERENS et al. 2009). A produção de naringinase por fermentação fúngica é de interesse devido à possibilidade de utilização de substratos da agroindústria, como o melaço, peptona de soja e extrato de levedura que são de baixo custo e grande disponibilidade no Brasil. *Aspergillus niger* destaca-se por ser um fungo GRAS e produzir uma variedade de enzimas. (SCHUSTER; DUNN-COLEMAN; FRISVAD, 2002).

Na produção de enzimas por *A. niger*, a metodologia de superfície de resposta tem demonstrado ser uma ferramenta útil, pois possibilita, com número reduzido de experimentos, estabelecer a concentração ótima de cada variável significativa e assim estabelecer uma condição otimizada de produção. (XU, 2008; GE; QUIAN; ZANG, 2008).

O uso de ultrassom na extração de produtos microbianos vem se destacando por ser tecnologia destituída de geração de subprodutos (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE, 2009; CHISTI, 2003), apresentar baixo custo de operação e não requerer equipamento sofisticado ou treinamento técnico extensivo.

O objetivo deste trabalho foi produzir naringinase por *A. niger* em fermentação submersa com o auxílio de metodologia de superfície de resposta e utilizar o uso do Ultrassom para sua extração.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MICRO-ORGANISMO

*Aspergillus niger* 426, isolado de ameixa seca pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos), identificado e cedido gentilmente pela Professora Maria Helena Fúngaro, do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Foi utilizado melaço de cana-de-açúcar safra 2003 procedente da Usina de Açúcar e Álcool da COROL (Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda.), localizada na região Norte do Paraná. A matéria prima continha, em média, 60% de açúcares totais.

### FERMENTAÇÃO

Os cultivos em batelada, realizados em triplicatas, foram conduzidos tendo pH inicial dos meios ajustados para 4,5; distribuídos em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio esterilizado, inoculados com  $6 \times 10^6$  esporos/mL, com agitação (180rpm) a 28°C. A fermentação foi interrompida com a retirada dos frascos, nos tempos de 96, 120 e 144 horas, para realização das determinações analíticas.

*Meio basal:* A composição do meio foi (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0; KCl 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5;  $\text{FeCl}_3$  0,1; melaço 3,0 e naringina 0,5. (MACHADO, 2007).

*Meios com variação da fonte de nitrogênio:* O experimento que investigou a melhor fonte de nitrogênio para a produção de naringinase por *A.niger*

426 analisou diferentes fontes de nitrogênios, incluindo peptona, peptona soja, extrato de levedura,  $\text{NaNO}_3$  e prolina na concentração de 10,0 g/L, adicionado ao meio basal.

*Meio para produção de naringinase:* Os experimentos para a escolha do melhor meio de cultivo para a produção de naringinase foram realizados segundo os princípios da metodologia de superfície de resposta, tendo como variáveis independentes as concentrações de extrato de levedura, selecionado como fonte de nitrogênio e naringina como indutor no meio de fermentação.

#### SONICAÇÃO DOS CULTIVOS

A irradiação ultrassônica dos cultivos foi realizada com aparelho Ultrasonic Processor 20kHz, modelo GE 130PB/70W da Sonics and Materials, equipado com guia de onda tipo sonda de 9,5mm de diâmetro. A potência acústica foi controlada manualmente abaixo de 40W, sendo o guia de onda imerso numa profundidade de 2cm em 50ml da cultura, com irradiação contínua. O meio de cultivo otimizado, realizado em triplicata, foi retirado do shaquer para interrupção da fermentação no tempo de 120 horas e irradiado nos tempos de 05, 1,2 e 3 minutos, em seguida foi retirada uma amostra. centrifugada a 13400rpm por 15min sob refrigeração (4°C) para posterior análise do sobrenadante.

#### DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

#### DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa foi determinada, ao término de cultivo, por gravimetria. Procedeu-se a filtragem do fermentado e posterior secagem a 80°C até peso constante.

## DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES TOTAIS

Os açúcares totais foram determinados pelo método do Fenol Sulfúrico. (DUBOIS et al. 1956). A curva padrão foi elaborada utilizando solução padrão de glucose em concentrações variando de 20 a 100 $\mu$ g/mL por meio de leituras das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm.

