



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

VIRNA LUIZA DE FARIAS

AUMENTO DO RENDIMENTO DO EXTRATO DE PIMENTA (*Capsicum frutescens* L.): UTILIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS.

FORTALEZA

2013

VIRNA LUIZA DE FARIAS

AUMENTO DO RENDIMENTO DO EXTRATO DE PIMENTA (*Capsicum frutescens* L.): UTILIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Pesquisador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Co-orientadora: Pesquisadora Dr^a Deborah dos Santos Garruti

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F238a Farias, Virna Luiza de.
Aumento do rendimento do extrato de pimenta (*Capsicum frutescens* L.) : utilização de preparações enzimáticas comerciais / Virna Luiza de Farias. – 2013.
152 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.
Coorientação: Profa. Dra. Deborah dos Santos Garruti.
1. Pimenta tabasco. 2. Engenharia Química. I. Título.

VIRNA LUIZA DE FARIAS

AUMENTO DO RENDIMENTO DO EXTRATO DE PIMENTA (*Capsicum frutescens* L.): UTILIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 08/03/2013

BANCA EXAMINADORA



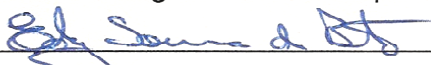
Pesquisador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Orientador)

EMBRAPA Agroindústria Tropical



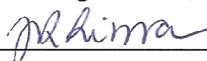
Pesquisadora Dr^a Deborah dos Santos Garruti (Co-orientadora)

EMBRAPA Agroindústria Tropical



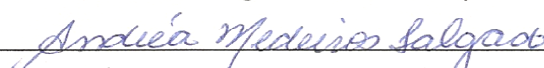
Pesquisador Dr. Edy Souza de Brito

EMBRAPA Agroindústria Tropical



Pesquisadora Dr^a Janice Ribeiro Lima

EMBRAPA Agroindústria Tropical



Prof^a Dr^a Andréa Medeiros Salgado

(UFRJ/Escola de Química)

Aos meus pais

À comunidade científica

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente na minha vida iluminando meus caminhos.

Aos meus pais, por toda a dedicação empregada nos meus estudos, e pelo apoio e incentivo sempre.

Ao pesquisador da Embrapa Dr. Gustavo Saavedra, por ter mais uma vez aceitado ser meu orientador, pela amizade, confiança no meu trabalho e conhecimentos repassados, de grande importância para a minha vida acadêmica e profissional.

À pesquisadora da Embrapa Deborah Garruti, pela co-orientação, pela contribuição nos testes sensoriais e paciência na discussão dos resultados.

Ao pesquisador da Embrapa Edy Brito, pelos conhecimentos repassados e contribuições nos meus trabalhos desde a graduação. Agradeço pela colaboração na discussão dos resultados, pela ajuda nas análises de capsaicinoides quando precisei, e pelas correções na qualificação.

À pesquisadora da Embrapa Ana Paula Dionísio, pela ajuda nas análises de carotenoides, e pelas contribuições na qualificação.

À pesquisadora da Embrapa Janice Lima e à professora Andréa Salgado por terem aceitado participar da minha banca de defesa, contribuindo para a melhoria do meu trabalho.

Aos professores da pós-graduação da Engenharia Química da UFC, pelos conhecimentos repassados. Agradeço especialmente ao professor Fabiano Fernandes, pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos amigos do laboratório de Bioprocessos, uma grande família, com os quais compartilhei bons momentos durante o período dos meus experimentos: Adriana Crispim, Ana Paula Colares, Andréa Cardoso, Carina Lemos, Caroline Gondim, Cívita Sousa, Cyntia Ladyane, Denise Rêgo, Diego Menezes, Genilton Júnior, Helder Levi, Janaina Vieira, Kally Sousa, Leise Soares, Luciana, Manuella Macêdo, Marcus Paulo, Mariza Vieira, Natália Lima, Rakel Hina, Renata Débora, Rosa Abreu, Ruann Janser, Simone Semionato, Suzanne e Verônica Lopes. Todos foram importantes, contribuindo para deixar o ambiente de trabalho mais animado e agradável, além de terem me proporcionado a oportunidade de aprender a conviver com as diferenças, de ceder em favor do próximo, de dizer "não" quando necessário,

de compartilhar conhecimentos e de momentos inesquecíveis durante os congressos.

Ao meu querido grupo da maceração enzimática: Andréa, Carina, Cyntia, Janaina e Renata, pela união e apoio sempre. Agradeço especialmente à Janaina, pela amizade, pelas inúmeras ajudas nos processamentos de pimenta, pelas caronas para a Embrapa ou para momentos de descontração.

A todos os meus colegas de laboratório que me ajudaram nos dias de processamento de pimenta, seja na retirada dos pedúnculos ou na obtenção da polpa.

À querida e supercompetente Natália Moura pela amizade, carinho, compartilhamento de conhecimentos, pelos favores nos dias em que eu não podia comparecer à Embrapa, e pela ajuda constante que foram de fundamental importância nos experimentos.

À Ídila pelo seu bom humor constante e por sempre estar disponível a ajudar, sem medir esforços, tanto nas análises físico-químicas quanto nas sensoriais.

Aos estagiários do Laboratório de Análise Sensorial Darline, Renier e Eric, pelos momentos de descontração e pelo apoio e ajuda nas análises sensoriais de molhos de pimenta.

A todos os provadores que participaram dos testes sensoriais de molho de pimenta.

Ao Laboratório de Microbiologia da Embrapa Agroindústria Tropical, pelas análises microbiológicas dos molhos de pimenta submetidos aos testes sensoriais.

À minha amiga Milena Coelho, pela amizade, apoio, incentivo e companheirismo durante todos esses 15 anos.

Aos meus amigos do IFCE de Limoeiro do Norte: Ana Erbênia, Ariosvana, Dani, Juliana Zani, Lívia, Rômmulo e Venicio; pelo apoio constante e pelos momentos de descontração em Limoeiro, tornando o ambiente de trabalho bem mais agradável e menos cansativa a rotina Fortaleza-Limoeiro.

Ao professor Ícaro Gusmão e ao Rafael, pela oportunidade de realizar a extração da capsaicina no PADETEC, utilizada posteriormente como padrão para as análises de capsaicinoides.

Ao departamento de Engenharia Química da UFC pela oportunidade de realizar meu doutorado.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por ceder suas instalações e equipamentos para a realização da parte experimental da minha tese.

À Agropecuária Avaí pelo fornecimento de amostras de pimenta tabasco.

À Novozymes, pelas preparações enzimáticas cedidos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao IFCE *Campus* Limoeiro do Norte, pela flexibilização dos meus horários de trabalho, permitindo a conclusão dos meus experimentos.

RESUMO

Além de possuírem compostos benéficos para a saúde humana, as pimentas são muito apreciadas pela sua pungência. Devido a sua elevada conveniência, uma maneira muito popular de consumo de pimentas vermelhas é na forma de molhos, cujas técnicas de produção variam dependendo da empresa. O objetivo geral deste trabalho foi estudar a maceração enzimática de polpa de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.) para aumentar o rendimento do seu extrato, permitindo um novo processo para a elaboração do molho. Foram avaliados a influência do sal na fermentação autóctone da polpa de pimenta, a maceração enzimática da polpa, a fermentação da polpa previamente macerada e o rendimento em extrato a partir da polpa tratada com enzimas e da não tratada. De acordo com cada experimento, os parâmetros analisados foram: microbiota autóctone, atividade de enzimas endógenas, cor, consistência, concentração de carotenoides e de capsaicinoides. Por fim os molhos elaborados com os extratos provenientes das polpas macerada e não macerada foram analisados sensorialmente. A adição de sal à polpa de pimenta reduziu a população das bactérias ácido-láticas heterofermentativas, resultando na ausência de gás durante o processo fermentativo. A maceração em erlenmeyers sob agitação, em tempos superiores a 6 horas, provocou alteração da cor e do odor da polpa, além do crescimento de fungos aeróbicos. As condições para a maceração enzimática que resultaram em maior redução de consistência foram: frascos de vidro tampados, adição de 20% de água (m/m polpa), $1000 \mu\text{L/g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e de Celluclast a 50°C , sem agitação. O tratamento enzimático antes da fermentação resultou em uma polpa com coloração mais vermelha e escura, com separação de fases e maior rendimento de extrato. Os molhos elaborados a partir da polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2) apresentaram aceitação de cor e características de sabor e aroma semelhantes, entretanto o Molho 2 apresentou maior intensidade de aroma frutal e menor ardência ($p < 0,05$). Ainda que a maceração enzimática da polpa de pimenta tenha promovido maior rendimento em extrato e boa recuperação de capsaicinoides, o molho formulado a partir dessa polpa não foi o mais aceito pelos julgadores, devido os consumidores de pimenta, em geral, serem apreciadores da ardência em molhos de pimenta, e a maceração enzimática ter causado a redução da percepção desse atributo. Entretanto vale

ressaltar que os molhos foram igualmente aceitos quanto ao sabor. Assim, essa tecnologia pode ser aplicada para aumentar o rendimento de extrato de pimenta, com menos geração de resíduos, e produzir molhos de pimenta com menor pungência, para agradar a um público que não aprecia a elevada ardência dos molhos de pimenta tradicionais.

Palavras-chave: tabasco, maceração enzimática, fermentação autóctone.

ABSTRACT

Besides having beneficial compounds to human health, peppers are well appreciated for its pungency. Due to its high convenience, a very popular way of consumption of red peppers is in the form of sauces, which production techniques vary depending on the company. The aim of this work was to study the enzymatic maceration of tabasco pepper pulp (*Capsicum frutescens* L.) in order to increase the yield of its extract, allowing a new process for the preparation of the sauce. We evaluated the influence of the salt on the autochthonous fermentation; the enzymatic maceration of the pulp; the fermentation of the pulp previously macerated, and the yield of the extract from pulps treated and not treated with enzymes. According with each experiment, the analyzed parameters were: autochthonous microbiota, endogenous enzymes activity, color, consistency, carotenoids and capsaicinoids concentrations. Finally, the sauces prepared with the extracts from both macerated and non-macerated pulps were sensorially analyzed. Adding salt to the pepper pulp reduced the population of heterofermentative lactic-acid bacteria, resulting in the absence of gas during the fermentation process. Enzymatic maceration in Erlenmeyer flasks under stirring, at times greater than 6 hours, resulted in changes of the pulp color and odor, and favored the growth of aerobic fungi. The conditions for the enzymatic maceration which resulted in greater reduction of pulp consistency were: capped glass vials, addition of 20% water (w/w pulp), $1000 \mu\text{L}\cdot\text{g}_{\text{pulp}}^{-1}$ Pectinex AR and Celluclast at 50°C , without stirring. The enzymatic treatment prior to fermentation resulted in a darker red pulp, with phase separation and a higher extract yield. Sauces made from the not macerated (Sauce 1) and macerated (Sauce 2) pepper pulps showed similar acceptability for color and similar aroma and flavor characteristics, however Sauce 2 showed higher intensity of fruity aroma and lower burning sensation ($p < 0.05$). Although the enzymatic maceration of the pepper pulp have promoted higher extract yield and good capsaicinoids recovery, the sauce made from this pulp was not the most accepted by the panelists, mostly because the general pepper consumers appreciate the burning sensation in pepper sauces, and the enzymatic maceration have caused a reduction in the perception of that attribute. However, it is noteworthy that the sauces were equally accepted in terms of flavor. Thus, this technology can be applied to increase the yield of pepper extract, with less waste, and produce

pepper sauce with less burning sensation, in order to please consumers that dislike it in the traditional pepper sauces.

Keywords: tabasco, enzymatic maceration, autochthonous fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pimenta tabasco (<i>Capsicum frutescens</i> L.).	23
Figura 2 - Estrutura molecular dos capsaicinoides e seus análogos.	25
Figura 3 - Principais carotenoides das pimentas vermelhas.	27
Figura 4 - Parede celular vegetal e seus constituintes.	31
Figura 5 - Estrutura molecular da pectina.	32
Figura 6 - Modo de ação das principais enzimas pectinolíticas.	35
Figura 7 - Produção da polpa de pimenta, obtida da trituração das pimentas sem pedúnculos em liquidificador industrial.	38
Figura 8 - Frasco de vidro com tampa de metal utilizado nos experimentos de maceração enzimática.	39
Figura 9 - A: Cromatograma da oleorresina em HPLC semipreparativo, com tempo de retenção de 5,3 minutos; B: Espectro de absorção no ultravioleta.	43
Figura 10 - Cromatograma do padrão inicial, com informações conhecidas, utilizado para comparação com outras amostras.	44
Figura 11 - Cromatograma do padrão recém-extraído.	44
Figura 12 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PCF (Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação).	57
Figura 13 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PCFA (Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação-Água).	58
Figura 14 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PACF (Polpa-Água-Cloreto de sódio-Fermentação).	59
Figura 15 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PAMCF (Polpa-Água-Maceração enzimática-Cloreto de sódio-Fermentação).	60
Figura 16 - Esquema ilustrativo das etapas do experimento de cálculo do rendimento em fase líquida de pimenta: A: Lavagem das pimentas sem pedúnculo; B: Maceração enzimática da formulação D em shaker sem agitação; C: Polpas fermentando em B.O.D. a 30°C; D: Resíduo resultante da separação; E: Extrato obtido da separação.	61
Figura 17 - Comparação visual entre as polpas de pimenta sem e com sal, respectivamente.	71
Figura 18 - Perfis de pH e acidez das polpas de pimenta.	72
Figura 19 - Atividade de pectinametilsterase (PME) nas polpas de pimenta sem e com sal.	73
Figura 20 - Concentração de grupos redutores (GRT) nas polpas de pimenta.	74
Figura 21 - Carotenoides totais nas polpas de pimenta fermentadas.	75
Figura 22 - Polpa de pimenta sem sal no tempo inicial e polpas fermentadas após 1, 2, 3, 4, 6 e 9 semanas, respectivamente.	77
Figura 23 - Polpa de pimenta com sal no tempo inicial e polpas fermentadas após 1, 2, 3, 4, 6 e 9 semanas, respectivamente.	77
Figura 24 - Capsaicinoides totais das polpas de pimenta durante a fermentação.	78
Figura 25 - Escoamento da polpa de pimenta com diferentes concentrações de água.	81
Figura 26 - Análise de consistência em consistômetro de Bostwick. A: Amostra apresentando a separação das fases aquosa e polposa (sinerese) e B: Amostra homogênea.	83
Figura 27 - Escoamento das fases polposa e aquosa em consistômetro de Bostwick em vários tempos de maceração enzimática com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL.	84
Figura 28 - Grupos redutores totais ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL em até 6 horas.	85
Figura 29 - Variação do pH ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L.g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL em até 6 horas.	86
Figura 30 - Escoamento das fases aquosa e polposa em consistômetro de Bostwick após 24 a 96 horas de maceração enzimática com 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL.	87

Figura 31 - Grupos redutores totais ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL de 24 a 96 horas. _____	88
Figura 32 - Polpa de pimenta A : Condição inicial; B : Polpa macerada enzimaticamente por 96 horas. _____	88
Figura 33 - Variação do pH ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L}\cdot\text{g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL de 24 a 96 horas. _____	89
Figura 34 - Comparação do efeito da maceração entre quatro enzimas pectinolíticas com adição de 15% de água. _____	90
Figura 35 - Comparação do efeito da maceração entre quatro enzimas pectinolíticas com adição de 20% de água. _____	90
Figura 36 - Comparação do efeito da maceração entre duas enzimas pectinolíticas com adição de 20% de água. _____	91
Figura 37 - Escoamento das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente com 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e Celluclast de 6 a 24 horas. _____	93
Figura 38 - Polpa de pimenta macerada enzimaticamente com a combinação Pectinex AR e Celluclast durante 18 horas. _____	94
Figura 39 - Escoamento da polpa de pimenta em diferentes temperaturas de maceração enzimática. _____	97
Figura 40 - Capsaicinoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas. _____	98
Figura 41 - Polpas de pimenta maceradas enzimaticamente, em duplicata, a 30, 40, 50 e 60°C, respectivamente. _____	100
Figura 42 - Contagem de microrganismos em placa: A : Colônias de bactérias ácido-láticas, com produção de ácido representada pelo halo esverdeado, em meio HHD; B : Colônias de leveduras em meio Agar batata dextrose. _____	103
Figura 43 - Variação do pH e da acidez total titulável ao longo da fermentação das polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS) durante 6 semanas. _____	104
Figura 44 - Variação dos grupos redutores totais (GRT) ao longo da fermentação das polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS) durante 6 semanas. _____	105
Figura 45 - Polpa macerada com sal (MCS), Polpa macerada sem sal (MSS), Polpa não macerada com sal (NMCS). _____	107
Figura 46 - Teor de carotenoides totais, expressos em zeaxantina, na Polpa macerada com sal (MCS), Polpa macerada sem sal (MSS), Polpa não macerada com sal (NMCS). _____	109
Figura 47 - Concentração de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina e capsaicinoides totais na polpa não macerada com sal (NMCS). _____	110
Figura 48 - Concentração de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina e capsaicinoides totais na polpa macerada com sal (MCS). _____	111
Figura 49 - Concentração de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina e capsaicinoides totais na polpa macerada sem sal (MSS). _____	111
Figura 50 - Formulações após o processo de maceração enzimática e/ou fermentação, em duplicata. _____	114
Figura 51 - Extratos obtidos da separação em peneira das formulações após o processo de maceração enzimática e/ou fermentação. _____	115
Figura 52 - Molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2) apresentando separação de fases. _____	118
Figura 53 - Descritores que caracterizam os molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2) para o atributo aroma. _____	119
Figura 54 - Descritores que caracterizam os molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2) para o atributo sabor. _____	120

- Figura 55** - Histograma de frequência da análise de aceitação da cor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2). _____ 122
- Figura 56** - Histograma de frequência da análise de aceitação do sabor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2). _____ 123
- Figura 57** - Histograma de preferência do sabor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2). _____ 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da polpa de pimenta sem sementes, em base úmida. _____	67
Tabela 2 - Caracterização da polpa de pimenta sem sementes, em base seca. _____	67
Tabela 3 - Populações de enterobactérias, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras nas polpas de pimenta. _____	69
Tabela 4 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos carotenoides totais das polpas de pimenta fermentadas. _____	76
Tabela 5 - Parâmetros de cor das polpas de pimenta durante a fermentação. _____	76
Tabela 6 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos capsaicinoides totais das polpas de pimenta fermentadas. _____	79
Tabela 7 - Caracterização das preparações enzimáticas comerciais. _____	79
Tabela 8 - Diferença do escoamento das polpas, com 20% de água, maceradas com 4 preparações enzimáticas diferentes, considerando-se a média de todos os tempos de maceração. _	91
Tabela 9 - Diferença do escoamento da polpa de pimenta macerada com Pectinex AR e Celluclast.	92
Tabela 10 - Diferença do escoamento da polpa de pimenta nos testes de maceração enzimática com Celluclast e com a combinação Pectinex AR e Celluclast. _____	95
Tabela 11 - Concentração de capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina) nas polpas maceradas com enzima pectinolítica e/ou celulolítica. _____	96
Tabela 12 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos capsaicinoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas. _____	98
Tabela 13 - Parâmetros de cor instrumental das amostras maceradas enzimaticamente em diferentes temperaturas e seus respectivos controles. _____	99
Tabela 14 - Populações de enterobactérias, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras nas polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS). _____	101
Tabela 15 - Parâmetros de cor instrumental das polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS). _____	106
Tabela 16 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos carotenoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas. _____	109
Tabela 17 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos capsaicinoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas. _____	112
Tabela 18 - Composição das formulações e rendimento em extrato após a separação da polpa de pimenta. _____	113
Tabela 19 - Carotenoides nos extratos obtidos da separação da fase líquida e resíduo das formulações. _____	116
Tabela 20 – Capsaicinoides totais nos extratos obtidos da separação da fase líquida do resíduo das formulações. _____	116
Tabela 21 - Resultados das análises para verificação da segurança microbiológica dos molhos de pimenta. _____	117
Tabela 22 – Valores de intensidade dos atributos de aroma dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2). _____	121
Tabela 23 - Valores de intensidade dos atributos de sabor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2). _____	121

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Pimentas	22
2.1.1	A espécie <i>Capsicum frutescens</i>	23
2.1.2	Capsaicinoides	24
2.1.3	Carotenoides	26
2.2	Produção de molho de pimenta	27
2.3	Fermentação autóctone de vegetais	29
2.4	A parede celular vegetal e a maceração enzimática	31
2.4.1	Enzimas de maceração	33
2.5	Análise sensorial de pimentas	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Material	37
3.1.1	Matéria-prima e obtenção da polpa	37
3.1.2	Preparações enzimáticas	38
3.1.3	Recipientes para a maceração enzimática	39
3.2	Determinações analíticas	39
3.2.1	Análises físico-químicas	39
3.2.1.1	Umidade	39
3.2.1.2	Extrato etéreo	39
3.2.1.3	Proteína	40
3.2.1.4	Cinzas	40
3.2.1.5	Grupos redutores totais	40
3.2.1.6	Capsaicinoides	40
3.2.1.7	Carotenoides totais	45
3.2.1.8	Resíduo insolúvel em álcool (AIR), Pectina, Hemicelulose e Celulose + Lignina	47
3.2.1.9	Determinação de acidez total titulável	47
3.2.1.10	Determinação do pH	47
3.2.1.11	Cor	47
3.2.1.12	Análise de consistência	48
3.2.2	Análises enzimáticas	48
4.2.2.1	Poligalacturonase (PG)	48
4.2.2.2	Pectinametilesterase (PME)	48
4.2.2.3	Pectinoliase (PL)	48
4.2.2.4	Xilanase	48
4.2.2.5	Celulase	48
3.2.3	Análises microbiológicas	48
3.2.3.1	Enterobactérias	48

