

Avaliação do potencial de produção de pectinase a partir do resíduo da casca da maçã por fermentação de estado sólido

Evaluation of pectinase production potential from apple hand residue by solid state fermentation

DOI:10.34117/bjdv7n3-472

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 18/03/2021

Larissa Fernanda Finazzi da Costa

Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia

Instituição: Launer química

Endereço: Rod Estrada Transantarita, km 3,5, Estrela - RS

E-mail: larissa-costa@uergs.edu.br

Marlene Guevara dos Santos

Mestre em engenharia

Instituição: Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Endereço: Rua Benjamin Constant, 229 - Centro Bento Gonçalves – RS

Email: marlene-santos@uergs.edu.br

Daiana Maffessoni

Mestre em engenharia

Instituição: Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Endereço: Rua Benjamin Constant, 229 - Centro Bento Gonçalves – RS

E-mail: daiana-maffessoni@uergs.edu.br

RESUMO

As enzimas pectinolíticas ou pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas, são usadas na extração de suco de fruta e são usadas nos processos de clarificação, redução da turbidez e viscosidade dos sucos, dentre outras aplicações. Essas enzimas são produzidas por fungos filamentosos dentre eles se destaca o *Aspergillus niger*, que é a espécie mais comumente utilizada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização da casca da maçã como substrato para produção de pectinase em estado sólido utilizando *Aspergillus niger*. As etapas da metodologia foram pré-tratamento e caracterização da casca da maçã, obtenção, isolamento e identificação do microrganismo, fermentação em estado sólido e os ensaios de clarificação e redução de turbidez foram realizados em triplicatas e os resultados foram comparados com uma enzima comercial. O teor de pectina encontrado nas casca da maçã foi cerca de $14,91\% \pm 0,02$ mostrando que a casca da maçã é uma alternativa de substrato para a produção de pectinase, o teor de sólidos solúveis foi 14°Brix , a umidade é $28,83\% \pm 0,064$ tal valor indica que não há necessidade de manutenção da umidade

durante a fermentação, o pH 4,4 indica uma condição favorável para o crescimento dos microrganismos sem que haja necessidade de manutenção. O microrganismo foi obtido através da bioprospecção realizada em casca da maçã, o isolamento foi feito identificando quais das colônias obtinham as características de uma colônia de *Aspergillus niger* e foram cultivadas em meio BDA a identificação realizada foi morfológica. A fermentação em estado sólido foi realizada por 120 horas, nas quais foram retiradas alíquotas a cada 24 horas. O extrato bruto enzimático obtido após o processo fermentativo removeu 77,16 % de turbidez e clarificou 70,4 % a amostra analisada, enquanto a enzima comercial removeu 74,4 % de turbidez e para ensaios de clarificação o resultado foi 64,8 %. Tais resultados comprovam que a viabilidade da produção de pectinase a partir da casca da maçã na produção de enzimas pectinolíticas produzidas por fermentação em estado sólido pelo *Aspergillus niger*.

Palavras-chave: pectinase, fermentação, resíduo.

ABSTRACT

Pectinolytic enzymes or pectinases form a heterogeneous group of enzymes that hydrolyze pectic substances, are used in the extraction of fruit juice and are used in the processes of clarification, reduction of turbidity and viscosity of juices, among other applications. These enzymes are produced by filamentous fungi. Among them, *Aspergillus niger* stands out, which is the most commonly used species. This work aimed to evaluate the use of apple peel as a substrate for producing solid state pectinase using *Aspergillus niger*. The steps of the methodology were pre-treatment and characterization of the apple peel, obtaining, isolation and identification of the microorganism, solid state fermentation and the clarification and turbidity reduction tests were carried out in triplicates and the results were compared with a commercial enzyme. The pectin content found in the apple peel was about $14.91\% \pm 0.02$ showing that the apple peel is an alternative substrate for the production of pectinase, the content of soluble solids was 14° Brix, the humidity is $28.83\% \pm 0.064$ this value indicates that there is no need to maintain moisture during fermentation, pH 4.4 indicates a favorable condition for the growth of microorganisms without the need for maintenance. The microorganism was obtained through bioprospecting performed on apple peel, isolation was done by identifying which of the colonies obtained the characteristics of a colony of *Aspergillus niger* and were grown in BDA medium, the identification performed was morphological. Solid state fermentation was carried out for 120 hours, in which aliquots were removed every 24 hours. The crude enzymatic extract obtained after the fermentation process removed 77.16% of turbidity and clarified 70.4% of the analyzed sample, while the commercial enzyme removed 74.4% of turbidity and for clarification tests the result was 64.8% . Such results prove that the viability of pectinase production from apple peel in the production of pectinolytic enzymes produced by solid state fermentation by *Aspergillus niger*.