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NARINGINASE

A atividade da naringinase foi determinada segundo uma adaptação do Método de Davis. (DAVIS, 1947). A mistura de reação foi composta de 0,8mL de naringina, dissolvida em tubo de ensaio previamente contendo 0,5mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 4,0) e 0,1mL de sobrenadante do cultivo. O branco teve a composição de 0,8mL de água destilada e 0,6mL do mesmo tampão. Essas misturas foram incubadas a 50°C por uma hora. Foi retirada uma alíquota de 0,1mL, em tubos de ensaio contendo 3mL de dietilenoglicol 90% (v/v). Por último, foi adicionado 0,1mL de NaOH 4N. Os tubos ficaram em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor que será lida em 420nm.

Os resultados de atividade enzimática foram expressos em mU/mL, considerando uma unidade de atividade de naringinase como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 $\mu$ mol de naringina por minuto sob as condições descritas. Foi realizada uma curva padrão utilizando naringina em concentrações variando de 0,2 a 1,0g/L.

## DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Foi empregado um delineamento composto central rotacional (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001), com dois níveis equidistantes de variação, codificados em -1 e +1; dois pontos centrais (0) e quatro pontos axiais ( $+\sqrt{2}$ ); ( $-\sqrt{2}$ ),

resultando em 10 experimentos (Tabela 2). A concentração das variáveis independentes no ponto central foi baseada na melhor produção de naringinase obtida por Machado (2007). Os níveis foram decodificados de acordo com a equação 1, onde  $X_1$  são os valores reais das variáveis independentes e  $x_1$  são os valores codificados das variáveis independentes.

$$x_1 = (X_1 - \text{ponto central}) / \text{faixa de variação} \dots \dots \dots (1)$$

As variáveis independentes foram representadas pelas concentrações de extrato de levedura(g/L) e naringina(g/L), enquanto que a variável dependente refere-se à atividade de naringinase.

As análises referentes à metodologia de superfície de resposta, análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias dos tratamentos avaliadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) foram realizadas utilizando o programa Statistic 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.

O meio de cultivo básico utilizado neste trabalho foi anteriormente otimizado na fonte de carbono, quantidade de naringina e tempo de fermentação por Machado, R.A.M. (2007) que obteve como melhor produção de naringinase o valor de 178,6 mU/mL.

Para melhorar a produção enzimática, o presente trabalho, inicialmente, testou diferentes fontes de nitrogênio. Cinco diferentes fontes de nitrogênio foram adicionadas ao meio basal na concentração de 10g/L e os valores obtidos de naringinase e biomassa foram avaliados nos seguintes tempos de fermentação: 96, 120 e 144 horas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1:

**Tabela 1** – Influência da fonte de nitrogênio na atividade de naringinase de *A. niger*.

FONTES DE NITROGÊNIO	ATIVIDADE DE NARINGINASE (mU/mL) <sup>a</sup>		
	96 h	120 h	144 h
NaNO <sub>3</sub>	45,9	54,96	91,81
Extrato Levedura	135,3	225,0	203
Peptona	87,6	72,8	106
Peptona soja	71,4	116,6	208,2
Prolina	77	256,4	262,8

(a) média das triplicatas.

O teste de Tukey, utilizado para comparação das médias dos resultados da atividade enzimática entre os tempos de 96h e 120h, mostrou que são significativamente diferentes, em nível de 5%, para as fontes, prolina e extrato de levedura. A mesma análise, para NaNO<sub>3</sub>, peptona e peptona de soja, não apresentou diferença significativa. Os baixos valores obtidos de naringinase, quando NaNO<sub>3</sub> foi utilizado, também foram reportados por BRAM; SOLOMONS (1965). Contudo quando empregado por PURI; BANERJEE; BANERJEE (2005), não apresentou efeito inibitório para produção de naringinase. Para a produção de glucose-oxidase por *A. niger*, o NaNO<sub>3</sub> mostrou ser uma fonte adequada de nitrogênio. (MIRÓN et al. 2008).

Quando considerada a fonte de nitrogênio peptona, em comparação ao nitrato de sódio, verifica-se que a peptona apresentou maior produção enzimática, confirmando os resultados apresentados por PURI; BANERJEE; BANERJEE (2005) e MACHADO (2007). Entretanto, nestes experimentos foram utilizadas linhagens diferentes do *A. niger*.