3.2.3.2 Bactérias ácido-láticas	48
3.3.2.3 Bolores e leveduras	48
3.2.4 Análise estatística	49
3.3 Experimentos	49
3.3.1 Comparação entre o processo fermentativo autóctone de polpa de pimenta tabasco (<i>Capsicum frutescens</i> L.) com e sem adição de sal.	49
3.3.2 Estudo da maceração enzimática em polpa de pimenta tabasco (<i>Capsicum frutescens</i> L.).	50
3.3.2.1 Efeito da adição de água na maceração enzimática de polpa de pimenta.	50
3.3.2.2 Avaliação de uma preparação enzimática pectinolítica na maceração enzimática de polpa de pimenta.	50
3.3.2.3 Efeito da ação de enzimas pectinolíticas na maceração enzimática estática de polpa de pimenta.	51
3.3.2.4 Efeito da adição de celulase na maceração enzimática de polpa de pimenta com enzimas pectinolíticas.	52
3.3.2.5 Efeito da temperatura na ação das enzimas de maceração.	52
3.3.3 Fermentação da polpa de pimenta associada à maceração enzimática.	53
3.3.4 Avaliação do rendimento do processo.	54
3.3.5 Elaboração dos molhos de pimenta.	62
3.3.6 Análise sensorial dos molhos de pimenta.	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 Caracterização da polpa de pimenta.	67
4.2. Comparação entre o processo fermentativo autóctone de polpa de pimenta tabasco (<i>Capsicum frutescens</i> L.) com e sem adição de sal.	68
4.3 Caracterização dos preparações enzimáticas.	79
4.4 Estudo da maceração enzimática em polpa de pimenta tabasco (<i>Capsicum frutescens</i> L.).	81
4.4.1 Efeito da adição de água na maceração enzimática de polpa de pimenta.	81
4.4.2 Avaliação de uma preparação enzimática pectinolítica na maceração enzimática de polpa de pimenta.	82
4.4.3 Efeito da ação de enzimas pectinolíticas na maceração enzimática estática de polpa de pimenta.	89
4.4.4 Efeito da adição de celulase na maceração enzimática de polpa de pimenta com enzimas pectinolíticas.	92
4.4.5 Efeito da temperatura na ação das enzimas de maceração.	96
4.5 Fermentação da polpa de pimenta associada à maceração enzimática.	100
4.6 Avaliação do rendimento do processo.	112
4.7 Análise sensorial dos molhos de pimenta	117
5 CONCLUSÕES	125

6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	126
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
	APÊNDICE A – FICHA SENSORIAL UTILIZADA PARA ESCOLHA INICIAL DOS DESCRITORES DE AROMA E SABOR PARA MOLHO DE PIMENTA.	138
	APÊNDICE B – FICHA SENSORIAL DO TESTE DE ACEITAÇÃO DA COR E CARACTERIZAÇÃO DO AROMA E DO SABOR DOS MOLHOS DE PIMENTA.	139
	APÊNDICE C – FICHAS DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS TESTES DE ACEITAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE DESCRITORES PARA O SABOR DOS MOLHOS DE PIMENTA E TESTE DE PREFERÊNCIA, ELABORADAS NO SOFTWARE FIZZ.	140
	APÊNDICE D – FICHAS DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE DESCRITORES PARA O AROMA DOS MOLHOS DE PIMENTA, ELABORADAS NO SOFTWARE FIZZ.	144
	APÊNDICE E – CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS NAS POLPAS DE PIMENTA, EM DENSIDADE ÓTICA (D.O.).	147
	APÊNDICE F – PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DAS POLPAS DE PIMENTA FERMENTADAS.	148
	APÊNDICE G – PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DAS POLPAS MACERADAS ENZIMATICAMENTE EM DIFERENTES TEMPERATURAS E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES.	149
	APÊNDICE H – CAROTENOIDES TOTAIS DAS POLPAS NÃO MACERADA COM SAL (NMCS), MACERADA COM SAL (MCS) E MACERADA SEM SAL (MSS).	150
	APÊNDICE I - PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DAS POLPAS NÃO MACERADA COM SAL (NMCS), MACERADA COM SAL (MCS) E MACERADA SEM SAL (MSS).	151
	APÊNDICE J – PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DOS EXTRATOS DE CADA TRATAMENTO	152

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* (família Solanaceae) compreende cerca de 27 espécies conhecidas de pimenta (BONTEMPO, 2007), que são largamente cultivadas e utilizadas em todo o mundo (LEE *et al.*, 2008). Os atributos nutricionais e sensoriais, e a promoção de benefícios à saúde fazem destes vegetais um dos mais consumidos mundialmente. Os frutos de pimenta possuem um largo espectro de compostos antioxidantes, em particular, polifenóis, vitamina C, flavonoides e carotenoides (DI CAGNO *et al.*, 2009a). Os principais parâmetros de qualidade de pimentas são suas características de aroma, cor, e principalmente, pungência (LEE *et al.*, 2008).

Os capsaicinoides, encontrados somente no gênero *Capsicum* (SANATOMBI; SHARMA, 2008), são os compostos responsáveis pela ardência apresentada por muitas variedades de pimentas, sendo que o grau de pungência varia entre espécies e variedades (KRAIKRUAN *et al.*, 2008). Dentre os vários capsaicinoides, dois são predominantes: capsaicina (trans-8-etil-N-vanilil-6-nonenamida) e dihidrocapsaicina (8-metil-N-vanililnonanamida) (LIU *et al.*, 2010), os quais são responsáveis por cerca de 90% da pungência (PERUCKA; OLESZEK, 2000).

Todas as regiões brasileiras são produtoras e consumidoras de pimenta (*Capsicum* spp.), sendo a produção destinada tanto para o consumo *in natura* como para o processamento (DUTRA *et al.*, 2007). A área anual cultivada é de cerca de dois mil ha e os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. A produtividade média depende do tipo de pimenta cultivada, variando de 10 a 30 t/ha. A crescente demanda do mercado, estimado em 80 milhões de reais ao ano, tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas (doces e picantes) um dos mais importantes do país (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO, 2004).

Apesar de sua reconhecida importância econômica e social, a cultura da pimenta é pouco estudada no Brasil, em todas suas fases do sistema de produção. A busca por melhor qualidade, preços e custos têm exigido dos produtores maior eficiência técnica e econômica na condução dos sistemas de produção (MINAS GERAIS, 2012).

As pequenas e médias indústrias processadoras de pimentas são carentes de parâmetros químicos, físicos e microbiológicos de controle de qualidade. Os principais pontos de estrangulamento são a falta de qualidade das matérias-primas utilizadas, a ausência no mercado de equipamentos adequados para a produção em pequena escala, higiene precária durante o processamento e a necessidade de adequação dos processos de produção de conservas, molhos e outros produtos a base de pimenta (CARVALHO, 2007; DA COSTA; HENZ, 2004).

A fermentação ácido-lática de vegetais, usualmente utilizada como um método de biopreservação para a manufatura de produtos prontos e semiprontos, é uma biotecnologia importante para manter ou melhorar as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos, além de aumentar sua segurança microbiológica e, conseqüentemente, sua vida de prateleira (DI CAGNO *et al.*, 2009b).

Uma das opções tecnológicas para a fermentação ácido-lática de vegetais é a fermentação espontânea por bactérias ácido-láticas autóctones. Quando ocorre espontaneamente, a fermentação de vegetais é frequentemente caracterizada pela sucessão de bactérias ácido-láticas hetero e homofermentativas, em presença ou não de leveduras, responsáveis pelos processos de fermentação em várias etapas (DI CAGNO *et al.*, 2009b). A fermentação de pimentas é um processo complexo e dinâmico, dependente de vários fatores. Fatores intrínsecos da planta incluem a presença de enzimas e carboidratos disponíveis. Fatores extrínsecos como temperatura, pH, concentração de sal, exposição ao ar e contaminação microbiana também são importantes para tal processo (FLORES *et al.*, 2007).

O processo fermentativo de vegetais inicia-se com a adição de sal, em geral, o cloreto de sódio (CRISÓSTOMO *et al.*, 2008). Para a fabricação de molhos, as pimentas são normalmente trituradas juntamente com sal e fermentadas antes do processamento (KOH, 2005). O sal atua como agente de seleção para bactérias ácido-láticas homofermentativas, que rapidamente crescem e convertem açúcares fermentescíveis a ácido lático e outros produtos finais (MARUVADA; MCFEETERS, 2009). Também é utilizado para reduzir o tempo de fermentação, que artesanalmente, é muito lento (GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

Durante a fermentação o tecido vegetal é desintegrado por enzimas, dentre elas, a pectinametilesterase (PME), que atua especificamente quebrando grupos metila, resultando em cadeias lineares de pectina, encontradas em paredes

celulares, liberando ácido pécico, metanol e íons hidrogênio (FLORES *et al.*, 2007), causando o amolecimento do tecido vegetal.

Apesar haver inúmeras referências acerca da fermentação de pepino, repolho e azeitona, pouco se sabe a respeito da fermentação láctica da polpa de pimenta, sendo encontrados apenas relatos dispersos em bancos de informação disponível na rede mundial (CRISÓSTOMO, 2008). Poucos artigos sobre fermentação de pimenta com sal pela microbiota autóctone foram encontrados na literatura (GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2006; CRISÓSTOMO, 2008).

Segundo Servili *et al.* (2008) a fermentação natural é um processo imprevisível e mais demorado, resultando em produtos de baixa qualidade, com características sensoriais variáveis. Um entendimento da dinâmica microbiana durante a fermentação natural pode permitir uma fermentação mais rápida, a obtenção de um produto final de melhor qualidade (SILVA *et al.*, 2008), e a padronização da sua qualidade, além do desenvolvimento de novos produtos.

A aplicação de enzimas que degradam a parede celular representa uma nova tendência na produção de especiarias. A hidrólise enzimática de material vegetal é frequentemente aplicada para uma série de finalidades, como aumentar o rendimento durante o processamento de suco, aumentar a liberação de metabólitos secundários de plantas, para a recuperação de ingredientes funcionais em alimentos, e para o descascamento de frutas (SCHWEIGGERT; CARLE; SCHIEBER, 2007).

Segundo Schweiggert, Carle e Schieber (2007), para a elaboração de preparações pastosas, como especiarias em geral, a hidrólise enzimática da parede celular também pode ser utilizada como uma alternativa à moagem. As primeiras tentativas de utilização de preparações enzimáticas na tecnologia de especiarias foram na extração de oleorresinas e na decorticação de pimentas verdes.

Apesar de relatos da aplicação de enzimas de maceração em pimentas, não há na literatura estudos aprofundados sobre esse tema e nem sobre o efeito da maceração enzimática nos produtos elaborados a partir da polpa tratada enzimaticamente e fermentada.

Diante disso, objetivo geral deste trabalho foi estudar a maceração enzimática de polpa de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.) para aumentar o

rendimento do seu extrato, permitindo um novo processo para a elaboração do molho.

Os objetivos específicos foram:

- a.** Estudar o processo de fermentação autóctone de polpas de pimenta previamente maceradas enzimaticamente e não maceradas, avaliando também o efeito do sal, nas características microbiológicas e físico-químicas das polpas;
- b.** Buscar condições adequadas para a maceração enzimática de polpa de pimenta, estudando variáveis como: adição e quantidade de água, tempo de maceração enzimática, temperatura de incubação, avaliando características físico-químicas da polpa;
- c.** Avaliar o efeito da maceração enzimática da polpa de pimenta no rendimento do líquido base (extrato), utilizado na produção do molho de pimenta;
- d.** Caracterizar e avaliar sensorialmente os molhos de pimenta produzidos partindo-se da polpa macerada e não macerada enzimaticamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pimentas

Existem basicamente dois gêneros de pimenta mais conhecidos, o *Piper* e o *Capsicum*. As pimentas do gênero *Piper* são as mais antigas, utilizadas em tempos remotos somente no Oriente. São sementes de plantas da família das piperáceas, tendo como a mais conhecida a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), como é conhecida no Brasil (BONTEMPO, 2007).

O gênero *Capsicum* compreende cerca de 27 espécies conhecidas. As pimentas desse gênero pertencem à família das solanáceas, da qual também fazem parte a berinjela, a batata, o tabaco, o pimentão, como é conhecido no Brasil, ou “pimento”, em Portugal (BONTEMPO, 2007). As pimentas do gênero *Capsicum* estão entre os vegetais e especiarias mais antigos e populares do mundo (GUZMAN *et al.*, 2010).

As pimenteiras são nativas da América, mas sua origem exata é controversa; alguns pesquisadores acreditam que elas surgiram na Bacia Amazônica, enquanto outros afirmam que elas se originaram na América Central ou ainda no México. Na América, as pimentas parecem ter surgido há 7.000 anos a.C. na região do México Central (BONTEMPO, 2007).

Os frutos de pimenta variam em cores, apresentando-se inicialmente verdes, marfins ou amarelos, adquirindo após o amadurecendo uma variedade de cores incluindo marrom, laranja, vermelho, violeta ou amarelo (GUZMAN *et al.*, 2010).

As características de pungência e aroma, juntamente com sua grande variedade de cores, formas e tamanhos favorecem o uso de pimentas na elaboração de vários alimentos (DI CAGNO *et al.*, 2009a). Além disso, as pimentas são utilizadas para a manufatura de produtos desidratados, pimentas em conserva, pastas e pimentas cortadas para serem consumidas cruas, como saladas ou para ser usadas em pizzas (DI CAGNO *et al.*, 2009a).

2.1.1 A espécie *Capsicum frutescens*

Capsicum frutescens, comumente conhecida como pimenta vermelha, é uma das pimentas mais usadas na culinária e na medicina popular brasileira, além de ser utilizada como matéria prima nas indústrias farmacêuticas (DUARTE *et al.* 2004; BONTEMPO, 2007). É consumida in natura, em conserva e na forma de molhos líquidos (CARVALHO *et al.*, 2006).

Os frutos são pequenos e vermelhos, de formato alongado quando maduros; têm aroma e sabor forte e são bastante picantes (Figura 1), sendo utilizados numa grande variedade de pratos na culinária baiana (BONTEMPO, 2007). No Brasil, é a pimenta picante mais conhecida e consumida (LOPES; OKURA, 2005). Plantada em todo o país, destacam-se os cultivos nos estados de Minas Gerais, Bahia e Ceará (CARVALHO, 2007).

Figura 1 - Pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.).



Fonte: Crisóstomo *et al.* (2008).

A espécie *Capsicum frutescens* é muito conhecida pela denominação de malagueta (LOPES; OKURA, 2005), que em Portugal e em Moçambique é conhecida ainda como “piri-piri”, mais consumida na Europa, na sua forma desidratada (BONTEMPO, 2007). Nos Estados Unidos é chamada de tabasco (CARVALHO *et al.*, 2006).

A pimenta tabasco é conhecida mundialmente pelo molho de pimenta que leva seu nome (CARVALHO, 2007; HENRIQUE *et al.*, 2003). No Brasil, mais

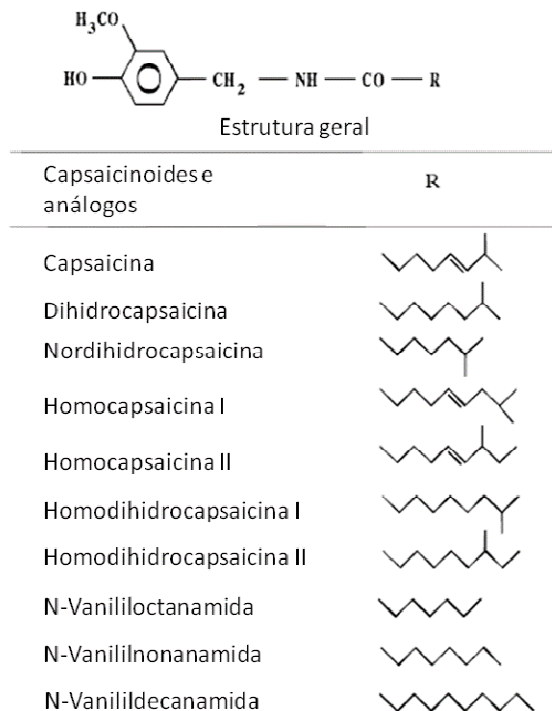
especificamente no estado do Ceará, ela está sendo cultivada e processada objetivando a exportação (CARVALHO *et al.*, 2006).

2.1.2 Capsaicinoides

Os capsaicinoides são compostos fenólicos responsáveis pelo sabor pungente ou picante em pimentas (DA COSTA *et al.*, 2010), e estão presentes somente em pimentas do gênero *Capsicum* (LEE *et al.*, 2008). Dentre os capsaicinoides (Figura 2), capsaicina (trans-8-etil-N-vanilil-6-nonenamida) e dihidrocapsaicina (8-metil-N-vanililnonanamida) são responsáveis por aproximadamente 90% da pungência (PERUCKA; OLESZEK, 2000; CONTRERAS-PADILLA; YAHIA, 2008).

Além de serem ingredientes de sabor, a aplicação dos capsaicinoides na medicina, toxicologia e como repelente já foi relatada na literatura (SCHWEIGGERT; SCHIEBER; CARLE, 2006). São caracterizados por uma elevada atividade biológica e sua eficácia farmacológica, neurológica e dietética é bem conhecida. Mesmo em baixas concentrações, mostram um efeito positivo no metabolismo dos carboidratos (PERUCKA; OLESZEK, 2000). São potentes analgésicos, anti-inflamatórios e antioxidantes (LEE *et al.*, 2008).

Bennett e Kirby (1968) analisaram uma amostra de pimenta (*Capsicum annum*), que apresentou 69% de capsaicina, 22% de dihidrocapsaicina, 7% de nordihidrocapsaicina, 1% de homocapsaicina e 1% de homodihidrocapsaicina. Por terem sido encontrados em maiores concentrações, capsaicina e dihidrocapsaicina foram considerados capsaicinoides principais, enquanto os outros foram considerados capsaicinoides menores. Segundo Schweiggert; Schieber; Carle (2006), capsaicinoides menores estão presentes em concentrações baixas e não contribuem significativamente para a pungência (SCHWEIGGERT; SCHIEBER; CARLE, 2006).

Figura 2 - Estrutura molecular dos capsaicinoides e seus análogos.

Fonte: Contreras-Padilla e Yahia (2008).

Nos estudos de Zewdie e Bosland, (2001), a máxima concentração de capsaicinoides foi detectada quatro semanas após a floração dos frutos de pimenta. Contreras-Padilla e Yahia (1998) verificaram que a concentração de capsaicinoides decresceu após atingir um nível máximo, com o aumento da atividade de peroxidase; sugerindo que os capsaicinoides podem ser degradados por essa enzima.

Inicialmente o teste organoléptico de Scoville era usado para medir a pungência de pimentas, que se dava em unidades Scoville (SHU) (SANATOMBI; SHARMA, 2008). Entretanto esse teste mede subjetivamente a pungência ao invés da avaliação da concentração de capsaicinoides (REILLY; CROUCH; YOST, 2001).

O método desenvolvido por Wilbur L. Scoville consistia em macerar a pimenta "over night" em álcool, agitação e filtração para obtenção de uma solução alcoólica. Essa solução era adicionada a uma quantidade de água contendo açúcar, em proporções definidas, até que a ardência não fosse mais percebida na língua (SCOVILLE, 1912). Então se uma amostra de pimenta apresenta 100.000 SHU, isto significa que foi necessário diluir cem mil vezes a solução contendo capsaicinoides

para que sua pungência não fosse mais notada. Quanto maior o número de diluições, maior é a pungência da pimenta (JUNIOR, 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) substituiu o método organoléptico, uma vez que a metodologia de CLAE é considerada mais confiável, precisa e rápida para determinar tanto a concentração de capsaicínides em uma amostra de pimenta quanto a sua pungência (YAO; NAIR; CHANDRA, 1994; SANATOMBI; SHARMA, 2008). Woodbury (1980) *apud* Wall e Bosland (1998) usou CLAE para estimar capsaicínides e correlacionou com a escala Scoville (SHU). Por isso atualmente a conversão de concentração de capsaicínides em unidades Scoville consiste em multiplicar a concentração em ppm por 15 (WALL; BOSLAND, 1998).

Os capsaicínides podem ser analisados ou quantificados quanto às suas características físicas e químicas, mas a pungência só pode ser validada através de uma correlação com a ardência sentida durante o consumo oral (WALL; BOSLAND, 1998).

