



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JANAINA MARIA MARTINS VIEIRA

MACERAÇÃO ENZIMÁTICA DE PELÍCULA COMESTÍVEL DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) PARA A EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES

FORTALEZA

2010

JANAINA MARIA MARTINS VIEIRA

MACERAÇÃO ENZIMÁTICA DE PELÍCULA COMESTÍVEL DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) PARA A EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.

FORTALEZA

2010

V715m Vieira, Janaína Maria Martins

Maceração enzimática de película comestível de cajá (*Spondias mombin* L.) para a extração de carotenóides / Janaína Maria Martins Vieira, 2010.

65 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2010.

JANAINA MARIA MARTINS VIEIRA

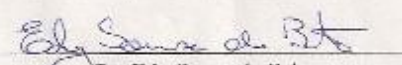
MACERAÇÃO ENZIMÁTICA DE PELÍCULA COMESTÍVEL DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) PARA A EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES


Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração em Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 24/02/2010.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Orientador)
EMBRAPA Agroindústria Tropical - CE


Dr. Edy Sousa de Brito
EMBRAPA Agroindústria Tropical - CE


Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Universidade Federal de Campina Grande/UFCG - PB

A Deus e aos meus pais
Itamar e Margaret, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir estar aqui.

A Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realizar a graduação em Engenharia de Alimentos e o mestrado em Engenharia Química.

A Embrapa Agroindústria Tropical, pela oportunidade de realização da parte experimental deste trabalho nas dependências do Laboratório de Bioprocessos.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período do mestrado.

Ao orientador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, por ter me amparado e acreditado em mim, além de ter dado o presente de me orientar e sempre me guiar durante todo o mestrado.

Ao pesquisador Dr. Edy Sousa de Brito, pela participação e ensinamentos ofertados durante todo o trabalho.

Ao professor Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva pela participação, apoio e orientação principalmente na estatística deste trabalho.

À professora Andréa pela participação e colaboração dada a este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação do Departamento de Engenharia Química pela convivência, paciência e ricos ensinamentos.

À Maria, secretária da coordenação da Pós-graduação, pelo convívio, amizade, risadas e lições que tornavam o trabalho mais alegre.

À professora Maria do Carmo pela amizade, oportunidade e lição de vida durante grande parte da minha graduação e até os dias atuais.

Aos meus amigos da graduação Carlos Eliardo, Bruna Rabelo, Carla Couto, Ilane Ximenes e Marina Rebouças pelo apoio, companheirismo, horas de conselhos, almoços e muitos momentos de descontração.

Às amigas Juliana Vidal, Herlene Greyce e Rachel Sales por muitos ensinamentos e pela força para que eu chegasse ao mestrado.

À minha turminha de mestrado Tatiane Nunes, Cleiton, Francisca Maria, Jéfferson Malveira e Milena Maria pelos vários momentos de descontração, perturbação e ensinamentos. Em especial, agradeço ao amigo Jéfferson não só pela amizade, mas também por grande ajuda, paciência, compreensão e esclarecimentos de dúvidas durante o mestrado.

Aos amigos de mestrado e professores Kerolaine e Assis por toda a ajuda oferecida durante o semestre mais cruel do mestrado. Sem a humildade e conhecimentos que vocês me ofereceram eu não estaria concluindo esta etapa.

A todos do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical que estiveram ao meu lado nas etapas mais importantes deste trabalho. Agradeço em especial a Adriana Crispim, Virna Luiza, Andréa Cardoso, Cyntia Ladyane, Ruann Janser, Renata Débora e Rosa Abreu.

Às amigas e praticamente irmãs de coração Bruna Honorato e Karine Macedo, pelo convívio, amizade, aprendizado, “clubes da luluzinha”, carnavais, farras, forrós, pagodes, participação e conselhos em todos os momentos que precisei.

Aos meus pais, Itamar e Margaret, por sempre pensarem em mim antes de pensar em si mesmos. Por terem renunciado de muitas coisas e momentos para que eu realizasse esta etapa tão importante para mim e para minha vida. Muito obrigada por terem acreditado em mim, sem vocês eu nada seria.

À minha irmã Marieta, pelos conselhos, pelas brigas, discussões, crises existenciais, farras e por me guiar sempre pensando no melhor para mim, tudo isto serviu e foi de muito aprendizado e colaboração para hoje eu estar realizando mais um sonho.

À minha irmã Luciana, e minhas queridas sobrinhas Ana Letícia e Lavínia pela compreensão, descontração, momentos de alegrias que me deixaram mais tranquila para percorrer o mestrado.

À tia Marta, por simplesmente existir e sempre estar disponível a ajudar sem medir esforços.

Ao Edinaldo, por na época em que foi apenas meu amigo ter acreditado no que eu queria para minha vida e ter dado toda a força para que eu acreditasse no meu potencial. E hoje, obrigada por todo o amor, paciência (e que paciência), por me escutar e durante nosso convívio ainda me aconselhar sempre procurando me ajudar. Obrigada por tudo que tem feito.

A todos da minha família pela ajuda e força durante esta importante etapa da minha vida.

Aos que participaram de alguma forma e me ajudaram em mais esta etapa, obrigada.

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial no setor de fruticultura. A Região Nordeste se destaca devido ao sabor e aroma exótico de seus frutos e à sua enorme diversidade. Porém, partes dessas frutas, além de perecíveis, são sazonais e daí a necessidade de se buscar alternativas técnicas e econômicas para o aproveitamento do excedente de produção, possibilitando o seu consumo e exportação durante todo o ano. O aumento da produção gera uma preocupação em relação aos impactos ambientais provocados nos ecossistemas naturais. Os problemas relacionados a geração de resíduos sólidos, e sua implicação na saúde, meio ambiente e qualidade de vida, tem se agravado nas últimas décadas principalmente pela falta de políticas institucionais para o setor. Um forte exemplo dentre estas frutas, é o fruto da cajazeira (*Spondias mombin* L.), que no Brasil é encontrada principalmente nos estados do Norte e Nordeste. As frutas e outros vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido bem comprovadas nos últimos anos. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, antiocianinas, além dos já conhecidos; vitaminas C, E e A contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos. A presença de carotenóides no cajá, e principalmente em seus resíduos, possibilitou sua utilização para extrair carotenóides de sua película através da maceração enzimática. Inicialmente realizou-se a caracterização química da película e posteriormente a caracterização dos complexos enzimáticos a serem utilizados. Para a maceração foram realizadas análises preliminares como: avaliação da razão polpa:água, quantidade de enzima a ser adicionada e determinação do melhor complexo enzimático a ser utilizado. Avaliou-se também a necessidade de trituração da película comestível de cajá. Na extração de carotenóides por hidrólise enzimática, realizou-se um planejamento fatorial fracionário $2^{(k-1)}$ com um ponto central, onde se variou fatores como quantidade de enzima, temperatura de maceração e tempo de maceração. Verificou-se que a película comestível de cajá apresenta caracterização físico-química mais rica em termos de proteína e lipídios que a polpa de cajá. As preparações enzimáticas apresentaram atividades pectinolíticas, xilanolíticas, amilolíticas e celulolíticas. A razão polpa:água adequada para a maceração de película foi de 1:4, assim como o tempo de trituração mais eficiente foi de 30s. A preparação enzimática Pectinex XXL mostrou-se mais eficiente na maceração da película comestível de cajá, provavelmente devido ao seu maior conteúdo de pectinoliase. É possível extrair carotenóides de película comestível de cajá através de hidrólise enzimática utilizando meio aquoso. A condição de melhor recuperação de carotenóides utilizou 150 μ L do complexo enzimático, 3h de maceração a uma temperatura de 35°C.

Palavras-chave: Cajá, maceração enzimática, carotenóides.

ABSTRACT

Brazil is third largest producer in sector of fruit production. Northeast stands out due to flavor and aroma of exotic fruit and its enormous diversity. However, parts of fruit, and perishable, are seasonal, hence need to seek technical and economic alternatives to use of surplus production, allowing for consumption and export throughout the year. The increase in production creates a concern about environmental impacts caused to natural ecosystems. The problems related to solid waste generation, and its effect on health, environment and quality of life has worsened in recent decades due to lack of institutional policies for sector. A strong example of how these fruits is fruit of hog plum tree (*Spondias mombin* L.), which in Brazil is found mainly in North and Northeast. Other fruits and vegetables contain different antioxidants, whose activities have been well documented in recent years. Presence of phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acids, antiocianinas, besides those already known, vitamins C, E and A contribute to beneficial effects of these foods. Presence of carotenoids in the yellow mombin, and especially in its waste, allowed its use for extracting carotenoids from their pellicle by enzyme maceration. Initially this was done to establish the composition of pellicle and then characterization of enzymatic complexes to be used. For maceration were conducted as preliminary analysis: evaluation of pulp reason: water, amount of enzyme to be added and determine the best enzyme complex to be used. We also evaluate the need for grinding yellow mombin edible pellicle. In the extraction of carotenoids by enzymatic hydrolysis, there was a fractional factorial design $2^{(k-1)}$ with central point, which varied factors as amount of enzyme, maceration temperature and maceration time. It was found that yellow mombin edible pellicle presents physical-chemical richer in terms of protein and lipids that the yellow mombin. Enzyme preparations showed pectinolytic activities, xylan, amylolytic and cellulolytic. Reason pulp: water suitable for soaking pellicle was 1:4, and time crunch was more efficient 30s. Enzyme preparation Pectinex XXL was more efficient in maceration of yellow mombin edible pellicle, probably due to their higher content of pectinoliase. It is possible to extract carotenoids from yellow mombin edible pellicle by enzymatic hydrolysis using aqueous medium. The condition of better recovery of carotenoids used 150 μ L of enzyme complex, 3h liquors at a temperature of 35 °C.

Keywords: Yellow mombin, enzyme maceration, carotenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fruto da cajazeira (A) e fruto em corte transversal (B).-----	6
Figura 2 – Estrutura de alguns carotenóides.-----	8
Figura 3 – Estrutura da parede celular vegetal. -----	11
Figura 4 – Estrutura molecular da pectina. -----	12
Figura 5 – Modo de ação das pectinesterases. -----	14
Figura 6 – Modo de ação da poligalacturonase. -----	15
Figura 7 – Modo de ação das liases.-----	16
Figura 8 - Fluxograma de obtenção da película comestível de cajá. Cajás congelados (A), cajás descongelados prontos para o processamento (B), despoldadeira utilizada no processamento (C) e tanque de separação de resíduos (D).-----	18
Figura 9 – Tratamento enzimático da película comestível integral de cajá utilizando 1000µL de Biopectinase CCM com 25 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C). 33	33
Figura 10 – Tratamento enzimático da película comestível integral de cajá utilizando 1000µL de Biopectinase CCM com 50mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2 (B) E 3h(C). 33	33
Figura 11 – Tratamento enzimático da película comestível integral de cajá utilizando 1000µL de Biopectinase CCM com 100 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).33	33
Figura 12 – Tratamento enzimático da película comestível triturada de cajá utilizando 1000µL de Pectinex Ultra SP-L com 25 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).39	39
Figura 13 – Tratamento enzimático da película comestível triturada de cajá utilizando 1000µL de Pectinex Ultra SP-L com 50 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).39	39
Figura 14 – Tratamento enzimático da película comestível triturada de cajá utilizando 1000µL de Pectinex Ultra SP-L com 100 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C). -----	39
Figura 15 – Trituração da película comestível de cajá nos tempos 0 (A), 30 (B), 60 (C), 90 (D) e 120s (E).-----	40
Figura 16 - Diagramas de Pareto para as variáveis dependentes sólidos solúveis totais (A), grupos redutores totais (B), resíduo seco (C) e teor de carotenóides (D). -----	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala para as características de avaliação visual.-----	19
Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} com ponto central. -----	22
Tabela 3 – Valores de cada nível do planejamento experimental. -----	22
Tabela 4 – Caracterização da película comestível de cajá em base seca. -----	30
Tabela 5 – Atividade enzimática das preparações comerciais. -----	31
Tabela 6 – Concentração de grupos redutores totais utilizando Pectinex Ultra SP-L nas amostras controle, adição de 10, 100 e 1000 μ L. -----	35
Tabela 7 – Concentração de grupos redutores totais utilizando 10 μ L de 6 complexos enzimáticos comerciais distintos em maceração de 1h. -----	36
Tabela 8 – Concentração de grupos redutores totais para maceração enzimática utilizando película integral e o complexo Pectinex XXL. -----	37
Tabela 9 – Concentração de grupos redutores totais nos tempos de trituração.-----	41
Tabela 10 –Média do teor de caroteóides dos experimentos na fase líquida. -----	44
Tabela 11 - Média do teor de carotenóides dos experimentos na fase sólida.-----	45

SUMÁRIO

RESUMO -----	ix
ABSTRACT -----	x
LISTA DE FIGURAS -----	xi
LISTA DE TABELAS -----	xii
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. OBJETIVOS -----	4
2.1. Objetivo Geral -----	4
2.2. Objetivos Específicos -----	4
3. REVISÃO DE LITERATURA -----	5
3.1. O cajá -----	5
3.2. Carotenóides -----	6
3.3. Parede celular -----	10
3.4. Pectina -----	12
3.5. Enzimas pectinolíticas -----	13
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	17
4.1. Obtenção da película comestível de cajá -----	17
4.2. Caracterização da película comestível de cajá -----	18
4.3. Definições das condições de maceração enzimática -----	18
4.3.1. Avaliação inicial da razão película:água -----	19
4.3.2. Avaliação da quantidade de enzima a ser utilizada -----	20
4.3.3. Avaliação do complexo enzimático a ser utilizado -----	20
4.3.4. Efeito da trituração -----	21
4.4. Extração de carotenóides por hidrólise enzimática -----	21
4.5. Determinações analíticas -----	23
4.5.1. Resíduo seco -----	23
4.5.2. Cinzas -----	23

4.5.3. Extrato etéreo -----	23
4.5.4. Proteína -----	24
4.5.5. Carotenóides totais -----	24
4.5.6. Resíduo Insolúvel em Álcool -----	25
4.5.7. Determinação de grupos redutores totais -----	26
4.5.8. Caracterização das preparações enzimáticas comerciais -----	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES -----	30
5.1. Caracterização da película comestível de cajá -----	30
5.2. Caracterização das preparações enzimáticas comerciais -----	31
5.3. Condições de maceração enzimática -----	32
5.3.1. Razão película:água -----	32
5.3.2. Quantidade de enzima a ser utilizada -----	34
5.3.3. Complexo enzimático a ser utilizado -----	35
5.3.4. Efeito da trituração -----	38
5.4. Extração de carotenóides -----	41
5.4.1. Fase líquida -----	41
5.4.2. Fase sólida -----	45
6. CONCLUSÕES -----	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	48

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o agronegócio representa o segmento mais significativo de nossa economia, correspondendo a 34% do PIB nacional, gerando 37% dos empregos e sendo responsável por 42% das exportações brasileiras.

