



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA – CCSST
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTO

MÁRDOMI FERNANDO GAMA

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO SUBPRODUTOS DO COCO DO BABAÇU**

Imperatriz
2016

MÁRDOMI FERNANDO GAMA

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO SUBPRODUTOS DO COCO DO BABAÇU**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso Bacharelado em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal do
Maranhão/CCSST, para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de
Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Crispim de Freitas

Imperatriz
2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva, Mardomi Fernando Gama da.

Produção de amilase por fermentação submersa utilizando subprodutos do coco babaçu / Mardomi Fernando Gama da Silva. - 2016.

16 f.

Orientador(a): Adriana Crispim de Freitas.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2016.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Processos. I. Freitas, Adriana Crispim de. II. Título.

MARDOMI FERNANDO GAMA

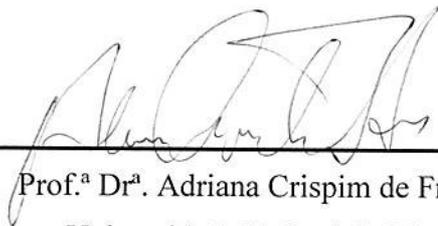
**PRODUÇÃO DE AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso Bacharelado em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal do
Maranhão/CCSST, para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de
Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Adriana Crispim de Freitas

Aprovado em: 23 / 08 / 2016

Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª. Adriana Crispim de Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA



Prof.ª Dr.ª. Virlane Kelly Lima Hunaldo
Universidade Federal do Maranhão - UFMA



Prof.ª Msc. Lara Lima Seccadio
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

**AMYLASE PRODUCTION BY SUBMERGED FERMENTATION USING
BYPRODUCTS FROM BABASSU COCONUT**

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZAN-
DO SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU**

Márdomi Fernando Gama¹;

Adriana Crispim de Freitas¹

¹Universidade Federal do Maranhão, CCSST.

RESUMO

A necessidade de reduzir impactos ambientais, diminuindo a quantidade de resíduos gerados pela produção de alimentos, tem impulsionado a biotecnologia a reaproveitar tais resíduos gerados na cadeia alimentar. A produção de enzima a partir de subprodutos da indústria de alimentos se torna uma opção para reutilização dos mesmos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de amilase a partir da mistura de subprodutos da extração de óleo do coco babaçu. Foram utilizados misturas de mesocarpo, endocarpo e borra para realização da fermentação submersa por *Aspergillus Oryzae* CCBP 001 em shakers do tipo Orbital com agitação de 100 rpm, a 30°C. A composição de cada mistura foi realizada pelo planejamento experimental do tipo *simplex-laticce* e as etapas divididas em 4 intervalos de 24 a 96 horas com planejamento experimental Plackett-Burman. A maior produção de amilase ocorreu após 48 horas de fermentação em meio contendo 33,33% de mesocarpo e 66,66% de borra. Contudo, foi no período de 24 horas que a produtividade foi maior. O gráfico ternário mostrou que as melhores respostas foram as que possuíam mistura de endocarpo e borra e mesocarpo e endocarpo. A partir da análise de variância, percebeu-se que a borra é o substrato que mais impacta na produção de amilase.

Palavras-chaves: enzimas; biotecnologia; processos

INTRODUÇÃO

O mundo enfrenta o difícil desafio de lidar com o esgotamento de recursos e acumulação de resíduos no meio ambiente. A robusta cadeia de processos alimentares gera resíduos em uma escala de multi tonelada a cada ano. A produção destes resíduos alimentares abrange todo o ciclo de vida de alimentos da agricultura até o processamento industrial (Mirabella; Castellani e Sala, 2014). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura dos Estados Unidos (2016) uma enorme quantidade de alimentos produzidos no mundo são desperdiçados a cada ano. Dentro dessa produção de alimentos, frutas e legumes são os mais afetados. Cerca de 45% deles não são reutilizados ou encontram-se estragados.

Dados da FAO (2016) mostram a quantidade em quilogramas de alimentos produzidos e desperdiçado em cada continente por ano em dois cenários. O primeiro cenário mostra que cada pessoa desperdiça em média 61,42 kg de alimento por ano em seu consumo diário. Esse número aumenta pra 100 kg/ano quando apenas os continentes mais desenvolvidos são levados em consideração. Em contrapartida, o segundo cenário mostra que a produção alimentícia per capita desperdiça 164 kg de alimentos por ano nos 5 continentes. Esse número multiplicado pela população mundial se torna ainda mais impactante.

Com a finalidade de diminuir o impacto causado pelo desperdício de alimentos, a biotecnologia vem como uma das diferentes maneiras de reutilizar os resíduos da cadeia alimentar. O processamento secundário de resíduos desempenha um papel importante para agregar valor através da produção de proteínas, biofilmes, ingredientes funcionais e enzimas (Alexandrino et al., 2007)

O desenvolvimento tecnológico direciona para processo biotecnológico visando processos mais limpos, com menor impacto ambiental. Portanto, a substituição de processos químicos convencionais, em detrimento de processos enzimáticos, é essencial para melhorar a

produção industrial de forma geral (Coelho et al., 2001). A produção enzimática não só agrega valor aos bens de consumo, como também mostra a possibilidade de utilizar os recursos naturais de forma eficiente (Silva et al., 2016).