Entre os tempos de 120 e 144 horas não houve diferença significativa para todas as fontes analisadas, apesar da maior atividade ser identificada no tempo de 144 horas utilizando prolina como fonte de nitrogênio. Mediante esta análise estatística, deduz-se que o tempo de 120h é o mais indicado para a produção de naringinase.

No tempo de fermentação de 120 horas, dentre todas as fontes de nitrogênio testadas, a prolina e o extrato de levedura produziram os valores mais

elevados de naringinase. O teste de Tukey, utilizado para comparar as médias dos resultados das diferentes fontes de nitrogênio, mostrou diferença significativa em nível de 5% da prolina e o extrato de levedura com as demais fontes de nitrogênio utilizadas. Entretanto, não houve diferença significativa entre prolina e extrato de levedura. PURI; BANERJEE; BANERJEE (2005) testaram diferentes fontes de nitrogênio e obteve os melhores resultados com peptona, porém esses autores não testaram o extrato de levedura.

O aminoácido prolina com seu elevado custo quando comparado ao extrato de levedura foi descartado para os demais experimentos, uma vez que a análise pelo teste de Tukey não mostrou diferença significativa entre essas duas fontes para a produção enzimática no tempo de 120 horas. Assim como neste trabalho, BRAM, B, SOLOMONS, G.L. (1965) também testaram a influência da fonte de nitrogênio em fermentação submersa para produção de naringinase por *A. niger* NRRL-72-4 e indicaram como melhor fonte o extrato de levedura. Portanto, o extrato de levedura foi escolhido como fonte de nitrogênio para os subsequentes experimentos, fixando-se o tempo em 120 horas.

#### OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (M.S.R).

A escolha do novo ponto central bem como dos níveis de variação levou em consideração os resultados do experimento anterior (Tabela 1) e os resultados obtidos por Machado (2007).

A MSR foi aplicada para otimizar os parâmetros de fermentação (concentração do extrato de levedura e naringina) como variáveis independentes, buscando alcançar a maior atividade de naringinase por *A. niger* em melaço. Esses parâmetros foram investigados, fixando-se o tempo em 120 horas, usando o delineamento experimental central composto rotacional cujas variáveis codificadas, originais, e as respostas da atividade da naringinase e biomassa estão apresentadas na Tabela 2 sendo que todas as culturas foram realizadas em triplicatas.

**Tabela 2** – Valores das variáveis codificadas e decodificadas, atividade de naringinase e biomassa na fermentação de melaço por *A.niger* 426 em 120 horas.

ENSAIO	CODIFICADAS		DECODIFICADAS		ATIVIDADES (mU/mL) <sup>a</sup>	BIOMASSA (g/L) <sup>a</sup>
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	Extrato de Levedura (g/L)	Naringina (g/L)		
1	-1	-1	6	0,2	272,8	18,47
2	-1	1	6	0,8	343,1	19,97
3	1	-1	14	0,2	354,3	41,65
4	1	1	14	0,8	239,2	31,11
5	-1,414	0	4	0,5	301,3	25,75
6	+1,41 4	0	16	0,5	198,3	24,23
7	0	-1,414	10	0,0757	267,7	16,42
8	0	+1,41 4	10	0,9243	307,4	36,80
9	0	0	10	0,5	249,4	26,56
10	0	0	10	0,5	255,0	31,84

(a) média das triplicatas.

O modelo quadrático ajustado obtido pelo software Statistica 7.0, para a atividade de naringinase, está apresentado a seguir:

$$Y = 252,19 - 21,01x_1 + 1,42x_2 + 7,22x_{1,2} + 26,11x_{2,2} - 46,35x_1x_2 \dots\dots\dots (1)$$