Keywords: pectinase, fermentation, residue.

1 INTRODUÇÃO

A maçã, fruto da macieira, possui forma de globo, sabor agridoce e coloração verde ou vermelha. Seu principal consumo é na forma fresca, mas o processamento é bem

aceito, como sucos, geleias, vinagre, doces (SEBRAE, 2019). Possui diversas características importantes desde a importância na manutenção da saúde controlando a glicemia, hidratando e repondo energias, reduzindo níveis de colesterol, auxiliando na saúde bucal, a maçã é rica em vitaminas, fibras e fundamental para manter uma dieta saudável (VALOR MEDICINAL, 2019).

No Brasil, a produção de maçã tem aumentado muito nos últimos anos e estima-se uma produção de 1,2 milhão de toneladas (MORAIS, 2018; MOTTA e MOTTA, 2019). O suco é considerado um dos principais produtos obtido do processamento da maçã. A cadeia produtiva da maçã é organizada verticalmente, ou seja, uma mesma empresa geralmente comporta desde a produção de mudas até a venda do produto final, seja a maçã *in natura* ou os resíduos para a indústria (MOTTA e MOTTA, 2019). O resíduo, bagaço (casca, polpa, semente), de acordo com Nunes (2016), representa em torno de 25% do peso do fruto, e tem como destino final ou aterros sanitários ou é utilizado na suplementação de adubos. Mas estudos estão sendo realizados de modo a aproveitar melhor esse subproduto da indústria para produção de álcool, bebidas alcoólicas, fibras para enriquecimento de alimentos (SEBRAE, 2019).

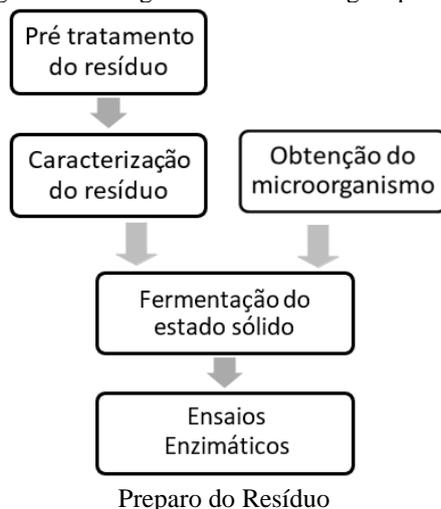
Dentre os componentes da casca da maçã, destaca-se a pectina, composta por complexos de polissacarídeos que são utilizadas na fabricação de geleias, como espessantes, estabilizantes, emulsificantes (FiB, 2014).

As enzimas responsáveis pela quebra da pectina são conhecidas como enzimas pectinolíticas ou pectinases e são empregadas nas indústrias têxteis, de extração de óleos e, principalmente, nas indústrias de sucos diminuindo o tempo de clarificação e aumentando a eficiência da extração. Dentre os produtores dessas enzimas estão os fungos da espécie *Aspergillus niger* (ROCHA, 2010). Assim sendo, este trabalho tem por objetivo avaliar a utilização da casca da maçã como substrato para produção de pectinase em estado sólido utilizando *Aspergillus niger*.

2 METODOLOGIA

A metodologia desenvolvida foi de acordo com o Fluxograma.

Figura 1: Fluxograma da metodologia aplicada



As cascas foram lavadas em água corrente, e depois separadas das cascas. Essas serão limpas e trituradas e peneiradas. O resíduo úmido foi disposto em bandejas de alumínio e levados a estufa com circulação de ar a temperatura de 60°C por um período de 30 horas em camadas de aproximadamente 0,5 cm, para chegar-se ao resíduo seco da casca da maçã.