2.1.3 Carotenoides

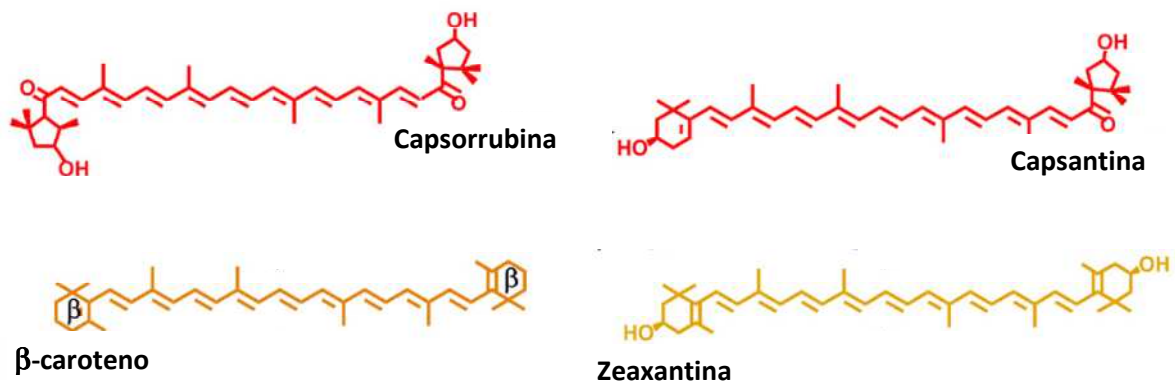
Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja ou vermelha de muitos alimentos. Uma vez que a cor é o atributo que mais influencia a aceitação dos alimentos, os carotenoides de grande importância tecnológica (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Embora sejam micronutrientes, presentes em níveis muito baixos (microgramas por grama), os carotenoides estão entre os constituintes alimentícios mais importantes (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Em pimentas, há pelo menos 34 carotenoides não esterificados, incluindo β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, violaxantina, capsantina e capsorrubina (GUZMAN *et al.*, 2010).

Segundo Rodriguez-Amaya; Kimura e Amaya-Farfan (2008), em pimentas vermelhas há a preponderância de carotenoides raros ou específicos da espécie, que são capsantina e capsorrubina, entretanto β -caroteno e zeaxantina (Figura 3) também estão entre os principais (KADAKAL *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os pigmentos vermelhos capsantina, capsorrubina e criptocapsina são mais valorizados como corantes naturais, enquanto β -caroteno, α -caroteno, γ -caroteno e β -criptoxantina possuem atividade pró vitamínica A, sendo o β -caroteno o de maior atividade (WALL; WADDELL; BOSLAND, 2001).

A principal causa de perdas ou destruição de carotenoides durante o processamento ou a estocagem é a oxidação, enzimática ou não. A isomerização dos trans-carotenoides para isômeros cis altera a sua atividade biológica e a cor, mas não na mesma extensão que a oxidação. A transformação é promovida por ácidos, calor e luz, e, portanto pode ocorrer durante corte, fatiamento, ralagem ou trituração (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008)

Figura 3 - Principais carotenoides das pimentas vermelhas.



Fonte: Guzman *et al.* (2010)

2.2 Produção de molho de pimenta

De acordo com a ANVISA, molhos são os produtos em forma líquida, pastosa, emulsão ou suspensão à base de especiaria(s) e ou tempero(s) e ou outro(s) ingrediente(s), fermentados ou não, utilizados para preparar e ou agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas. Podem ser designados de "Molho" seguido do ingrediente que caracteriza o produto ou por denominações consagradas pelo uso. A designação pode ser seguida de expressões relativas ao processo de obtenção, forma de apresentação, finalidade de uso e ou característica específica (BRASIL, 2005).

O molho de pimenta é uma das formas de conservação e consumo de pimentas mais utilizadas no mundo, tendo como principal característica a facilidade de uso (FURTADO; DUTRA, 2012).

Para o preparo de molhos líquidos, é importante utilizar matéria-prima de ótima qualidade e sem danos, e pasteurizar o produto. Os molhos devem ser armazenados ou conservados em vidros esterilizados, identificados com etiquetas com informações básicas sobre o produto, como marca comercial, tipo de pimenta, nome e endereço do fabricante, data de fabricação e validade, entre outros (CARVALHO, 2007).

Várias metodologias para elaboração de molhos de pimenta, artesanal e industrial, estão disponíveis na literatura. Segundo Furtado e Dutra (2012), o tradicional molho artesanal é produzido com pimentas picantes, vinagre, sal e água. Podem ser acrescentados açúcar, alho e especiarias. Os ingredientes são liquidificados e posteriormente cozidos (refogados). Outras receitas acrescentam outras hortaliças, como tomate, cenoura, cebola, alho, salsa, coentro e orégano, por exemplo.

De acordo com Portal (2013), o molho de pimenta tradicional é preparado com vinagre, pimenta e sal, e envelhecido em barris de carvalho. O sal para consumo humano, segundo a legislação, é cloreto de sódio cristalizado, extraído de fontes naturais, adicionado obrigatoriamente de iodo. No molho de pimenta, o sal é utilizado como conservante natural, uma vez que em concentrações adequadas, diminui a atividade de água dos alimentos, inibindo o crescimento microbiano. Assim como o sal, o vinagre também é utilizado como um conservante (diminuindo o pH do produto).

Letra *et al.* (2013) descrevem a produção de molho de pimenta nas seguintes etapas: após colheita e seleção, limpeza e lavagem, as pimentas são cozidas em tachos de aço inox a 100°C por 30 a 40 minutos com adição de sal. Em seguida as pimentas são levadas a uma despoldadeira, onde ocorre a separação das sementes e casca. A polpa é adicionada de vinagre e homogeneizada em liquidificador industrial. Por fim, o molho é envasado em frascos de vidro.

Para a produção do famoso molho de pimenta Tabasco®, as pimentas colhidas são transportadas para a Ilha de Avery (Estados Unidos) e enviadas para a estação de moagem no mesmo dia. As pimentas são esmagadas, misturadas com uma pequena quantidade de sal da Ilha de Avery e colocadas em barris de carvalho branco, onde são envelhecidas por 3 anos. Este processo de envelhecimento traz mais sabor, consistência e qualidade para o produto. Em seguida, o mosto

totalmente envelhecido é misturado com vinagre especial destilado através de várias agitações, e após quatro semanas é filtrado (TABASCO, 2013). As etapas de colheita dos frutos, moagem com adição de sal e acondicionamento da massa de pimenta em recipientes (fermentação) também ocorrem no Brasil, sob responsabilidade da Agropecuária Avaí (Ceará). A massa fermentada é enviada aos Estados Unidos, lá ocorrendo as etapas posteriores de beneficiamento (HENRIQUE *et al.*, 2003).

2.3 Fermentação autóctone de vegetais

Cada tipo de vegetal tem um único nicho em termos de composição química, capacidade tamponante, biota competitiva e compostos naturais antagonistas. A temperatura e as condições de cultivo também afetam a microbiota natural (DI CAGNO *et al.*, 2013).

Os vegetais frescos são frequentemente contaminados por vários micro-organismos deteriorantes e, em alguns casos, por micro-organismos patogênicos por causa do seu contato com o solo durante o cultivo e a colheita (DI CAGNO *et al.*, 2009a), possuindo assim vida de prateleira curta (DI CAGNO *et al.*, 2013). Em hortaliças e frutas em decomposição também é frequente a presença de bactérias ácido-láticas, que são principalmente bacilos ou cocos Gram positivos que produzem ácido lático como metabólito primário. São principalmente anaeróbios, ainda que possam crescer em condições aeróbicas, por isso são comumente chamados anaeróbios aerotolerantes (GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.* 2006).

A fermentação láctica de vegetais, um método tradicional de biopreservação de alimentos prontos e semiprontos, é considerada uma biotecnologia simples e valiosa para manter e/ou melhorar a segurança, a vida de prateleira, e as propriedades nutricional e sensorial dos vegetais (DI CAGNO *et al.*, 2009a, 2013).

Quando condições favoráveis de anaerobiose, atividade de água, concentração de sal e temperatura ocorrem, vegetais *in natura* podem sofrer fermentação láctica espontânea. Em alguns casos, a fermentação alcoólica ocorre simultaneamente (DI CAGNO *et al.*, 2013).

A fermentação espontânea de vegetais é geralmente caracterizada pela sucessão de bactérias ácido-láticas hetero e homofermentativas, em presença ou não de leveduras, que são responsáveis pela fermentação em vários estágios (DI CAGNO *et al.*, 2009a). Geralmente, bactérias Gram-negativas são inibidas nos primeiros estágios da fermentação láctica (DI CAGNO *et al.*, 2013). Segundo Di Cagno *et al.* (2013), durante a fermentação as bactérias ácido-láticas sintetizam diferentes bacteriocinas e liberam peptídeos antimicrobianos, que inibem bactérias deteriorantes (GARCÍA-MARTINEZ *et al.*, 2006).

Tem sido sugerido que a proliferação de leveduras em alimentos é favorecida pelo meio ácido criado pelas bactérias ácido-láticas, enquanto o crescimento de bactérias ácido-láticas é estimulado pela presença de leveduras, que podem fornecer fatores de crescimento, como vitaminas e compostos de nitrogênio solúveis. A associação de bactérias ácido-láticas e leveduras durante a fermentação pode também contribuir com metabólitos, que podem influenciar do sabor e aroma dos alimentos (MUGULA; NARVHUS; SØRHAUG, 2003).

O co-metabolismo estável entre bactérias ácido-láticas e leveduras é comum em vários alimentos, permitindo a utilização de substâncias que, de outra maneira não são fermentescíveis (por exemplo, amido), e desse modo aumentando a adaptação microbiana ao complexo ecossistema alimentício (MUGULA; NARVHUS; SØRHAUG, 2003).

Apesar de em alguns casos a fermentação láctica espontânea poder causar variações indesejáveis nas características sensoriais de vegetais frescos e/ou não ocorrer de maneira rápida o suficiente para inibir micro-organismos deteriorantes e patogênicos, ela pode intensificar as características da pimenta e prevenir o crescimento de outros tipos de micro-organismos que desviem o processo fermentativo, podendo-se assim obter um produto estável (DI CAGNO *et al.*, 2009a).

O chucrute é um exemplo de produto elaborado por meio de fermentação natural, na qual os micro-organismos presentes na matéria-prima conduzem a fermentação em sequência, resultando em um produto de qualidade aceitável sensorialmente (JOSHI; SHARMA; THAKUR, 2008).

García-Martinez *et al.* (2006) citam que a fermentação de pimenta Jalapeño ocorre durante 4 ou 6 semanas. Tradicionalmente é realizada em tanques fechados providos de uma válvula para eliminação do gás formado durante o

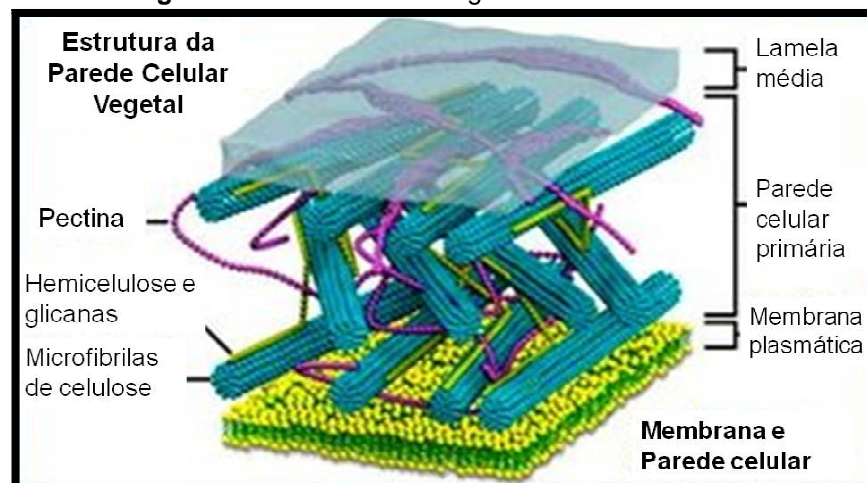
processo. As pimentas, inicialmente verdes luminosas, adquirem uma coloração verde oliva. Segundo Plengvidhya; Breidt Jr. e Fleming (2004), para uma fermentação adequada, a concentração de sal adicionada a repolhos pode ser reduzida para menos de 2%, que é a concentração normalmente utilizada na produção de chucrute.

A fermentação espontânea de alho forneceu bons resultados do ponto de vista nutricional, uma vez que o processo contribuiu para o aumento da concentração de alguns compostos benéficos à saúde, especialmente polifenóis e a atividade antioxidante relacionada a esses compostos (MONTAÑO *et al.*, 2004).

2.4 A parede celular vegetal e a maceração enzimática

A composição da parede celular vegetal pode variar significativamente entre os diferentes tipos de frutos, mas consiste principalmente de pectina, hemicelulose, celulose, lignina e outros compostos (Figura 4) (WANG; XU; JIN, 2009).

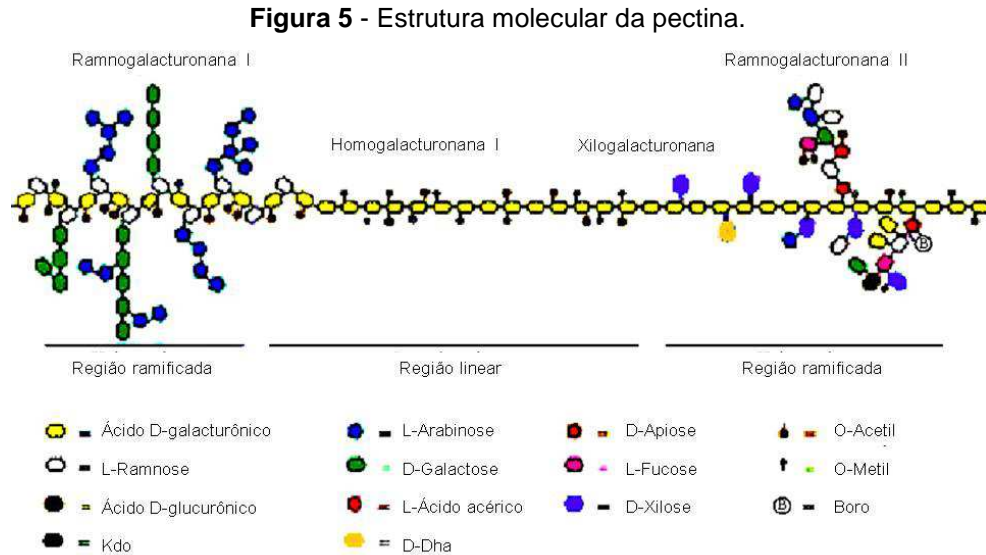
Figura 4 - Parede celular vegetal e seus constituintes.



Fonte: Sobiologia (2013)

Quimicamente, as substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos coloidais complexos, com uma cadeia principal formada por resíduos de ácido galacturônico esterificados com metanol, unidos por ligações α -1,4 (ou em menor quantidade de ligações β -1,4), e também com 2 a 4% de ligações β -1,2 de ramnose (COELHO, SALGADO; RIBEIRO, 2008). Pode ser dividida em duas regiões, linear

(*smooth region*) e ramificada (*hairy region*). O grau de esterificação varia com a fonte da pectina (Figura 5) (YADAV *et al.*, 2009).



Fonte: Yadav *et al.* (2009)

A celulose é um homopolímero formado por resíduos de D-glicose unidos entre si por ligações do tipo β -1,4. As cadeias lineares de alinhamento paralelo são firmemente ligadas por ligações de hidrogênio para formar as microfibrilas (RODRIGUES; FERNANDES, 2012). Nas paredes celulares, a celulose se encontra ligada às substâncias pécicas por polímeros de xilose e glicose (xilanas e xiloglicanas), denominados hemiceluloses. Também são hemiceluloses as galactomananas e as β -glicanas (KOBBLITZ, 2010).

A parede celular dos frutos tem uma estrutura complexa, composta de feixes de microfibras cristalinas e celulose embebidas em um gel aquoso de hemicelulose e pectina. Devido a essa complexidade na sua estrutura, uma única enzima não é capaz de clivar as estruturas das paredes celulares (WANG; XU; JIN, 2009).

A maceração enzimática é uma tecnologia largamente aplicada no processamento de frutas com a finalidade de clivar as cadeias polissacarídicas da parede celular, utilizando-se enzimas hidrolíticas, dessa forma, aumentando o rendimento da extração do suco e aumentando a liberação de compostos funcionais presentes nos frutos, como antocianinas, vitaminas, polifenóis, compostos de aroma (SCHOU DHARI; ANANTHANARAYAN, 2007; RODRIGUES; FERNANDES, 2012).

2.4.1 Enzimas de maceração

A combinação de pectinases, celulasas e hemicelulasas são chamadas coletivamente de enzimas de maceração (UENOJO; PASTORE, 2007). Uma preparação enzimática normalmente contém a enzima de interesse e várias substâncias adicionadas, como diluentes, conservantes e estabilizantes. Também pode conter outras enzimas e metabólitos produzidos pelo micro-organismo, além de resíduos da matéria prima utilizada no meio fermentativo. Todos os constituintes da preparação comercial devem apresentar pureza de acordo com as Boas Práticas de Fabricação atuais (BAYINDIRLI, 2010).

No Brasil, a Resolução RDC Nº 205, de 14 de novembro de 2006 da ANVISA regulamenta sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2006).

Enzimas pectinolíticas são usadas no processamento industrial de frutas para aumentar rendimentos, melhorar a liquefação, clarificação e a filtração de sucos, maceração, e extração de tecidos de plantas. O tratamento enzimático de polpas acarreta larga degradação das pectinas da lamela-média e da parede celular pelas atividades de poligalacturonase, pectinametilesterase e pectinoliase. O efeito sinérgico da combinação de pectinases e celulasas é crucial no tratamento enzimático da polpa para uma quase completa liquefação de frutas e vegetais polposos. A hidrólise enzimática da parede celular aumenta o rendimento de extração, os açúcares redutores, conteúdo de matéria seca solúvel e conteúdo de ácido galacturônico e acidez titulável dos produtos. A polpa resultante tem menor viscosidade, e a quantidade de resíduos de bagaço é reduzida (DEMIR *et al.*, 2001). Bautista-Ortín *et al.* (2005) utilizaram enzimas de maceração para melhorar as características cromáticas e sensoriais de vinhos.

Enzimas já foram empregadas para a extração de capsaicinoides e carotenoides de pimentas (*Capsicum annuum* L.) usando etanol como solvente (SANTAMARÍA *et al.*, 2000). Uma vez que a parede celular vegetal é composta de celulose e pectinas, celulasas e pectinases têm sido utilizadas para essa finalidade (SCHOUDHARI; ANANTHANARAYAN, 2007).

Enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam substâncias pécticas, presentes na maioria das plantas.

Essas enzimas são largamente distribuídas em plantas superiores e em micro-organismos (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngica, especialmente de *Aspergillus* e *Penicillium* (BRAVO *et al.*, 2000), sendo a espécie *Aspergillus niger* a mais utilizada para tal finalidade (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). As pectinases produzidas por *Aspergillus* são de grande importância por sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos (BRAVO *et al.*, 2000). As pectinases microbianas respondem por 25% das vendas globais de enzimas para aplicações em alimentos (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As pectinases comerciais são extensivamente utilizadas atualmente, mas disponível apenas como mistura bruta de enzimas fúngicas extracelulares, contendo enzimas como poligalacturonases, pectinoliase, celulasas e hemicelulasas (BRAVO *et al.*, 2000; WANG; XU; JIN, 2009).

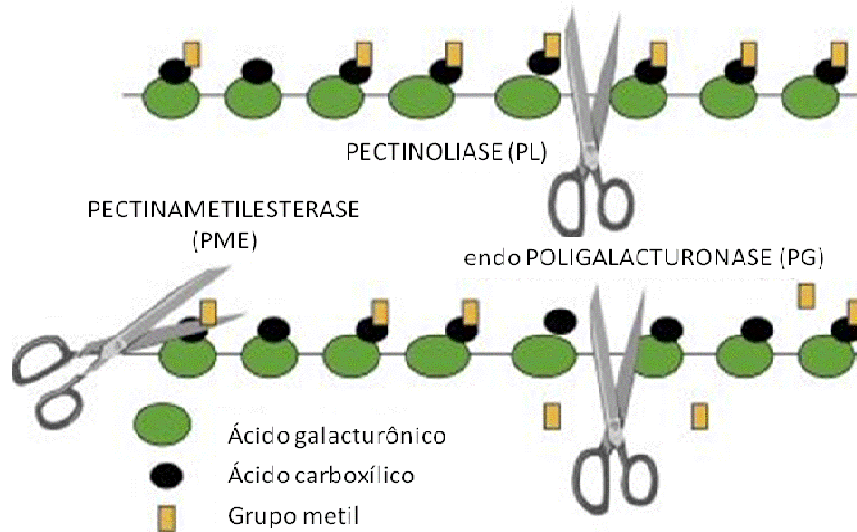
Na indústria de alimentos, essas enzimas atuam na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas e extração de óleo vegetal, bem como na produção de alimentos para bebês e em uso simultâneo com celulasas e hemicelulasas no tratamento de biomassa celulósica (BRAVO *et al.*, 2000). Provavelmente ocorre uma interação complexa entre os parâmetros intrínsecos dos frutos e a pectinase, como a estrutura da parede celular e as diferentes atividades enzimáticas (WANG; XU; JIN, 2009). Lee *et al.* (2008) utilizaram complexos enzimáticos pectinolíticos e celulolíticos para melhorar a eficiência da fermentação de pimenta (*Capsicum annuum* cv. Chungyang) pela bactéria *Bacillus subtilis*, com o objetivo de reduzir a pungência da pimenta.

As pectinases incluem várias enzimas divididas em classes e subclasses, dependendo da especificidade do substrato e do modo de ação, como metilesterases, hidrolases e liases (YADAV *et al.*, 2009).

As pectinametilesterases rompem a ligação éster, desmetoxilando ácidos galacturônicos esterificados com metanol. Resultam na formação de pectinas com baixo teor de metoxilação ou ácido péctico, além de metanol. As poligalacturonases e pectatolases atacam preferencialmente as ligações entre ácidos galacturônicos de pectinas com baixo teor de metoxilação (ou ácido péctico), enquanto as pectinolases têm preferência por ligações entre ácidos galacturônicos de pectinas metoxiladas (pectinas com alto teor de metoxilação) (KOBBLITZ, 2010). A pectinoliase

é a única enzima capaz de hidrolizar, pectinas altamente esterificadas, sem ação prévia de outra pectinase (BRAVO *et al.*, 2000). O modo de ação dessas enzimas está ilustrada na Figura 6.