No setor de fruticultura, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, ficando apenas atrás da China e Índia. Contudo as exportações brasileiras de frutas é ainda muito incipiente diante da grandeza da produção. Por outro lado, no mercado interno, o consumidor está cada vez mais exigente em busca de produtos saudáveis e de qualidade (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A Região Nordeste possui clima predominantemente seco, porém bastante favorável ao cultivo de frutas típicas de clima tropical. Destaca-se como um grande produtor de frutos tropicais nativos e exóticos, em virtude das condições climáticas favoráveis. A produção e a conseqüente industrialização destas frutas vêm sendo um ponto forte na economia desta região (SANTOS e FERRAZ, 2009).

A fruticultura tropical, nesta região, constitui-se em atividade econômica potencial, devido ao sabor e aroma exótico de seus frutos e à sua enorme diversidade. O resultado desses esforços pode ser percebido pela elevação do Valor Bruto de Produção (VBP) de frutas na Região, que atingiu o patamar de R\$ 7,9 bilhões, para um total de R\$ 25,2 bilhões correspondentes ao setor agrícola, deixando o segmento com 31% do valor de toda a agricultura regional em 2008, ultrapassando até a pecuária (com R\$ 6,8 bilhões) (NETO, 2009; SILVA, 2008).

Partes dessas frutas, além de perecíveis, são sazonais e daí a necessidade de se buscar alternativas técnicas e econômicas para o aproveitamento do excedente de produção, possibilitando o seu consumo e exportação durante todo o ano. O aumento da produção gera uma preocupação em relação aos impactos ambientais provocados nos ecossistemas naturais. Os problemas relacionados a geração de resíduos sólidos, e sua implicação na saúde, meio ambiente e qualidade de vida, tem se agravado nas últimas décadas principalmente pela falta de políticas institucionais para o setor. A implantação de um sistema para reciclagem do resíduo sólido gerado pela indústria de processamento de frutas mostra-se pertinente, pois agrega valor econômico ao bagaço das frutas, além de reduzir os problemas ambientais decorrentes desta atividade industrial. Desta forma, o processamento de tal resíduo configura-

se como uma forma dinâmica de destinação deste material, promovendo a geração de empregos e renda para a população dessa região (SILVA, 2008).

Um forte exemplo dentre estas frutas exóticas, é o fruto da cajazeira (*Spondias mombin* L.), uma árvore frutífera da família *Anacardiaceae*, que se encontra dispersa nas regiões tropicais da América, África e Ásia. No Brasil, a cajazeira é encontrada principalmente nos estados do Norte e Nordeste e seus frutos são conhecidos como cajá, cajá verdadeiro, cajá-mirim ou taperebá. A cajazeira ainda não é cultivada em escala comercial, sendo considerada planta em domesticação e de exploração extrativa. Mesmo assim, tem participação crescente no agronegócio da região Nordeste, principalmente pela comercialização dos seus frutos para consumo como fruta fresca e processamento de polpa. O fruto é caracterizado como drupa de 3 a 6 cm de comprimento, ovóide ou oblongo, achatado na base, cor variando do amarelo ao alaranjado, casca fina, lisa pouco espessa também variando do amarelo ao alaranjado, suculenta de sabor ácido-adocicado (SACRAMENTO e SOUZA, 2000). Apresenta excelente sabor e aroma, além de rendimento acima de 60% em polpa, e por isso são amplamente utilizados na confecção de polpas, sucos, picolés, sorvetes, néctares e geléias de excelente qualidade e valor comercial.

Segundo Broinizi *et al.* (2007), as frutas e outros vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido bem comprovadas nos últimos anos. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, antiocianinas, além dos já conhecidos; vitaminas C, E e A contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos.

Os carotenóides são compostos lipossolúveis, poliisoprenóides que formam um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais encontrados na natureza e são insolúveis em meio aquoso. Embora as principais fontes dos carotenóides sejam as plantas, eles são também encontrados nos microrganismos e nos animais, sendo armazenados em diferentes tecidos. No entanto, o conteúdo de carotenóides nos frutos depende da espécie, variedade, safra e grau de maturação. A distribuição destes compostos também apresenta variações consideráveis, sendo geralmente mais concentrados na película do que na polpa de alguns frutos (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 1989).

Os carotenóides ocorrem invariavelmente nos cloroplastos de plantas superiores, ainda que neste tecido fotossintético sua cor esteja mascarada pela clorofila. Também são encontrados em algas, bactérias, fungos e leveduras. Estima-se que a natureza produza cerca de 100 milhões de toneladas de carotenóides por ano (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999b).

Rodriguez-Amaya e Kimura (1989) determinaram a composição de carotenóides e o valor de vitamina A do cajá, detectando e identificando 7 carotenóides. A polpa com casca

apresentou um conteúdo total de carotenóides de 25,8mg/g, o conteúdo total na polpa foi de 17mg/g. Em termos de vitamina A, a remoção da casca causa um decréscimo de aproximadamente 30% (187,3 para 135,0 RE¹/100g). Desta forma, estes autores sugerem que em termos nutricionais é melhor se consumir o cajá com a casca, que segundo Silva *et al.* (1997) também é chamada de película comestível.

A presença de carotenóides no cajá, e principalmente em seus resíduos, possibilitou sua utilização para extrair carotenóides de sua película através da maceração enzimática. A grande vantagem será a transformação de um resíduo sem utilização, sem valor comercial, que ainda apresenta custos para seu descarte e é potencialmente um causador de prejuízos ao meio ambiente. Podendo ser transformado em ingredientes para utilização e aproveitamento em outros ramos da indústria. Adicionalmente, o que é hoje um material de descarte, demandando custos para seu transporte até depósitos apropriados de lixo, poderá se transformar em mais uma fonte de receita para a empresa.

Desde a Antiguidade que os alimentos vêm sendo transformados por via biotecnológica. A biotecnologia em si, pode ser definida como a utilização de seres vivos viáveis, ou porções ativas deles, para a produção de bens e serviços. As enzimas são utilizadas na indústria alimentar para acelerar reações químicas específicas (LIMA e MOTA, 2003). Têm sido utilizadas pelo homem há vários séculos. A hidrólise de produtos com enzimas é um meio atraente de oferecer propriedades funcionais e nutricionais.

Entretanto, a partir das primeiras décadas do século XX que o desenvolvimento da tecnologia de enzimas se intensificou. A descoberta de novas enzimas integrantes das vias metabólicas, o aumento do conhecimento das propriedades das enzimas, a constatação de que quase todas as enzimas de interesse industrial podem ser produzidas por microrganismos e o crescimento no mercado de produção de enzimas, foram fatores responsáveis para a evolução da tecnologia enzimática. Na indústria de panificação, enzimas já são utilizadas como alternativa aos emulsificantes, firmando a massa e deixando o produto mais macio e flexível por mais tempo (NOVOZYMES, 2002). Na indústria cervejeira, as enzimas são adicionadas com auxiliares e oferecem a possibilidade de criação de novos tipos de cerveja ao aumentar o grau de fermentação. Em vinhos, as enzimas proporcionam a extração de mais cor e mais taninos (NOVOZYMES, 2005).

¹ RE = retinol equivalente

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar extração de carotenóides de película comestível de cajá utilizando maceração enzimática.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar em termos físico-químicos a película comestível de cajá;
- Caracterizar enzimaticamente as preparações comerciais enzimáticas a serem utilizadas;
- Avaliar a quantidade de água que deve ser adicionada a película de cajá que propicie a atividade da enzima;
- Determinar o complexo enzimático a ser utilizado, assim como a quantidade a ser utilizada;
- Avaliar a necessidade de trituração da película;
- Avaliar o efeito do complexo enzimático sobre a extração de carotenóides.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O cajá

A cajazeira tem como centro de origem a América Tropical, sendo também disseminada em quase todos os quadrantes do Brasil. Na Amazônia, é vulgarmente conhecida por taperebá; em São Paulo, Minas Gerais, por cajazeira miúda e cajá pequeno; nos Estados do Sul, por cajazeira ou cajá mirim e na maioria dos Estados do Nordeste, onde ocorre espontaneamente em condições silvestre competindo com outras espécies vegetais, ou em quintais, sítios e, até mesmo, na proteção e sombreamento do cacaueteiro, é simplesmente conhecido por cajá (BOSCO *et al.*, 2000).

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) pertence à família *Anacardiaceae* e ao gênero *Spondias*, o qual também inclui a siriguela (*Spondias purpurea* L.), a cajaraneira (*Spondias cytherea* Sonn.) e o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm). A cajazeira apresenta tronco ereto, casca acinzentada, rugosa, fendida e muito grossa, copa de forma capitata corimbiforme dominante que alcança até 30m de altura, sendo a árvore mais alta do gênero (SACRAMENTO e SOUZA, 2000).

A cajazeira ainda não é cultivada em escala comercial, e de exploração extrativa, sendo considerada planta em domesticação. Mesmo assim, tem participação crescente no agronegócio da região Nordeste, principalmente pela comercialização dos seus frutos para consumo como fruta fresca e para processamento de polpa. Desenvolve-se em clima úmido, subúmido, quente, temperado-quente, e resiste a longo período de seca. No Ceará, ocorre com maior frequência nas regiões de precipitação média anual superior a 1.100mm, ou seja, nas zonas litorâneas próximas a Fortaleza e nas Serras de Guaramiranga, Meruoca, Baturité e Ibiapaba (SACRAMENTO e SOUZA, 2000). A colheita do fruto compreende os meses de janeiro a maio (GLOBO RURAL, 2007).

O fruto é constituído de polpa, casca e semente (Figura 1), mas apenas a polpa assume posição de destaque no tocante ao aspecto comercial (BOSCO *et al.*, 2000). Os frutos possuem excelente sabor e aroma, além de rendimento de 60% em polpa, sendo amplamente utilizados na confecção de sucos, néctar, sorvetes, geléias, vinhos, licores. Devido a sua acidez, normalmente não é consumido ao natural. Na medicina popular e indústria farmacêutica é crescente a utilização da cajazeira. Existem relatos de que a casca da cajazeira

é aromática, adstringente e hemética, sendo utilizada em casos de febre biliosas e palustres, além de propriedades antidiarréica, antidesintérica, antiblenorrágica e anti-hemorroidária. As folhas são utilizadas interna e externamente, conforme os casos; são úteis contra febre biliosas, constipação do ventre, dores do estômago, complicações consecutivas aos partos e certas enfermidades dos olhos e da laringe (SACRAMENTO e SOUZA, 2000).

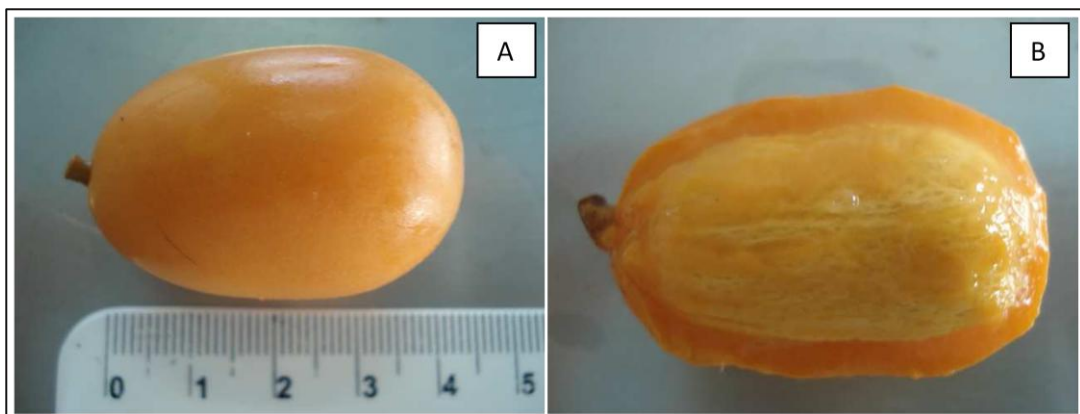


Figura 1 – Fruto da cajazeira (A) e fruto em corte transversal (B).
(Fonte: MOURA, 2009)

3.2. Carotenóides

Uma das principais teorias que explicam o poder curativo e preventivo dos alimentos baseia-se na presença de antioxidantes (CARVALHO *et al.*, 2006). Os carotenóides são exemplos de antioxidantes e hoje são de interesse de investigadores de diferentes áreas do conhecimento incluindo química, bioquímica, biologia, ciência e tecnologia de alimentos, medicina, farmácia e nutrição. Os carotenóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos, responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de frutas, raízes, flores, pescados, invertebrados e pássaros. Ocorrem invariavelmente nos cloroplastos de plantas superiores, ainda que neste tecido fotossintético, seja mascarado pela cor da clorofila. Também são encontrados em algas, bactérias e fungos. Rodriguez-Amaya (1999b) estimou que a natureza possa produzir aproximadamente 100 milhões de toneladas de carotenóides ao ano.

A estrutura básica dos carotenóides é um tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico e linear, formado a partir de oito unidades isoprenóides de 5 carbonos unidas de maneira tal que

a ordem se inverte no centro. Este esqueleto básico pode se modificar por hidrogenação, deshidrogenação, encurtamento ou extensão da cadeia, reordenação, entre outros, dando como resultado uma grande diversidade de estruturas. Foram encontrados e caracterizados mais de 600 carotenóides que ocorrem naturalmente. Os carotenóides hidrocarbonados se denominam coletivamente como carotenos e os que contêm oxigênio se denominam xantofilas. Podem ser acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. A ciclização ocorre em um, ou ambos, extremos da molécula, formando um ou dois anéis β , ou anéis ϵ (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999b).