O mercado mundial de enzimas foi avaliado em 4,2 bilhões de dólares em 2014 e deverá crescer 7,0% a partir de 2016 até 2020. Bebidas e alimentos são aqueles que dominam o mercado de enzimas industriais. O principal fator que leva a este aumento de consumo é a alta demanda de bens de consumo, biocombustíveis, e da necessidade de redução de custos e otimização de recursos no processo de produção (Market e Market, 2015).

Em geral, as enzimas podem ser produzidas por diversas fontes, desde as microbianas até vegetais. As fontes microbianas apresentam maior aplicação industrial uma vez que possuem vantagens expressivas como a diversidade metabólica, menor tempo de produção, estabilidade e custo. Sendo as leveduras e fungos filamentosos os microrganismos mais utilizados para produção em larga escala (Lehninger; Michael, 2006).

As principais enzimas utilizadas na indústria de alimentos são: oxirredutases, transferase e hidrolases (Coelho; Salgado e Ribeiro, 2008). Adicionalmente, como parte do grupo das hidrolases, as amilases são frequentemente utilizadas em processos de produção de alimentos, uma vez que estas degradam o amido catalizando a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 presentes na estrutura do amido (Gupta et al., 2003). Esse grupo, tem grande importância biotecnológica em vários processos, como produção de cervejas, bebidas fermentadas, panificação, cereais e alimentos para bebês, além da sacarificação do amido (Marques; Cunha, 2008).

Amilases microbianas estão comercialmente disponíveis e são amplamente utilizados na hidrólise completa do amido e outros processos na indústria de alimentos e têxtil (Gupta et al., 2003).

Para a produção dessas enzimas, os rejeitos industriais podem ser utilizados como matéria-prima. Assim, os rejeitos do processamento de babaçu (*Orbignya sp*) tem sido reutilizados para outros fins. O fruto desta árvore, o coco babaçu, é composto basicamente por endocarpo (52-60%), epicarpo (12-18%), rico em fibras, mesocarpo (17-22%), rico em amido, e amêndoas oleaginosas (6-8%). É a partir das amêndoas oleaginosas que o óleo é extraído (produto principal do coco babaçu) . Portanto, as demais partes necessitam de um destino correto para causar menor impacto ambiental e agregar valor ao subproduto (Carrazza; Ávila e Silva, 2012).

Com a finalidade de minimizar os resíduos e subprodutos do processo agroindustriais, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de alfa-amilase a partir dos subprodutos gerados no processo de obtenção de óleo de babaçu por *Aspergillus Oryzae* CCBP 001 em fermentação submersa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substrato

Toda a matéria-prima utilizada como substrato é subproduto da extração de óleo babaçu. Foram utilizados o endocarpo, mesocarpo e a borra proveniente do processo de obtenção do óleo. Estes substratos foram concedidos pela Tobasa Bioindústria de Babaçu S.A e pela Associação de Quebradeiras de Coco em Cidelândia- MA. O mesocarpo e o endocarpo foram armazenados a temperatura de 25 °C e a torta do babaçu sob temperatura de 7 °C.

Cultura de Microrganismo

Aspergillus Oryzae CCBP 001 (Culture Collection Bioprocessos) foi a linhagem de fungo filamentosos utilizada durante o experimento . A mesma foi cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical-Fortaleza/Ceará.

O fungo foi inoculado em meio composto por 10 g de farelo de trigo e 5 ml de solução contendo 1,7% (m/v) e NaHPO₄ 2,0% (m/v) (NH₄)₂SO₄ este foi incubado em estufa incubadora durante 5 dias a 30°C para produção de esporos.

Os esporos dos fungos foram depositados em solução estéril de Tween 80 (0,1%) com intuito de preparar o inóculo para fermentação. Com o auxílio da câmara de Neubauer, o número de esporos por mililitro em suspensão foram quantificados. O padrão utilizado foi de 10^7 esporos /100 ml.

Delineamento Experimental

Com intuito de se obter uma composição ótima entre os substratos do babaçu na produção de amilase, realizou-se o delineamento experimental do tipo *simplex-lattice*.

Partiu-se de três componentes para a mistura guardando as seguintes proporções: 1(100%), 0 (0%), 1/3 (33,33%) e 2/3 (66,67%) de um total de 2 g de substrato (TABELA 1).

Para obtenção do delineamento experimental, análise dos dados e construção do modelo foi utilizado o software *Statistica*TM 10 da Statsoft Inc. (Tulsa, Oklahoma, USA).