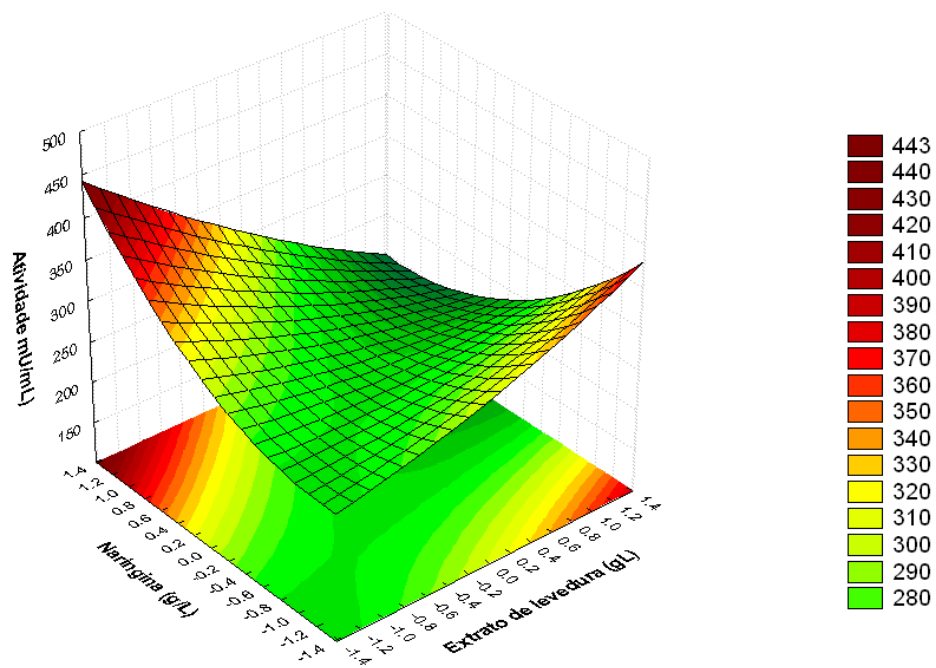
No qual: Y representa a estimativa de atividade de naringinase em mU/mL, x<sub>1</sub> representa a concentração de extrato de levedura em g/L e x<sub>2</sub> a concentração de naringina em g/L.

A equação (1) apresentou um coeficiente de determinação de 75% e um desvio da regressão não significativo (6,82%) indicando que ela é um adequado modelo preditor das condições experimentais. Além disso, a análise de variância mostrou que o coeficiente linear, o termo linear de x<sub>1</sub>, o termo quadrático de x<sub>2</sub> e o termo de interação entre as variáveis independentes são significativos em nível de 5%.



A análise estatística mostrou uma correlação negativa de 64% entre o extrato de levedura e naringina indicando que essas variáveis apresentam efeitos opostos. Tal relação está apresentada na Figura 1 em que se verifica que o aumento na concentração de uma das variáveis independentes implica a redução da outra, quando se deseja alcançar um ótimo de atividade.

**Figura 1** – Gráfico da superfície de resposta e curvas de contorno resultante da influência da concentração de naringina e extrato de levedura sobre a atividade de naringinase por *A. niger* 426.



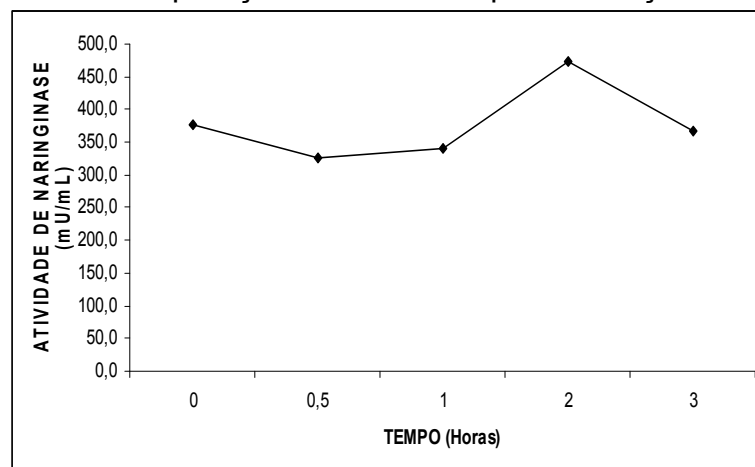
Quando observado o crescimento do micro-organismo em relação à concentração das variáveis utilizadas, a alta concentração de extrato de levedura e baixa de naringina proporcionou um aumento na concentração da biomassa apresentada no ensaio 3 (Tabela 2), enquanto que o baixo valor de extrato de levedura e alto de naringina reduziu consideravelmente a concentração da biomassa apresentada no ensaio 2 (Tabela 2), deduzindo que o *A. niger* utiliza esse composto para biossíntese de material celular (BRANKAR; BULE; SINGHAL; ANANTHANARAYAN; 2008), porém a biomassa não apresenta relação direta com a produção de naringinase, uma vez que ambos os experimentos apresentaram as melhores atividades de naringinase.