A característica estrutural dos carotenóides (Figura 2) é um sistema extenso de ligações duplas conjugadas, no qual consiste em alternar ligações carbono-carbono simples e duplas. Esta parte da molécula é responsável pela capacidade dos carotenóides de absorverem luz na região visível, e em consequência sua grande capacidade de coloração. Requer-se pelo menos sete ligações duplas conjugadas para que um carotenóide produza a cor amarelo suave. A cor se acentua, a medida que o sistema conjugado se estende. A ciclização causa impedimento, por isso o β -caroteno e o ζ -caroteno são de cor laranja e vermelho-laranja respectivamente, ainda que tenham o mesmo número de ligações duplas conjugadas que o licopeno (onze), de cor vermelha. A intensidade e matiz das cores nos alimentos dependem de quais carotenóides estão presentes, suas concentrações e estado físico (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999b).

A importância dos carotenóides vai além do seu papel pigmentante, enquanto alguns são precursores de vitamina A, outros exibem ação antioxidante, sendo considerados compostos funcionais. Evidências epidemiológicas demonstram que dietas ricas em carotenóides encontram-se associadas à redução do risco de incidência de câncer e doenças cardiovasculares, bem como na proteção de membranas celulares e lipoproteínas contra danos oxidativos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

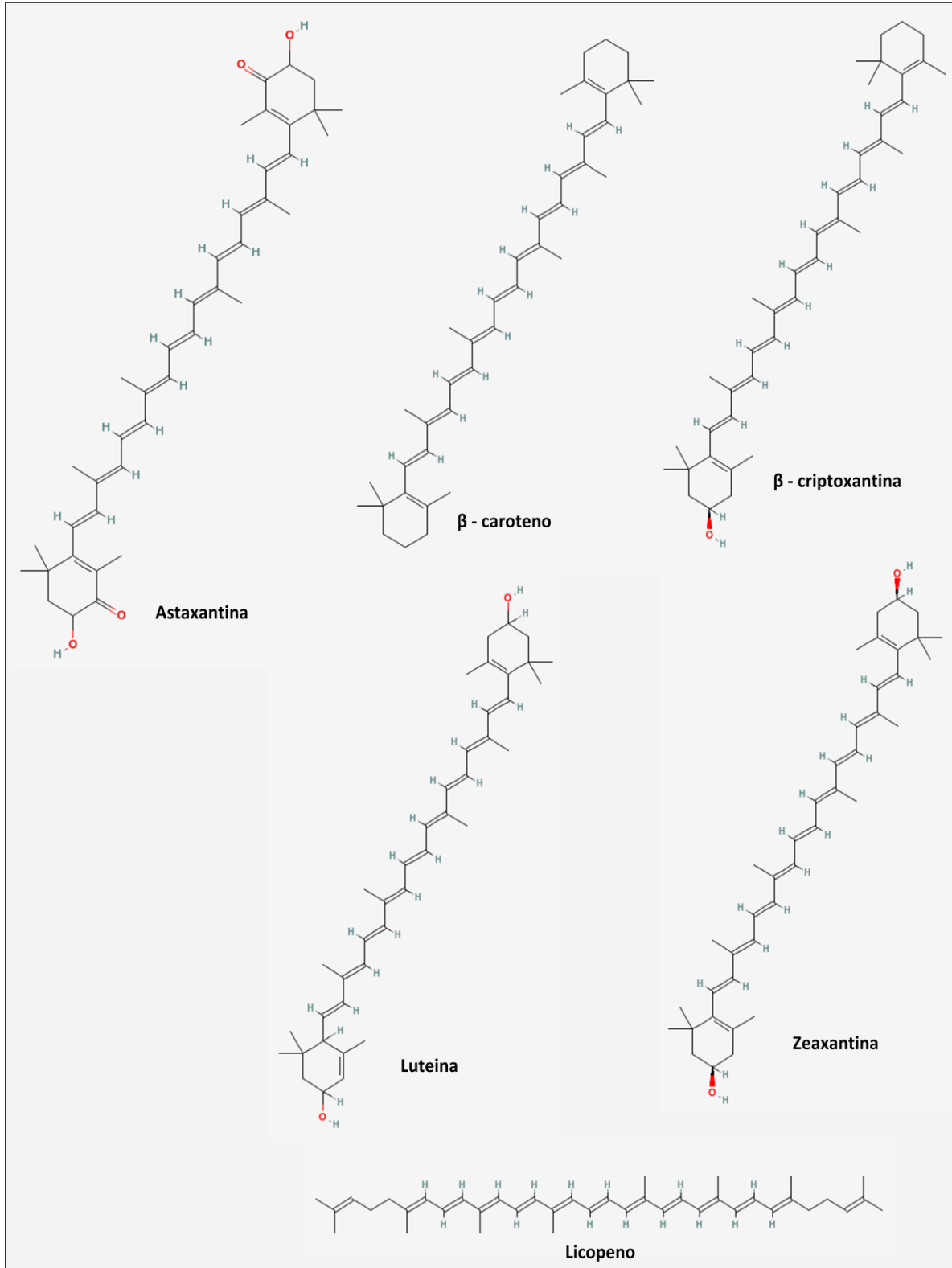


Figura 2 – Estrutura de alguns carotenóides.
(Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

As frutas em geral, têm baixos níveis de pró-vitamina A quando relacionadas a plantas com folhas, no entanto, são geralmente bem aceitas por crianças e adultos. Acredita-se que a pró-vitamina A das frutas são mais biodisponíveis (Rodriguez-Amaya, 1999b). Por causa da estrutura molecular de carotenóides e dos muitos fatores que afetam sua bioconversão em retinol, a atividade biológica de carotenóides em pró-vitamina A não é equivalente ao de retinol. Estudos relatam que 1 mg de retinol é equivalente a 12 mg de β -caroteno de frutas e 26 mg de β -caroteno em vegetais folhosos (NESTEL e NALUBOLA, 2003).

Dentre as frutas, as de clima temperado são normalmente ricas em antocianinas e pobres em carotenóides, as únicas frutas carotenogênicas de clima temperado são pêsego, nectarina e damasco. Em contrapartida, as frutas tropicais são consideradas ricas em carotenóides (SENTANIN e RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

Hiane *et al.* (2003) separou e quantificou carotenóides da polpa in natura e farinha de bacuri. Os principais carotenóides encontrados foram, por ordem decrescente de concentração, β -caroteno, ζ -caroteno e β -zeacaroteno.

Sentanin e Rodriguez-Amaya (2007) determinaram os principais carotenóides presentes em três cultivares de mamão e três cultivares de pêsego. Nas variedades de mamão foi encontrado licopeno, β -criptoxantina e β -caroteno como principais carotenóides, sendo o primeiro majoritário e nos cultivares de pêsego analisados encontraram β -criptoxantina, β -caroteno e violaxantina como principais carotenóides, sendo o primeiro majoritário.

Fonseca *et al.* (2007) objetivou explicar as diferenças na coloração da polpa e da casca entre os frutos dos mamoeiros ‘Sunrise Solo’ e ‘Golden’, e ao realizar a análise de carotenóides totais percebeu que a casca possuía um teor superior à polpa.

Em polpa de acerola recém-processada não congelada, foram identificados β -caroteno, β -criptoxantina e α -caroteno (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003). Lima *et al.* (2002) realizou estudos com pitanga roxa e vermelha e observou que o teor de carotenóides totais do fruto maduro foi maior do que no semi-maduro, entretanto a quantidade deste fitoquímico foi significativamente mais elevada na pitanga roxa do que na vermelha.

Rodriguez-Amaya e Kimura (1989) determinaram a composição de carotenóides e o valor de vitamina A do cajá, detectando e identificando 7 carotenóides como α -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, zeinoxantina, criptoxantina, criptoflavina e luteína. A polpa com a casca apresentou um conteúdo total de 25,8mg/g de carotenóides, onde 64% era constituído por β -criptoxantina. O conteúdo total da polpa foi de 17mg/g, com as concentrações de α -caroteno,

β -caroteno e luteína moderadamente mais altas, e da β -criptoxantina aproximadamente 50% menor que da polpa e casca juntas.

3.3. Parede celular

Todas as partes da planta são recobertas por uma camada externa, cuja estrutura é essencialmente composta por material lipídico depositado em camadas. As células individuais são circundadas por uma estrutura relativamente rígida designada parede celular, cuja composição, forma, espessura e tamanho dependem da função das células que compõem o tecido (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A parede celular é uma estrutura muito complexa que possui diversas funções. Proporciona às células rigidez mecânica, mantém a sua morfologia, controla a expansão celular e transporte intercelular e protege a célula contra uma grande quantidade de organismos potencialmente patogênicos. Como muitas destas funções são exigidas ao mesmo tempo em vários estádios de desenvolvimento do vegetal, a parede celular possui simultaneamente, grande flexibilidade com um máximo de resistência, devido a um sofisticado controle metabólico, com regiões de extrema complexidade, com altos conteúdos de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos. Assim, a determinação da composição exata destas substâncias na parede celular, fornece importantes informações para o esclarecimento das funções específicas que determinado tipo de célula possui (BRAGATTO, 2007).

A parede celular (Figura 3) é composta por várias camadas. A lamela média é a camada mais externa que faz a coesão entre as células e é composta principalmente de pectinas. A parede celular primária localiza-se após a lamela média e a secundária liga-se imediatamente do lado de dentro da parede primária, ambas consistem de microfibrilas de celulose trançadas em conjunto num padrão irregular, embebidas numa matriz amorfa composta de hemiceluloses, pectinas e proteínas (CHITARRA E CHITARRA, 2005).

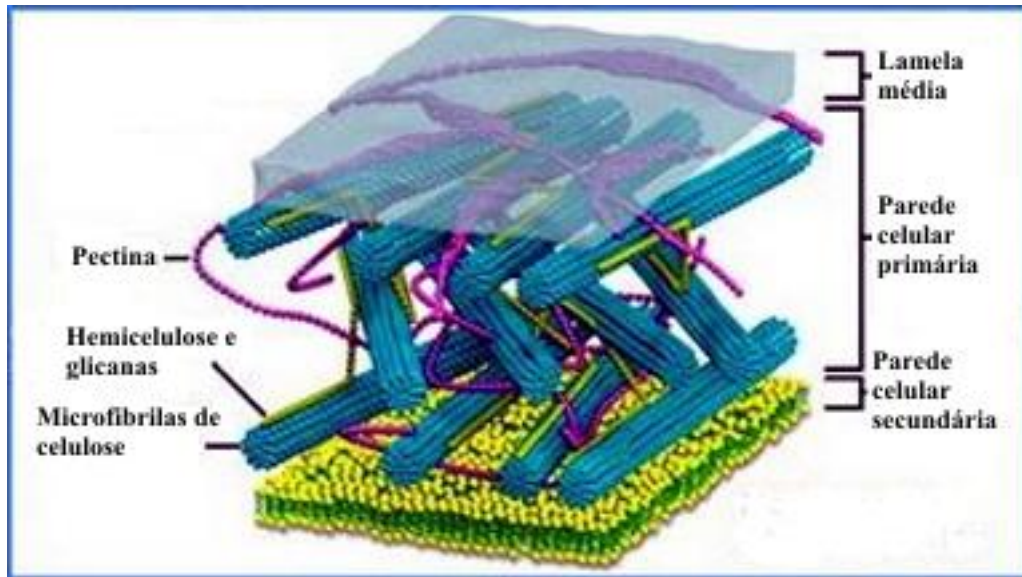


Figura 3 – Estrutura da parede celular vegetal.
(Fonte: micro.magnet.fsu.edu)

A celulose encontrada na parede celular das plantas é a biomolécula mais abundante na natureza. As plantas produzem, anualmente, cerca de 180 bilhões de toneladas de celulose. É produzida na forma de microfibrilas de celulose, (semi)-cristalina em cadeias lineares de β -1,4-D-glicose ligadas por pontes de hidrogênio (DELMER, 1999). Cada microfibrila de celulose consiste de aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular. Em geral, a parede primária contém de 10 a 40% de celulose e a secundária aproximadamente 40 a 60% (BRAGATTO, 2007).

As hemiceluloses são formadas por diversos grupos de polissacarídeos, interligados às microfibrilas de celulose. Na parede primária das plantas dicotiledôneas, as hemiceluloses mais abundantes são as xiloglucanas, representando aproximadamente 20%. As xiloglucanas são polissacarídeos cuja cadeia principal é constituída por unidades de β -1,4-D-Glicose e apresentam função regulatória, pois seus oligossacarídeos, denominados de oligossacarinas, regulam o crescimento celular. Estão associadas às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio, e promovem a união das microfibrilas de celulose adjacentes. Esta interação parece estar relacionada às propriedades mecânicas da parede celular (FRY, 1988; MACNEIL *et al.*, 1984).

3.4. Pectina

As substâncias pécicas são polissacarídeos ácidos de elevado peso molecular, constituídas por unidades de ácido D-galacturônico e ocorrem praticamente em todas as plantas superiores, nas quais se encontram principalmente sob a forma de protopectinas na lamela média e na membrana celular. Nos frutos, encontram-se nos espaços intercelulares, estando presentes em grande quantidade nos frutos verdes na forma de protopectinas (PIMENTA *et.al.*, 2000).

As pectinas são substâncias da família dos polissacarídeos, sendo os principais constituintes da parede celular dos frutos. Quimicamente a pectina (Figura 4) é composta por cadeias lineares de ácido D-galacturônico em ligações α -1,4, interrompidas pontualmente por resíduos de L-ramnose em ligação α -1,2. Grande parte dos resíduos de ácido galacturônico encontra-se esterificados com metanol, sendo as cadeias laterais compostas, principalmente, por arabinose e galactose (LIMA e MOTA, 2003).

As pectinas contribuem para a adesão entre as células e para a resistência mecânica da parede celular. Além de seu papel importante no crescimento das células, elas estão envolvidas em interações com agentes patogênicos, e a sua quantidade e natureza são determinantes para a textura de frutos e vegetais em geral, durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (BRANDÃO e ANDRADE, 1999).