Tabela 1. Matriz do delineamento da mistura *Simplex-lattice* para produção de amilase com *A. oryzae* CCBP 001 em fermentação submersa utilizando diferentes subprodutos de babaçu

Ensaio	ENDOCARPO	MESOCARPO	BORRA
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/3	2/3	0
5	1/3	0	2/3
6	0	1/3	2/3
7	2/3	1/3	0
8	2/3	0	1/3
9	0	2/3	1/3
10	1/3	1/3	1/3

Produção de Amilase

Fermentação submersa foi o processo utilizado para produção da amilase. Os substratos foram pesados de forma individual, binária e ternária, respeitando o planejamento experimental, usando frascos Elerm Meyers de 250mL para realizar a mistura.

Posteriormente, as misturas foram incubadas em Shaker orbital com agitação de 100 rpm, a 30°C. O experimento foi dividido em 4 etapas de acordo com o planejamento experimental Plackett-Burman. A retirada das alíquotas amostrais foram feitas após 24 h /48 h/ 72h e 96 h de fermentação.

Determinação da Biomassa Microbiana

Foi utilizado papel-filtro previamente seco e tarado para filtrar o meio e reter a biomassa. A mesma foi seca em estufa com temperatura igual a 95°C. Após 24 horas a mesma foi retirada e pesada em balança analítica. O sobrenadante foi utilizado para determinação do pH e da atividade amilolítica. O mesmo foi estocado a -18 °C.

Determinação do pH

A leitura do pH do meio foi realizada no ph-metro da Nova Técnica , em dois momentos: antes da fermentação e depois no sobrenadante obtido da filtração do meio fermentado.

Determinação de Atividade Amilolítica.

Primeiramente aclimatou-se a 37°C 1 mL da solução de amido a 2% em banho termostático. Este reagiu com 1 ml do complexo enzimático durante 15 min. A reação foi paralisada por meio da adição de 0,5 ml de NaOH 1N. Consequente a isto, levou-se 1 ml da solução resultante para ser misturado a 1 mL de DNS. Esta solução foi aquecida em banho de água a 100 °C por 15 minutos. Após o aquecimento as amostras foram levadas ao banho de gelo até alcançar temperatura ambiente.

A determinação da atividade de alfa-amilase foi realizada através da leitura das soluções em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorvâncias foram relacionados as respectivas curvas padrões de DNS, de acordo com método adaptado de Miller (1959).

RESULTADOS

Os resultados da interação dos três substratos na atividade amilolítica para cada ensaio nos diferentes intervalos do delineamento experimental Simplex Lattice foram dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores em percentual da mistura no planejamento Simplex-lattice para produção de amilase com *A. oryzae* CCBP 001 em fermentação submersa utilizando diferentes subprodutos de babaçu nos tempo de fermentação de 24, 48, 72 e 96h

Ensaio	Substratos (%)			Unidade de atividade amilolítica (U/mL)			
	Endocarpo	Mesocarpo	Borra	24h	48h	72h	96h
1	100	0	0	0,450	3,830	4,609	2,358
2	0	100	0	1,801	2,338	4,125	1,693
3	0	0	100	2,916	2,526	1,780	3,306
4	33.33	66.67	0	2,970	5,093	2,553	2,688
5	33.33	0	66.67	4,260	6,974	3,427	3,319
6	0	33.33	66.67	2,311	7,189	0,490	4,777
7	66.67	33.33	0	3,053	1,242	0,632	2,607
8	66.67	0	33.33	1,411	1,443	0,040	3,668
9	0	66.67	33.33	1,122	2,271	4,562	3,655
10	33.33	33.33	33.34	2,997	2,513	1,290	3,910

O ensaio que apresentou maior atividade amilolítica foi o submetido a 48 horas de processo fermentativo em meio contendo 66,66% de borra e 33,33% de mesocarpo (ensaio 6).

O ensaio 5 contendo 33,33% de endocarpo e 66,66% de borra após 48 h de fermenta-

ção, ensaio 2 com 100% de endocarpo após 72 h e o ensaio 6 contendo 33,33% de mesocarpo e 66,66% de borra após 96 h de processo fermentativo, apresentaram também altas atividades amilolíticas quando comparadas aos demais ensaios.

Notou-se que, de forma geral, os ensaios que tiveram maior produção de amilase foram os que não possuíam em sua composição o amido como maior constituinte. A presença abundante do amido, não leva o microrganismo a secretar a enzima de interesse uma vez que o substrato já está bastante biodisponível no meio. Assim, a medida que o substrato em maior concentração se esgota, o microrganismo secreta enzimas para obter energia das outras fontes menos presentes no meio.

Produção de biomassa

A quantidade de biomassa gerada não apresentou uma relação direta com a atividade enzimática (TABELA 3).