A melhor condição das variáveis apontada pela metodologia de superfície de resposta que proporcionou a atividade de naringinase de 354,3 mU/mL por *A. niger* em melão, foi obtida com a otimização do processo, utilizando 14,0 g/L de extrato de levedura e 0,2 g/L de naringina com tempo de fermentação de 120 horas (ensaio 3 da Tabela 1). A condição otimizada foi utilizada em um cultivo visando a extração de naringinase por ultrassom.

#### EXTRAÇÃO DE NARINGINASE PELA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM

Em processos biotecnológicos, o ultrassom vem sendo usado na liberação e extração de proteínas, principalmente enzimas (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE, 2009), melhorar a produção de fermentação microbiana (MARQUES; BUZATO; CELLIGOI, 2006; HERRÁN et al. 2008) e lise celular de micro-organismos. (VARGAS; PIÃO; CARMONA, 2004). Assim, *A. niger* foi cultivado no meio de fermentação otimizado e, em seguida, submetido em diferentes tempos de ondas ultrassônicas (0,5; 1; 2 e 3 minutos), objetivando a liberação enzimática. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 2.

**Figura 2** – Efeito da aplicação do ultrassom para liberação de naringinase.



Em fermentação, a localização da enzima agregada à célula microbiana ou livre no meio de cultivo constitui importante aspecto do efeito do ultrassom sobre a atividade enzimática. Assim, a aplicação do ultrassom durante 0,5 minuto, provocou uma diminuição da atividade enzimática que pode ser compreendida como a agregação daquelas moléculas enzimáticas livres no cultivo e consequentemente obstrução dos sítios ativos. (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE, 2009). OZBEK; ULGEN (2000) demonstraram o efeito do ultrassom em diferentes soluções enzimáticas. De acordo com esses autores, a natureza do fluido no qual as enzimas estão solubilizadas detém importante papel no processo de inativação. Além de promover a agregação das moléculas, também foram demonstradas modificações químicas das moléculas enzimáticas em soluções de glucose-oxidase. (GUISEPPI-ELIE; CHOI; GECKELER, 2009).

Entretanto, o efeito negativo do ultrassom apresentou-se minimizado no tempo de aplicação de 1 minuto e com 2 minutos a atividade aumentou para 473,6 mU/mL. Esse valor representa uma elevação de 25,3%, quando comparado ao valor obtido do cultivo não sonicado. Esse aumento de atividade de naringinase, possivelmente devido à liberação de moléculas enzimáticas agregadas às células microbianas ou mesmo à ruptura celular, resultou em um aumento de atividade enzimática. Assim, a quantidade de enzimas liberadas sobrepôs o efeito negativo verificado em 0,5 minuto de aplicação de ultrassom. O efeito de ultrassom em células microbianas tem sido apresentado por diversos autores. A capacidade de ultrassom provocar ruptura celular e liberar proteínas foi demonstrada em *S. cerevisiae*. (GOGATE; KABADI, 2009). Herrán et al. (2008) reportaram a dispersão de hifas em cultura de *A. terreus* enquanto que VARGAS; PIÃO; CARMONA (2004) demonstrou lise celular e liberação de invertase em *A. niger*.

O tempo de 3 minutos de aplicação de ultrassom foi excessivo uma vez que a atividade diminuiu para 325,6 mU/mL. Micro-organismos e proteínas diferem à resposta da duração do tratamento com ultrassom e a extensão do dano depende da quantidade de energia absorvida. (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE; 2009). Cultivos de *Anabaena flos-aquae* e *Selenastrum capricornutum* tiveram o conteúdo protéico elevado com o uso de ultrassom, mas a atividade de fosfatase alcalina, agregada à superfície celular, aumentou no primeiro e diminuiu no segundo micro-organismo. (FRANCKO et al. 1990). Em *A. terreus*, o uso de ultrassom aplicado em pulsos de segundos e conteúdo energético variável, provocou o

crescimento de células livres e a redução da produção de lovastatin (HERRÁN; LOPES; PÉREZ; CHISTI, 2008) enquanto que em *A. niger* CCT7415, a aplicação de ultrassom de conteúdo energético idêntico ao do presente trabalho, porém durante 2 minutos, induziu ruptura celular e o aumento de invertase. (VARGAS; PIÃO; CARMONA, 2004).