Figura 6 - Modo de ação das principais enzimas pectinolíticas.



Fonte: Lourens e Pellerin (2013).

As celulases são aplicadas em combinação com pectinases, onde o efeito sinérgico dessas enzimas é necessário para que ocorra uma quase total liquefação de frutas e de vegetais (UENOJO; PASTORE, 2007). Kashyap *et al.* (2001) e Uenojo e Pastore (2007) relatam vários estudos com aplicações de celulases em combinação com pectinases para melhor efeito das enzimas.

Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulases e hemicelulases são utilizadas para melhorar a extração de óleo de oliva, enquanto a combinação de celulases e hemicelulases aceleram o processo de fermentação de grãos de café (UENOJO; PASTORE, 2007). O tratamento enzimático com a mistura de pectinases, celulases e hemicelulases promoveu um rendimento de cerca de 80% do total de suco presente em mangas. A combinação de pectinesterase, arabanase, hemicelulase, tanase e celulase é utilizada para melhorar a clarificação de suco de goiaba (KASHYAP *et al.*, 2001).

2.5 Análise sensorial de pimentas

A análise sensorial é a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (ABNT, 1993 *apud* TEIXEIRA, 2009). É uma ferramenta de grande importância para o desenvolvimento de produtos, e indispensável às empresas que almejam a elaboração de produtos diferenciados e aperfeiçoamento de processos (ARAÚJO et al., 2011).

A avaliação sensorial de um produto alimentício é conduzida por meio de métodos diferenciados, que dependem do produto a ser analisado e do objetivo das análises (TEIXEIRA, 2009; ARAÚJO, 2012). Análise sensorial envolvendo testes de sabor com pimentas se torna difícil devido à presença da capsaicina, que é propensa a dessensibilizar os provadores em uma sessão sensorial. Além disso, consumidores regulares de especiarias pungentes, como pimentas, também se tornam menos sensíveis, acarretando diferenças de sensibilidade entre os julgadores (LAWLESS; HEYMANN, 2010).

Trabalhos disponíveis na literatura realizaram análise sensorial de pimentas em termos de aroma e compostos voláteis (CHITWOOD; PANGBORN; JENNINGS, 1983), enquanto para atributos de sabor foram encontrados trabalhos com conserva e molho de pimenta biquinho (LOPES; OKURA, 2005), sorvete de pimenta (DUTRA *et al.*, 2010) e geleia de pimenta com abacaxi (ARAÚJO, 2012). Van Ruth e Roozen (1994) avaliaram tanto os compostos voláteis quanto os atributos de sabor de pimentas desidratadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

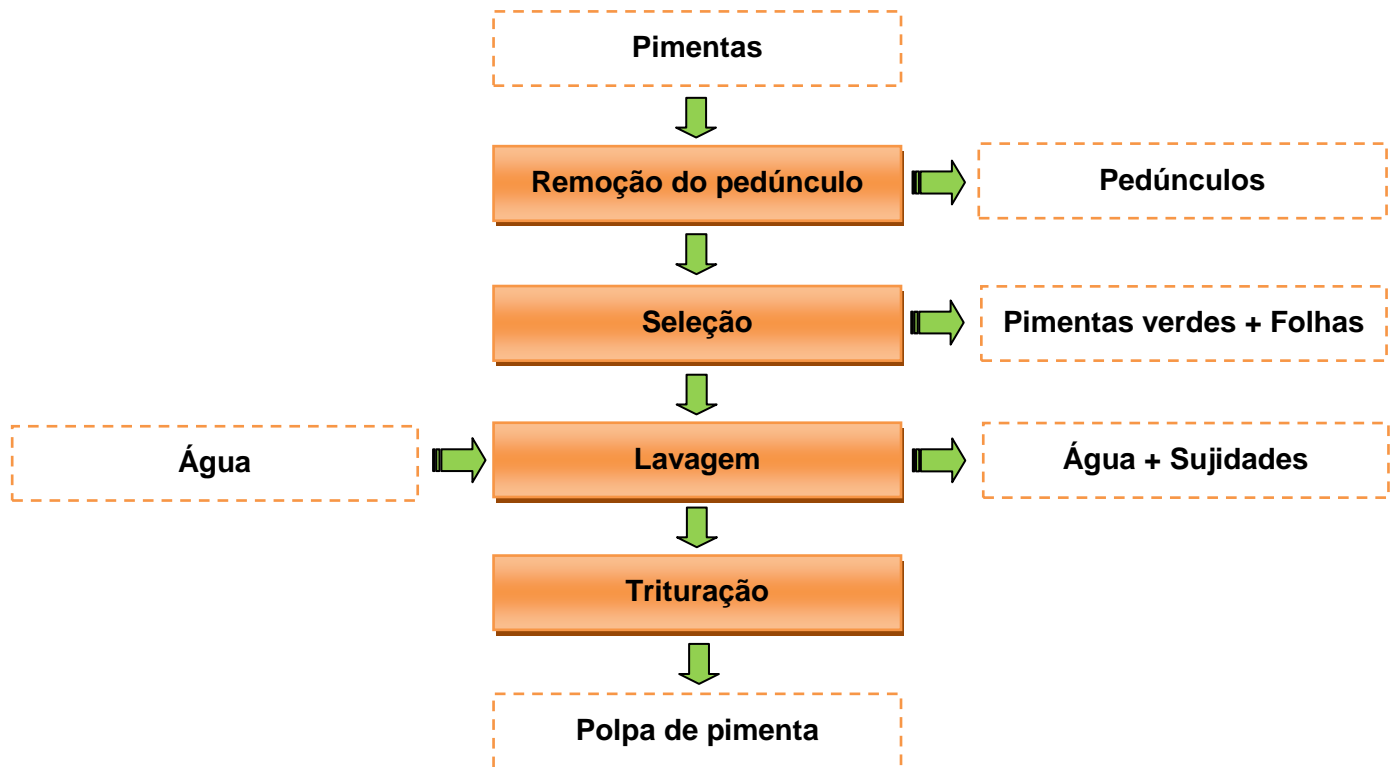
3.1 Material

3.1.1 *Matéria-prima e obtenção da polpa*

As pimentas utilizadas neste trabalho foram da espécie *Capsicum frutescens* L., variedade tabasco, no estágio de maturação maduro, caracterizado pela coloração vermelha alaranjada e textura firme. Os frutos foram cedidos pela Agropecuária Avaí, localizada em Limoeiro do Norte-CE, ou adquiridas da Central de Abastecimento do Ceará (CEASA) ou provenientes de Paraipaba-CE.

Após a remoção dos pedúnculos, os frutos passaram por uma seleção, que consistiu na retirada de frutos verdes, e foram lavados duas vezes com água corrente para retirada de sujidades, como folhas. Posteriormente, foram triturados em liquidificador industrial para obtenção da polpa de pimenta. A Figura 7 mostra o fluxograma geral de obtenção da polpa de pimenta. Essas etapas foram realizadas no Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical. Todos os experimentos foram executados com a polpa contendo sementes, no Laboratório de Bioprocessos.

Figura 7 - Produção da polpa de pimenta, obtida da trituração das pimentas sem pedúnculos em liquidificador industrial.



Para a caracterização da polpa de pimenta foram realizadas as seguintes análises: umidade, extrato etéreo, proteína, cinzas, grupos redutores, capsaicinoides, carotenoides, resíduo insolúvel em álcool (AIR), acidez total titulável.

Para a realização das análises, as sementes foram removidas da polpa com auxílio de uma peneira de uso doméstico com diâmetro de poro de 2 mm. Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

3.1.2 Preparações enzimáticas

As enzimas utilizadas na condução dos experimentos foram cedidas gentilmente pela Novozymes®: Ultrazym AFPL, Pectinex AR, Pectinex XXL, Pectinex Smash XXL e Celluclast.

Para avaliação da atividade enzimática das preparações comerciais, foram realizadas análises de: poligalacturonase, pectinametilesterase, pectinoliase, xilanase e celulase.

3.1.3 Recipientes para a maceração enzimática

O tratamento enzimático da polpa de pimenta foi conduzido inicialmente em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade com boca larga (diâmetro interno: 4,5 cm), que eram agitados em *shaker* orbital. Posteriormente, os experimentos passaram a ser realizados em frascos de vidro, de 260 g de capacidade, com tampa metálica e hermeticamente fechados (Figura 8), incubados estaticamente em B.O.D. (incubadora bacteriológica).

Figura 8 - Frasco de vidro com tampa de metal utilizado nos experimentos de maceração enzimática.



3.2 Determinações analíticas

3.2.1 Análises físico-químicas

3.2.1.1 Umidade

A determinação do teor de umidade foi feita por método gravimétrico, à temperatura de 105°C, até peso constante, segundo método 012/IV em IAL (2008).

3.2.1.2 Extrato etéreo

O extrato etéreo foi obtido por extração na amostra previamente seca, com éter etílico, por 5 horas, em aparelho tipo Soxhlet, segundo método 032/IV em IAL (2008).

3.2.1.3 Proteína

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl compreendendo as etapas de digestão com H₂SO₄, destilação com solução de NaOH 50% e, finalmente, a titulação com solução de HCl 0,02 N, conforme procedimento 955.04 da AOAC, (2000). Foi utilizado o fator de conversão para proteína bruta equivalente a 6,25.

3.2.1.4 Cinzas

A análise de cinzas foi feita por método gravimétrico, de acordo com o método 940.26 da AOAC (2000), através de aquecimento a 550°C em mufla.

3.2.1.5 Grupos redutores totais

A concentração de grupos redutores totais foi determinada, em glicose, pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

3.2.1.6 Capsaicinoides

Para a quantificação dos principais capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina) foi utilizado o método 995.03: Capsaicinoides em *Capsicum* e Seus Extrativos, descritos por AOAC (2000).

a. Extração do padrão de capsaicina

Primeiramente extraiu-se o padrão da capsaicina utilizando-se cromatografia líquida em escala semipreparativa. Esta etapa foi realizada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico – PADETEC, localizado no *Campus* do Pici da Universidade Federal do Ceará.

b. Obtenção da oleorresina

Utilizou-se polpa de pimenta *habanero* no estágio de maturação verde, pois nesse estágio o fruto possui maior concentração de capsaicinoides.

A um extrator Soxhlet de 150 mL de capacidade, adicionou-se cerca de 50 g de polpa de pimenta liofilizada. Em seguida juntou-se 100 mL de acetona P.A. e aqueceu-se a mistura a 56° C durante 4 horas, com circulação do solvente. O extrato obtido foi retirado do extrator. Mantendo-se a amostra, adicionou-se novamente a acetona e o processo foi repetido por mais cinco vezes. Ao fim das extrações, todos os extratos obtidos foram reunidos em um só, filtrado em papel de filtro e concentrado a 70°C sob vácuo. O concentrado final é um líquido bastante viscoso, chamado de oleorresina.

Para remover a gordura proveniente da pimenta, adicionou-se álcool etílico 95% à oleorresina na proporção 4:1 (álcool:oleorresina), agitou-se, e então removeu-se a fase alcoólica contendo a gordura.

c. Isolamento da capsaicina em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (coluna semipreparativa)

Inicialmente, injetou-se em HPLC semipreparativo, um padrão de capsaicina previamente isolado, com concentração conhecida (0,152 mg.mL⁻¹, 99% de pureza) nas condições abaixo:

Coluna: Supelco C18 (250 x 10 mm)

Pré-coluna: C18

Fase móvel: metanol:água (85:15)

Vazão: 5 mL/min

Loop de injeção: 200 µL

Detector: UV a 280 nm

Temperatura: 25 a 30°C

Tempo de corrida: 10 minutos

Verificou-se que o tempo de retenção do padrão de capsaicina foi de 5,1 minutos.

Para a purificação da capsaicina da oleorresina, esta foi dissolvida em metanol, de forma a se obter uma concentração de 100 mg.mL⁻¹, e foi injetada nas mesmas condições anteriores. Na oleorresina, o tempo de retenção da capsaicina foi de 5,3 minutos, então o pico do cromatograma da oleorresina em 5,3 minutos foi coletado, tomando-se o cuidado de não coletar as frações muito próximas às bases

do pico para que não houvesse contaminação com outras substâncias, reduzindo assim a pureza do padrão. A Figura 9A representa o cromatograma da oleoresina em HPLC semipreparativo, e a Figura 9B mostra o espectro de absorção no ultravioleta.

Após várias injeções de oleoresina, os conteúdos de todas as coletas foram reunidos e concentrados em rotaevaporador sob vácuo, obtendo-se assim a capsaicina.

Para análise da pureza do padrão recém-extraído, diluiu-se a capsaicina concentrada em álcool etílico P.A. de forma a se obter uma concentração aproximada de $0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$. A solução foi injetada, após injeção do padrão inicial, em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, em escala analítica, nas condições abaixo, que também foram aplicadas para a quantificação dos capsaicoides nas amostras de pimenta:

Coluna: Zorbax SB-C18 (4,6 x 150 mm)

Pré-coluna: MetaGuard Pursuit $5 \mu\text{m}$ C18 4,6mm

Fase móvel: acetonitrila e água com 1% de ácido acético (40:60 v/v)

Vazão: 1,5 mL/min - isocrático

Loop de injeção: 20 μL

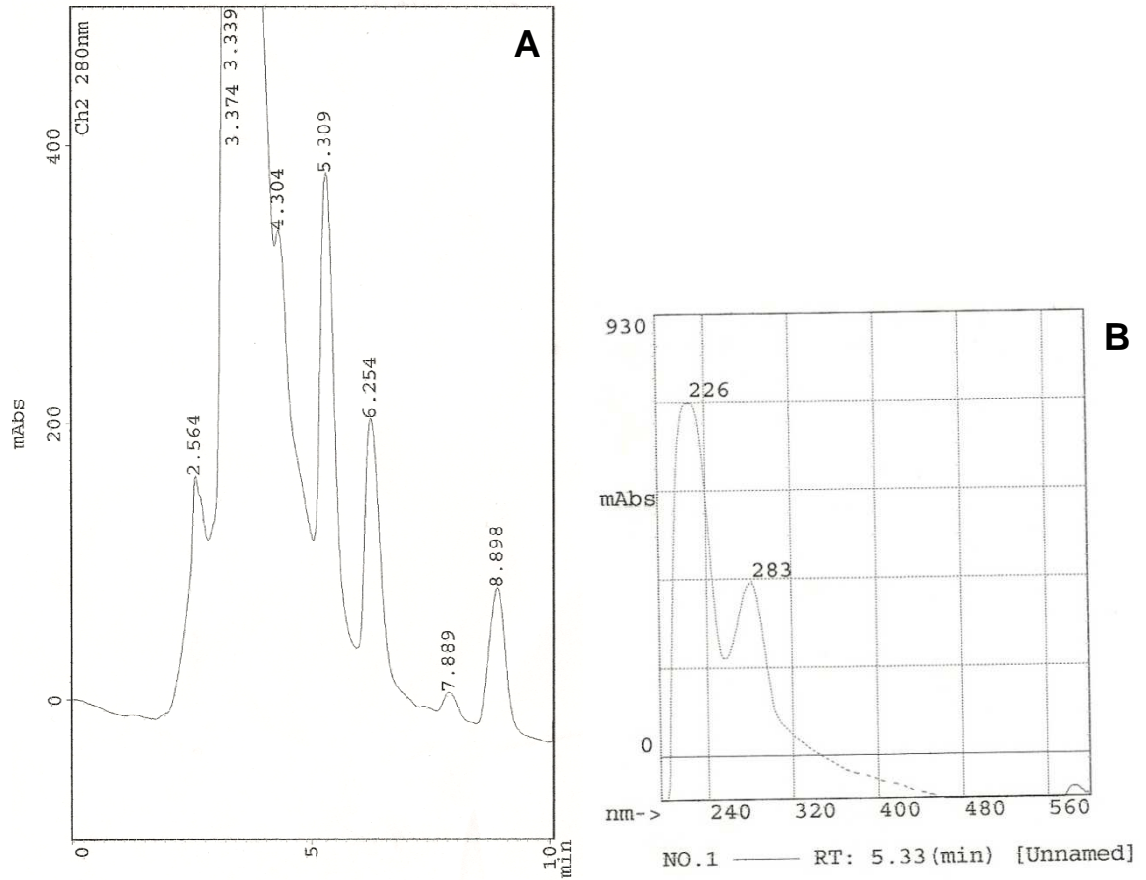
Detector: UV a 280 nm

Temperatura: 30°C

Pressão: 170 bar

Tempo de corrida: 20 minutos

Figura 9 - A: Cromatograma da oleorresina em HPLC semipreparativo, com tempo de retenção de 5,3 minutos; **B:** Espectro de absorção no ultravioleta.



A Figura 10 mostra o cromatograma do padrão inicial e a Figura 11 representa o cromatograma do pico recém-extraído.

Figura 10 - Cromatograma do padrão inicial, com informações conhecidas, utilizado para comparação com outras amostras.

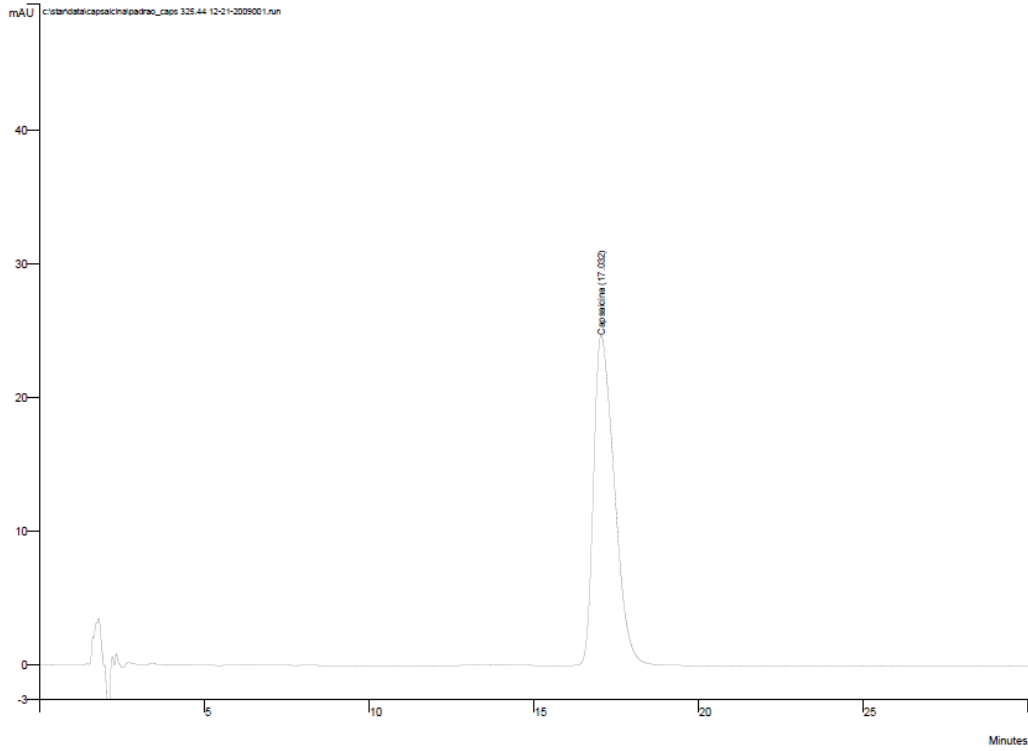
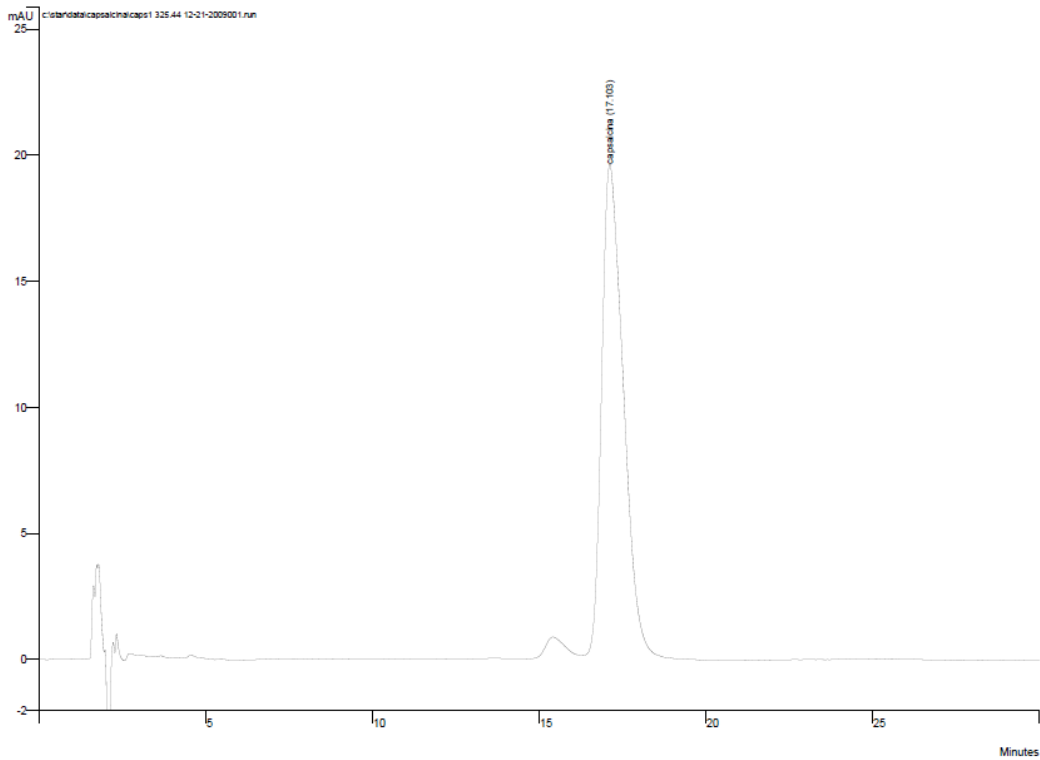


Figura 11 - Cromatograma do padrão recém-extraído.