Tabela 3. Valores em g/mL da quantidade de biomassa produzida pelo *A. oryzea* nos diferentes ensaios a partir de subprodutos de babaçu nos tempo de fermentação de 24, 48, 72 e 96h

Ensaio	BIOMASSA (g/100mL)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	0.131	0.131	0.130	0.125
2	0.054	0.066	0.074	0.078
3	0.065	0.079	0.073	0.069
4	0.066	0.086	0.114	0.098
5	0.088	0.106	0.084	0.071
6	0.073	0.097	0.085	0.081
7	0.098	0.127	0.107	0.110
8	0.114	0.118	0.101	0.107
9	0.067	0.086	0.094	0.083
10	0.094	0.101	0.100	0.088

O ensaio 6, que produziu a maior quantidade de amilase, apresentou biomassa com concentração igual a 0,0968 g/mL. Em contrapartida, o ensaio 1 com 24 horas de fermentação e menor produção amilolítica, teve concentração de biomassa igual a 0,103 g/mL. Assim, não

houve relação direta entre a quantidade de biomassa no final da fermentação e a produção amilolítica.

Essa relação não foi observada pois a produção de biomassa não indica que o microrganismo gerado secretará apenas a enzima de interesse, nesse caso a amilase. Outros compostos presentes na mistura podem favorecer a produção de outros complexos enzimáticos. Carvalho (2014), em seus estudos da produção de pectinametilesterase e poligalacturonase, deixa evidente a necessidade de se purificar extratos enzimáticos para obtenção da enzima de interesse uma vez que o elevado crescimento microbiano pode gerar produtos secundários.

Variação do pH

O gráfico 1 mostra a variação do pH de acordo com o tempo para cada ensaio.

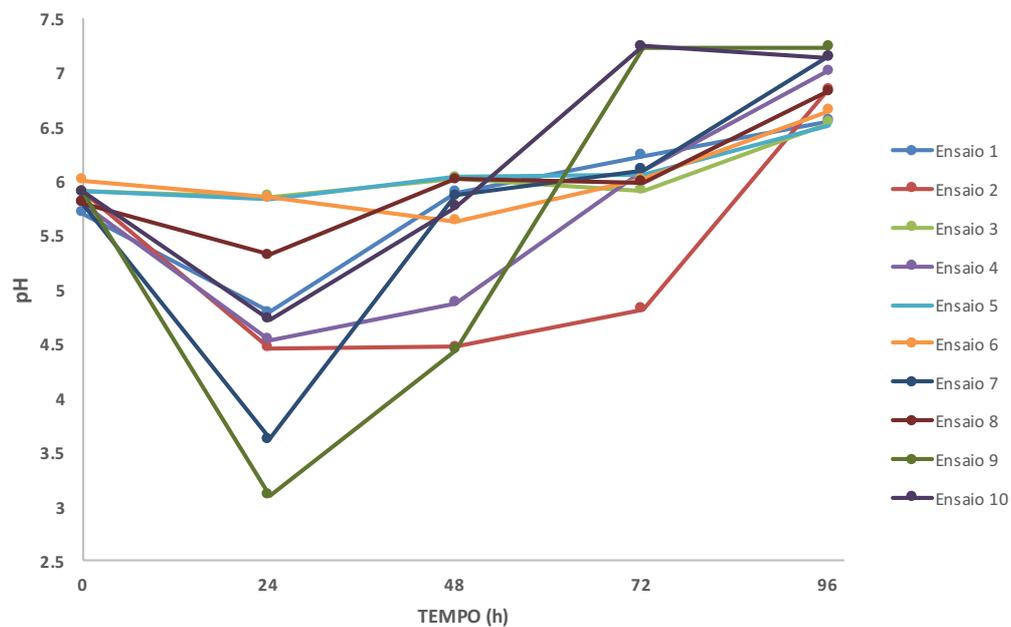


Gráfico 1. Variação do pH de acordo com o tempo para os ensaios fermentativos a partir do fungo *A. oryzae*.

Após 24h de processo fermentativo observou-se a redução dos valores de pH. Nos tempos de 48h até 72h, nota-se que os valores pH crescem até chegarem próximo a neutralidade após 96h.

Chancharoonpong *et al.* (2012) mostrou que ao inocular este microrganismo o pH se comportou de maneira similar, diminuindo nas primeiras horas, aumentando 36h após o início do processo fermentativo aumentou e alcançando valores próximo a neutralidade no final da fermentação.

Os meios com pH que tendem a neutralidade foram aqueles onde ocorreram a maior atividade amilolítica dentro de cada intervalo de tempo. No tempo de 24 horas, o ensaio 5 contendo 66,66% de borra e 33,33% de endocarpo apresentou pH igual a 5,83. Após 48 horas o maior pH foi observado também no ensaio 5, o ensaio com produção igual a 6,974 U, a segunda maior dentro desse intervalo.