Caracterização do Resíduo

A caracterização físico-química dos resíduos quanto à densidade aparente, pH, umidade, cinzas, sólidos solúveis, açúcares redutores e pectina, foi realizada conforme procedimentos descritos a seguir.

Densidade Aparente

Para determinação da densidade aparente pesou-se 100 gramas dos resíduos que foram colocados em proveta para determinar o volume ocupado, sem haver compactação (Correia, 2004). A densidade aparente é expressa na Equação 1.

$$\text{Densidade aparente} = \frac{m}{v} \quad (1)$$

Onde: m é massa pesada (g) e v é o volume da solução (mL).

pH

Preparou-se uma suspensão com 10mL de água destilada e 1,0 g da amostra sólida. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos, depois o pH foi mensurado em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Umidade

Pesou-se de 2 g da amostra em cápsula de porcelana previamente tarada. A mesma foi aquecida durante 3 horas a 105°C. Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente, pesou-se. A umidade foi calculada conforme a Equação 2.

$$Umidade = \frac{100 * N}{P} \quad (2)$$

Onde é N é a massa depois do aquecimento e P é a massa ntes do aquecimento.

Teor de sólidos solúveis (°Brix)

Ajustou-se o refratômetro para a leitura de n em 1,3330 com água a 20°C, de acordo com as instruções do fabricante. Transferiu-se de 3 a 4 gotas da amostra homogeneizada para o prisma do refratômetro. Circulou-se água à temperatura constante pelo equipamento, de preferência a 20°C, no tempo suficiente para equilibrar a temperatura do prisma e da amostra e mantenha a água circulando durante a leitura, observando se a temperatura permanece constante.

Pectinas

Transferiu-se 200 ml da solução da amostra, para um béquer de 400 ml. Ela foi evaporada em banho-maria até cerca de 25 ml. Esfriou-se. Adicionou-se 3 ml de ácido sulfúrico 0,5 M e adicionou-se lentamente, 200 ml de etanol anidro. Deixou-se em repouso por 10 horas e filtrar. Lavou-se o filtro com 50 ml de álcool a 95%. O precipitado foi transferido para o mesmo béquer em que foi feita a evaporação, com o auxílio de um jato de água quente. Evaporou-se até reduzir a 40 ml. Esfriou-se. Posteriormente, foi adicionado 5 ml de solução de hidróxido de sódio a 10% e 5 ml de água. Ficando em repouso por 15 minutos. Logo após adicionado 40 ml de ácido clorídrico (1+9). Ferveu-se por 15 minutos e filtrou-se.

O precipitado foi transferido para um béquer de 200 ml, com auxílio de um jato de água quente. Após lavado bem o papel de filtro com água quente. Completou-se com água o volume de 40 mL. Esfriou-se. Adicionou-se 5 ml de solução de hidróxido de sódio a 10% e 5 ml de água que ficou em repouso por 15 minutos.

Logo após adicionou-se 49 mL de água e 10 mL de ácido clorídrico (1+9). Ferva por 5 minutos. Filtrar em cadinho de Gooch que tenha sido previamente aquecido por 30 minutos em mufla a 550°C e resfriado até a temperatura ambiente em dessecador com cloreto de cálcio anidro, pesado. A amostra foi aquecida por 30 minutos em mufla a 550°C. Depois de resfriada a mesma foi pesada. A perda de peso dará a quantidade de ácido pécico (Equação 3).

$$\frac{100*N}{P} = (\%) \text{ de ácido pécico} \quad (3)$$

Onde: N é massa final e P é a massa inicial de amostra.

Isolamento e identificação do microrganismo

Os microrganismos foram obtidos de modo natural a partir da casca da maçã, a mesma foi colocada em recipientes fechados sob o abrigo de luz. Posteriormente foram feitos repiques a fim de se obter colônias características típicas *Aspergillus niger*. A identificação do microrganismo foi realizada através das análises das características macromorfológicas são elas o tamanho da colônia, características dos bordos, textura, relevo e pigmentação.

Fermentação em estado sólido

O cultivo em estado sólido foi conduzido em bandejas contendo 80 g de meio sólido, os mesmos foram inoculados com suspensão de esporos de *A.niger*. Aeração foi feita a partir de bombas de aquário que injetavam ar, para um garrafa que continha uma solução de água e álcool iodado para garantir a assepsia do meio evitando contaminação.