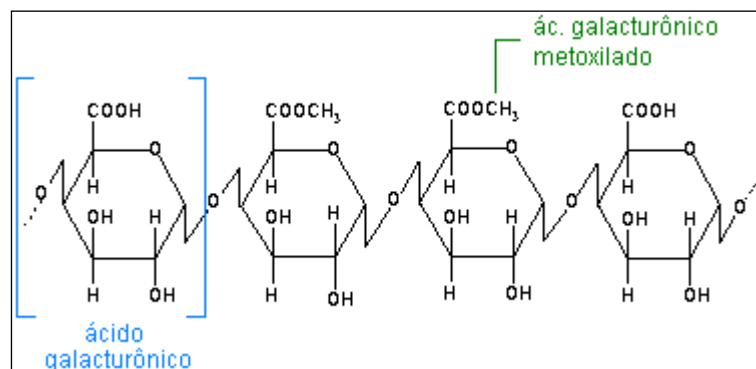


Figura 4 – Estrutura molecular da pectina.
(Fonte: fcfar.unesp)

Nos últimos dez anos, o modelo da estrutura molecular da pectina parecia bastante simples. A pectina era quebrada para produzir uma pectinase forte com atividades de pectinaliase, pectinesterase e poligalacturonase. Mas recentemente, aprendeu-se mais sobre a estrutura de toda a parede celular (NOVO NORDISK, 1999).

3.5. Enzimas pectinolíticas

Enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente protéica, que participam de várias reações bioquímicas, tendo como fundamental o controle metabólico. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente favorecidas, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas, e de elevada importância nos processos biotecnológicos (COELHO *et al.*, 2008).

As pectinases são enzimas hidrolíticas, cuja definição e classificação se faz com base na parte galacturano da molécula de pectina que é atacada. Embora o ácido D-galacturônico seja o principal constituinte das substâncias pécicas, proporções variáveis de outros açúcares, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose e traços de 2-O-metilfucose também podem ser encontrados (LEITÃO *et al.*, 1995).

As substâncias pécicas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos e bactérias. São muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade e melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação; no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais e na extração de polpa de tomate. São também utilizadas para reduzir o amargor excessivo em cascas de citrus, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados. A infusão de pectinase e β -glicosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais e aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em óleo de oliva extravirgem (UENOJO e PASTORE, 2007).

Tais enzimas são produzidas e vendidas por diversas empresas industriais. Os componentes majoritários das pectinases são a pectinesterase, pectinaliase e poligalacturonase (COELHO *et al.*, 2008).

As enzimas pectinolíticas atuam de forma sinérgica e são classificadas de acordo com o modo de ação sobre o substrato (CASTILHO *et al.*, 1996). Devido à diversidade estrutural das substâncias pécicas, as pectinases têm diferentes mecanismos de ação, podendo ser divididas em dois grupos principais: enzimas despolimerizantes, que quebram a cadeia da pectina por hidrólise ou clivagem transeliminativa e enzimas desmetoxilantes, que atuam sobre os grupos metoxílicos presentes no substrato, sem alterar o tamanho da cadeia (CODNER, 2001; MALVESSI e SILVEIRA, 2004).

Segundo Uenojo e Pastore (2007), a classificação das enzimas pécicas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, pela preferência de substrato (pectina, ácido pécico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante). Existem basicamente três tipos de pectinases:

- Desesterificante ou desmetoxilante

A pectinesterase, polimetilgalacturonato esterase ou PMGE (EC 3.1.11) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado). Age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (Figura 5), apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50°C. Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas. Pode estar envolvida em mudanças das substâncias pécicas durante amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais.

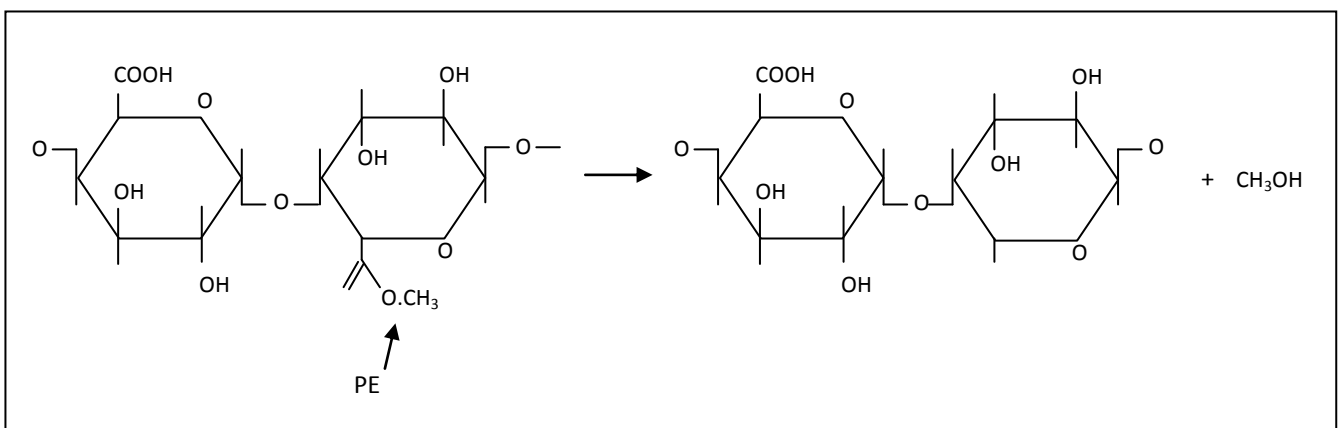


Figura 5 – Modo de ação das pectinesterases.

- Despolimerizantes

São classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo- (randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido pécico ou pectina como substrato. Envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações α -1,4) e as liases (catalisam a β -eliminação).

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e poligalacturonases.

- Poligalacturonases ou PG: hidrolisam α -1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico. É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo-(hidrólise randômica) (EC 3.2.1.15) ou exo-(hidrólise seqüencial) (EC 3.2.1.67) do ácido pécico. O modo de ação é expresso na Figura 6.

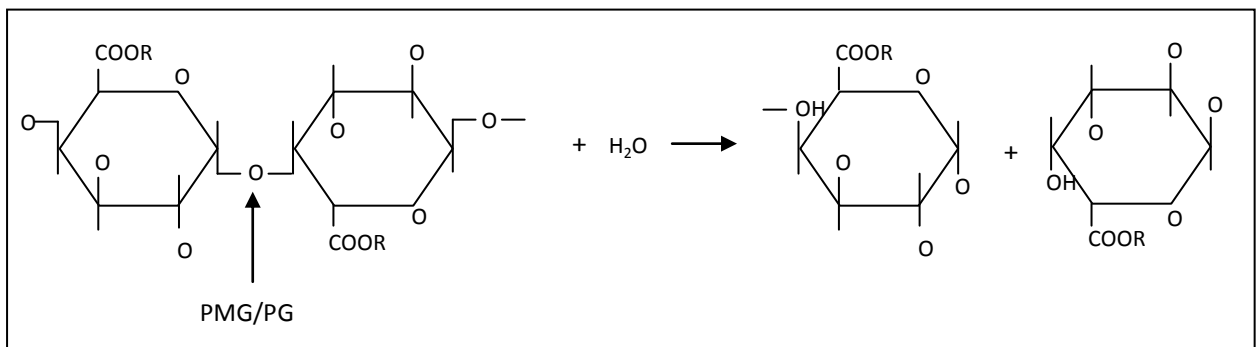


Figura 6 – Modo de ação da poligalacturonase.

As liases são também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado e incluem as pectinaliases e as pectatoliases.

- Pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) (EC 4.2.2.10): catalisa a β - eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo- ou exo-.

As pectina liases são preferíveis no processamento de sucos e vinhos, pois evitam a produção de metanol e com isso os ésteres voláteis responsáveis pelo aroma específico das

frutas não são afetados (DELGADO, *et al.*, 1992). O modo de ação dessas enzimas é mostrado na Figura 7.

- Pectato liase (poligalacturonato liase, PGL): catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido pécico de modo endo- ou exo- por transeliminção, requer Ca^{2+} para atividade. As endo-pectatoliasas (EC 4.2.2.2) clivam a cadeia de ácidos pécicos de forma randômica, enquanto as exo-pectatoliasas (EC 4.2.2.9) liberam dímeros insaturados a partir da extremidade da cadeia de substrato.

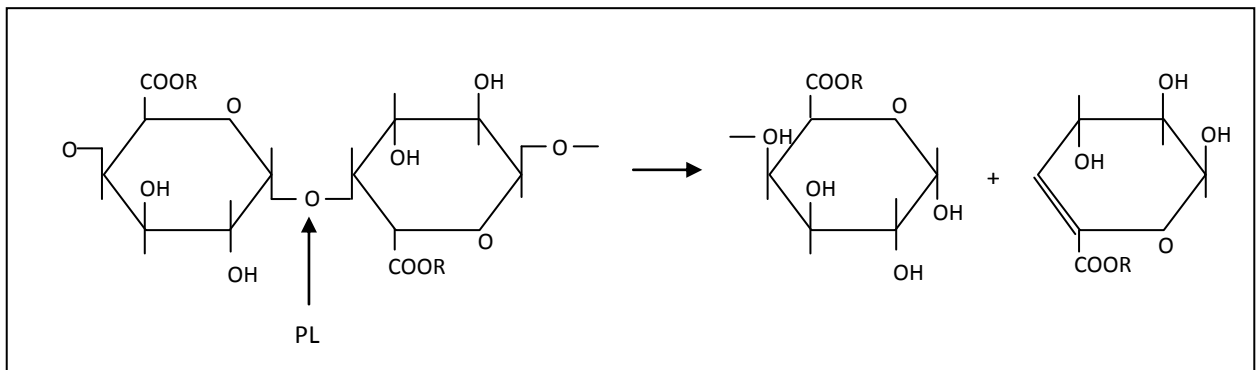


Figura 7 – Modo de ação das liases.

- Protopectinases

Estas enzimas solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada. Com base nas suas aplicações, são principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina e, protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares. Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção da película comestível de cajá

Os frutos de cajá foram colhidos, em pequena propriedade rural no município de Pecém/CE, situado a 60Km da capital Fortaleza. Foram congelados e armazenados em caixas de poliestireno expandido, para serem transportados até o Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza/CE.

Na unidade de processamento, os frutos foram lavados primeiramente apenas com água para que se retirassem todas as sujidades. Foi realizada uma seleção para que fossem processados apenas frutos em bom estágio de maturação. Após a seleção foi realizada uma segunda lavagem com água clorada, com 20mg/L de cloro e imersão de 15 minutos. Em seguida realizou-se a etapa de despolpa. Utilizou-se despolpadeira Bonina modelo 0.25 df (ITAMETAL – Itabuna/BA), malha de 1mm, para a remoção das cascas e caroços. Após a retirada da polpa, películas e caroços foram colocados em tanque com água para sua separação, devido à diferença de densidade existente. As películas recolhidas da porção inferior do tanque foram dispostas em telas para que se retirasse o excesso de água e, em seguida, foram embaladas em sacos plásticos de polietileno e selados em seladora Sulpack SP-350. Posteriormente, foram congelados e armazenados em freezer a -18°C (Figura 8).

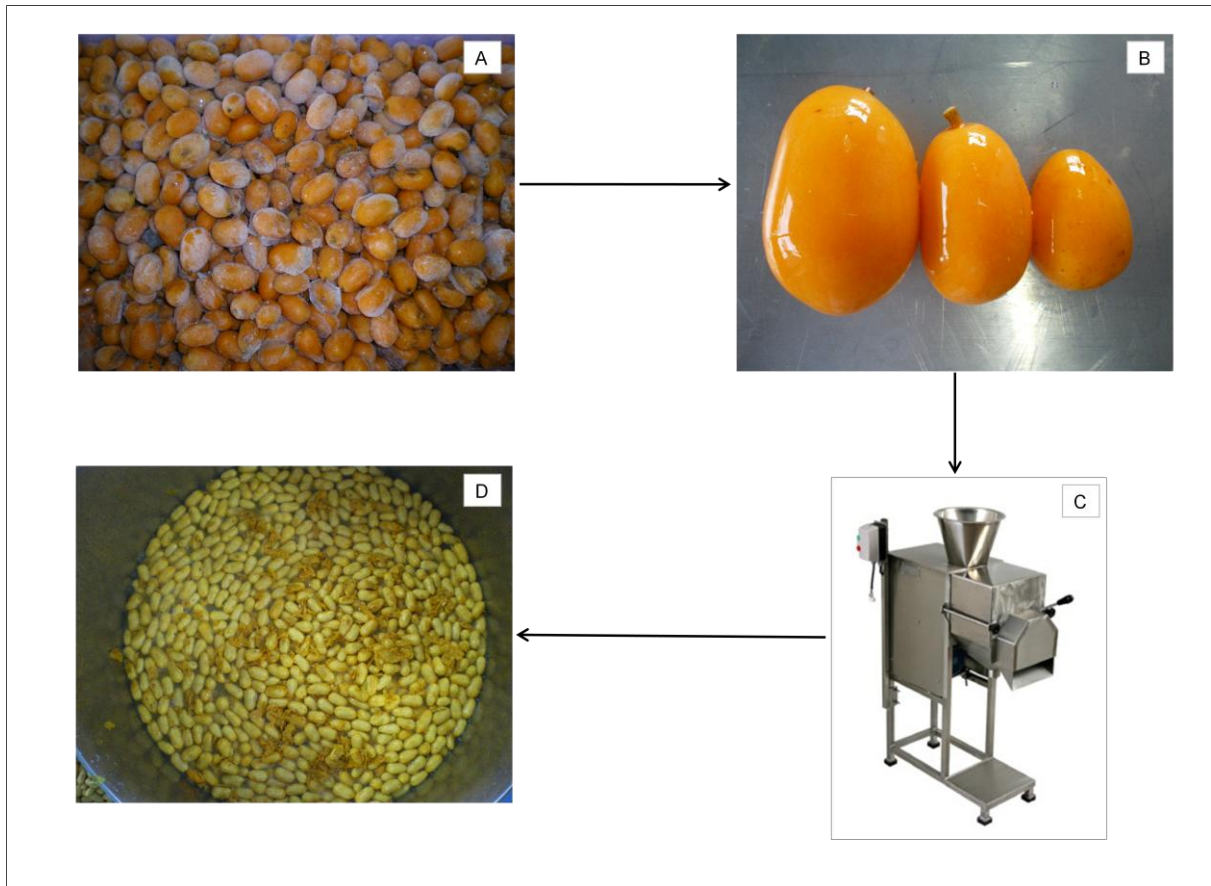


Figura 8 - Fluxograma de obtenção da película comestível de cajá. Cajás congelados (A), cajás descongelados prontos para o processamento (B), despulpadeira utilizada no processamento (C) e tanque de separação de resíduos (D).