No intervalo de 72 h , o ensaio 1 contendo 100% de endocarpo apresentou pH igual a 6,23, acompanhando também a maior produção de amilase dentro desse tempo de fermentação. Em adição, o pH do ensaio com maior produtividade dentro do intervalo de 96h, ensaio 6, alcançou valor igual a 6,64. Assim, notou-se que as maiores produções em cada intervalo de tempo no processo fermentativo, ocorreram em pH na faixa de 5,83 a 6,64.

Sahnoun *et al.* (2015), afirma que a faixa ótima de pH para produção de amilase por *A. oryzae* se encontra entre 4,5 e 6. Produção de enzimas nessa faixa de pH tem sido bastante procuradas pelas indústrias, pois a maioria são produzidas em meios ácidos que torna o processo mais dispendioso (Cruz, *et al.*, 2011).

Produtividade

De forma geral, os ensaios que obtiveram maior produção foram aqueles submetidos a 48 horas de fermentação submersa. No entanto, avaliando a produtividade, produção por hora, os ensaios de 24 h foram os que apresentaram resultados, em média, mais satisfatórios. A produtividade média para os ensaio de 24h foi igual a $0,996 \text{ U/mL.h}^{-1}$ contra $0,738 \text{ U/mL.h}^{-1}$ para 48 h, $0,320 \text{ U/mL.h}^{-1}$ para 72 h e $0,33 \text{ U/mL.h}^{-1}$ para 96 h.

Portanto, as análises estatísticas da influência da mistura do substrato irá se deter a aquela que possui maior apelo industrial, ou seja, maior produtividade.

Influência da composição do substrato na produtividade

A Figura 1 mostra o gráfico ternário para produção de amilase com 24 horas de fermentação. Observando as alterações de perfil na produção de amilase frente a diferentes formulações de substrato.

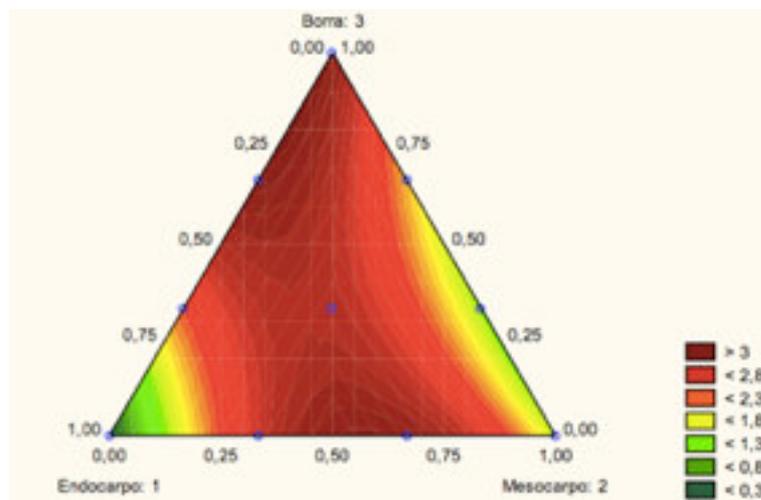


Figura 1. Gráfico ternário para composição ideal de substrato para produção de α amilase

A relação da atividade amilolítica a partir de diferentes subprodutos da produção de óleo babaçu é representada no gráfico ternário. Cada componente da mistura pura é representada em um canto do triângulo equilátero. Assim, cada ponto dentro do triângulo, corresponde

a uma fração diferente dos componentes na mistura. O centro do triângulo por sua vez, corresponde a proporções iguais da mistura (Martinello et al., 2006; Lobanova et al., 2016).

As zonas de máxima variável de resposta tendem para o lado do triângulo que possui mistura de endocarpo e borra e de endocarpo e mesocarpo como substratos. Este lado mostra atividade amilolítica acima de 3 U/mL.

Como evidenciado na Tabela 3, a equação de regressão prevista representa o modelo com os substratos significativos para a produção de amilase em 24 h de fermentação. Todas as variáveis respostas independentes foram adequadas ao modelo cúbico especial (Rheiner et al., 2016; Kurosawa; Hubinger e Park, 2009).

Tabela 3. Análise de Variância (ANOVA), modelo, R² para a produção de amilase em 24h de fermentação

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F	R	p- value
Regressão	9,32251	6	1,553752	2,079596	0,81	<0,09
Residual	2,24142	3	0,747141			
Total	11,56393	9	1,284841			

Modelo cúbico: Atividade de amilase= $0,24x_1+1,68x_2+3,32x_3+9,40x_1.x_2+4,75x_1.x-3,37x_2.x_3+2,06x_1.x_2.x_3$, onde x_1 = endocarpo, x_2 = mesocarpo e x_3 = borra

Os coeficientes de determinação R² e F test (ANOVA) foram utilizados para verificar a significância do modelo.

O valor de R² se encontra menor que 0,9. O valor de 0,81 encontrado nesta análise, não se encontra na faixa ideal, mas ainda assim é significativo e pode ser usado para prever a produção de amilase a partir da mistura desses substratos.