A irradiação ultrassônica de baixa intensidade (20 kHz), durante 2 minutos apresentou como um método adequado para a extração da naringinase de *A. niger*.

Assim, a melhor atividade de naringinase alcançada por *A. niger* 426 de 473,6 mU/mL ocorreu quando cultivado em melaço (3,0g/L), extrato de levedura (14,0g/L) e naringina (0,2g/L), em 120 horas de fermentação e seguido de aplicação do ultrassom com intensidade de 20 kHz por 2 minutos.

## REFERÊNCIAS

- BRANKAR, S. B.; BULE, M.V.; SINGHAL, R.S.; ANANTHANARAYAN, L., Glucose oxidase – an review. **Biotechnology Advances**, v.27, n.4, p.489-501, 2009.
- BARROS, N.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. São Paulo: Unicamp, 2001.
- BRAM, B; SOLOMONS, G.L. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology**, v.13, n.6, p.842-845, 1965.
- CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.2, p.89-93, 2003.
- DAVIS, W.B. Determination of flavanones. **Analytical Chemistry**, v.19, p.476-478, 1947.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- FRANCKO, D.A. et al. Effect of low-dose ultrasonic treatment on physiological variables in *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum*. **Biotechnology Letters**, v.12, n.3, p.219-224, 2002.
- FELISMINO, R. **Jornal do Brasil**. Disponível em: <[www.convista.com](http://www.convista.com)> Acesso em: 1 set. 2009.
- GE, X.Y; QIAN, H.; ZHANG, W.G. Enhancement of fructanohydrolase synthesis form *Aspergillus niger* by simultaneous in vitro induction and in vivo acid stress using sucrose ester. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v.24, p.133-138, 2008.
- GUISEPPI-ELIE, A.; CHOI, S.; GECKELER, K. Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.58, n.1-4, p.118-123, 2009.
- GOGATE, P.R.; KABADI, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.1, p.60-72, 2009.
- HERRÁN, N.S., LOPES, J.L.C., PÉREZ, J.A.S., CHISTI, Y. Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v.83, n.5, p.593-600, 2008.
- MARQUES, L.L.M., BUZATO, J.B., CELLIGOI, M.A.P.C. Effects of Raffinose and Ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Sacharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.6, p.873-880, 2006.

MACHADO, R.A.M. **Produção de naringinase por *Aspergillus niger* na fermentação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MIRÓN, J. et al. Joint effect of nitrogen and phosphorus on glucose oxidase production by *Aspergillus niger*. Discussion of an experimental design with a risk of co-linearity. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, n.1, p.54-63, 2008.

OZBEK, B.; ULGEN, K.O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v.36, n.9, p.1037-1043, 2000.

PURI, M.; BANERJEE, A.; BANERJEE, U.C. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. **Process Biochemistry**, v.40, n.1, 195-201, 2005.

RIBEIRO, I. A.; ROCHA, J.; SEPODES, B.; MOTA-FILIFE, H.; RIBEIRO, M.H. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds., **Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.52-53, p.13-18, 2008.

RIBEIRO, I.A.; RIBEIRO, M.H.L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. **Food control**, v.19, p.432-438, 2008.

ROKHINA, E.V.; LENS, P.; VIRKUTITE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.5, p.298-306, 2009.

SAERENS, K. et al. Production of glucolipids and specialty fatty acids from sophorolipids by *Penicillium decumbens* naringinase: Optimization and kinetics. **Biotechnology Journal**, v.4, n.4, p.517-524, 2009.

SCHUSTER, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Darmstadt, v.59, p.426-435, abr. 2002.

VARGAS, L.H.M; PIÃO, A.C.S.; CARMONA, E.C. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.2, p.137-142, 2004.

XU, Y. et al. Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.9. n.7, p.558-566, 2008.