4.2. Caracterização da película comestível de cajá

A película comestível de cajá foi caracterizada quanto ao resíduo seco, umidade, cinzas, extrato etéreo, teor de proteínas, carotenóides totais, e resíduo insolúvel em álcool (AIR), do qual quantificou-se pectina, hemicelulose e celulose + lignina.

4.3. Definições das condições de maceração enzimática

Para a realização da maceração enzimática foi necessário que se definissem parâmetros iniciais como necessidade e quantidade de adição de água, complexo enzimático a

ser utilizado e quantidade de enzima. Posteriormente avaliou-se a necessidade de triturar a película para que o complexo enzimático obtivesse uma maior superfície de contato. Dentro deste contexto pode-se realizar uma avaliação da extração de carotenóides de película comestível de cajá por hidrólise enzimática. Para avaliar esta extração utilizaram-se os parâmetros definidos nos testes iniciais.

4.3.1. Avaliação inicial da razão película:água

Foi avaliado o efeito da adição de diferentes quantidades de água sobre o tratamento enzimático da película de cajá. Utilizou-se película integral e em um erlenmeyer de 250mL colocou-se 25g de película e adicionou-se 25, 50, e 100mL de água destilada. Foi realizada uma homogeneização manual e posteriormente, adicionado 1000 μ L de Biopectinase CCM. O tratamento foi de 1, 2 e 3 horas de incubação a 30°C e 150rpm de rotação em shaker orbital. A avaliação da razão polpa:água foi qualitativa utilizando a Tabela 1, onde a intensidade da alteração está relacionada à desintegração crescente das partículas.

Tabela 1 – Escala para as características de avaliação visual.

<i>Grau de alteração</i>	<i>Característica da alteração</i>
0	Sem alteração visual
1	Alteração visual baixa
2	Alteração visual média
3	Alteração visual alta
4	Alteração visual altíssima

As amostras dispostas em erlenmeyer foram posicionadas em uma base branca e as imagens foram obtidas utilizando câmera digital Pentax Optio M40 com resolução 1024 pixels.

4.3.2. Avaliação da quantidade de enzima a ser utilizada

Avaliaram-se diferentes quantidades de enzima sobre a película integral de cajá. Em um erlenmeyer de 250mL colocou-se 25g de película e 100mL de água destilada. Foi realizada uma homogeneização manual e posteriormente, adicionaram-se diferentes quantidades, 10, 100 e 1000 μ L, de Pectinex Ultra SP-L. O tratamento foi feito em 1, 2 e 3 horas de incubação a 30°C e 150rpm de rotação em shaker orbital. Foi realizado também o controle onde não se adicionou o complexo enzimático. O efeito foi avaliado quantitativamente através dos grupos redutores totais. A maceração foi realizada em triplicata e a análise de grupos redutores totais foi realizada em duplicata pelo método DNS. Para análise estatística foi feito teste de Tukey de comparações das médias ao nível de 10% de significância.

4.3.3. Avaliação do complexo enzimático a ser utilizado

Para se determinar a preparação enzimática a ser utilizada, foram feitas macerações enzimáticas utilizando película integral, mesma concentração de enzima e modificando somente o complexo enzimático. Em erlenmeyer de 250mL colocou-se 25g de película e 100mL de água destilada. Foi realizada uma homogeneização manual e posteriormente, a adição de 10 μ L de cada complexo enzimático. Os erlenmeyers foram levados ao shaker orbital a 150rpm, a 30°C por 1h. As preparações enzimáticas utilizadas foram Celluclast, Shearzyme, Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L, Pectinex SMASH XXL e Pectinex XXL. Ao final foram quantificados os grupos redutores totais liberados pela ação enzimática, utilizando o método DNS e feito teste de comparação das médias para verificar a existência de significância ao nível de 10%.

Posteriormente, foi realizada maceração utilizando o complexo enzimático Pectinex XXL, nas concentrações 10, 100 e 1000 μ L. Em erlenmeyer colocou-se 10g de película e 40mL de água destilada. Foi realizada uma homogeneização manual e posteriormente, adicionou-se o complexo enzimático. Foram levadas à agitação a 150rpm em shaker orbital a 30°C. Realizou-se a maceração nos tempos 1, 2 e 3h. Para avaliar a eficiência dos complexos enzimáticos quantificaram-se os grupos redutores totais, pelo método do DNS

e realizou-se uma análise estatística de comparações das médias ao nível de 10% de significância (teste de Tukey).

4.3.4. Efeito da trituração

Foram feitos testes preliminares para avaliar primeiramente a necessidade de se utilizar trituração. Em um erlenmeyer de 250mL colocou-se 25g de película triturada inicialmente por 30s e adicionou-se 25, 50, e 100mL de água destilada. Foi realizada uma homogeneização manual e posteriormente, adicionado 1000 μ L de Pectinex SP-L. O tratamento foi realizado com 1, 2 e 3 horas de incubação a 30°C e 150rpm de rotação em shaker orbital. A avaliação foi qualitativa utilizando os dados da Tabela 1.

Avaliou-se o melhor tempo de trituração utilizando 25g de película integral e 100mL de água destilada. A trituração foi realizada, nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150s utilizando Mixer Walita. Na avaliação do efeito realizou-se análise de grupos redutores totais pelo método do DNS, em duplicata.

4.4. Extração de carotenóides por hidrólise enzimática

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário $2^{(k-1)}$ com ponto central (Tabela 2), onde se variou fatores como quantidade de enzima, temperatura de maceração e tempo de maceração (Tabela 3). Foi realizado 3 blocos.

Em erlenmeyer colocou-se 10g de película e 40mL de água destilada, realizou-se trituração de 30s em Mixer Walita. Foi utilizado o complexo enzimático Pectinex XXL e a rotação do shaker orbital foi 150rpm.

Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} com ponto central.

<i>Ensaio</i>	<i>Quantidade de enzima</i>	<i>Tempo de maceração</i>	<i>Temperatura de maceração</i>
1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1
5	0	0	0
6	-1	-1	+1
7	+1	-1	-1
8	-1	+1	-1
9	+1	+1	+1
10	0	0	0
11	-1	-1	+1
12	+1	-1	-1
13	-1	+1	-1
14	+1	+1	+1
15	0	0	0

Tabela 3 – Valores de cada nível do planejamento experimental.

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
<i>Quantidade (μL)</i>	50	100	150
<i>Temperatura ($^{\circ}$C)</i>	25	30	35
<i>Tempo (h)</i>	1	2	3

Ao término das macerações, separou-se película (fase sólida) da água (fase líquida) e foram realizadas determinações analíticas.

Na fase líquida foram realizadas análises de sólidos solúveis totais, grupos redutores totais, resíduo seco e teor de carotenóides.

Na fase sólida foi realizada análise do teor de carotenóides totais de acordo com o método descrito nos item 3.2.6.

Os resultados foram analisados pelo pacote STATISTICA 7.0.

4.5. Determinações analíticas

4.5.1. Resíduo seco

O resíduo seco foi determinado utilizando o método descrito por IAL (1985). Foi pesado aproximadamente 10g da amostra em cápsula de porcelana previamente tarada. Colocou-se para aquecer em estufa com circulação de ar a 105°C até que se atingisse peso constante.

A determinação da umidade foi realizada pela diferença do resíduo seco.

4.5.2. Cinzas

As cinzas foram determinadas, segundo o método descrito por IAL (1985). Foi pesada aproximadamente 5g da amostra em um cadinho previamente aquecido em mufla a 550°C, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. O material foi levado para carbonização a 200°C e incinerado a 500°C. Esperou-se reduzir a temperatura. Os cadinhos foram retirados da mufla e colocados em dessecador para que resfriassem. Posteriormente foram pesados e calculou-se o teor de cinzas.

4.5.3. Extrato etéreo

Foi determinado utilizando o método de extração direta em Soxhlet descrito por IAL (1985). Pesou-se aproximadamente 1g da amostra previamente dessecada, transferiu-se para um cartucho e adicionou um pouco de algodão para cobrir a amostra. O cartucho foi colocado no equipamento de Soxhlet e com um balão volumétrico previamente tarado iniciou-se a extração utilizando como solvente hexano. A extração ocorreu por 6 horas. Após esta etapa, evaporou-se o solvente em um evaporador rotativo a vácuo, e o balão volumétrico

contendo o material lipídico foi colocado em estufa a 105°C por 1 hora. Em seguida, resfriou-se em dessecador e foi realizada a pesagem.

4.5.4. Proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método Micro-Kjeldahl, baseado na quantificação do nitrogênio total, segundo AOAC (1980). Pesou-se 0,2g da amostra e transferiu-se para tubos de digestão. Adicionou-se 5mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,5g da mistura catalítica (mistura digestora a base de K_2SO_4 , $CuSO_4$ e Se). Realizou-se a digestão em bloco digestor até atingir a temperatura de 400°C. Após a completa digestão, a amostra foi resfriada e adicionou-se 10mL de água destilada. A destilação das amostras foi feita por neutralização com NaOH 50%. A amônia produzida foi recolhida em 10mL de ácido bórico 2%. A titulação foi realizada com solução padronizada HCl 0,02N com indicador. Para os cálculos do teor de nitrogênio total multiplicou-se 1,4008 ao volume gasto na titulação, o fator do HCl, a normalidade do HCl e dividiu-se pelo peso da amostra. Para a transformação de nitrogênio total em proteínas multiplicou-se o resultado por 6,25.

4.5.5. Carotenóides totais

A quantificação de carotenóides totais foi realizada adaptando-se o método descrito por Higby (1962). Em um becker envolto em papel alumínio, pesou-se aproximadamente 1g de película de cajá, adicionou-se 30mL de álcool isopropílico e 10mL de hexano. Foi realizada uma homogeneização utilizando Mixer-Walita por 1 minuto. Em seguida adicionou-se aproximadamente 10mL de água e transferiu-se para um tubo de centrífuga envolto em papel alumínio, agitando o material por 1 minuto em agitador de tubos. Após a agitação utilizou-se uma peneira para separar a película da fase líquida. A fase líquida foi transferida para um funil de separação de 250mL envolto em papel alumínio. Repetiu-se o procedimento de adição dos solventes até perceber que não havia mais extração. Foi realizado descansos de 30 minutos no funil de separação para a completa distinção das fases aquosa e orgânica. A fase orgânica separada foi transferida para um becker envolto em papel alumínio.

Após a extração completa, o conteúdo do becker foi filtrado em algodão contendo uma pitada de sulfato de sódio anidro P.A., para um balão volumétrico de 50mL envolto em papel alumínio, lavando o algodão com hexano e pressionando-o no funil para retirar todo o pigmento presente no algodão. Adicionou ao balão 5mL de acetona e aferiu-se o conteúdo com hexano. Realizou-se leitura em espectrofotômetro Varian em um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em mg/g de β -criptoxantina em base seca, utilizando o coeficiente molar de 2460 para este carotenóide dissolvido em hexano, conforme Rodriguez-Amaya (1999a).

4.5.6. Resíduo Insolúvel em Álcool

A análise de pectina foi baseada na metodologia utilizada por Schieber *et al.* (2005). Pesou-se 30g de película de cajá e homogeneizou-se em 300mL de etanol (80% v/v) fervente como auxílio de um Mixer – Walita, permanecendo sob aquecimento por 1h a 80°C. Logo após realizou-se uma centrifugação a 15.000g durante 10 minutos e filtrou-se o centrifugado à vácuo, coletando o resíduo. O resíduo foi lavado com etanol quente até se obter um extrato com filtrado claro. Em seguida o extrato foi colocado em agitação com 50mL de acetona. A agitação ocorreu em shaker orbital (TE-420 marca Tecnal) a 150 rpm por 12h. Foi realizada nova filtração e em seguida secou-se em exaustor por 24h. Realizou-se a pesagem e assim obteve-se o AIR (resíduo insolúvel em álcool).

Foi retirado 0,8g do AIR e colocado sob agitação com 50mL de solução alcalina de EDTA (0,05M NaOH; 0,5mM EDTA) a 150 rpm durante 1h. Em seguida realizou-se centrifugação a 15.000g por 20 minutos e logo após uma filtração à vácuo, coletando o resíduo e lavando com água destilada. Este resíduo foi reservado para quantificar hemicelulose. Juntou-se os sobrenadantes e ajustou-se o pH para 6,5. A solução foi colocada na diálise em membranas de diálise Dyalises membrane cellulose de espessura 33mm (SIGMA-ALDRICH) com água destilada por 48h. Após a diálise, o líquido das membranas foi coletado e adicionou-se álcool comercial na proporção 3:1 (álcool:líquido), deixando em repouso por 24h. Após o descanso foi colocado em estufa a 60°C e pesou-se o resíduo determinando assim **pectina**.

O resíduo reservado na etapa anterior foi colocado sob agitação em 50mL de solução de NaOH 16% por 5h. Em seguida realizou-se centrifugação a 15.000g por 20

minutos. Foi realizada filtração à vácuo, coletando o resíduo e lavando com água destilada por duas vezes. O resíduo foi reservado para quantificar celulose + lignina. Juntou-se os sobrenadantes e o pH foi ajustado para 6,5. A solução foi colocada na diálise da mesma forma que quantificou pectina. Após a diálise, o líquido das membranas foi coletado e adicionou-se álcool comercial na proporção 3:1 (álcool:líquido), deixando em repouso por 24h. Após o descanso foi colocado em estufa a 60°C e pesou-se o resíduo determinando assim **hemicelulose**.