A quantificação da concentração do padrão obtido e da sua pureza foi feita por comparação com a área do padrão inicial, de concentração e pureza

conhecidas. Verificou-se que o padrão isolado, encontrava-se em forma de solução na concentração de $0,124 \text{ mg.mL}^{-1}$, com 93,44% de pureza.

d. Construção da curva padrão de capsaicina

Um padrão de capsaicina de concentração $152 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 98,88% de pureza foi diluído em álcool etílico a concentrações que variaram de 15,2 a $152,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. As concentrações de dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina foram estimadas pela curva de capsaicina.

e. Preparo das amostras para quantificação de capsaicinoides

Foram pesadas 12,5 g de polpa em balão de fundo chato e adicionou-se 100 mL de álcool etílico P.A. A polpa ficou em refluxo com o solvente por uma hora e meia. Após resfriada, a solução foi filtrada em papel de filtro para um balão volumétrico de 100 mL. A solução resultante foi filtrada em filtro Millipore de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. As amostras foram analisadas em CLAE, nas condições já citadas.

3.2.1.7 Carotenoides totais

a. Metodologia descrita por Higby (1962)

Pesou-se aproximadamente 10 g de amostra em tubo de ensaio rosqueado envolto em papel alumínio. Adicionou-se 15 mL de álcool isopropílico e 5 mL de hexano e levou-se o tubo para homogeneização em agitador de tubos por 1 minuto. Em seguida o conteúdo do tubo foi filtrado a vácuo em funil de Büchner, lavando-se o resíduo presente no papel de filtro com 5 mL de hexano ou até que o resíduo estivesse isento de pigmentos. O filtrado foi transferido para um funil de separação, adicionado de água e deixado em repouso por 30 minutos. Após esse tempo a separação das fases já havia ocorrido, então a parte incolor (não emulsificada) da fase aquosa foi descartada. Essa fase tem aspecto leitoso, mas não contém quantidade significativa de carotenoides. Lavou-se o funil várias vezes com água, separando e descartando a fase incolor após cada lavagem. Essa etapa serve para transferir toda a parte colorida para a camada de hexano. Finalmente drenou-se a fase hexânica para um balão volumétrico de 50 mL (ou maior, dependendo da quantidade de hexano usada para remoção de toda a coloração da

amostra) através de uma fina camada de algodão contendo uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro. Lavou-se o funil de separação com 3 a 4 mL de hexano, transferindo também para o balão. Lavou-se o algodão com hexano até completa remoção dos carotenoides do mesmo. O sulfato de sódio em pó é usado para produção de um sistema anidro. Adicionou-se 5 mL de acetona ao balão volumétrico e completou-se o volume com hexano. A solução está pronta para ser lida em espectrofotômetro, a 450 nm.

b. Metodologia descrita por Rodriguez-Amaya (2001)

Aproximadamente 1,0 g de amostra foi pesada em balança analítica. Utilizando almofariz e pistilo, misturou-se a amostra com Celite® 545 (Sigma-Aldrich), macerando-a. Acetona foi adicionada para promover a extração dos pigmentos. A mistura foi filtrada em funil de Büchner e o resíduo foi levado novamente ao almofariz. A extração e a filtração foram repetidas até que o resíduo se apresentasse destituído de cor. O extrato foi recolhido em um único kitassato. Os carotenoides foram transferidos, aos poucos, para aproximadamente 50 mL de éter de petróleo seguido de adição cuidadosa de água destilada, até que se visualizasse a separação das fases. A fase inferior, constituída de água e acetona, foi descartada. Quando todos os carotenoides estavam transferidos para o éter de petróleo, a fase etérea foi lavada quatro vezes com água para a remoção total da acetona, e recolhida em frasco Erlenmeyer. Na presença eventual de água residual, adicionou-se pequena quantidade de sulfato de sódio anidro, até que toda a água fosse absorvida. Transferiu-se a fase etérea para uma proveta, lavando o resíduo de sulfato de sódio até que todos os carotenoides fossem removidos. Mediu-se o volume, e a absorbância no comprimento de onda de absorção máxima (450 nm) foi medida num espectrofotômetro Cary50conc UV-VIS.

O teor de carotenoides totais em µg/g e expresso como zeaxantina, foi calculado utilizando valor de absorvidade ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) de 2348 e a fórmula abaixo:

$$C (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\text{Absorbância} \times \text{volume (mL)} \times 10^4}{(A^{1\%}_{1\text{cm}}) \times \text{peso da amostra (g)}}$$

3.2.1.8 Resíduo insolúvel em álcool (AIR), Pectina, Hemicelulose e Celulose + Lignina

A quantificação dos resíduos insolúveis em álcool, assim como do conteúdo de pectina, hemicelulose e celulose em associação com lignina, foi realizada por método gravimétrico segundo metodologia de Schieber *et al.* (2005).

3.2.1.9 Determinação de acidez total titulável

A acidez titulável foi medida por potenciometria e expressa como a quantidade (mL) de NaOH 0,1N para atingir o pH 8,3, segundo metodologia 942.15 da AOAC (2000).

3.2.1.10 Determinação do pH

O pH foi medido em potenciômetro, segundo metodologia 201/IV (IAL, 2008).

3.2.1.11 Cor

A determinação da cor instrumental foi realizada em colorímetro Minolta, modelo CR-300, verde(-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente. As medições foram realizadas em triplicata com o aparelho previamente calibrado. Foi utilizada a polpa com sementes, utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1986). No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L*, a*, b*, a coordenada L* corresponde à luminosidade, a* e b* referem-se às coordenadas de cromaticidade.

A comparação da cor de uma determinada amostra com um padrão pode ser expressa por um único valor: ΔE . Este valor define a magnitude da diferença total de cor; e é expresso pela seguinte equação:

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0,5}$$

3.2.1.12 *Análise de consistência*

Análise realizada com um consistômetro de Bostwick, com o qual se obtém a distância percorrida pela amostra na base do equipamento pelo tempo de 30 segundos, medido em um cronômetro. Assim, a consistência foi medida em centímetros (BOURNE, 2002). As amostras maceradas e os controles foram homogeneizados mecanicamente antes do teste em consistômetro.

A diferença do escoamento foi definida como a diferença entre o escoamento da polpa após determinado tempo de maceração enzimática e o escoamento da polpa no início do experimento (tempo 0).

3.2.2 *Análises enzimáticas*

4.2.2.1 *Poligalacturonase (PG)*: Segundo Couri et al., (2000)

4.2.2.2 *Pectinametilesterase (PME)*: Segundo Jen e Robinson (1984)

4.2.2.3 *Pectinoliase (PL)*: Segundo Zetelaki e Harváth (1982)

4.2.2.4 *Xilanase*: Segundo Gomes et al. (1992)

4.2.2.5 *Celulase*: Segundo Pinto (2002)

3.2.3 *Análises microbiológicas*

Amostras de 25 g foram assepticamente suspensas em 225 mL de água peptonada tamponada estéril, e homogeneizadas. Após diluições seriadas em 9 mL do eluente, as amostras foram plaqueadas em meio agarizado específico para a enumeração de cada grupo de micro-organismos. Os meios VRBGA (Violet Red Bile Agar), HHD (Homofermentative-Heterofermentative Differential Medium), PDA (Potato Dextrose Agar) e agar bacteriológico foram fornecidos por Himedia (Índia).

As polpas foram avaliadas quanto às contagens de:

3.2.3.1 *Enterobactérias*: Segundo Oblinger et al. (1982)

3.2.3.2 *Bactérias ácido-láticas*: De acordo com o item 19.525 de Hall et al. (2001)

3.2.3.3 *Bolores e leveduras*: Segundo Tournas et al. (2009)

3.2.4 Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas foram analisados pela ANOVA utilizando o pacote STATISTICA 7.0. Em caso de diferença significativa entre tratamentos ao nível de significância de 5%, realizou-se o teste de Tukey.

3.3 Experimentos

3.3.1 Comparação entre o processo fermentativo autóctone de polpa de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.) com e sem adição de sal.

A polpa foi obtida conforme o fluxograma apresentado na Figura 7, sendo que metade das pimentas foi adicionada de 10% (m/m) de cloreto de sódio P.A. no momento da moagem. As polpas foram acondicionadas em frascos de vidro, previamente lavados e sanitizados, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. A cada recipiente foram adicionados cerca de 180 g de polpa.

As polpas foram avaliadas no tempo inicial e após 1, 2, 3, 4, 6 e 9 semanas. Até a quarta semana as amostras foram avaliadas semanalmente, pois esse é o tempo de fermentação utilizado na produção industrial; aumentando-se o intervalo de análise com o passar do tempo.

Em cada tempo, um frasco de cada tratamento foi retirado para realização de análises físico-químicas, descritas no item 4.2.1: pH, grupos redutores totais, acidez, carotenoides (metodologia a), cor instrumental e concentração de capsaicinoides; análises enzimáticas, descritas no item 4.4.2: poligalacturonase (PG), pectinoliase (PL) e pectinametilesterase (PME); análises microbiológicas, de acordo com as metodologias do item 4.2.3: enterobactérias, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras.

3.3.2 Estudo da maceração enzimática em polpa de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L).

3.3.2.1 Efeito da adição de água na maceração enzimática de polpa de pimenta.

As polpas foram tratadas enzimaticamente com $1000 \mu\text{L} \cdot \text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ da enzima Pectinex XXL em Erlenmeyers agitados em *shaker* orbital a 250 rpm a 30°C por 2 horas. A maceração enzimática foi avaliada sem adição de água, e com adição de 5, 10, 15 e 20% (m/m) de água destilada a 75 g de polpa. Amostras controle possuíam a mesma formulação das amostras, mas sem adição de enzima. Os controles referentes a cada percentual de água não foram incubados, e, portanto foram analisados no tempo 0. Todas as amostras foram preparadas em duplicata. Avaliou-se a consistência das polpas antes e após a maceração, conforme a metodologia do item 4.2.1.12.

Segundo produtores de derivados de pimenta da região de Limoeiro do Norte/CE, após a fermentação, a polpa passa por um processo de separação das sementes e dos fragmentos de cascas por meio de uma peneira. Polpa residual, aderida às sementes e cascas, é removida adicionando-se água, homogeneizando-se os resíduos e realizando-se nova separação. Ainda de acordo com os produtores, a quantidade máxima de água que pode ser adicionada para que a polpa não sofra redução considerável da sua pungência, e não resulte em perdas comerciais, é 20% (v/m) da polpa. Por esse motivo, o percentual máximo de água testado foi 20%.

3.3.2.2 Avaliação de uma preparação enzimática pectinolítica na maceração enzimática de polpa de pimenta.

A maceração enzimática da polpa de pimenta foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, incubados em *shaker* orbital, conforme metodologia descrita previamente para a maceração enzimática de película de cajá e purê de abóbora em escala de laboratório (VIEIRA; PINTO, 2009; MOURA *et al.*, 2011). Para os ensaios de maceração enzimática com *Capsicum frutescens* L. foram empregados 75 g de polpa, acrescidos de 15% (m/m) de água destilada (11,25 g) e

da enzima a ser avaliada. Posteriormente, os Erlenmeyers foram incubados a 30°C a 250 rpm de rotação.

Nos experimentos realizados com Pectinex XXL nas concentrações de 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$, as amostras foram submetidas à maceração enzimática durante um período de 6 horas, sendo analisadas a intervalos regulares de tempo (0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 horas).

Um experimento, mais prolongado, foi também executado com 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL, no qual o tempo de maceração enzimática estendeu-se por 96 horas, tendo-se amostras analisadas a cada 24 horas de processo. Para todos os experimentos preparou-se um controle, constituído de polpa e água, sem adição de enzima, avaliado no tempo inicial (tempo 0). Em cada tempo, as amostras e o controle foram preparados em duplicata. Foram analisados consistência, pH e grupos redutores totais das amostras, conforme metodologias descritas no item 4.2.1.

3.3.2.3 Efeito da ação de enzimas pectinolíticas na maceração enzimática estática de polpa de pimenta.

A maceração enzimática da polpa de pimenta foi realizada em frascos de vidro com tampa. A cada frasco foram adicionados 75 g de polpa, água destilada e a enzima a ser avaliada. Para cada enzima, foram testadas polpas com 15 e 20 % (m/m) de água, correspondentes a 11,25 e 15 g, respectivamente. Os potes fechados foram incubados em B.O.D., estaticamente, a 30°C durante 6 horas. A condição estática consistiu em não agitar os frascos durante a incubação, como ocorreu nos testes anteriores.

As enzimas estudadas foram Ultrazym AFPL, Pectinex AR, Pectinex XXL e Pectinex Smash XXL na concentração de 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ (75 μL).

Amostras de polpa com Pectinex AR e Pectinex Smash XXL com 20% (m/m) de água também foram avaliadas após 18 e 24 hs de maceração. Foi preparado um controle, constituído de polpa e água, sem adição enzimas, avaliado no tempo inicial (tempo 0).

Em cada tempo, as amostras e os controles foram preparados em duplicata. As amostras foram avaliadas quanto à consistência (item 4.2.1.12).

3.3.2.4 Efeito da adição de celulase na maceração enzimática de polpa de pimenta com enzimas pectinolíticas.

A frascos de vidro foram adicionados 75 g de polpa, 20% (m/m) de água destilada (15 g) e a enzima pectinolítica e/ou celulolítica. Os potes fechados foram incubados em B.O.D. a 30°C.

- a. Inicialmente realizou-se um teste no qual a polpa foi macerada com 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ (75 μL) de Pectinex AR adicionada da mesma concentração de Celluclast durante 18 horas. Os resultados de consistência foram comparados com os valores obtidos com a maceração somente por ação da enzima pectinolítica.
- b. Para avaliação do melhor tempo de maceração enzimática, polpas contendo 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e de Celluclast, adicionadas de 20% (m/m) de água, foram maceradas por 6, 18 e 24 horas, sendo também analisadas amostras controle em cada tempo e no tempo inicial (Controle 0).
- c. Posteriormente foram conduzidos testes de maceração por 18 horas somente com a enzima Celluclast, e com a combinação Celluclast e Pectinex AR, nas concentrações de 500 e 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ (37,5 e 375 μL , respectivamente) de cada enzima. Foi preparado um controle, constituído de polpa e água, sem adição enzimas, avaliado no tempo inicial (Controle 0); e um controle com a mesma composição do Controle 0 incubado nas mesmas condições das amostras, avaliado após 18 horas (Controle 18). A concentração de capsaicínides foi determinada, seguindo a metodologia do item 4.2.1.6.

Nas três etapas a consistência das polpas foi analisada.

3.3.2.5 Efeito da temperatura na ação das enzimas de maceração.

A frascos de vidro foram adicionados 75 g de polpa de pimenta, 20% (m/m) de água destilada (15 g) e 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de cada enzima (75 μL): Pectinex AR e Celluclast. Os potes fechados foram incubados em B.O.D., *shaker* sem agitação e estufa, dependendo da temperatura desejada, durante 18 horas. As

polpas foram maceradas enzimaticamente nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C. Foi preparado um controle, constituído de polpa e água, sem adição de enzimas, avaliado no tempo inicial (Controle 0); e um controle com a mesma formulação para cada temperatura testada, incubados nas mesmas condições das amostras e avaliados após 18 horas. Todas as amostras foram elaboradas em duplicata.

As amostras foram analisadas quanto à sua consistência, conteúdo de capsaicinoides e cor instrumental, descritas no item 4.2.1.

3.3.3 Fermentação da polpa de pimenta associada à maceração enzimática.

Três tipos de amostra foram estudados: Polpa macerada com sal (MCS), Polpa macerada sem sal (MSS), Polpa não macerada com sal (NMCS). A polpa NMCS reproduz o processo tradicional de fermentação da polpa de pimenta realizado industrialmente. A polpa MCS é o processo alternativo, onde a polpa é macerada enzimaticamente antes de ser fermentada; enquanto a polpa MSS foi formulada para avaliar o efeito do sal após a maceração enzimática, antes da fermentação.

As amostras foram preparadas, em duplicata, da seguinte forma:

NMCS: Pesaram-se aproximadamente 160 g de polpa de pimenta, adicionaram-se 10% (m/m) de cloreto de sódio P.A. em potes de vidro e realizou-se a homogeneização da mistura com auxílio de bastão de vidro. Os frascos foram tampados para posterior fermentação da polpa. Esta amostra consistiu em um controle, com mesma formulação que é utilizada na elaboração de produtos comerciais.

MCS: Pesaram-se 145,5 g de polpa de pimenta, aos quais foram adicionados 20% (m/m) de água (29,1 g) e $1000 \mu\text{L} \cdot \text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ (145,5 μL) de Pectinex AR e de Celluclast. Após homogeneização mecânica, o pote foi fechado e incubado em *shaker* orbital sem agitação a 50°C por 18 horas para que ocorresse a ação das enzimas de maceração. Seguida a maceração enzimática, juntaram-se 10% (m/m) de cloreto de sódio P.A. (14,5 g), agitou-se mecanicamente, e novamente o frasco foi tampado, e então transferido para as condições de fermentação. A adição de sal após a maceração enzimática teve como finalidade paralisar a atividade das enzimas de maceração.

MSS: Pesaram-se aproximadamente 160 g de polpa de pimenta, adicionaram-se 20% (m/m) de água (32,0 g) e $1000 \mu\text{L} \cdot \text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ (145,5 μL) de Pectinex AR e de Celluclast. Após homogeneização mecânica, o pote foi fechado e incubado em *shaker* orbital sem agitação a 50°C por 18 horas. Depois da maceração enzimática, os frascos foram encaminhados para as condições de fermentação.

Para o processo fermentativo, todas as amostras foram incubadas a 30°C durante 6 semanas em B.O.D.

A cada semana de fermentação, dois frascos de cada amostra foram recolhidos para o acompanhamento das análises físico-químicas, seguindo as metodologias descritas no item 4.2.1: pH, acidez total titulável, grupos redutores totais, cor, carotenoides (metodologia b) e capsaicinoides; e análises microbiológica, conforme metodologias do item 4.2.3: enterobactérias, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras.

3.3.4 Avaliação do rendimento do processo.

Um dos métodos para elaboração de molho de pimenta consiste na fermentação da polpa e posterior filtração para obtenção do líquido, denominado extrato, que é adicionado de vinagre e sal. Nesta etapa, buscou-se avaliar o rendimento em líquido de pimenta (extrato) a partir de quatro métodos diferentes, assim como seus conteúdos de carotenoides e de capsaicinoides, realizando-se o experimento em duplicata.

Inicialmente foram elaboradas quatro formulações diferentes, denominadas PCF, PCFA, PACF e PAMCF, de acordo com as etapas que ocorreram antes da separação das fases líquida e sólida. A formulação PCF foi utilizada para avaliar o rendimento de extrato sem adição de água, enquanto a formulação PCFA reproduz o processo tradicional industrial de fermentação da polpa e obtenção do extrato para elaboração do molho de pimenta. A formulação PACF, sem adição de enzimas, foi utilizada como controle para a formulação PAMCF, cuja polpa foi adicionada de enzimas e de água na elaboração da formulação, já que a água é necessária para a maceração enzimática.

PCF (Polpa – Cloreto de sódio – Fermentação): Pesaram-se aproximadamente 140 g de polpa de pimenta em frascos de vidro, e adicionaram-se 10% (m/m) de cloreto de sódio P.A. (14 g). A amostra levada para fermentação.

PCFA (Polpa – Cloreto de sódio – Fermentação – Água): Pesaram-se aproximadamente 140 g de polpa de pimenta e adicionaram-se 10% (m/m) de cloreto de sódio P.A. (14 g). Após a fermentação, 20% (m/m) de água destilada (28 g) foram adicionadas à amostra.

PACF (Polpa – Água – Cloreto de sódio – Fermentação): Pesaram-se aproximadamente 140 g de polpa de pimenta, adicionaram-se 10% (m/m) de cloreto de sódio P.A. (14 g) e 20% (m/m) de água destilada (28 g). A amostra foi incubada para que a fermentação ocorresse.

PAMCF (Polpa – Água – Maceração enzimática – Cloreto de sódio – Fermentação): Pesaram-se aproximadamente 140 g de polpa de pimenta, adicionaram-se 20% (m/m) de água destilada (28 g) e $1000 \mu\text{L} \cdot \text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$, correspondente a 140 μL de Pectinex AR e de Celluclast. Os frascos foram fechados e incubados a 50°C por 18 hs em *shaker* orbital sem agitação. Decorrido o tempo de maceração enzimática, os potes foram abertos e adicionados de 10% (m/m) de cloreto de sódio P.A. (14 g). Os ingredientes foram homogeneizados com auxílio de bastão de vidro, e em seguida os potes foram novamente fechados, e transferidos para as condições de fermentação.

As polpas PCF, PCFA e PACF, após pesagem dos componentes nos frascos, foram homogeneizadas, tampadas e imediatamente incubadas a 30°C por quatro semanas em B.O.D. A polpa PAMCF foi fermentada após a maceração enzimática, nas mesmas condições das outras amostras.

As Figuras 12, 13, 14 e 15 representam as etapas de preparo das formulações e obtenção do extrato.