**ANEXO**

## **ANEXO A**

Normas da revista Semina: Ciências Agrárias – UEL

Diretrizes para Autores

**Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.**

### **Categorias dos Trabalhos**

- a) Artigos científicos: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 35 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

### **Apresentação dos Trabalhos**

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português, inglês ou espanhol, no editor de texto Word for Windows, com espaçamento duplo, em papel A4, fonte Times New Roman, tamanho 12 normal, com margens esquerda e direita de 2,5 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas, de acordo com a categoria do trabalho. Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem estar separadas no final do trabalho. As figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões. As



legendas das figuras deverão ser colocadas em folha separada obedecendo à ordem numérica de citação no texto. Fotografias devem ser identificadas no verso e desenhos e gráfico na parte frontal inferior pelos seus respectivos números do texto e nome do primeiro autor. Quando necessário deve ser indicado qual é a parte superior da figura para o seu correto posicionamento no texto.

## **Preparação dos manuscritos**

### **Artigo científico:**

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras); *Abstract* com *Key-words* (no máximo seis palavras); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final ou Resultados, Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser escritos em letras maiúsculas e minúsculas e destacados em negrito, sem numeração. Quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem receber números arábicos. O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo de congresso, nota prévia ou formato reduzido.

### **A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:**

- 1. Título do trabalho**, acompanhado de sua tradução para o inglês.
- 2. Resumo e Palavras-chave:** Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 150 e um máximo de 300 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (***Abstract e Key words***).
- 3. Introdução:** Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.
- 4. Material e Métodos:** Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.
- 5. Resultados e discussão com conclusões ou Resultados, Discussão e Conclusões:** De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser

apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.

**6. Agradecimentos:** As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

### **Observações:**

Quando for o caso, antes das referências, deve ser informado que o artigo foi aprovado pela comissão de bioética e foi realizado de acordo com as normas técnicas de biosegurança e ética.

**Notas:** Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

**Figuras:** Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

**Tabelas:** As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

**Grandezas, unidades e símbolos:** Deverá obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

**7. Citações dos autores no texto:** Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- Os resultados de Dubey (2001) confirmam que o.....
- e acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- ... e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- ... comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

**8. Referências Bibliográficas:** As referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes (única exceção à norma – item 8.1.1.2). A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

### **Comunicação científica**

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologia completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; *Abstract* com *Key-words*; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a seqüência – introdução, metodologia, resultados (podem ser incluídas tabelas e figuras), discussão, conclusão e referências bibliográficas.

### **Relato de caso**

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, achados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, micro-organismos ou parasitas de interesse agrônomo, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; *Abstract* com *Key-words*; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

### **Artigo de revisão bibliográfica**

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os colaboradores poderão ser convidados a apresentar artigos de interesse da revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; *Abstract* com *Key-words*; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

### **Outras informações importantes**

1. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.
2. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "**Ad hoc**" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.
3. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/proppg/semina>).
4. Os trabalhos não aprovados para publicação serão devolvidos ao autor.
5. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.
6. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
7. Informações devem ser dirigidas a:

<p><b>Universidade Estadual de Londrina</b>  Centro de Ciências Agrárias</p> <p>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva</p> <p>Comitê Editorial da Semina Ciências Agrárias</p> <p>Campus Universitário - Caixa Postal 6001  86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.</p> <p>Informações: Fone: 0xx43 33714709  Fax: 0xx43 33714714  Emails: <a href="mailto:vidotto@uel.br">vidotto@uel.br</a>;  <a href="mailto:csvjneve@uel.br">csvjneve@uel.br</a></p>	<p><b>ou Universidade Estadual de Londrina</b>  Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação</p> <p>Conselho Editorial das revistas Semina</p> <p>Campus Universitário - Caixa Postal 6001  86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.</p> <p>Informações: Fone: 0xx43 33714105  Fax: Fone 0xx43 3328 4320</p> <p>Emails: <a href="mailto:eglema@uel.br">eglema@uel.br</a>;</p>
--	--

#### Itens de Verificação para Submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)
3. URLs para as referências foram informadas quando necessário.

4. O texto está em espaço 1,5 ou duplo; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão no final do documento.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.
6. A identificação de autoria do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.

#### Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude de aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais. A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores. Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. Nesses casos, os artigos, depois de adequados, deverão ser submetidos à nova apreciação. As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

#### Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

**Semina: Ciências Agrárias**

Londrina - PR

ISSN 1679-0359