Extração enzimática

Os tratamentos dos extratos enzimáticos foram feitos através da centrifugação nas condições de 180 rpm e 30 minutos. As alíquotas que foram centrifugadas continham o substrato e tampão acetato (200 mM pH = 4,0) e foram retiradas em triplicata de cada reator no intervalo de tempo de 24 horas. Posteriormente o suco natural de maçã Gala foi

utilizado para a avaliação dos extratos enzimáticos de *A. niger*, produzidos em cultivo em estado sólido. Com 1 ml de sobrenadante e 6 mL de suco a incubação foram definidos como temperatura e o tempo de incubação para os testes os valores 50°C e 60 minutos respectivamente, tais valores foram escolhidos as referências bibliográficas de trabalhos semelhantes com pectinases e o *Aspergillus niger*.

Ensaio realizados

Os ensaios nos biorreatores foram conduzidos por 120 horas e com a utilização da casca da maçã como meio. Os extratos enzimáticos brutos obtidos foram testados na clarificação de suco maçã Gala (*Mahus domestica*) em comparação com a enzima comercial Pectinez Ultra SP-L (Nocozymes Latin America Ltda). As frutas foram adquiridas em um mercado local e higienizadas com água. O suco foi obtido com auxílio de um liquidificador (Mondial) e não foi adicionado água na sua preparação. As amostras de sucos de maçã foram condicionadas em tubos e para 6,0 mL de suco foi adicionado 1 mL dos extratos enzimáticos, sendo a dosagem utilizada de 1 unidade de pectinase totais por mL de suco. O tempo de incubação dos devidos tratamentos enzimáticos foi de 60 minutos, a 50 °C.

Ensaio de turbidez

Em pequenas alíquotas de 6 ml de suco de maçã foram adicionadas a 1 ml de extrato enzimáticos que após o procedimento de incubação citado anteriormente, retirou-se 500 µL em frascos de ensaios de turbidez e adicionou-se em tubos de ensaios de turbidez e foi adicionada água destilada. Após a homogeneização da solução foram feitas as análises de turbidez. O suco tratado com os extratos brutos foi comparado com o suco tratado com enzima comercial Pectinex Ultra SP-L quanto a diminuição da turbidez. A redução da turbidez foi calculada pela Equação 4.

$$\text{Redução da turbidez (\%)} = \frac{\text{Turb}_{\text{suco controle}} - \text{Turb}_{\text{suco tratado}}}{\text{Turb}_{\text{suco controle}}} * 100 \quad (4)$$

Onde: Turb suco controle é a turbidez do suco que não foi tratado, Turb suco tratado é turbidez do suco tratado com extrato enzimático.

Ensaio de clarificação

A clarificação do suco de maçã gala foi determinada por intensidade de cor, medida em espectrofotômetro, metodologia adaptada por Sandri (2010). A leitura das amostras foi realizada nos comprimentos de onda de 440 e 520 nm contra água. O comprimento de onda de 440 nm corresponde à cor amarela decorrente de oxidação de polifenóis; a medida de 520 nm refere-se à cor vermelha, resultante da presença de antioxidantes da fruta. O suco tratado com os extratos brutos foi comparado com o suco tratado com enzima comercial Pectinex Ultra SP-L quanto ao aumento da clarificação.

A intensidade de cor (IC) do suco foi expressa como a soma das absorvâncias a 440 nm e 520 nm (Equação 5).

$$IC = Abs_{440} + Abs_{520} \quad (5)$$

A clarificação, expressa em percentual de clarificação, foi determinada em função da intensidade de cor do suco controle e do suco tratado (Equação 6).

$$\text{Clarificação (\%)} = \frac{IC_{\text{suco controle}} - IC_{\text{suco tratado}}}{IC_{\text{suco controle}}} * 100 \quad (6)$$

Onde: IC suco controle é a intensidade de cor do suco que não foi tratado, IC suco tratado é intensidade do suco tratado com extrato enzimático.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do Resíduo

A produção de pectinase por *Aspergillus niger* é induzida pela presença de pectina no meio de cultura. Assim, a caracterização dos resíduos da casca da maçã visa conhecer a composição dos resíduos com respeito ao conteúdo de nutrientes, que são importantes na síntese da enzima como percentual de pectina, açúcares redutores e proteína, bem como os parâmetros que afetam o processo como pH e a densidade aparente. A caracterização da casca da maçã como meio na produção de pectinases por fermentação em estado sólido esta apresentadas na Tabela 1, os dados são referentes a base úmida.