A separação das fases líquida e sólida de cada amostra foi realizada com uma peneira de uso doméstico com abertura de 2 mm, onde o conteúdo dos potes foi comprimido contra a peneira com uma colher até que o máximo de líquido fosse extraído. O extrato foi pesado para o cálculo do rendimento com base no peso total inicial. O rendimento foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa de extrato}}{(\text{Massa de polpa} + \text{Massa de cloreto de sódio} + \text{Massa de água})} \times 100$$

Os extratos foram analisados quanto às concentrações de carotenoides (metodologia b) e de capsaicinoides, seguindo as metodologias descritas no item 4.2.1.

A Figura 16 ilustra as etapas de preparo das formulações e separação do extrato e resíduo.

Figura 12 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PCF (Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação).

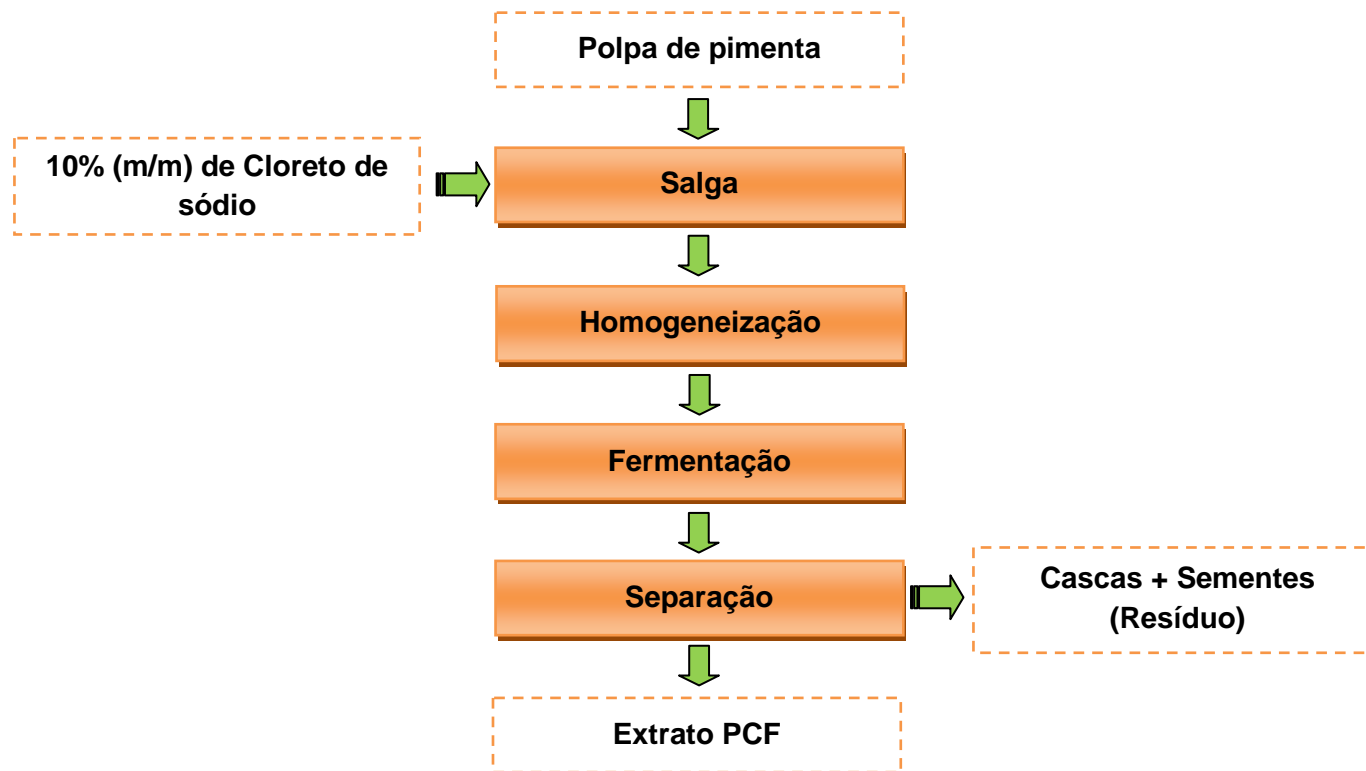


Figura 13 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PCFA (Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação-Água).

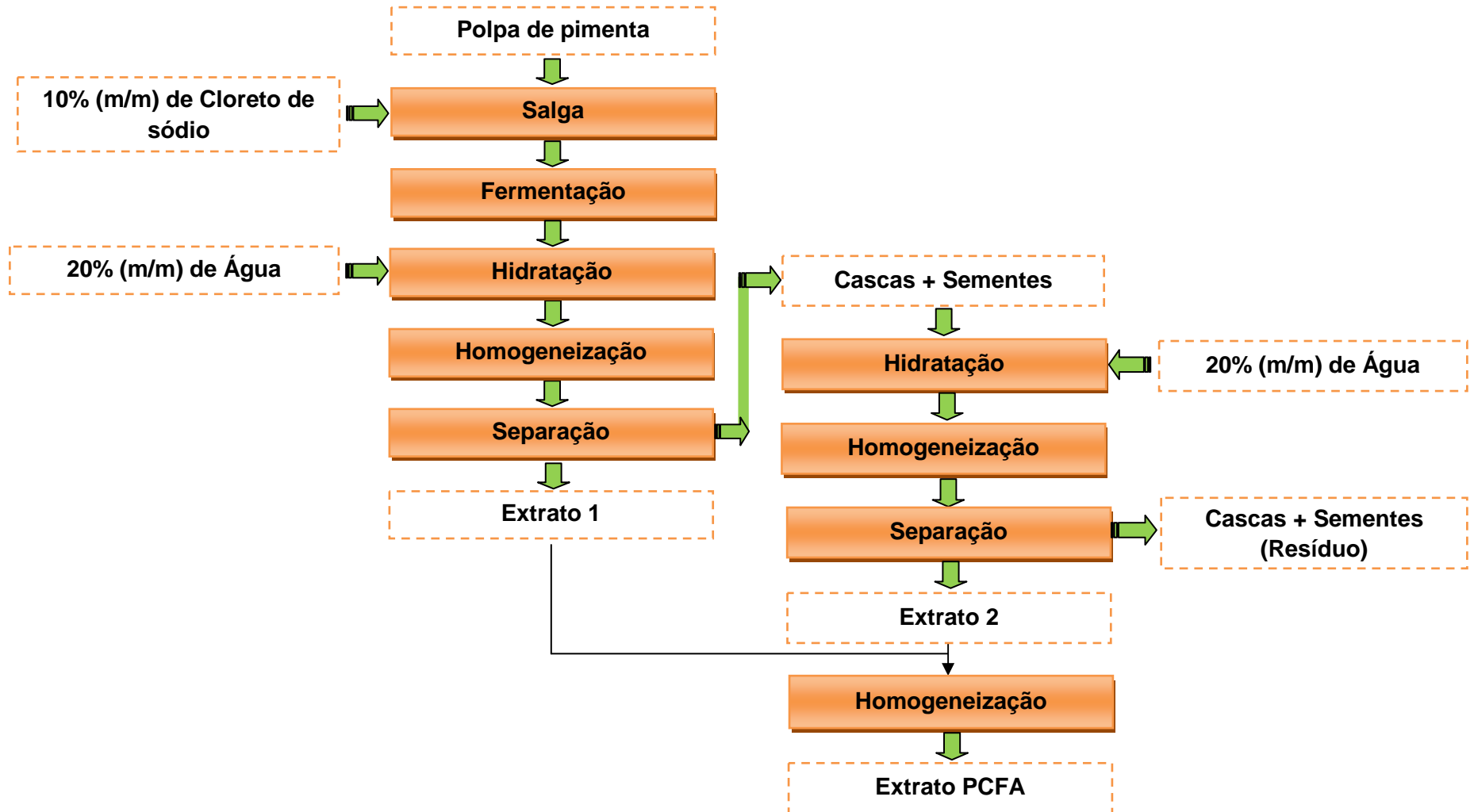


Figura 14 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PACF (Polpa-Água-Cloreto de sódio-Fermentação).

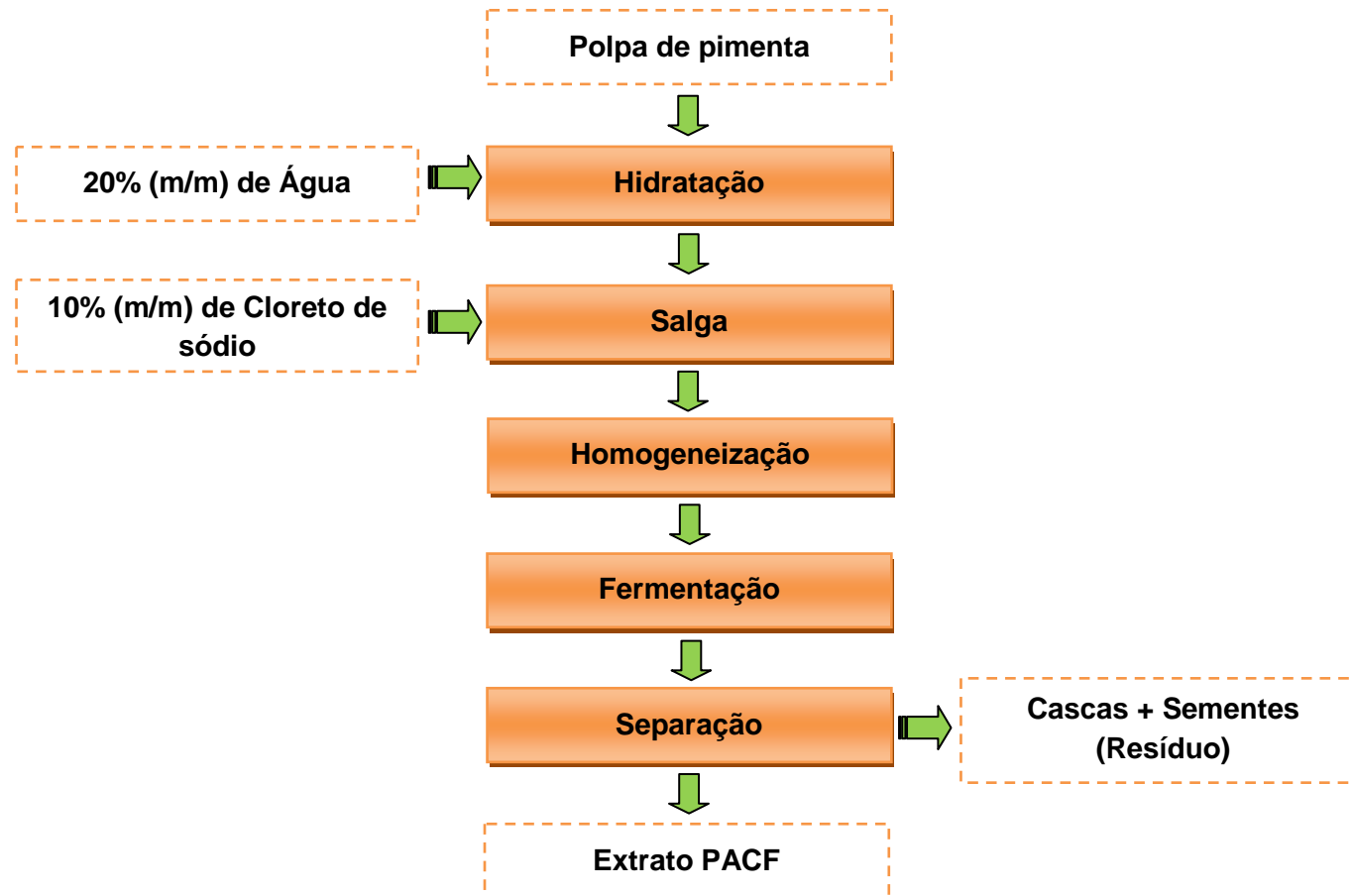


Figura 15 - Preparo da formulação para obtenção do extrato PAMCF (Polpa-Água-Maceração enzimática-Cloreto de sódio-Fermentação).

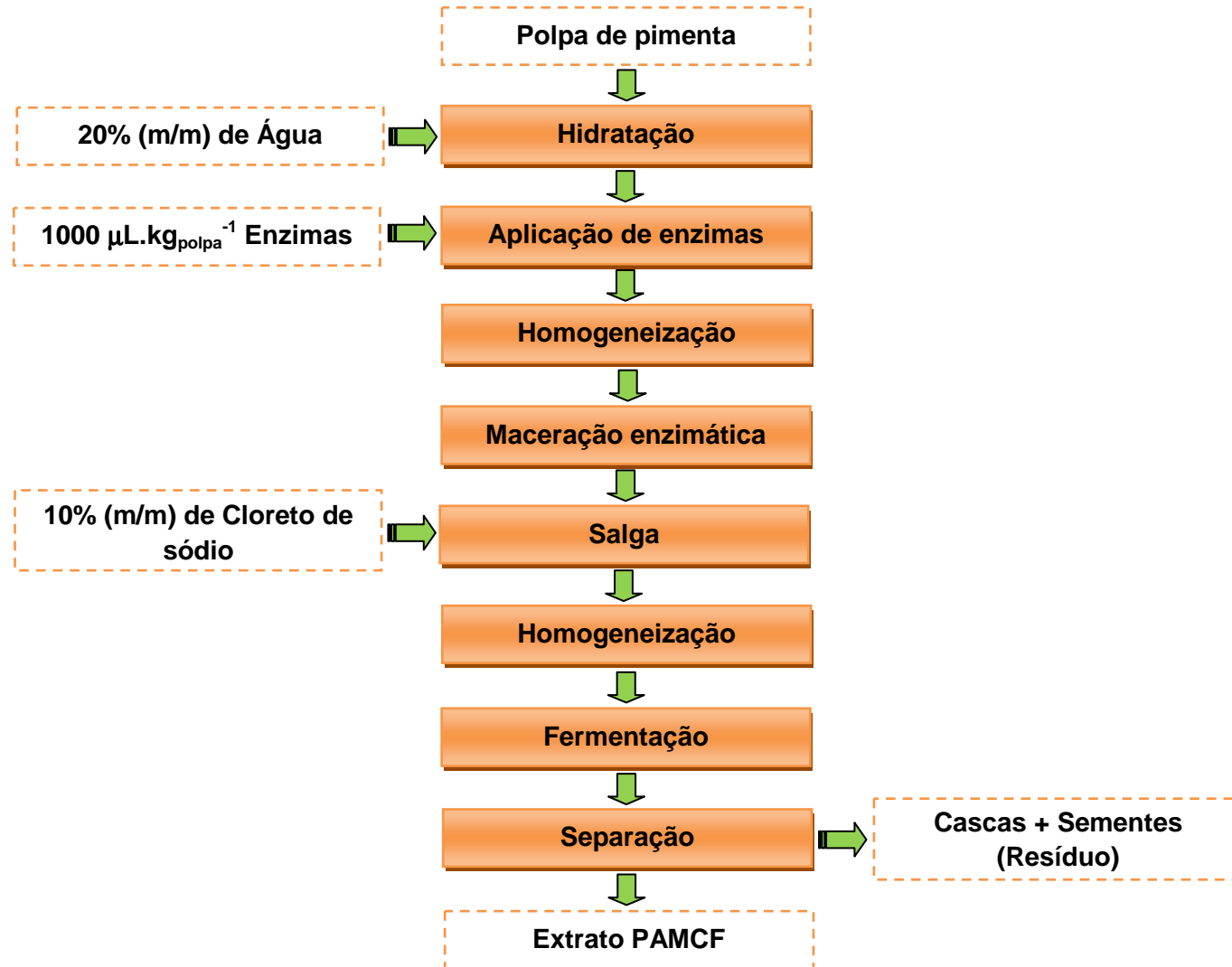
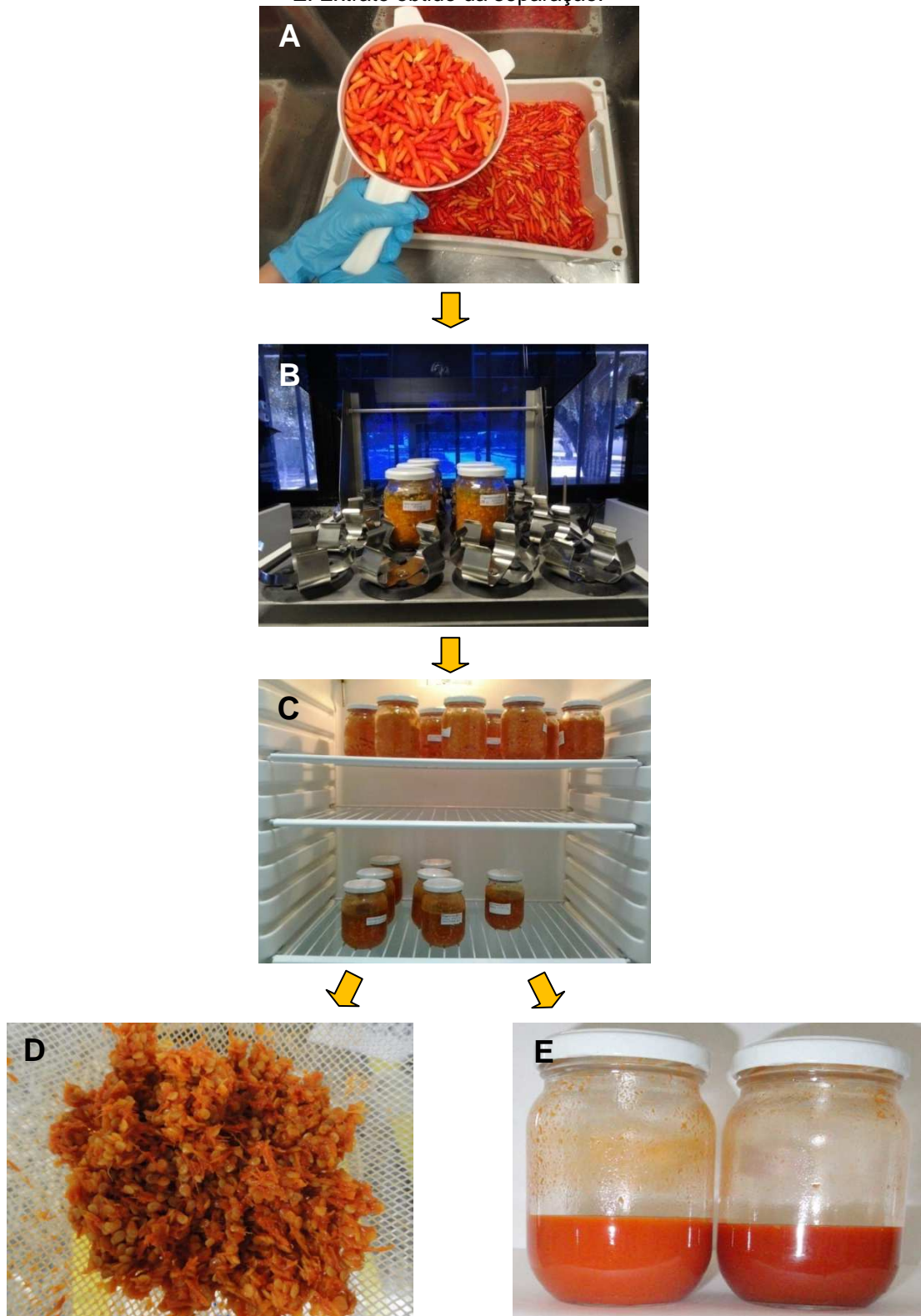


Figura 16 - Esquema ilustrativo das etapas do experimento de cálculo do rendimento em fase líquida de pimenta: **A**: Lavagem das pimentas sem pedúnculo; **B**: Maceração enzimática da formulação D em shaker sem agitação; **C**: Polpas fermentando em B.O.D. a 30°C; **D**: Resíduo resultante da separação; **E**: Extrato obtido da separação.



3.3.5 Elaboração dos molhos de pimenta.

Para a elaboração dos molhos, inicialmente foram preparadas polpas com as formulações PACF (Figura 14) e PAMCF (Figura 15). Os equipamentos e utensílios utilizados para a obtenção da polpa foram previamente sanitizados com solução clorada. As formulações foram preparadas em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Adicionou-se água mineral e sal iodado comercial às polpas ao invés da água destilada e cloreto de sódio P.A., utilizados nos experimentos de rendimento. Após quatro semanas de fermentação, e obtenção dos extratos PACF e PAMCF, foram formulados os molhos de pimenta.

Haja vista que há disponível muitas variedades de receitas e procedimentos para a produção de molhos de pimenta, buscou-se informações sobre a composição de molhos comercialmente conhecidos, de formulação mais simples, com a menor quantidade de ingredientes possível, de forma que o sabor de pimenta ficasse mais perceptível.

Verificou-se que os molhos de composição mais simples são constituídos apenas de pimenta (inteira ou não), vinagre e sal. Ao invés de se utilizar a pimenta inteira ou a polpa, utilizou-se o extrato separado do resíduo da polpa, obtido como mostrado nas Figuras 14 e 15. Para escolha da melhor formulação, foi realizada uma sessão de grupo de foco com dois provadores, consumidores de molho de pimenta, os quais foram solicitados a provar os molhos elaborados com diferentes proporções extrato:vinagre:sal. Nesta etapa utilizou-se somente o líquido obtido da polpa macerada enzimaticamente (extrato PAMCF).

Os molhos foram formulados usando a proporção 10:10:1 de extrato de pimenta:vinagre:sal, respectivamente, e o preparo consistiu apenas em juntar os ingredientes em um recipiente e agitar mecanicamente até completa dissolução do sal.