De acordo com o modelo cúbico especial, notou-se que a borra e o endocarpo quando comparados individualmente são os substratos que possuem maior impacto dentro da produção de amilase. Pode-se afirmar também que as interações entre endocarpo e mesocarpo e

borra e endocarpo acontecem de forma positiva. Desta forma, o endocarpo e o mesocarpo são os subprodutos que melhor impacta a produção de amilase.

CONCLUSÃO

O ensaio que apresentou maior atividade amilolítica foi o ensaio 6, após 48 horas de processo ,contendo 66,66% de borra e 33,33% de mesocarpo. Pode-se perceber que os ensaios que tiveram maior produção de amilase foram os que não possuíam em sua composição o amido como maior constituinte.

Notou-se também que a concentração de biomassa gerada não apresentou relação direta com atividade amilolítica, uma vez que a maior concentração de biomassa foi no ensaio com menor produção de amilase, sendo o contrário verdadeiro.

Em contrapartida, percebeu-se que existe uma relação entre o pH final da mistura e a produção da enzima, uma vez que, de forma geral, as maiores produções enzimáticas ocorreram em pH próximo da neutralidade .

Verificou-se que os meios que possuíam mistura de endocarpo e borra e de endocarpo e mesocarpo eram os meios ideais para o processo fermentativo, sendo a borra o substrato que possui maior impacto dentro da produção de amilase.

Por fim, pode-se concluir que apesar da maior produção ser encontrada após 48 h, o processo fermentativo de 24 h é mais produtivo e por isso deve ser estudado mais afundo já que ele garante produtividade em menor tempo diminuindo gastos de energia e consequentemente custos do processo.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, M. A. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2): 364-368, 2007.
- CARRAZZA, L. R.; ÁVILA, J. C. C; SILVA, M. L. Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto e da Folha do Babaçu (*Attalea* spp.). Brasília - DF: Editora Instituto Sociedade, População e Natureza (ISNP), 2012. 68p.
- CARVALHO, S. Pectinases produzidas pelo agente biológico 'G088': extração e purificação. 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 19(1): 33-42, 2001.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, M. A.; RIBEIRO, B.D. *Tecnologia Enzimática*, Rio de Janeiro: Editora EBUP, 2008. 288 p.
- CRUZ, E. A. et al. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. *Journal of Health Sciences*, 13(4): 245-249, 2011.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF UNITED STATES. Food Loss and Food Waste. Statistics. United States of America, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/en/?width=921.6&height=921.6>>. Acessado em: 15 de Agosto de 2016.
- GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599-1616, 2003.

KUROZAWA, L. E.; HUBINGER, M. D.; PARK, K. J. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(3): 557-566, 2009.

LEHNINGER, A. L.; MICHAEL, C. *Bioquímica: Princípios de bioquímica*. São Paulo: Editora Sarvier, 2006. 1202 p.

LOBANOVA, O. SAFT- γ force field for the simulation of molecular fluids 6: Binary and ternary mixtures comprising water, carbon dioxide, and n-alkanes. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 93: 320-336, 2016.

MARKET E MARKET. *Enzymes Market. Top Markets Report*. United State of America, 2016. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/food-enzymes-market-800.html>>. Acessado em : 15 de Agosto de 2016

MARQUES, S. J. P.; CUNHA, M. E. T. Produção de Álcool Combustível Utilizando Milho. *UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas*, 7(1): 45-51, 2008.

MARTINELLO, T. et al. Optimization of poorly compactable drug tablets manufactured by direct compression using the mixture experimental design. *International Journey of Pharmacy*. 322: 87-95, 2006.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65: 28-41, 2014.

SAHNOUN, M. et al. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 7: 73-80, 2015.

RHEINER, C. O. et al. Produção de Lipases Com atividade de hidrólise Por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol. *Ciências Exatas e Naturais*, 18(1): 98-115, 2016.

SILVA, M. B. et al. Isolamento de microrganismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. *Scientia Plena*, 12(5), 2016

ANEXO I

INSTRUÇÕES AOS AUTORES- REVISTA CIÊNCIA E AGROTECNOLOGIA

Escopo e política

A publicação de artigos dependerá da observância das Normas Editoriais, dos pareceres do Corpo Editorial e da Comissão *ad hoc*. Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e tanto os autores quanto os membros do Corpo Editorial e/ou Comissão *ad hoc* não obtêm informações identificadoras entre si.

Forma de preparação dos manuscritos

1. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos são de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

2. A *Ciência e Agrotecnologia* é uma revista científica, editada bimestralmente pela Editora da Universidade Federal de Lavras (Editora UFLA). Publica artigos científicos elaborados por membros da comunidade científica nacional e internacional, nas áreas de Ciências Agrárias, Zootecnia e Medicina Veterinária, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Economia e Administração do Agronegócio e Engenharia Rural. É condição fundamental que os artigos submetidos não tenham sido e nem serão publicados simultaneamente em outro periódico. Com a aceitação do artigo para publicação, a revista adquire amplos e exclusivos direitos sobre o artigo para todas as línguas e países.