Tabela 1: Caracterização dos resíduos da casca da maçã em base úmida

Parâmetros Analisados	Unidade	Casca da maçã
Umidade	%	28,83 ± 0,064
Sólidos solúveis	°Brix	14,03 ± 0,057
Pectinas	%	14,91 ± 0,020
pH	-	4,4 ± 0,005
Densidade aparente	g/mL	0,114 ± 0,001

O valor de pH está de acordo com os determinados por Pagani (2005) para a casca da maçã, (4,4). O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos têm como condição favorável de desenvolvimento pH baixo (4,5 – 5,0). Os resíduos aqui estudados apresentam alto teor de pectina sendo de 14,91 % para o resíduo de maçã em base úmida. Apresentam o valor de sólidos solúveis de 14° Brix valor o qual se encontra de acordo com a Pagani (2005). A densidade aparente (0,114 g/mL) revela que os resíduos tendem a não se compactarem completamente, fator propício ao desenvolvimento de microrganismo, visto que os espaços vazios criados pelo resíduo geram espaços suficientes para a circulação de ar. Tal característica é essencial tendo em vista que o material será utilizado como substrato para o processo de fermentação em estado sólido.

Obtenção, Isolamento e Identificação dos Microrganismos

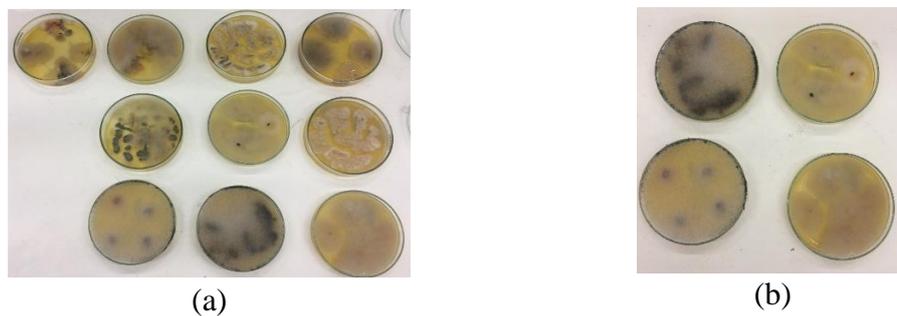
Os microrganismos foram obtidos de modo natural a partir da casca da maçã, a mesma foi colocada em recipientes fechados sob o abrigo de luz. Após quatro dias a prospecção dos microrganismos foi feita em capela de fluxo laminar usando como meio de cultivo a batata dextrose onde os esporos crescidos nas amostras foram espalhados com alças de drigalski (Figura 1). Foram nove incubadas a 25°C por um período de quatro dias.

Figura 1: Prospecção de microrganismos que cresceram na casca da maçã após 4 dias de incubação. (a) Método de estriamento em placa (b) Captação dos esporos do microrganismo.



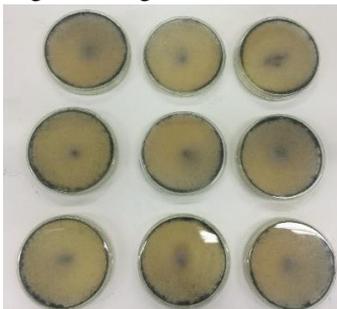
Após 4 dias foi observado e analisados que das nove placas (Figura 2a) apenas quatro apresentaram as características morfológicas de colônias de *Aspegillus* (Figura 2b).

Figura 2: Crescimento microbiano da prospecção da casca da maçã. (a) após 4 dias de prospecção (b) placas que apresentaram características de colônia de *Aspergillus niger*.



Dessas que possuíam as características morfológicas de *Aspergillus* foram isoladas cultivadas novamente em capela de fluxo de fluxo laminar nas mesmas condições descritas anteriormente com intuito de isolar colônias de *Aspergillus*, das quais todas as nove placas produzidas apresentaram características (Figura 3).

Figura 3: Segundo isolamento.