Ao resíduo reservado na etapa anterior adicionou-se 100mL de água destilada e colocou-se a solução na diálise da mesma forma que quantificou pectina e hemicelulose. Após a diálise, o líquido das membranas foi coletado e adicionou-se álcool comercial na proporção 3:1 (álcool:líquido), deixando em repouso por 24h. Após o descanso foi colocado em estufa a 60°C e pesou-se o resíduo. Após a pesagem, a amostra foi incinerada em mufla a 550°C. Para determinar **celulose + lignina**, retirou-se a diferença de peso referente às cinzas.

Os resultados foram determinados através da relação de peso de cada fração com o peso do AIR total da amostra e expressos em g/100g _{película}.

4.5.7. Determinação de grupos redutores totais

O teor de grupos redutores totais (GRTs) foi determinado segundo Miller (1959), utilizando ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS). Sobre 1mL de amostra de GRTs, devidamente acondicionada em tubo de ensaio, adicionou-se 1mL de solução de DNS. Após vigorosa homogeneização, os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida os tubos foram retirados e rapidamente resfriados com água corrente. Adicionou-se 8mL de água destilada à mistura reacional e procedeu-se nova homogeneização. A intensidade da cor foi quantificada em espectrofotômetro Varian Cary – 50 a 540nm. A concentração de GRT foi realizada utilizando curvas-padrões previamente estabelecidas.

4.5.8. Caracterização das preparações enzimáticas comerciais

As preparações enzimáticas utilizadas foram a Biopectinase CCM, cedida pela Quest International e Celluclast, Shearzyme, Pectinex Ultra SP-L, Pectinex XXL e Pectinex SMASH XXL, cedidas pela Novozymes Latin America Ltda.

- **Poligalacturonases**

A determinação da atividade enzimática das poligalacturonases foi realizada de acordo com Couri (1993). Em tubos de ensaio adicionou-se 4mL de ácido poligalacturônico e foram mantidos em banho termostático a 35°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou 0,1mL do extrato enzimático devidamente diluído. Após 30 minutos de reação transferiu-se 0,1mL do meio reacional para tubo contendo 1mL de DNS completando o volume com 0,9mL de água destilada. A atividade de poligalacturonase é expressa em U.mL⁻¹, onde uma unidade corresponde a 1 μmol de ácido galacturônico por mL, por minuto nas condições de reação.

- **Pectinametilesterases**

A metodologia utilizada para a determinação de pectinametilesterases foi baseada em Khanna *et al.* (1981). Em becker adicionou-se 30mL de solução de pectina 1% previamente ajustada o pH para 7,0 e 6mL do extrato enzimático devidamente diluído. Realizou-se uma titulação com NaOH 0,01N ajustando o pH do conteúdo do becker para 7,0 em um tempo de 10 minutos de reação. Anotou-se o volume de NaOH gasto para o ajuste do pH. Para o cálculo da atividade enzimática multiplicou-se o volume de NaOH gasto pelo fator do NaOH, por 1000 e pela diluição do extrato enzimático. A atividade da pectinametilesterase é expressa em U.mL⁻¹, onde uma unidade de pectinesterase corresponde como a quantidade de enzima que libera 1mmol de grupos carboxílicos por hora de reação.

- **Pectinaliases**

De acordo com o método descrito por Zetelaki-Horvath (1982) realizou-se a determinação da atividade enzimática das pectinaliases. Em tubos de ensaio adicionou-se 2,5mL de solução de pectina 2%, 0,5 mL de CaCl₂ 0,01M e 21,0 mL de tampão acetato. Em seguida foi colocado em banho termostático a 35°C por 10 minutos. Adicionou 1mL do preparo enzimático devidamente diluído, agitou-se e realizou-se imediatamente a leitura em espectrofotômetro a 235nm. Retornou ao banho e realizou-se nova leitura após 10 minutos de reação. A atividade de pectinase é expressa em U.mL⁻¹, onde uma unidade representa 1 μmol de 4,5 glicosídeo uronato produzido por minuto de reação em pH 5,5 nas condições de reação, por mL do preparado enzimático.

- **Xilanases**

A determinação da atividade enzimática da xilanase foi realizada de acordo com Gomes *et al.* (1992). Em tubos de ensaio adicionou-se 0,5mL de solução de xilana 1% e 0,5mL do complexo enzimático diluído em balão volumétrico. Os tubos foram levados ao banho termostático a 60°C por 10 minutos. Após os 10 minutos paralisou a reação adicionando em cada tubo 1mL de DNS, homogeneizou-se e procedeu-se a análise de Grupos Redutores Totais, conforme 4.5.7. O branco foi feito sem deixar que a reação ocorresse. A atividade de xilanase é expressa em U.mL⁻¹, onde uma unidade corresponde a 1 μmol de xilose por mL, por minuto nas condições de reação.

- **Amilases**

A determinação da atividade enzimática das amilases foi realizada de acordo com Pinto (2002). Adicionou-se 1mL de solução de amido 2% e manteve-se em banho termostático a 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1mL do complexo enzimático

devidamente diluído e permaneceu no banho termostático, sob agitação, por 15 minutos. Para a paralisação da reação foi adicionado 0,5mL de NaOH 1N. Transferiu-se 1mL para tubos contendo 1mL de DNS, quantificou-se os Grupos Redutores Totais liberados, conforme item 4.5.7. A atividade de amilase é expressa em U.mL^{-1} , onde uma unidade é correspondente a quantidade de enzima que hidrolisa 10mg de amido em 30 minutos a uma temperatura de 37°C .

- **Celulases**

A determinação da atividade enzimática das celulases foi realizada baseada em Pinto (2002). Aos tubos de ensaio, adicionou 0,9mL de solução de celulose 1% e manteve-se em banho termostático a 40°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,1mL do complexo enzimático devidamente diluído e permaneceu no banho termostático, sob agitação, por 60 minutos. Para a paralisação da reação foi adicionado 1mL de DNS e realizou homogeneização. A quantificação dos Grupos Redutores Totais liberados foi conforme item 4.5.7. A atividade de celulase é expressa em U.mL^{-1} , onde uma unidade corresponde à quantidade de enzima que libera 1mmol de glicose por minuto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização da película comestível de cajá

A película de cajá apresentou 79,51g/100g de umidade e 20,14g/100g de resíduo seco. Em termos de massa seca apresentou 2,34g/100g de cinzas, 25,25g/100g de extrato etéreo, 14,91g/100g de proteínas e 57,50g/100g de carboidratos totais (Tabela 4).

Tabela 4 – Caracterização da película comestível de cajá em base seca.

Característica	Quantidade (g/100g película)
Composição centesimal	
Cinzas	2,34 ± 0,01
Extrato etéreo	25,25 ± 0,72
Proteína	14,91 ± 0,04
Carboidratos Totais	57,50
AIR	19,46 ± 0,52
Pectina	8,45 ± 0,42
Hemicelulose	5,42 ± 0,27
Celulose + lignin	3,45 ± 0,15

O teor de extrato etéreo, proteína e carboidratos em base úmida foram 3,98g/100g, 2,35g/100g e 9,06g/100g, respectivamente. Leon e Shaw (1990) encontraram para a polpa de cajá 0,1 a 2,1g/100g de lipídios, 0,8 a 1,4g/100g de proteína e 8,7 a 13,8g/100g de carboidratos. Viana *et al.* (2009) encontrou valores de proteínas referentes a 0,66 - 0,71 g/100g. A composição química da película de cajá, ao ser comparada com os resultados citados, encontra-se com teores superiores. Desta forma, a película de cajá possui maior teor de proteína e lipídios que a própria polpa de cajá e conteúdo de carboidratos equivalente.

O teor de carotenóides totais presentes na película comestível de cajá foi de 125,6mg β-criptoxantina/g massa seca. Rodriguez-Amaya e Kimura (1989) determinaram a composição de carotenóides do cajá, a polpa com a casca apresentou um conteúdo total de

carotenóides de 25,8mg/g. O conteúdo total de carotenóides na polpa foi de 17mg/g. Percebendo-se assim, que a película de cajá apresenta cerca de 34% de carotenóides quando relacionado ao total encontrado pelos autores.

5.2. Caracterização das preparações enzimáticas comerciais

As preparações enzimáticas foram caracterizadas com a finalidade maior de saber as atividades das pectinases. Estando os complexos Pectinex Ultra SP-L, Pectinex XXL e Viscozyme L, com as maiores atividades de pectinases (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade enzimática das preparações comerciais.

<i>Preparações enzimáticas</i>	<i>Pectinases (U/mL)</i>			<i>Xilanases (U/mL)</i>	<i>Amilases (U/mL)</i>	<i>Celulases (U/mL)</i>
	PG¹	PME²	PL³			
<i>Pectinex Ultra SP-L</i>	243	10688	0,82	13,0	290,9	5,8
<i>Pectinex SMASH XXL</i>	N.D.	4431	N.D.	1,8	165,1	-
<i>Pectinex XXL</i>	182	12187	5,04	4,1	151,6	-
<i>Biopectinase CCM</i>	1022	1825	0,16	62,1	11,79	N.D.
<i>Viscozyme L</i>	225	29589	0,83	13,0	478,4	38,2
<i>Celluclast</i>	N.D.	4301	2,60	12,0	4,5	248,1
<i>Shearzyme</i>	N.D.	4236	N.D.	13,4	2,1	-

¹ Poligalacturonase, ² Pectinametilesterase, ³ Pectinaliase. N.D. = não detectada

Os complexos enzimáticos Pectinex Ultra SP-L, Pectinex XXL, Biopectinase CCM e Viscozyme L apresentaram-se com atividades enzimáticas para enzimas pectinolíticas além da presença de amilases e xilanases. No entanto, a Pectinex XXL se destacou por conter o maior conteúdo de pectinaliase dentre as preparações caracterizadas, 5,04 U/mL.

A Biopectinase CCM se destacou pelo maior conteúdo de poligalacturonase (1022 U/mL) e xilanase (62,1 U/mL), e a Viscozyme L por conter 29589 U/mL de pectinametilesterase.

O presente estudo mostra que ao trabalhar com frutos há a necessidade de se utilizar preparações enzimáticas onde exista uma maior presença de atividades pectinolíticas. Romero-Cascales *et al.* (2008) caracterizou seis preparações enzimáticas comerciais e avaliou a maceração e seus efeitos sobre a extração da cor durante a vinificação de uvas monastrell. Na caracterização, as preparações continham, em sua maioria, maior atividade de endopoligalacturonases e pectinametilesterases, apresentavam em porção menor atividades de pectinálise, celulase e β -glucosidade.

Dias *et al.* (2003) realizou um tratamento enzimático utilizando o complexo enzimático Ultrazym, da Novozymes Latin America Ltda. para diminuir a viscosidade da polpa de cajá, seu objetivo era criar uma metodologia de bebida fermentada de cajá. O autor afirma que a preparação comercial utilizada é composta por 2 classes de enzimas, que são poligalacturonases e celulases, que são indicadas para o tratamento de polpas, facilitando a clarificação da bebida.

5.3. Condições de maceração enzimática

5.3.1. Razão película:água

Ao realizar a análise visual com película integral, verificou-se que utilizando 25 e 50mL (Figuras 9 e 10) de água destilada, as partículas de película ainda permaneceram visíveis, não havendo uma desintegração, obtendo classificação 0 na escala, sem alteração visual. Ao utilizar 100mL de água destilada por 2h já se inicia a desintegração da película (Figura 11). Observa-se uma alteração visual crescente, na Figura 11A tem-se uma alteração baixa, enquanto na Figura 11C observa-se um alto nível de desintegração.

A adição direta da preparação enzimática à película de cajá não se mostra adequada. A principal dificuldade reside na homogeneização do volume de enzima a massa de película. Desta forma, a adição de água foi fundamental para o funcionamento do processo de maceração enzimática.



Figura 9 – Tratamento enzimático da película comestível integral de cajá utilizando 1000µL de Biopectinase CCM com 25 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).



Figura 10 – Tratamento enzimático da película comestível integral de cajá utilizando 1000µL de Biopectinase CCM com 50mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2 (B) E 3h(C).



Figura 11 – Tratamento enzimático da película comestível integral de cajá utilizando 1000µL de Biopectinase CCM com 100 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).

As pectinases, na classificação de enzimas, encontram-se dentro do grupo das hidrolases. Segundo Coelho *et al.* (2008) as hidrolases são enzimas em que a água participa na clivagem de ligações covalentes do substrato, além disso a água foi fundamental para melhorar a superfície de contato da película, pois ao utilizar quantidades inferiores de água as partículas de películas se aderem e não ocorre uma boa maceração.

No mesmo contexto, Moura (2009) realizou um estudo com maceração da polpa de cajá e concluiu que a adição do complexo enzimático á polpa, sem adição de água já proporciona uma boa redução na viscosidade. No entanto, Aquino (2008) realizou maceração enzimática em polpa de bacuri e percebeu que a adição de enzimas em baixas concentrações não obteve bons resultados, necessitando utilizar a razão polpa:água de 1:2.

Na película de cajá viu-se a necessidade de adição de água na proporção de 1:4 (película:água).

5.3.2. Quantidade de enzima a ser utilizada

Observou-se que, em relação a quantidade de enzima adicionada, não houve diferença significativa ao nível de 10% nos tempos 1 e 2h das amostras controle, adição de 10 μ L e adição de 100 μ L. A diferença só foi significativa na adição de 100 μ L e 1000 μ L no tempo 3h (Tabela 6).

Ao avaliar o tempo de incubação, percebeu-se que na amostra controle houve uma diferença significativa nos tempos 1 e 2h. Na adição de 10 μ L não houve diferença significativa, sendo esta quantidade eliminada para a continuidade do trabalho. Nas adições de 100 e 1000 μ L houve diferença significativa ao utilizar 3h de incubação.

A quantificação dos grupos redutores totais favoreceu a percepção de qual grandeza de concentração de enzima é mais apropriada a utilização.