3. Processo para publicação de artigos: O artigo é inicialmente avaliado pelo Conselho Editorial quanto à relevância, comparativa a outros artigos da área de conhecimento submetidos para publicação. Apresentando relevância comparativa, o artigo é avaliado por consultores 'ad hoc' para emitirem seus pareceres. Aprovado por consultores, caso necessário, o artigo é enviado ao autor correspondente para atendimento das correções e/ou sugestões. Caso as correções não sejam retornadas no prazo solicitado, a tramitação do artigo será

automaticamente cancelada. O não atendimento às solicitações dos consultores sem justificativas também leva ao cancelamento automático do processo de publicação do artigo. Após a aprovação das correções, o artigo é revisto quanto à nomenclatura científica, inglês, referências bibliográficas e português (resumo), sendo a seguir encaminhado para diagramação e publicação.

4. Custo para publicação: O custo da publicação é de R\$60,00 (sessenta reais) por página editorada (página impressa no formato final) até seis páginas e R\$120,00 (cento e vinte reais) por página adicional. No encaminhamento inicial, deve-se efetuar o pagamento de R\$120,00 (cento e vinte reais), não reembolsável, valor esse a ser descontado no custo final do artigo editorado (formato final). Por ocasião da submissão, deverá ser encaminhado o comprovante de depósito ou transferência bancária a favor de Fundecc/Livraria, Banco do Brasil, agência 0364-6, conta corrente 75.353-X. O comprovante de depósito ou de transferência bancária deve ser anexado no campo "File Upload".

5. O artigo deverá ser encaminhado via eletrônica (www.editora.ufla.br), editados em língua inglesa e deve-se usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas. O artigo deverá ser digitado no processador de texto Microsoft Word para Windows, tamanho A4 (21cm x 29,7cm), espaço duplo entre linhas, fonte: Times New Roman, tamanho 12, observada uma margem de 2,5 cm para o lado esquerdo e de 2,5 cm para o direito, 2,5 cm para margem superior e inferior, 2,5 cm para o cabeçalho e 2,5 cm para o rodapé. Cada artigo deverá ter no máximo 25 páginas e junto do mesmo deverá ser encaminhado ofício dirigido ao Editor Chefe, solicitando a publicação. Esse ofício deverá ser assinado por todos os autores, constando nome dos autores sem abreviação, a titulação e o endereço profissional completo (rua, nº, bairro, caixa postal, cep, cidade, estado, país e e-mail). Ao submeter o artigo, esse ofício deverá ser anexado no campo "Cover Letter". Qualquer futura inclusão,

exclusão ou alteração na ordem dos autores deverá ser notificada mediante ofício assinado por todos os autores (inclusive do autor excluído, se o caso).

6. O artigo deverá conter os seguintes tópicos: a) Título (em letras maiúsculas) em inglês e português, escrito de maneira clara, concisa e completa, sem abreviaturas e palavras supérfluas. Recomenda-se começar pelo termo que represente o aspecto mais importante do trabalho, com os demais termos em ordem decrescente de importância; b) NOME(S) DO(S) AUTOR(ES) listado(s) no lado direito, um abaixo do outro, sendo no máximo 6 (seis); c) ABSTRACT não deve ultrapassar 250 (duzentos e cinquenta) palavras e estar em um único parágrafo. Deve conter pelo menos, breve introdução, objetivo(s) e resultados mais importantes; d) INDEX TERMS contendo entre 3 (três) e 5 (cinco) palavras-chave em inglês que identifiquem o conteúdo do artigo, diferentes daquelas constantes no título e separadas por vírgula; e) RESUMO (versão em português do abstract); f) TERMOS PARA INDEXAÇÃO (versão em português dos index terms); g) INTRODUCTION (incluindo a revisão de literatura e objetivo); h) MATERIAL AND METHODS; i) RESULTS AND DISCUSSION (podendo conter tabelas e figuras); j) CONCLUSION(S); k) ACKNOWLEDGEMENT(S) (opcional) com estilo sério e claro, indicando as razões dos agradecimentos; l) REFERENCES (sem citações de teses, dissertações e/ou resumos de congressos e de outros eventos).

7. RODAPÉ: Deve constar formação, instituição de vínculo empregatício, contendo endereço profissional completo (rua, número, bairro, Cx. P., CEP, cidade, estado, país e e-mail) do autor correspondente. Os demais autores devem informar o endereço profissional, cidade, estado e país.

8. TABELAS: Deverão ser providas de um título claro e conciso e construídas de modo a serem auto-explicativas. Não deverão usar linhas verticais. As linhas verticais devem aparecer para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma ao final da tabela. A tabela

deve ser feita utilizando-se Microsoft Word (TABELA/INSERIR TABELA), no qual cada valor deve ser inserido em células distintas, estando centralizado e alinhado.