Dentre as nove placas ilustradas na Figura 3, foram escolhidas apenas quatro para a serem analisadas através de microscópios com corante de azul de metileno. O resultado encontrado nas análises das lamínas coradas (Figura 4), mostram características próprias tais como as célula conidiogênica, as hifas, Conídios e conidióforo do *Aspergillus niger* que são encontradas na literatura de identificação de *Aspergillus* (Figura 4). Após a identificação dos microrganismos os mesmos foram colocado nos biorreatores, juntamente com as cascas de maçãs para dar início ao processo de fermentação em estado sólido.

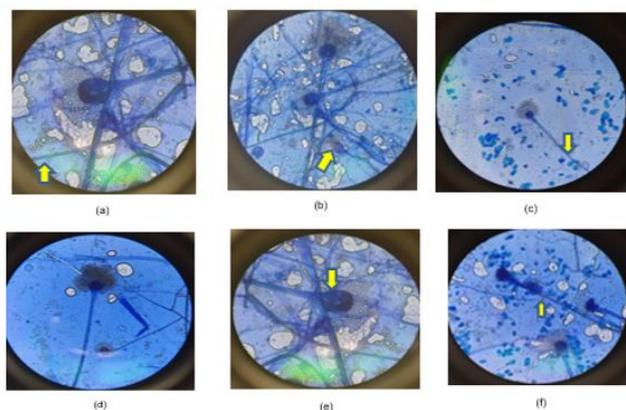


Figura 4 :Aspectos Gerais e Morfológicos do *A.niger*.(a) conídios, (b) hifas (c) conidióforo, (d) Célula conidiogênica. (e) Vesícula e (f) conidiosforos.

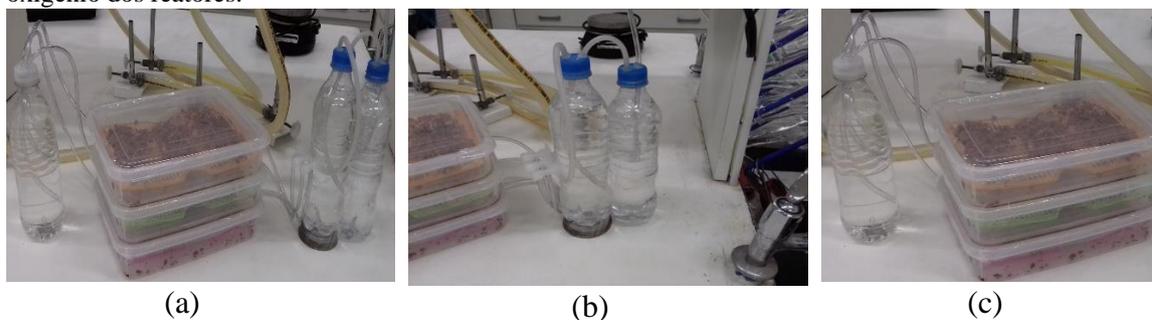
Fermentação em Estado Sólido

Os biorreatores foram montados buscam suprir as necessidades do microrganismo referenciadas sobre o consumo oxigênio (Figura 5a). Para a entrada de oxigênio foi usada mangueiras que com o auxílio de uma bomba de aquário mandava o ar esteril contido na garrafa de alimentação do biorreator onde havia solução esteril de etanol, água e iodo para evitar a contaminação na entrada do biorreator (Figura 5b). A fim de permitir uma distribuição equivalente de oxigênio por todo o reator foram feitos furos pela mangueira conectada ao fundo do reator. Já para a saída de ar foi feito furos

na laterais do reator onde estava conectado uma mangueira que ligava o biorreator para outra garrafa contendo outra solução de esterilização, visto que os fungos identificados e utilizados podem causar problemas respiratórios (Figura 5c).

Devido aos fato da casca da maçã utilizada no processo possuir cerca umidade 28,83 % (em base umida) e o *Aspergillus niger* não requerer uma alta concentração de umidade não foi levado em consideração este parâmetro para a umidade, o mesmo aconteceu com o parâmetro de pH, o pH encontrado na casca da maçã era semelhante ao ideal para o crescimento dos fungos logo não se fez necessário ajustar os biorreator para monitorar este para a montagem do biorreator. Para os ensaios realizados usou-se a identificação dos reatores de acordo com o coloração das grades dos mesmo, ou seja, verde, laranja e rosa.