3.3.6 Análise sensorial dos molhos de pimenta.

Os testes sensoriais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará sob o Parecer 147.279/2012.

a. Amostras

Foi chamado de Molho 1, aquele preparado com o extrato proveniente da formulação PACF, ou seja, sem maceração enzimática da polpa, e de Molho 2 o que foi preparado com o extrato proveniente da formulação PAMCF, cuja polpa foi macerada enzimaticamente.

Os molhos recém-preparados foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Agroindústria Tropical, onde foram analisados quanto à pesquisa de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp, para verificar se as amostras estavam de acordo com os padrões legais vigentes (BRASIL, 2001).

b. Provadores

Os provadores consistiram de estagiários e funcionários da Embrapa Agroindústria Tropical, consumidores apreciadores de molhos de pimenta. Trinta julgadores, sendo 18 mulheres e 12 homens, participaram dos testes de aceitação da cor e caracterização descritiva do aroma e do sabor; enquanto 16 mulheres e 7 homens, totalizando 22 julgadores, participaram dos outros testes.

c. Instalações

Os testes foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial da Embrapa Agroindústria Tropical, dotadas de cabines individuais climatizadas, com iluminação controlada e informatizadas (software FIZZ versão 2.40A).

d. Condução dos testes de aroma

Para o aroma, as amostras foram servidas em taças de vidro, contendo 10 mL de molho, cobertas com vidro de relógio. Os provadores faziam movimentos circulares com a taça tampada e em seguida, com a taça destampada, levavam-na ao nariz. Pó de café foi utilizado entre as amostras, para neutralizar o aroma anterior.

e. Condução dos testes de sabor

Para o sabor, os molhos foram servidos em pão de forma cortados na forma de quadrados de aproximadamente 4 cm², servidos em copos descartáveis codificados com números aleatórios de três dígitos. Aos pães foram adicionados 10

gotas de amostra no momento de serem consumidos. Os provadores bebiam leite entre as amostras.

Tanto nos testes de aroma quanto nos de sabor, as amostras foram codificadas com números aleatórios de três dígitos, e o delineamento utilizado foi o de blocos completos inteiramente casualizados.

f. Caracterização descritiva do aroma e do sabor

A caracterização do aroma dos molhos de pimenta foi realizada através do teste "check-all-that-apply", conhecido como CATA.

O teste consiste em fornecer aos provadores uma lista de palavras ou frases na qual eles devem marcar os termos que consideram apropriados para descrever um determinado produto. Este tipo de teste tem sido utilizado em estudos com consumidores para determinar os atributos sensoriais que eles esperam encontrar em um produto alimentício (ARES *et al.*, 2010; DOOLEY *et al.*, 2010). Em comparação com outros métodos descritivos, o CATA tem a vantagem de requerer poucas instruções, de ser relativamente fácil de ser conduzido e de ser rápido (LANCASTER; FOLEY, 2007 *apud* DOOLEY *et al.*, 2010).

Primeiramente, realizou-se um levantamento de termos que já haviam sido utilizados na literatura para descrever pimentas, como os descritores relatados por Chitwood *et al.* (1983). Já com a melhor formulação escolhida (extrato:vinagre:sal, 10:10:1), foi realizada uma nova sessão de grupo de foco com dois provadores, os quais foram solicitados a escolher os termos dentre os existentes em uma ficha (Apêndice A), que melhor descreviam o aroma e sabor dos molhos de pimenta formulados com os extratos separados da polpa não macerada (extrato PACF) e macerada (extrato PAMCF), podendo-se incluir tantos termos quanto fossem percebidos nas amostras. Essa etapa foi importante para escolher os descritores a serem incluídos na ficha de avaliação sensorial.

Os testes foram realizados em cabines individuais, sob luz vermelha, para mascarar a cor da amostra, de forma que este atributo sensorial não influenciasse na percepção do aroma e sabor.

Após sentir o aroma da amostra, os provadores marcavam os termos presentes na ficha (Apêndice B) que melhor descreviam as notas aromáticas

percebidas. Outros termos eventualmente percebidos nas amostras que não estivessem presentes na lista puderam ser adicionados.

Para o sabor, após provarem a amostra, os provadores procediam de forma semelhante à descrita para a análise de aroma, marcando na ficha de avaliação os sabores percebidos e incluindo outros termos. A ficha sensorial preenchida pelos julgadores está representada no Apêndice B.

g. Intensidade de atributos de aroma e de sabor

Em uma segunda etapa, os testes sensoriais foram realizados em computadores, por meio do "FIZZ sensory analysis software". Todos os testes dessa etapa foram realizados em cabines individuais sob luz vermelha.

Os atributos de aroma avaliados foram: frutal, irritante, pimentão, pimenta, cítrico e molho de tomate apimentado. Os provadores foram solicitados a marcar em uma escala, que variava de "Fraco" (0) a "Forte" (9), a intensidade com que estavam sentido cada um dos descritores citados.

Para o sabor, avaliou-se intensidade de ardência e de molho de tomate picante, utilizando-se escala semelhante à de intensidade de aroma. As fichas sensoriais utilizadas para sabor e aroma estão disponíveis nos Apêndices C e D, respectivamente.

h. Aceitação da cor

Os provadores realizaram o teste de aceitação da cor em uma sala anexa ao laboratório, onde as amostras se encontravam expostas dentro de tubos de ensaio rosqueados, por serem os recipientes de laboratório mais parecidos com a embalagem para o molho de pimenta utilizada comercialmente, fina e comprida. Estas foram avaliadas por meio de escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo, 5 = nem gostei, nem desgostei, 9 = gostei muitíssimo) (Apêndice B).

i. Aceitação do sabor

Os molhos foram avaliados por meio de escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo, 5 = nem gostei, nem desgostei, 9 = gostei muitíssimo), de acordo com a ficha sensorial no Apêndice C.

j. Pareado preferência

Os julgadores foram solicitados a indicar a amostra de molho de pimenta mais preferida, colocando (1) para a menos preferida e (2) para a mais preferida, de acordo com a ficha sensorial no Apêndice C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da polpa de pimenta.

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal da polpa de pimenta tabasco sem sementes, em base úmida; enquanto a Tabela 2 apresenta sua caracterização química, em base seca.

Tabela 1 - Composição centesimal da polpa de pimenta sem sementes, em base úmida.

Composição centesimal	Valores
Umidade (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	87,02 ± 0,02
Extrato etéreo (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	6,12 ± 0,20
Proteína (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	0,94 ± 0,20
Cinzas (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	1,09 ± 0,01
Grupos redutores (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	1,81 ± 0,05
*Carboidratos totais (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	4,83

*Carboidratos totais = 100 – (Umidade + Extrato Etéreo + Proteína + Cinzas)

Tabela 2 - Caracterização da polpa de pimenta sem sementes, em base seca.

Caracterização	Valores
Capsaicinoides	
Capsaicina (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	0,41 ± 0,05
Didihidrocapsaicina (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	0,19 ± 0,04
Nordihidrocapsaicina (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	0,02 ± 0,00
* Carotenoides (g.100 g_{polpa}⁻¹)	0,24 ± 0,03
** AIR (g.100 g_{polpa}⁻¹)	18,49 ± 0,26
Pectina (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	3,48 ± 0,35
Hemicelulose (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	4,02 ± 0,39
Celulose e Lignina (g.100 g _{polpa} ⁻¹)	11,04 ± 0,45
Acidez total titulável (g.100 g_{polpa}⁻¹)	38,63 ± 0,23

*Segundo Rodriguez-Amaya (2001)
Alcohol Insoluble Residues

Pela quantificação dos resíduos insolúveis em álcool (AIR) observou-se que a polpa de pimenta possui concentrações semelhantes de pectina e

hemicelulose, destacando-se dentre o AIR, a maior concentração de celulose associada à lignina. Essa composição do AIR da polpa de pimenta mostra que esta pode ser macerada enzimaticamente por enzimas pectinolíticas e celulolíticas para a modificação da consistência da polpa.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho aos encontrados na literatura (KADAKAL *et al.*, 2001; WALL; WADDELL; BOSLAND, 2001; KRAIKRUAN *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA, 2011; VALVERDE, 2011), verificou-se como a composição das pimentas é variável dentro da mesma espécie. Segundo Buggenhout *et al.* (2009) as características da matéria-prima são fortemente dependentes da genética e do seu grau de maturação, mas podem ser afetadas por práticas culturais como aplicações de fertilizantes e/ou hormônios, estresse ambiental como seca, estresse pelo frio, estresse pelo congelamento, e outros.

4.2. Comparação entre o processo fermentativo autóctone de polpa de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.) com e sem adição de sal.

Devido à variabilidade na composição e concentração das características químicas das pimentas, como conteúdo de açúcares, pH e acidez; assim como da microbiota presente, que são dependentes de fatores intrínsecos e extrínsecos, diferenças no processo fermentativo de um mesmo tipo de pimenta, nas mesmas condições podem ocorrer.

O estudo do processo fermentativo autóctone foi realizado pela comparação entre polpas com e sem adição de sal. Os resultados das análises microbiológicas estão disponibilizados na Tabela 3. Foi verificada a presença de todos os grupos de micro-organismos avaliados no tempo inicial em ambas as polpas. As bactérias ácido-láticas predominaram, apresentando contagens da ordem de 10^9 UFC.g⁻¹. Verificou-se um decréscimo na concentração de bactérias ácido-láticas, bolores e leveduras e enterobactérias com o tempo nas polpas estudadas. A microbiota das polpas de pimenta apresentou comportamento semelhante à da couve-flor durante a sua fermentação autóctone (PARAMITHIOTIS *et al.*, 2010). Com exceção de bolores e leveduras, a população dos outros micro-organismos avaliados foi maior do que na polpa de pimenta tabasco com sal estudada por Crisóstomo *et al.* (2008).

Tabela 3 - Populações de enterobactérias, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras nas polpas de pimenta.

Tempo (semanas)	Enterobactérias (UFC.g ⁻¹)		Bactérias ácido-láticas (UFC.g ⁻¹)		Bolores e leveduras (UFC.g ⁻¹)	
	Sem sal	Com sal	Sem sal	Com sal	Sem sal	Com sal
0	2,82 × 10 ⁹	6,15 × 10 ⁸	8,16 × 10 ⁹	1,37 × 10 ⁹	1,27 × 10 ⁵	5,25 × 10 ³
1	4,60 × 10 ⁵	6,05 × 10 ⁴	6,80 × 10 ⁸	6,80 × 10 ⁷	< 100	1,28 × 10 ⁴
2	1,00 × 10 ³	1,72 × 10 ⁶	1,48 × 10 ⁸	1,26 × 10 ⁷	< 100	1,30 × 10 ³
3	< 10	< 10	6,90 × 10 ⁷	4,85 × 10 ⁶	< 100	9,50 × 10 ²
4	< 10	< 10	5,70 × 10 ⁷	3,50 × 10 ⁶	< 100	< 100
6	< 10	< 10	2,95 × 10 ⁷	5,50 × 10 ⁵	< 100	< 100
9	< 10	< 10	3,50 × 10 ⁶	1,45 × 10 ⁶	< 100	< 100

Crisóstomo *et al.* (2008) estudaram uma polpa de pimenta tabasco de uma unidade de processamento. Nesta unidade não era realizada uma limpeza na linha de produção entre os processamentos de pimentas, e por isso, a matéria-prima que era processada no dia posterior recebia um inóculo natural de micro-organismos que se desenvolviam nos resíduos deixados nos equipamentos. Isso pode justificar a maior população inicial de bolores e leveduras na polpa analisada por eles, que foi de $3,20 \times 10^7$ UFC.g⁻¹.

No presente trabalho, a concentração inicial de enterobactérias foi de $2,82 \times 10^9$ e $6,15 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ (base úmida), na polpa sem e com sal, respectivamente. A presença de enterobactérias na polpa *in natura* se justifica pelo fato de os vegetais serem frequentemente contaminados por um grande número de micro-organismos deteriorantes e, em alguns casos, patogênicos (DI CAGNO *et al.*, 2009b).

Os frutos de pimenta não crescem em contato com o solo, dessa forma suas possíveis fontes de contaminação são as mãos dos manipuladores durante a colheita e a falta de higienização dos recipientes utilizados para seu armazenamento. A menor concentração de enterobactérias na polpa salgada já logo após o processamento mostra o rápido efeito do sal na inibição desses micro-organismos. Após 3 semanas de avaliação, as enterobactérias não foram mais detectadas. A redução da população de enterobactérias durante a fermentação natural de vários tipos de vegetais em que as bactérias ácido-láticas predominam tem sido reportada por vários autores (SÁNCHEZ *et al.* 2000; CRISÓSTOMO *et al.*, 2008; PARAMITHIOTIS *et al.*, 2010).

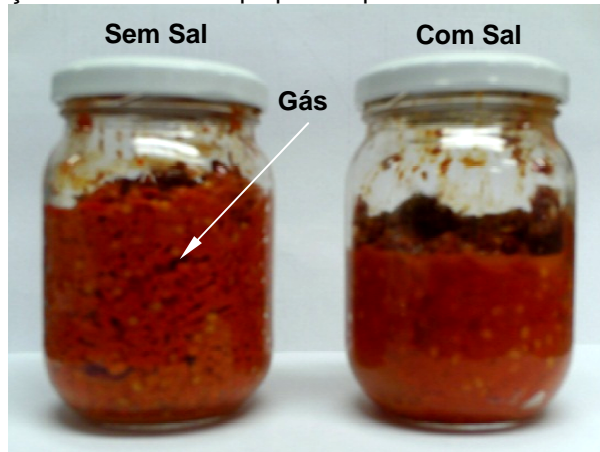
Pelo acompanhamento da microbiota das polpas durante a fermentação, verificou-se a ausência de enterobactérias nas amostras avaliadas a partir da terceira semana e por isso a partir desse tempo de fermentação a polpa apresenta segurança microbiológica com relação a potenciais patógenos. Assim a fermentação representa um aspecto positivo no processamento para a elaboração de produtos a base de pimenta. A produção e aumento da concentração de ácido láctico proporciona uma mudança na acidez, o que resulta em alteração do sabor e inibe o crescimento de outros micro-organismos.

Ji *et al.* (2007) relatam um estudo sobre a produção de chucrute, no qual as enterobactérias cresceram durante a fermentação, mas a população foi reduzida quando o vegetal foi fermentado em condições anaeróbicas.

As contagens de bactérias ácido-láticas decresceram ao longo do tempo, entretanto na polpa com sal essa redução foi mais significativa. Isso foi comprovado uma vez que entre o tempo 0 e a 6ª semana de avaliação, a concentração de bactérias ácido-láticas reduziu 2 ordens de grandeza na ausência do sal e 4 na polpa salgada. Após a 6ª semana, a concentração continuou decrescendo na polpa sem sal, havendo uma redução de 3 ordens de grandeza da população inicial na 9ª semana; enquanto na presença do sal observou-se uma elevação de um ciclo da população de bactérias ácido-láticas.

A menor ocorrência de bactérias ácido-láticas na polpa com sal pode estar relacionada a uma das funções do sal na fermentação, que é a seleção de bactérias ácido-láticas homofermentativas. Com a eliminação ou redução das heterofermentativas, pode ter havido um decréscimo da população total. Os resultados obtidos para as contagens de bactérias ácido-láticas estão relacionados à observação visual das polpas. A polpa sem sal apresentou formação de gás no interior do recipiente em todos os tempos de avaliação, o que não ocorreu na presença do sal. Isso foi verificado através da presença de espaços vazios na polpa (Figura 17), e no momento da abertura dos frascos.

Figura 17 - Comparação visual entre as polpas de pimenta sem e com sal, respectivamente.



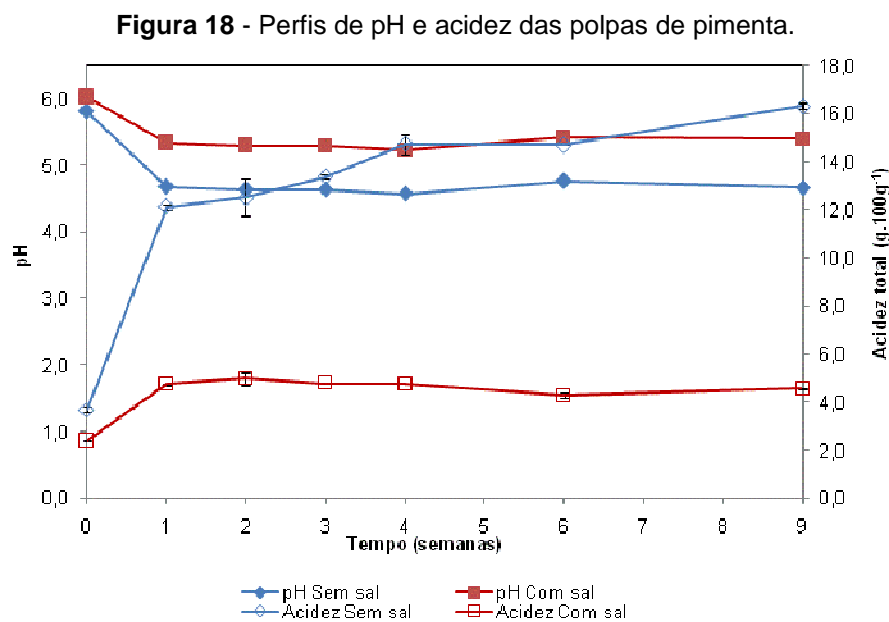
As bactérias ácido-láticas são divididas em dois grupos, com base nos produtos finais do metabolismo da glicose. Aquelas que produzem ácido lático como o maior ou único produto da fermentação da glicose são designadas homofermentativas. Aquelas que produzem quantidades iguais de lactato, dióxido de carbono e etanol de hexoses são designadas heterofermentativas (JAY, 2000). Supõe-se então, que houve maior concentração de bactérias ácido-láticas heterofermentativas na polpa sem sal, enquanto na presença de sal, as homofermentativas, que não produzem gás, devem ter predominado.

Segundo Özay e Borcakli (1996) a concentração de sal é um dos fatores que controlam também a fermentação de azeitonas. Eles observaram que quando a concentração de sal da salmoura passou de 6 g/mL para 14 g/mL, considerada muito alta, o crescimento de bactérias ácido-láticas foi cessado.

Segundo Di Cagno *et al.*, (2009b), a fermentação autóctone de vegetais é frequentemente caracterizada pela sucessão de bactérias ácido-láticas hetero e homofermentativas, juntamente ou não com leveduras. No trabalho de Özay e Borcakli (1996), a concentração de sal não influenciou o crescimento de leveduras durante a fermentação de azeitonas em salmoura. Entretanto, ao contrário das azeitonas, a fermentação de polpa de pimenta é caracterizada pela predominância de bactérias ácido-láticas, podendo haver aumento da população de leveduras, caso as condições do meio sejam modificadas à medida que as bactérias ácido-láticas se multiplicam, e favoreçam seu crescimento. No presente estudo a concentração de bolores e leveduras decresceu com o tempo tanto na polpa com sal quanto na ausência de sal, mantendo-se por mais tempo na polpa salgada.

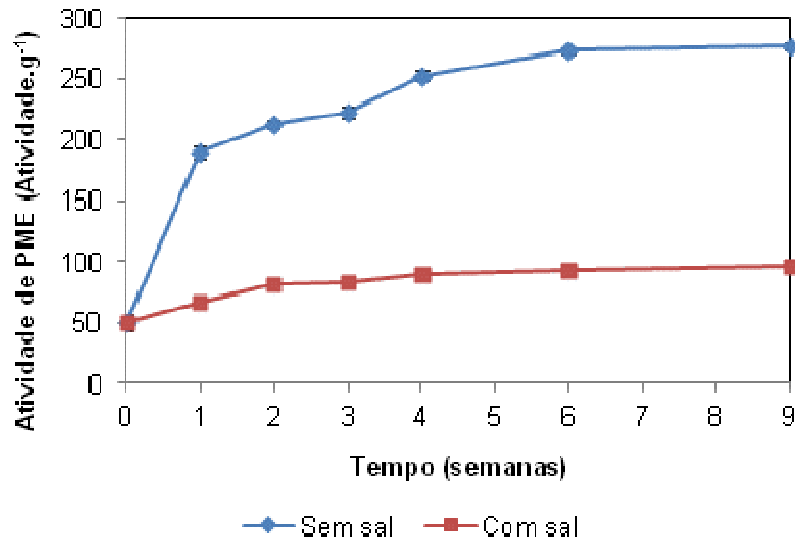
Devido à maior população de bactérias ácido-láticas, a polpa sem sal apresentou menor pH e maior acidez ao longo do tempo de avaliação das amostras. Os perfis de pH nos dois tipos de polpa estudados foram semelhantes ao longo do tempo. No início, o pH era 6,0 e 5,8 na polpa com e sem sal, respectivamente. Ao longo da fermentação, o pH decresceu ao passo que a acidez total aumentou. O pH ao final da fermentação foi de 5,4 (com sal) e 4,7 (sem sal), conforme mostra a Figura 18. Na polpa sem sal a acidez variou de 3,7% a 16,3% enquanto na presença de sal o aumento foi de 2,4% para 4,6%, conforme mostra a Figura 18.

A legislação brasileira não determina um valor de pH específico para molhos de pimenta, mas segundo García-Martínez *et al.* (2006) a Norma Oficial Mexicana especifica um valor mínimo de pH de 4,6 para a conservação de frutas e hortaliças por meio de fermentação láctica.



Dentre as enzimas pectinolíticas determinadas, somente a atividade de pectinametilsterase (PME) foi detectada em ambas as polpas, conforme mostra a Figura 19, sendo esta maior na polpa sem sal, uma vez que o sal inibe a atividade enzimática. Ji *et al.* (2007) relatam que o sal (NaCl) inibiu a atividade de enzimas pectinolíticas fúngicas durante a fermentação de pepinos.