Tabela 6 – Concentração de grupos redutores totais utilizando Pectinex Ultra SP-L nas amostras controle, adição de 10, 100 e 1000 μ L.

Tempo (h)	Concentração (mg/L)			
	Controle	10 μ L	100 μ L	1000 μ L
1	636 ^{abA}	684 ^{aA}	586 ^{aA}	3744 ^{aB}
2	595 ^{aA}	712 ^{aA}	557 ^{aA}	4943 ^{aB}
3	714 ^{bA}	809 ^{aA}	2727 ^{bB}	6597 ^{bC}

Médias com a mesma letra minúscula, não diferem significativamente ao nível de 10% de significância na mesma coluna.

Médias com a mesma letra maiúscula, não diferem significativamente ao nível de 10% de significância na mesma linha.

Dentre as quantidades de enzimas utilizadas, apenas as adições de 100 e 1000 μ L são apropriadas para o presente trabalho, no entanto 1000 μ L é considerada uma quantidade muito grande. Novozymes (2003) afirma que as enzimas podem ser caras se vistas pelo ângulo do custo por mol ou por peso da unidade. No entanto, o custo-chave a considerar na biocatálise não é o custo da enzima em si, mas a parte do custo que a enzima acrescenta ao produto final. Para reduzir os custos, as enzimas podem também ser imobilizadas para que possam ser reusadas muitas vezes.

Desta forma, preferiu-se, neste presente estudo, avaliar os efeitos da maceração trabalhando com quantidades em torno de 100 μ L.

5.3.3. Complexo enzimático a ser utilizado

Foram destacados com maior liberação de grupos redutores os complexos Shearzyme, Pectinex SMASH XXL e Pectinex XXL. Ao se comparar os 6 complexos enzimáticos utilizando o teste de Tukey, verificou-se que o complexo Pectinex XXL obteve diferença significativa ao nível de 90% do restante dos complexos (Tabela 7).

Silva *et al.* (1999) estudou a produção de suco clarificado de cajá utilizando uma preparação enzimática pectinolítica (Pectinex AR) e realizou quantificação de grupos redutores totais da polpa *in natura* e do suco clarificado com emprego de enzimas pectinolíticas. Na polpa determinou 4,53% de grupos redutores e no suco o valor subiu para

6,65%. Afirmando assim, que as enzimas pectinolíticas são capazes de liberar grupos redutores quando são utilizadas em frutos, polpas ou sucos de frutos.

Tabela 7 – Concentração de grupos redutores totais utilizando 10µL de 6 complexos enzimáticos comerciais distintos em maceração de 1h.

Tempo (h)	Concentração (mg/L)					
	<i>Shearzyme</i>	<i>Celluclast</i>	<i>Viscozyme L</i>	<i>Pectinex Ultra SP-L</i>	<i>Pectinex SMASH XXL</i>	<i>Pectinex XXL</i>
1	2056,19 ^c	1085,95 ^b	501,31 ^a	683,53 ^a	2070,24 ^c	3036,19 ^d

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, ao nível de 10% de significância, pelo Teste de Tukey.

Dentre os complexos com diferença significativa ao nível de 10%, a Pectinex XXL em termos de concentração de grupos redutores totais apresentou melhores resultados do que todos os outros complexos avaliados.

Na Tabela 8, ao avaliar o complexo Pectinex XXL em grandezas distintas, percebeu-se que as amostras com adição de 10 e 100µL não apresentaram diferença significativa ao nível de 10% nos tempos 1, 2 e 3h. No entanto, ao utilizar 1000µL, a diferença foi significativa para os 3 tempos avaliados.

Ao avaliar as adições no tempo de 1h, verificou-se que houve diferença significativa para as três quantidades de enzima adicionada. No tempo de 2h de incubação a diferença só foi verificada ao adicionar 1000µL. E, no tempo de 3h, também houve diferença significativa nas adições avaliadas. A maior liberação de grupos redutores totais foi verificada ao utilizar a adição de 1000µL e 3h de incubação.

Sun *et al.* (2006) também testaram várias enzimas (Pectinex Smash XXL, Pectinex Ultra SP-L, Pectinase FNP-1 e Celulase FNC-1) em diferentes condições na maceração de polpa de cenoura para verificar qual complexo seria mais adequado. Segundo os autores, Pectinex Smash XXL foi a melhor preparação de enzima comercial.

Tabela 8 – Concentração de grupos redutores totais para maceração enzimática utilizando película integral e o complexo Pectinex XXL.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Concentração (mg/L)</i>		
	<i>10μL</i>	<i>100μL</i>	<i>1000μL</i>
<i>1</i>	3036 ^{aA}	3440 ^{aB}	7309 ^{aC}
<i>2</i>	3016 ^{aA}	3649 ^{aA}	8129 ^{bB}
<i>3</i>	2768 ^{aA}	4136 ^{aB}	9463 ^{cC}

Médias com a mesma letra minúscula, não diferem significativamente ao nível de 10% de significância na mesma coluna.

Médias com a mesma letra maiúscula, não diferem significativamente ao nível de 10% de significância na mesma linha.

O complexo enzimático Pectinex XXL apresentou-se como a preparação enzimática mais eficiente neste estudo, isto pode ser relacionado com sua caracterização enzimática por apresentar atividade pectinolítica e em relação às outras preparações apresenta a maior atividade de pectinaliase. Segundo Yadav *et al.* (2009), as pectinaliases são as pectinases conhecidas capazes de degradar pectinas altamente esterificadas (como aqueles encontrados em frutas) em pequenas moléculas sem produzir metanol, em contraste com a combinação de poligalacturonase e pectinametilsterase, que são normalmente encontrados em produtos comerciais. Dentro deste contexto, neste trabalho decidiu-se extrair carotenóides da película comestível de cajá utilizando a preparação enzimática Pectinex XXL.

5.3.4. Efeito da trituração

Avaliando inicialmente a adição de diferentes quantidades de água pode-se perceber que utilizando a película triturada a percepção visual da maceração pode ser feita com 2h de processo e com 50 mL de água (Figura 13). Na Figura 12 não houve alteração visual, se classificando na escala em 0. Na Figura 13A percebe-se uma baixa alteração visual, e nas figuras 13B e 13C percebe-se uma alteração visual alta.

No experimento com 100mL (Figura 14), a maceração pode ser observada a partir de 1h (Figura 14A) após a adição da preparação enzimática, uma alteração média (escala 2). Destaca-se a alteração altíssima observada na Figura 14C, onde praticamente não se vê partículas de película de cajá. Constatando assim, grande eficiência quando se utiliza trituração na película.



Figura 12 – Tratamento enzimático da película comestível triturada de cajá utilizando 1000 μ L de Pectinex Ultra SP-L com 25 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).



Figura 13 – Tratamento enzimático da película comestível triturada de cajá utilizando 1000 μ L de Pectinex Ultra SP-L com 50 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).



Figura 14 – Tratamento enzimático da película comestível triturada de cajá utilizando 1000 μ L de Pectinex Ultra SP-L com 100 mL de água destilada nos tempos 0, 1(A), 2(B) e 3h(C).

Realizando apenas a trituração sem adição de enzimas, percebeu-se visualmente uma diminuição gradual no tamanho das partículas ao longo do tempo de trituração (Figura 11).



Figura 15 – Trituração da película comestível de cajá nos tempos 0 (A), 30 (B), 60 (C), 90 (D) e 120s (E).

Tiburtino-Silva *et al.* (2008) para extrair pectina da casca de maracujá cortou a casca em pedaços, adicionou 6 litros de água para cada 5kg de casca e triturou por 5 minutos em liquidificador. O autor utilizou preparações enzimáticas e devido a isso teve que utilizar um veículo de maceração que foi a água e a trituração para favorecer a eficiência do processo.

Na análise de grupos redutores notou-se que o teor de grupos totais dissolvidos na parte aquosa da amostra apresentou diferença significativa ao nível de 10% de significância na amostra controle para o restante das amostras. A liberação de grupos redutores totais da amostra controle quando comparada a amostra de 30s apresenta um aumento de aproximadamente 53%. Entre as amostras 30, 60, 90, 120 e 150s não houve diferença significativa (Tabela 9).

Tabela 9 – Concentração de grupos redutores totais nos tempos de trituração.

Tempo (s)	Concentração (mg/L)
0	953 ^c
30	1785 ^{ab}
60	1671 ^a
90	1762 ^{ab}
120	1987 ^{ab}
150	2083 ^b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, ao nível de 10% de significância, pelo Teste de Tukey.

Utilizando os dados do teste de Tukey definiu-se o tempo de trituração como 30s, onde visualmente já se percebe uma boa diminuição das partículas, além deste tempo não ter diferido dos tempos 60, 90, 120 e 150s.

5.4. Extração de carotenóides

A análise estatística baseou-se em análise dos efeitos, diagramas de Pareto e gráficos de superfície para os parâmetros estudados. O nível de significância avaliado foi de 90%.

5.4.1. Fase líquida

Na fase líquida foram avaliados parâmetros como: sólidos solúveis totais, grupos redutores totais, resíduo seco e teor de carotenóides totais.

No parâmetro sólidos solúveis totais verificou-se que a variação na quantidade de enzima e o tempo foram significativos ao nível de 90%. No diagrama de Pareto (Figura 16A), é perceptível a significância, e pelos valores do teste t verificou-se que para essa variável dependente a quantidade de enzima se mostra bem mais significativa que o tempo.

Na avaliação dos efeitos todas as variáveis independentes apresentaram efeitos positivos para a quantificação dos sólidos solúveis totais.

Os sólidos solúveis totais são os sólidos que se encontram dissolvidos, neste caso, na fase líquida deste experimento. Esse aumento nos sólidos solúveis era esperado, pois a maceração enzimática utilizando enzimas pectinolíticas facilitou a liberação dos sólidos que estavam contidos na película.

Para a avaliação da quantidade de grupos redutores totais também se verifica que ao nível de 90% de significância, a quantidade de enzima e o tempo de maceração foram relevantes (Figura 16B). O valor p foi de 0,0145, para a quantidade de enzima e 0,0626 para a variável independente tempo, estando ambos abaixo de 0,1.

A temperatura de maceração utilizada apresentou efeito negativo quando relacionada à quantificação dos grupos redutores totais. Dessa forma, esta variável independente ao ser aumentada, ocasionou uma diminuição no teor de sólidos solúveis totais.

Os grupos redutores totais são constituídos principalmente por açúcares, o aumento neste teor se deve a presença de enzimas degradantes da parede celular. Essas enzimas são as pectinametilesterases que atuam removendo grupos metoxílicos das substâncias pécticas, as poligalacturonases que liberam ácido poligalacturônico e as pectinaliases que atuam sobre os resíduos de ácido poligalacturônico ou substratos desmetoxilado liberando oligogalacturonídeos.

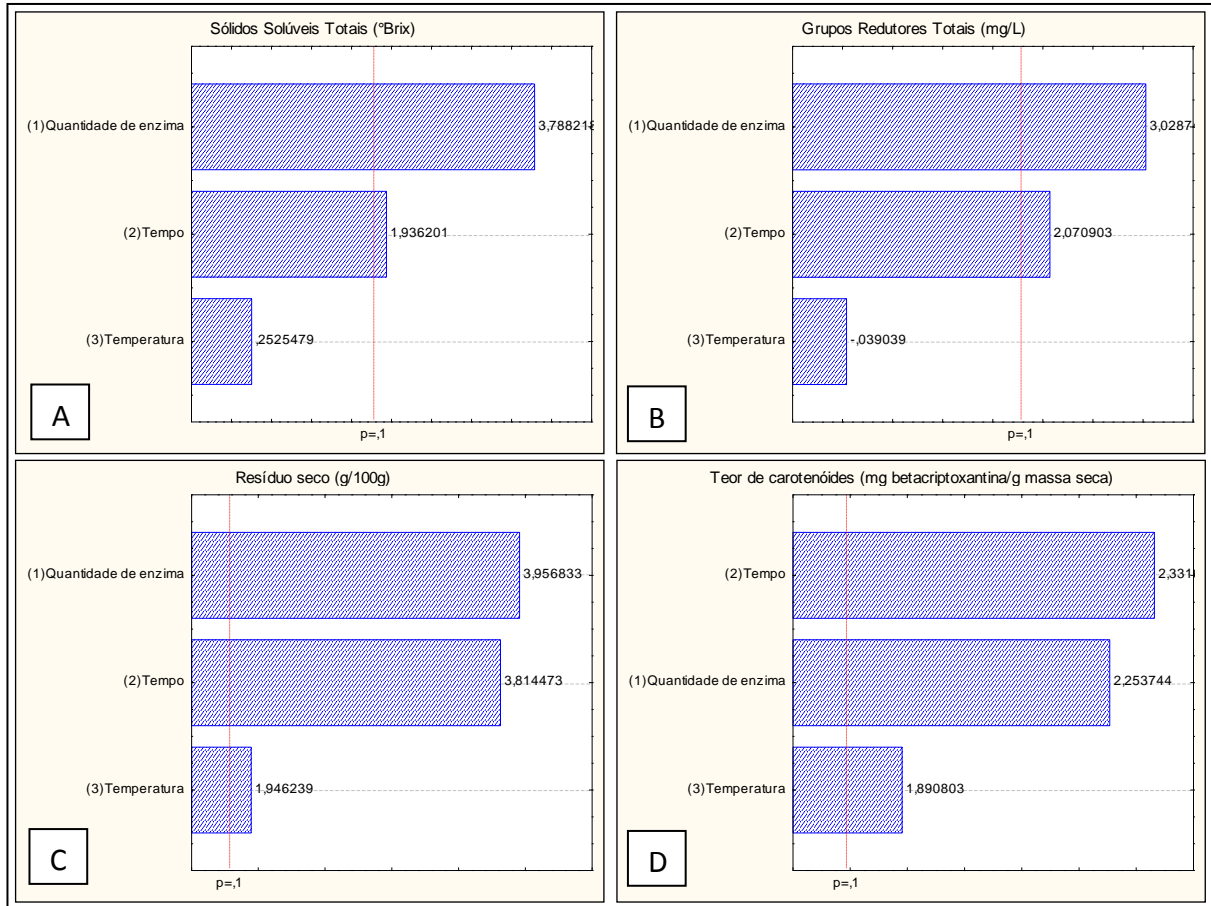


Figura 16 - Diagramas de Pareto para as variáveis dependentes sólidos solúveis totais (A), grupos redutores totais (B), resíduo seco (C) e teor de carotenóides (D).