Figura 5 Funcionamento do biorreator (a) Sistema de biorreator, (b) Entrada de oxigênio, (c) Saída de oxigênio dos reatores.



Ensaio realizados

A ação das enzimas pectinolíticas foi avaliada no tratamento de suco de maçã. O pH do suco in natura, medido em torno de 4,0, também se constitui em uma condição favorável para a ação do complexo pectinolítico. Como controle, foi utilizada a preparação comercial Pectinex Ultra SP-L (Novozymes Latin America Ltda). As atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos produzidos e da preparação comercial foram padronizadas para o mesmo valor, de 6 U/mL.

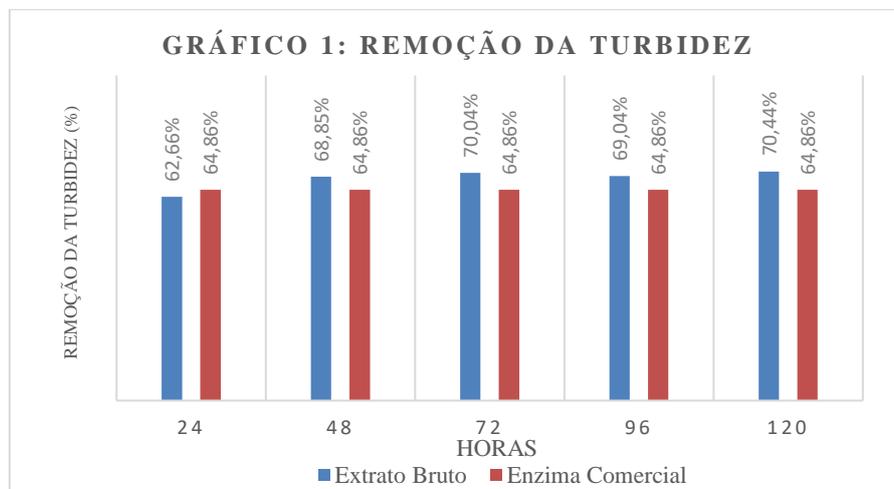
Ensaio de turbidez

Os ensaios de turbidez foram realizados a cada 24 horas por um período de 120 horas. Foram analisados os dados de dos 3 biorreatores montados. O valor de turbidez do Suco controle, ou seja, aquele que não recebeu nenhum tratamento foi 708 NTU os valores de remoção da turbidez de cada biorreator é apresentado na Tabela 2 esses valores são referentes a redução da turbidez por grama de substrato enzimático ao longo dos dias.

Tabela 2: Remoção da turbidez por reator.

	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
%Remoção da turbidez	64,31 ± 0,038	75,90 ± 0,008	76,08 ± 2,1	75,54 ± 0,041	77,16 ± 0,013

O valor de turbidez removido pela enzima comercial foi de 74,01% ± 0,17. A partir de 48 horas o resultado do extrato enzimático obtido no processo ultrapassaram o desempenho da enzima comercial. O Gráfico 1 demonstra a relação das do percentual removido de turbidez por reator ao longo do tempo em comparação a enzima comercial.