9. Caso o artigo contenha fotografias, gráficos, figuras, símbolos e fórmulas, essas deverão obedecer às seguintes normas:

Observação: Além de inseridas, no texto após a citação, foto, figura e gráficos deverão ser enviados em arquivos separados anexados no campo "manuscript files".

9.1 Fotografias podem ser coloridas ou em preto e branco, nítidas e com contraste, inseridas no texto, após a citação das mesmas salvas em extensão "TIFF" ou "JPEG" com resolução de 300 dpi. Na versão impressa da revista, as fotografias sairão em preto e branco.

9.2 Figuras podem ser coloridas ou em preto e branco, nítidas e com contraste, inseridas no texto, após a citação das mesmas, salvas em extensão "TIFF" ou "JPEG" com resolução de 300 dpi. As figuras deverão ser elaboradas com letra Times New Roman, tamanho 10, sem negrito, sem caixa de textos e agrupadas. Na versão impressa da revista, as figuras sairão em preto e branco.

9.3 Gráficos deverão ser inseridos no texto após a citação dos mesmos. Esses deverão ser elaborados preferencialmente em Excel, com letra Times New Roman, tamanho 10, sem negrito, salvos em extensão XLS e transformados em TIFF ou JPG, com resolução de 300 dpi.

9.4 Símbolos e Fórmulas Químicas deverão ser feitos em processador que possibilite a formatação para o programa Adobe InDesign CS6 (ex: MathType), sem perda de suas formas originais.

10. CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO CORPO DO TEXTO: PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA)

Dois autores: Silva and Leão (2014).

Três autores: Silva, Pazeto and Vieira, (2013).

Mais de três autores: Ribeiro et al. (2014).

Obs.: Quando dois autores de uma mesma obra forem citados na sentença, deve-se separá-los por (and), se não incluídos na sentença separá-los por ponto e vírgula (;). Se houver mais de uma citação no mesmo texto, deve-se apresentar os autores em ordem alfabética dos sobrenomes, seguidos pela data e separados por ponto e vírgula (;), por exemplo: Araújo (2010); Nunes Junior (2011); Pereira (2012) and Souza (2013).

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo. Orientações gerais: O nome do periódico deve ser descrito por extenso e em negrito. Em todas as referências deve-se apresentar volume, número entre parênteses, página inicial e final e ano de publicação.

As referências devem ser ordenadas alfabeticamente e "alinhadas à margem esquerda". Deve-se deixar espaçamento simples nas entrelinhas e duplo entre as referências.

EXEMPLIFICAÇÃO (TIPOS MAIS COMUNS):

ARTIGO DE PERIÓDICO:

Até três autores:

PINHEIRO, A. C. M.; NUNES, C. A.; VIETORIS, V. Sensomaker: a tool for sensorial characterization of food products. **Ciência e Agrotecnologia**, 37(3):199-201, 2013.

-Mais de três autores:

MENEZES, M. D. de et al. Digital soil mapping approach based on fuzzy logic and field expert knowledge. **Ciência e Agrotecnologia**, 37(4):287-298, 2013.

LIVRO:

a) Livro no todo:

FERREIRA, D.F. **Estatística multivariada**. Lavras: Editora UFLA, 2008. 672p.

b) Capítulo de livro com autoria específica:

BERGEN, W.G.; MERKEL, R.A. Protein accretion. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Growth regulation in farm animals**: advances in meat research. London: Elsevier Science, 1991. v.7, p.169-202.

c) Capítulo de livro sem autoria específica:

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido muscular. In: _____. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

DISSERTAÇÃO E TESE:

Não utilizar citações de dissertações e teses.

TRABALHOS DE CONGRESSO E de OUTROS EVENTOS:

Não utilizar citações de trabalhos de congressos e de outros eventos.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

As obras publicadas somente *online* são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento, acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão "Available in:" e da data de acesso ao documento, precedida da expressão "Access in:". Nota: "Não se deve referenciar material eletrônico de curta duração, na internet. Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

a) Livro no todo

TAKAHASHI, T. (Coord.). **Tecnologia em foco**. Brasília, DF: Socinfo/MCT, 2000.

Available in: <<http://www.socinfo.org.br>>. Access in: August, 22, 2000.

b) Parte de livro

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: _____. **Sociedade da informação no Brasil**: livro verde. Brasília, DF: Socinfo/MCT, 2000. cap.2. Available in: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Access in: August, 22, 2000.

c) Artigo de periódico (acesso online):

AVELAR, A.E.de; REZENDE, D.C.de. Hábitos alimentares fora do lar: um estudo de caso em Lavras MG. **Organizações Rurais & Agroindustriais**. 15(1):137-152, 2013. Available in: <<http://revista.dae.ufla.br/index.php/ora/article/view/652>> Access in: August, 18, 2014.