No resíduo seco encontrado na fase líquida da maceração, todas as variáveis independentes apresentaram significância a 90% para os resultados encontrados (Figura 16C).

A quantidade de enzima, o tempo de maceração e a temperatura apresentaram efeitos positivos para o parâmetro resíduo seco. Dessa forma, ao aumentar a quantidade de enzima, o tempo de maceração ou a temperatura, a quantidade de resíduo seco aumenta.

No teor de carotenóides totais encontrados na fase líquida da maceração, a variação na quantidade de enzima, o tempo de maceração e temperatura utilizadas tiveram significância ao nível de 90% (Figura 16D). Dessa forma, todas as variáveis independentes apresentaram efeitos positivos para o teor de carotenóides. Assim, aumentando as variáveis independentes gera um aumento na variável dependente, no caso, o teor de carotenóides.

Na Tabela 10 verifica-se a média do teor de carotenóides recuperado na fase líquida. Não é encontrado diferença significativa ao nível de 10% para os experimentos 1, 2, 3 e 4. Percebe-se que o menor teor de carotenóides foi 1,73 mg β -criptoxantina/g massa seca, encontrado ao se utilizar o menor tempo de maceração (1h) e menor quantidade de enzima (50 μ L).

A maior recuperação de carotenóides encontrada foi no experimento 5, com média de 19,40 mg β -criptoxantina/g massa seca, apresentando diferença significativa em relação aos outros experimentos. Esta recuperação utilizou 150 μ L do complexo enzimático, 3h de maceração a uma temperatura de 35°C.

Tabela 10 –Média do teor de carotenóides dos experimentos na fase líquida.

<i>Experimento</i>	<i>Variáveis</i>			<i>Teor de carotenóides (mg β-criptoxantina/g massa seca)</i>
	<i>Quantidade (μL)</i>	<i>Tempo (h)</i>	<i>Temperatura ($^{\circ}$C)</i>	
1	50	1	35	1,73 ^a
2	50	3	25	3,42 ^a
3	100	2	30	2,36 ^a
4	150	1	25	3,12 ^a
5	150	3	35	19,40 ^b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, ao nível de 10% de significância, pelo Teste de Tukey.

Segundo Rodrigues e Iemma (2005), o planejamento experimental vem sendo utilizado com o objetivo de aprimorar metodologias analíticas, como maior extração de compostos, maior resolução em picos de cromatografia e minimização de reagentes caros. Dentro deste contexto, verifica-se que as variáveis avaliadas obtiveram resultados positivos para o objetivo maior deste trabalho, extração de carotenóides por via enzimática.

5.4.2. Fase sólida

Na fase sólida percebe-se que não houve diferença significativa ao nível de 10% para os experimentos (Tabela 10).

Percebeu-se que os experimentos que utilizou 50 μ L e 100 μ L do complexo em 1h e 2h de maceração, respectivamente, apresentaram teor de carotenóides superior quando relacionado ao controle. O controle consiste na quantidade de carotenóides na película antes da maceração. Este fato se deve ao favorecimento da maceração enzimática na extração de carotenóides. Ao se utilizar enzimas, estas favoreceram a quebra da parede celular e assim uma consequente liberação de carotenóides, que se encontram contidos nos cloroplastos. Ao se realizar a determinação de carotenóides na amostra controle, utilizou-se somente o processo mecânico, enquanto nas amostras maceradas além do processo mecânico a ação das enzimas esteve presente.

Tabela 11 - Média do teor de carotenóides dos experimentos na fase sólida.

<i>Experimento</i>			<i>Teor de carotenóides</i> (mg β -criptoxantina/g massa seca)
Controle			125 ^a
<i>Quantidade (μL)</i>	<i>Tempo (h)</i>	<i>Temperatura ($^{\circ}$C)</i>	
50	1	35	152 ^a
50	3	25	112 ^a
100	2	30	133 ^a
150	1	25	104 ^a
150	3	35	115 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, ao nível de 10% de significância, pelo Teste de Tukey.

Como se trata da película após a maceração, esta já possui um teor de carotenóides, o decréscimo deste teor vai depender da quantidade de carotenóides que foi recuperado na fase líquida. Assim, confirma-se que o maior teor de carotenóides encontrado foi ao se utilizar a menor quantidade de enzimas (50 μ L) e menor tempo (1h) e maior

temperatura (35°C). Em contrapartida, o menor teor de carotenóides encontrado foi ao se utilizar maior quantidade de enzimas (150µL).

Dentro deste contexto, verifica-se que houve passagem de carotenóides da casca para a fase líquida, no entanto, outras avaliações aumentando faixa de tempo, concentrações de enzimas a níveis aceitáveis e até mesmo fixando uma temperatura podem ainda serem realizadas para aperfeiçoar o processo estudado.

6. CONCLUSÕES

- A película comestível de cajá apresenta caracterização físico-química mais rica em termos de proteína e lipídios que a polpa de cajá.
- As preparações enzimáticas apresentaram atividades pectinolíticas, xilanolítica, amilolíticas e celulolíticas.
- A razão película:água adequada para a maceração foi de 1:4, assim como o tempo de trituração mais eficiente foi de 30s.
- A preparação enzimática Pectinex XXL mostrou-se mais eficiente na maceração da película comestível de cajá, provavelmente devido ao seu maior conteúdo de pectinoliase.
- É possível extrair carotenóides de película comestível de cajá através de hidrólise enzimática utilizando meio aquoso.
- A condição de melhor recuperação de carotenóides utilizou 150 μ L do complexo enzimático, 3h de maceração a uma temperatura de 35°C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T.S.; ABREU, L.N.; ROSSETTI, A.G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 1, p. 56-58, 2003.

A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official Methods of Analysis**. 13 ed. Washington, 1980, p. 435-436 e 858.

A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official Methods of Analysis**. 11 ed. Washington, 1992.

AQUINO, A.C. **Otimização da maceração enzimática da polpa de bacuri (*Platonia insignis* mart.)**. 2008. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BOSCO, J.; SOARES, K.T.; FILHO, S.P.A.; BARROS, R.V. **A cultura da cajazeira**. João Pessoa: EMEPA-PB. Documentos, 28, 2000.

BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdH* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2007.

BRANDÃO, E.M.; ANDRADE, C.T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol.9, n.3, p.38-44, 1999.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, Dec. 2007.

CARVALHO, P.G.B.; MACHADO C.M.M.; MORETTI C.L.; FONSECA, M.E.N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, 24, p.397-404, 2006.

CASTILHO, L.R.; COELHO, M.A.Z; COURI, S.; LEITE, S.G.F.; MEDRONHO, R.A. Escolha de linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de pectinases e caracterização do complexo enzimático obtido. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1996, Rio de Janeiro. **Anais...**, 1996.

CASTRO, G. Fruticultura lidera produção. **Diário do Nordeste**, Fortaleza, 09 jul. 2009. Disponível em: <<http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=652997>> Acesso: 21/01/2010.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2ª ed. revista e ampliada, Lavras: UFLA, 2005.

CODNER, R.C. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. **Journal of Applied Bacteriology**, v.84, p.147-160, 2001.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia Enzimática**. EPUB, FAPERJ, Petrópolis, RJ, 2008.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 1993. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) – Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 1993.

DELGADO, L.; TREJO, B.A.; HUITRÓN, C.; AGUILAR, G. Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p.515-519, 1992.

DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v.50, p.245-276, 1999.

DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F.; LIMA, L.C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p. 342-350, 2003.

FONSECA, M.J.O.; LEAL, N.R.; CENCI, S.A.; CECON, P.R.; BRESSAN-SMITH, R.E.; BALBINO, J.M.S. Evolução dos pigmentos durante o amadurecimento de mamão ‘sunrise solo’ e ‘golden’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 451-455, 2007.

FRY, S.C. **The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis**. London: Longman Scientific and Technical, 246 p., 1988.

GLOBO RURAL, 2007. **Cajá e cajarana**. Disponível em:
<http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=15137> Acesso:
07/01/2010

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W.; ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 36: 701-707, 1992.

HIANE, P.A.; BOGO, D.; RAMOS, M.I.L.; FILHO, M.M.R. Carotenóides pró-vitamínicos e a composição em ácido graxos do fruto e da farinha do bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p. 206-209, 2003.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, v.27, p.42-49, 1962.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo, Vol. 1, 533p., 1985.

KHANNA, P.K.; SETHI, R.P.; TEWARI, H.K. Production poligalacturonase and pectin methyl esterase by *Aspergillus niger* C1. **Journal of Research. Punjab Agricultural University**, v. 18, n. 4, p. 415-420, 1981.

LEITÃO, M.C.A.; SILVA, M.L. A.; JANUÁRIO, M.I.N.; AZINHEIRA, H.G. Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.165-169, 1995.

LEON, I.; SHAW, P.E. Spondias: The red monbim and related fruits. In. NAGY, S.; SHAW, P.E.; WARDOWSKI, W.F. **Fruits of tropical and subtropical origin - Composition, Properties and Uses**. Lake Alfred: Florida Science Source, p.116-126, 1990.

LIMA, N.; MOTA, M. **Biotechnologia – Fundamentos a aplicações**. Lisboa: Lidel – edições técnicas, 2003.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.447-450, 2002.

MACNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**. Palo Alto, v.53, p. 625-663, 1984.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of Medium Composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p.693-702, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MOURA, C.L.A. **Maceração enzimática da polpa de cajá (*Spondias mombin* L.)**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

NESTEL, P.; NALUBOLA, R. **β -carotene in fruits is more bioavailable than that in vegetables**. ILSI Human Nutrition Institute, 2003. Disponível em: <http://www.foodsecurity.gov.kh/docs/ENG/FS12-Beta-Carotene-Fruits%20vs%20Vegetables-ENG.pdf>> Acesso: 08/01/2010.

NOVO NORDISKY. **Dextrozyme® E – mais dextrose, mais rápido. A capacidade de degradar uma maçã**. Editora Dorthe Naundrup Hansen, ano XIV, n. 1, 1999.

NOVOZYMES. **A maneira avançada de extrair suco**. Editora Dorthe Naundrup Hansen, ano XVIII, n. 2, 2003.

NOVOZYMES. **A revolução da panificação**. Editora Dorthe Naundrup Hansen, ano XVII, n. 4, 2002.

NOVOZYMES. **Biotimes**. Editora Susanne Strand, ano XX, n. 1, 2005.

OLIVEIRA, M.E.B.; GUERRA, N.B.; BARROS, L.M.; ALVES, R.E. **Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT. Documentos, 113, 2008.

PAIVA, E.P. **Constituintes da parede celular de duas cultivares de mamão: influência do estágio de maturação**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J.R.; COSTA, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhido em quatro estádios de maturação. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.24, n.4, p.1079-1083, 2000.

PINTO, G.A.S. **Procedimento operacional padrão – Determinação da atividade de α -amilase, poligalacturonase, celulase e invertase**. v 1, 2, 3 e 4. p. 1-5, 2002.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A Guide to carotenoid analysis in foods**. Washington (DC): International Life Sciences Institute Press; 1999a.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. Carotenóides e valor nutritivo de Vitamina A em cajá (*Spondias lutea* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.9, n.2, p.148-162, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., **Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A em Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados**. Tradução: Saturnino de Pablo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1999b.

ROMERO-CASCALES, I.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I.; ROS-GARCÍA, J.M.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; GÓMEZ-PLAZA, E. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 43, p. 1295–1305, 2008.

SACRAMENTO, C.K. do; SOUZA, F.X. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**, Série Frutas Nativas, 4, 42 p, Jabuticabal - Funep, 2000.

SCHIEBER, A.; FÜGEL, R.; HENKE, M.; CARLE, R. Determination of the fruit content of strawberry fruit preparations by gravimetric quantification of hemicelluloses. **Food Chemistry**, v. 91, p. 365-371, 2005.

SANTOS, E.O.; FERRAZ, Z.M.L. **Agrossíntese - O bom desempenho da fruticultura baiana**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/agrossintese_BaAgricV7N2.asp> Acesso: 20/11/2009.

SENTANIN, M.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de carotenóides em mamão e pêsego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(1): 13-19, 2007.

SILVA, A.P.V; MAIA, G.A.; OLIVEIRA, G.S.F.; FIGUEIREDO, R.W.; BRASIL, I.M. Características de qualidade do suco polposo de cajá (*Spondias lutea* L.) obtido por extração mecânico-enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.233-236, 1997.

SILVA, A.P.V.; MAIA, G.A.; OLIVEIRA, G.S.F.; FIGUEIREDO, R.W.; BRASIL, I.M. Estudo da produção do suco clarificado de cajá (*Spondias lutea* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, Campinas, 1999.

SILVA, A.S. **Avaliação da secagem do bagaço de cajá usando planejamento fatorial composto central**. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SUN, Y.; WANG, Z.; WU, J.; CHEN, F.; LIAO, X.; HU, X. Optimising enzymatic maceration in pretreatment of carrot juice concentrate by response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1082-1089, 2006.

TIBURTINO-SILVA, L.A.; BRITO, V.H.S.; REZENDE, I.W.; CEREDA, M.P.; Comparações entre metodologias para extração de pectina em maracujá (*Passiflora edulis* flavicarpa). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 3, p. 53-56, 2008.

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

VIANA, E.S.; OLIVEIRA, L.A.; SOUSA, M.R.; SILVEIRA, A.P.P.; LEAL, L.R.S.; GOMES, R.B. Caracterização de frutos de umbu-cajazeira para consumo *in natura* e processado. In: XVI Encontro Nacional e II Encontro Latino Americano de Analista de Alimentos, 2009, Belo Horizonte. **Anais...**, 2009.

YADAV, S., YADAV, P.K., YADAV, D., YADAV, K.D.S. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1–10, 2009.

ZETELAKI-HORVATH, K.. Factors affecting pectin lyase activity. **Acta Alimentaria**, v.11, n.1, p.21-29, 1982.