4.4.2 Ensaio de clarificação

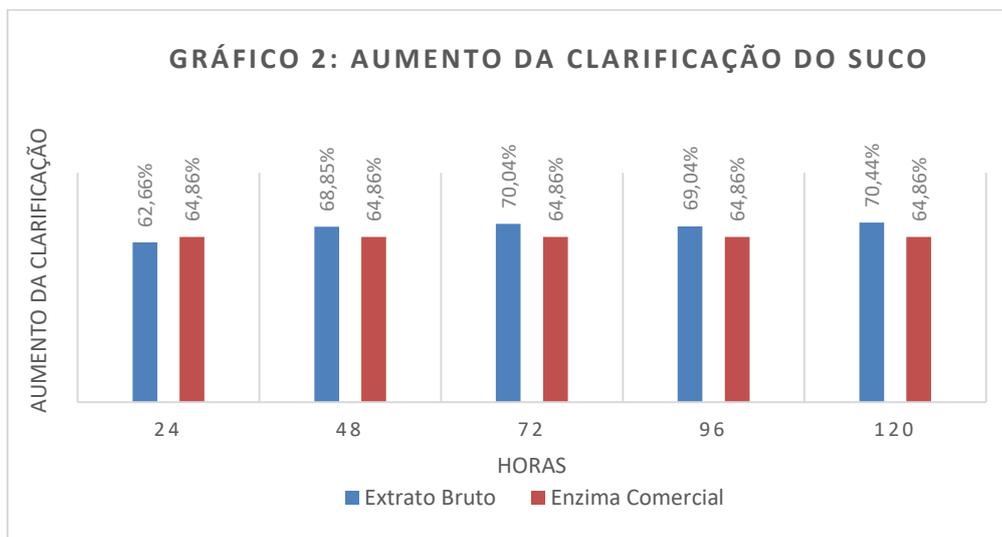
Os ensaios de clarificação foram realizados a cada 24 horas por um período de 120 horas. O valor de clarificação do suco controle de 0,2837, os valores de aumento da clarificação são apresentados na Tabela 3 esses valores são referentes ao percentual de aumento da clarificação por grama de substrato enzimático ao longo das 120 horas.

Tabela 3: Aumento da clarificação

	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Aumento da clarificação (%)	62,66%	68,85%	70,04%	69,04%	70,44%

O aumento da clarificação proporcionado pela enzima comercial foi 64,8 %, o desempenho do biorreator ultrapassou o desempenho da enzima comercial em apenas 48 horas.

O Gráfico 2 demonstra a relação do aumento da clarificação em porcentagem por reator ao longo do tempo em comparação a enzima comercial.



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento enzimático com os extratos produzidos experimentalmente proporcionou resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos com a preparação pectinolítica comercial, utilizando extrato enzimático produzido a partir da casca da maçã em cultivo sólido.

Em apenas 72 horas de cultivo os resultados obtidos dos extratos enzimáticos já eram superiores em aproximadamente 15% na remoção da turbidez quando comparado ao desempenho de uma enzima comercial. Enquanto para o aumento da clarificação o extrato bruto depois de 48 horas já se apresentava 4% a mais do que o resultados com a enzima comercial. Tal fato comprova a viabilidade de produção de pectinase a partir da casca da maçã em fermentação em estado sólido.

REFERÊNCIAS

FRANCO, Pedro Miguel Lucas. Características Físico-químicas, Propriedades Funcionais e Perfil de Compostos Fenólicos de 17 Variedades de Maças Portuguesas. 2014. 299 f. Tese (Doutorado) - Curso de Qualidade Alimentar, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.

MORAIS, Lavínia; BARBIERI, Marcela. MAÇÃ/CEPEA: Frutificação da safra 2018/19 deve se intensificar: Em regiões mais quentes, a frutificação se iniciou em meados de outubro. 2018. Disponível em: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/maca-cepea-frutificacao-da-safra-2018-19-deve-se-intensificar.aspx>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

MOTTA, Gabriel da Silva; MOTTA, Daiane da Silva. Lugar da cadeia produtiva da maçã no cenário global e local: percepções a partir de uma cidade no sul do Brasil. Brazilian Journal of Development. Curitiba, v. 5, n. 8, p. 11230-11244aug. 2019 ISSN 2525-8761

PAGANINI, Cícero. APROVEITAMENTO DE BAGAÇO DE MAÇÃ PARA A PRODUÇÃO DE ÁLCOOL E OBTENÇÃO DE FIBRAS ALIMENTARES. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 29, n. 6, p.1231-1238, dez. 2005.

REGINATTO, Caroline. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE *Aspergillus niger* LB-02-SF OBTIDAS EM PROCESSO SUBMERSO. 2016. 90 f. Curso de Pós- graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Bento Gonçalves, 2016.

ROCHA, Christiane Pereira. Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SANTI, Lucélia; BERGER, Markus. PECTINASES E PECTINA: APLICAÇÃO COMERCIAL E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO. Caderno Pedagógico, Lajeado, v. 11, n. 1, p.130-139, abr. 2013.

SEBRAE. O cultivo e o mercado da maçã. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-maca,ea7a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em: 08 abr. 2019.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. Química Nova, v.30, n.2, 388-394, 2007.