Figura 19 - Atividade de pectinametilsterase (PME) nas polpas de pimenta sem e com sal.



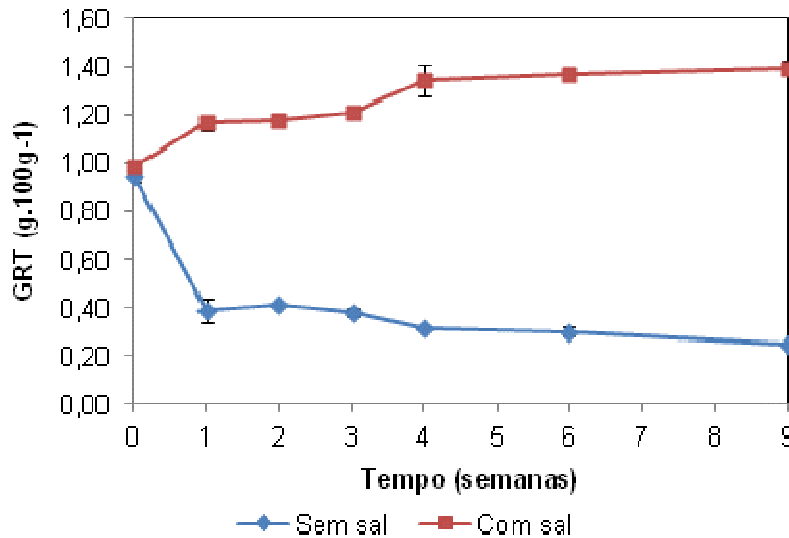
A pectinametilsterase é uma das enzimas que liberam ácidos carboxílicos e ácidos galacturônicos, o que causa uma redução no pH da polpa.

Uma unidade de atividade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de um nanomol de NaOH por dez minutos (JEN; ROBINSON, 1984).

O fato de não ter sido detectada atividade de enzimas pectinolíticas despolimerizantes (PL e PG) pelo método analítico utilizado, não significa sua ausência nas polpas. Essas enzimas, quando atuam na pectina do tecido vegetal, liberam grupos redutores.

A concentração de grupos redutores inicial foi semelhante nos dois tipos de polpa (Figura 20). Na ausência de sal, os açúcares decresceram com o tempo. Apesar da redução das populações dos micro-organismos avaliados, o decréscimo dos grupos redutores se deve ao seu consumo pelos micro-organismos ainda viáveis, presentes na polpa, para a manutenção do seu metabolismo. Também pode ter havido seu consumo por outros micro-organismos que não foram quantificados.

Figura 20 - Concentração de grupos redutores (GRT) nas polpas de pimenta.



Na presença do sal, a concentração de grupos redutores aumentou. García-Martínez *et al.* (2006) reportaram fato semelhante durante a fermentação de pimenta jalapeño (*Capsicum annuum* L.), e atribuíram tal comportamento à possível mudança ou desvio de alguma rota metabólica dos micro-organismos, fazendo com que utilizassem fontes alternativas de carbono em vez de açúcares hidrossolúveis. Assim, teria havido um acúmulo dos grupos redutores liberados pela degradação de componentes da parede celular, como a pectina, por enzimas pectinolíticas do próprio vegetal. Segundo os autores, esta alteração seria dependente das condições do meio.

Associado a isso, dentro dos grupos de micro-organismos monitorados, existem diferenças bioquímicas entre espécies, e a presença do sal pode ter direcionado à seleção de micro-organismos que não são capazes de assimilar grupos redutores resultantes da degradação da pectina do tecido vegetal. Sakai *et al.* (1993) afirma que endopoligalacturonases são produzidas por vários fungos e bactérias e por poucas leveduras. Assim, esse fato pode ter se dado também por enzimas produzidas pelos microrganismos presentes na polpa durante a fermentação.

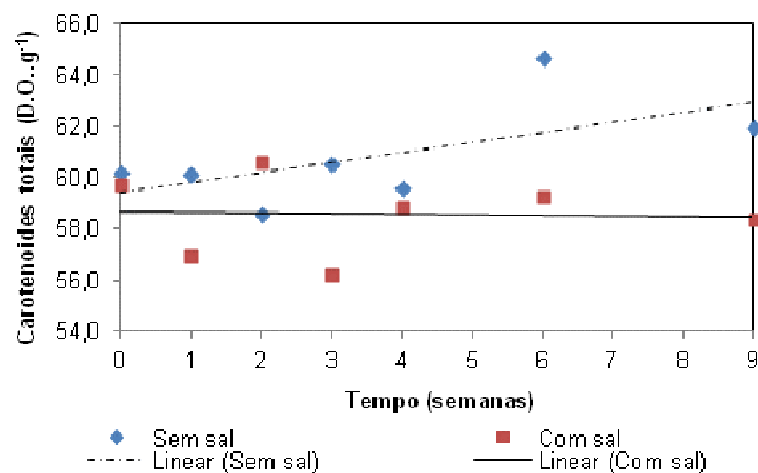
Segundo Etchells *et al.* (1943), a salga seca é um dos métodos de preservação de vegetais que utiliza sal mais conhecidos. Nesse método, o sal sólido é adicionado diretamente ao material vegetal. Como um resultado da ação do sal no

tecido vegetal, a água é removida, dissolvendo o sal e formando a salmoura. De acordo com Koh (2005), a fase líquida formada pela plasmólise, juntamente com a água intracelular de transporte de vitaminas e outros fatores de crescimento, servem como meio nutriente. Dessa forma, a quantidade de grupos redutores liberados, pela ação osmótica do sal ou pela ação de enzimas produzidas pelos micro-organismos; pode ter sido maior do que a quantidade assimilada pela microbiota presente na polpa com sal.

O Apêndice E disponibiliza os valores de carotenoides totais das polpas de pimenta. As polpas com sal apresentaram as menores concentrações de carotenoides, em termos de densidade ótica, e foram significativamente diferentes das amostras sem sal ($p < 0,05$). Mas como para 100g de amostra salgada, 90g corresponde à polpa de pimenta e 10g é sal, calcularam-se as concentrações de carotenoides descontando-se a quantidade de sal, e dessa forma observou-se um aumento das concentrações nas amostras adicionadas de sal.

O teor de carotenoides não variou significativamente com o tempo ($p > 0,05$). A Figura 21 ilustra a concentração de carotenoides totais nas polpas analisadas.

Figura 21 - Carotenoides totais nas polpas de pimenta fermentadas.



A regressão linear não foi significativa ($p > 0,05$) em ambas as polpas, com baixo coeficiente de determinação (R^2), indicando que a variação da concentração de carotenoides ao longo da fermentação das polpas foi pouco explicada pela regressão (Tabela 4).

Tabela 4 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos carotenoides totais das polpas de pimenta fermentadas.

Amostra	R ²	Equação do modelo	p _{valor}
Sem sal	0,3789	Y = 59,39 + 0,39x	0,1063
Com sal	0,0017	Y = 58,64 - 0,02x	0,9248

Quanto à avaliação da cor, apenas o parâmetro L* foi significativamente diferente (p<0,05) entre os dois tipos de polpa já no tempo inicial, enquanto a e b foram diferentes a partir de uma semana de fermentação (Tabela 5). Os valores de L*, a* e b* decresceram ao longo da fermentação e no tempo 9, foram significativamente diferentes (p<0,05) do tempo 1. A polpa com sal apresentou maiores valores para os parâmetros L*, a* e b* ao longo do tempo; indicando que ela manteve sua luminosidade, assim como suas colorações vermelha e amarela mais intensas do que a polpa sem sal. Isso também confirmado através da magnitude da diferença de cor (ΔE), que em todos os tempos, foi menor na polpa com sal, indicando menor diferença entre a coloração da polpa em cada tempo quando comparada com a cor inicial da polpa.

Tabela 5 - Parâmetros de cor das polpas de pimenta durante a fermentação.

Tempo*	L*		a*		b*		ΔE	
	Sem sal	Com sal	Sem sal	Com sal	Sem sal	Com sal	Sem sal	Com sal
0	38,6 ± 0,4 ^{ab}	39,5 ± 0,3 ^{aA}	25,7 ± 0,5 ^{aA}	26,3 ± 0,3 ^{aA}	32,9 ± 1,3 ^{aA}	33,7 ± 1,6 ^{aA}	--	--
1	37,4 ± 0,7 ^{bA}	38,5 ± 0,2 ^{bA}	19,5 ± 1,8 ^{bB}	24,4 ± 0,8 ^{abA}	27,5 ± 1,1 ^{bB}	30,9 ± 1,3 ^{bA}	8,3	3,5
2	35,6 ± 0,2 ^{cB}	38,2 ± 0,6 ^{bcA}	18,6 ± 1,5 ^{bB}	23,5 ± 1,2 ^{bA}	26,5 ± 0,6 ^{bcB}	30,3 ± 1,0 ^{bcA}	10,0	4,6
3	35,6 ± 0,3 ^{cB}	38,2 ± 0,0 ^{bcA}	17,8 ± 1,1 ^{bB}	24,9 ± 0,4 ^{abA}	25,3 ± 0,6 ^{bcB}	30,0 ± 0,2 ^{bcA}	11,3	4,2
4	35,2 ± 0,4 ^{cB}	38,1 ± 0,3 ^{bcA}	17,9 ± 0,3 ^{bB}	24,3 ± 1,1 ^{abA}	24,4 ± 0,4 ^{cB}	30,8 ± 0,3 ^{bA}	11,9	3,8
6	35,7 ± 0,2 ^{cB}	37,5 ± 0,3 ^{cA}	17,9 ± 1,3 ^{bB}	22,8 ± 0,7 ^{bA}	25,9 ± 0,2 ^{bcB}	30,3 ± 0,6 ^{bcA}	10,8	5,3
9	35,7 ± 0,1 ^{cB}	36,4 ± 0,2 ^{dA}	18,7 ± 1,4 ^{bB}	22,8 ± 0,3 ^{bA}	25,2 ± 1,1 ^{bcB}	27,8 ± 0,2 ^{cA}	10,8	7,4

*Tempo em semanas

Valores da cor ± desvio padrão. Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05) na coluna pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05) na linha, para um determinado parâmetro de cor comparando a polpa sem e com sal.

A diferença de coloração também pôde ser observada visualmente, onde a polpa com sal apresentou-se com coloração vermelha mais intensa do que na ausência de sal (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Polpa de pimenta sem sal no tempo inicial e polpas fermentadas após 1, 2, 3, 4, 6 e 9 semanas, respectivamente.



Figura 23 - Polpa de pimenta com sal no tempo inicial e polpas fermentadas após 1, 2, 3, 4, 6 e 9 semanas, respectivamente.



Pode-se relacionar a intensa coloração vermelha da polpa adicionada de sal com a migração de carotenoides do interior das células vegetais para o meio externo, proporcionada pela pressão osmótica causada pelo sal.

Segundo Rahim e Mat (2012), os frutos de pimenta são considerados fonte de antioxidantes. Além disso, Gökmen (2010) cita que as enzimas polifenoloxidasas endógenas podem causar alterações de cor em vegetais, assim como as peroxidases, em menor extensão. Ahmed, Shivhare e Ramaswamy (2002) relatam que o tempo e temperatura de estocagem influenciaram na cor da pasta de pimenta, observando-se uma rápida degradação quando as pastas foram estocadas a 25°C e 37°C. Eles atribuíram a redução dos valores de cor das pastas à oxidação dos pigmentos carotenoides. Então é possível que tenha ocorrido oxidação de compostos antioxidantes na amostra sem sal, o que foi inibida pelo sal na amostra salgada.

A modificação da força iônica do meio provocada pelo sal também pode ter influenciado nessa diferença de coloração. Segundo Gimeno, Astiasarán e Bello (2001), a cor é um dos atributos sensoriais que podem ser afetados quando a concentração de cloreto de sódio é modificada em produtos cárneos, como em salsichas fermentadas estudadas por Gimeno, Astiasarán e Bello (1999).

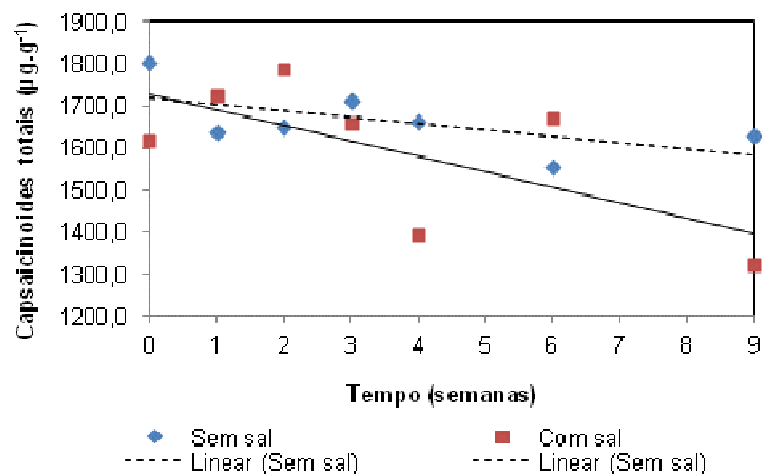
Dentre os capsaicinoides quantificados, apresentados no Apêndice F, a capsaicina foi aquela que se apresentou em maior concentração em ambas as polpas, seguido da dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina, corroborando com os resultados de Kraikruan *et al.* (2008). Um fato observado neste estudo, e também reportado por Zewdie e Bosland (2001), foi que a proporção capsaicina:dihidrocapsaicina em uma amostra de *Capsicum frutescens* foi de aproximadamente 2:1.

No presente trabalho as concentrações dos capsaicinoides totais variaram significativamente ($p < 0,05$) ao longo do tempo, assim como no estudo realizado por García-Martínez *et al.* (2006), onde verificou-se uma oscilação na concentração de capsaicina durante a fermentação de pimenta jalapeño. Entretanto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos.

Desconsiderando a presença do sal na polpa salgada, pelo mesmo cálculo citado para os carotenoides, observou-se um aumento no teor médio de capsaicinoides na polpa com sal em comparação à polpa sem sal, onde o acréscimo na concentração de capsaicina foi de 6,6%, na de dihidrocapsaicina foi de 4,98% e na de nordihidrocapsaicina foi de 6,8%. Contreras-Padilla e Yahia (1998) relatam estudos que sugerem que as peroxidases estão envolvidas na degradação dos capsaicinoides.

A Figura 24 ilustra o comportamento dos capsaicinoides nas polpas durante a fermentação.

Figura 24 - Capsaicinoides totais das polpas de pimenta durante a fermentação.



De acordo com a Tabela 6, o modelo linear foi significativo ($\alpha < 0,05$) para os dois tipos de polpa, e mostra que houve uma tendência de redução da concentração de capsaicinoides com o tempo de fermentação.

Tabela 6 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos capsaicinoides totais das polpas de pimenta fermentadas.

Amostra	R ²	Equação do modelo	p _{valor}
Sem sal	0,3809	Y = 1718,12 - 15,24x	0,0173
Com sal	0,4407	Y = 1728,00 - 37,04x	0,0135

Apesar de o cloreto de sódio ter reduzido a população dos microrganismos responsáveis pela fermentação da polpa de pimenta, sua presença direcionou o processo para uma fermentação homolática, sem produção de gás, o que é um aspecto positivo a nível industrial.

4.3 Caracterização das preparações enzimáticas.

A Tabela 7 apresenta os valores de atividade enzimática de poligalacturonase, pectinametilsterase, pectinoliase, xilanase e celulase das preparações enzimáticas utilizadas neste estudo.

Tabela 7 - Caracterização das preparações enzimáticas comerciais.

Preparações enzimáticas	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)				
	Poligalacturonase	Pectinametilsterase	Pectinoliase	Xilanase	Celulase
Ultrazym AFPL	833,00	29,98	6,32	74,46	16,08
Pectinex AR	408,48	3,58	1,45	176,50	74,44
Pectinex XXL	323,58	7918,32	3,93	202,76	0,76
Pectinex Smash XXL	N.D.	2732,12	2,20	21,95	4,46
Celluclast 1,5L	N.D.	808,00	5,02	407,95	15,34

N.D. = Não detectada

O complexo Celluclast mostrou baixa atividade de celulase, entretanto segundo Novozymes (2013), a enzima declarada, portanto com maior atividade, é a

celulase. A estocagem pode ter ocasionado a perda da atividade dessa enzima nessa preparação.

Os complexos enzimáticos são compostos por vários tipos de enzima, e essas preparações comerciais diferem entre si quanto à atividade dessas enzimas. Normalmente, a atividade da preparação enzimática é expressa pela atividade da enzima que predomina. Por exemplo, Bagger-Jørgensen e Meyer (2004) e Abdullah *et al.* (2007), citam que o complexo enzimático Pectinex Ultra SP-L contém diferentes enzimas pectinolíticas e celulolíticas, além de β -galactosidase, quitinase e transgalactosidase, mas a sua atividade enzimática é dada pela atividade de poligalacturonase por mililitro (26.000 PG.mL⁻¹).

Calcular a quantidade de enzima a ser aplicada somente pela atividade da enzima que predomina leva à necessidade constante de caracterização das enzimas, além da necessidade de se utilizar diferentes volumes de cada complexo enzimático para obtenção da mesma atividade da enzima principal ou de referência, e negligencia o efeito sinérgico das enzimas presentes no produto. Caso se proceda dessa forma, deve-se adotar uma, dentre as enzimas presentes no complexo, como sendo a padrão. Por exemplo, se nesse caso poligalacturonase fosse a enzima de referência, seria necessária a utilização do dobro do volume de Pectinex AR para mesma atividade de poligalacturonase da Ultrazym AFPL. Entretanto as atividades das outras enzimas presentes na Pectinex AR também duplicariam.

Em outro exemplo, Romero-Cascales *et al.* (2008) citam que para que haja a degradação da pectina, é necessário a combinação de enzimas do grupo das metilesterases, que removem os grupos metil das pectinas, e do grupo das despolimerases (hidrolases e liases), que clivam as ligações entre as unidades de ácido galacturônico. Assim, supõe-se que uma preparação enzimática com alta atividade somente de poligalacturonase será menos eficiente que uma preparação com mesma atividade de poligalacturonase em presença de pectinametilesterase.

Para fins de comparação do efeito da ação das enzimas do complexo enzimático sobre a polpa de fruta ou do material estudado, geralmente se utiliza a medida da enzima em porcentagem (gramas de preparação enzimática por 100 gramas de material) (BAGGER-JØRGENSEN; MEYER, 2004; SUN *et al.*, 2006; CHOUDHARI; ANANTHANARAYAN, 2007). As metodologias para estudo de

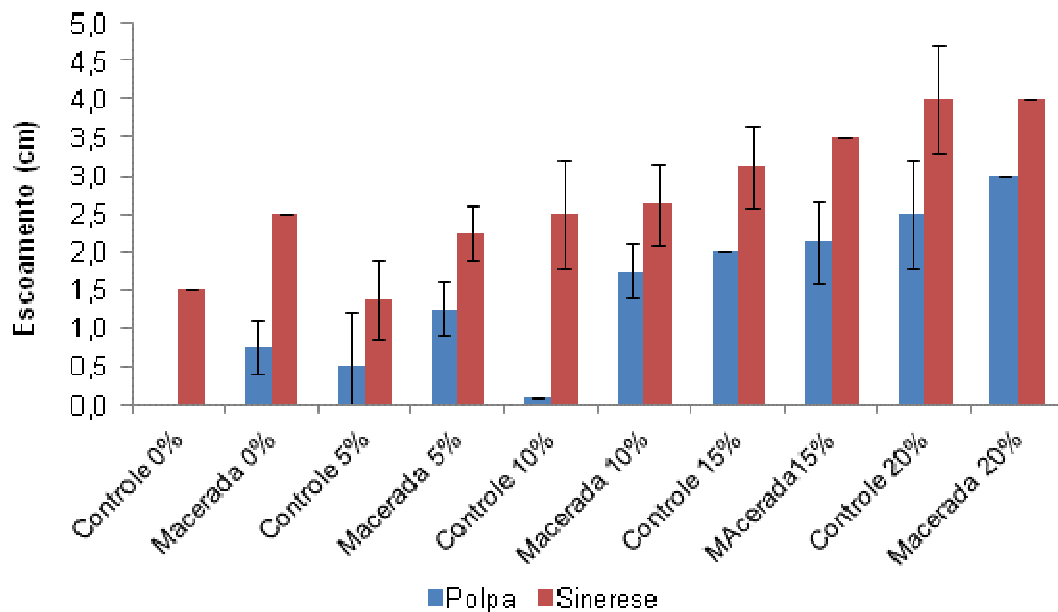
enzimas de maceração em polpas de fruta no laboratório onde os experimentos foram realizados também adotam o volume de enzima aplicado à determinada quantidade de polpa como método de comparação das preparações enzimáticas.

4.4 Estudo da maceração enzimática em polpa de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.).

4.4.1 Efeito da adição de água na maceração enzimática de polpa de pimenta.

As amostras apresentaram separação de fases (sinerese) no momento da análise de consistência. O escoamento da fase polposa e da aquosa, no geral, pareceu aumentar com o aumento da quantidade de água, mas verificando-se as barras de erro, percebe-se que não houve diferença na maioria dos escoamentos com a variação das proporções de água (Figura 25). Ainda assim, os maiores resultados foram com as maiores concentrações de água.

Figura 25 - Escoamento da polpa de pimenta com diferentes concentrações de água.



O fato de não ter havido diferença de escoamento entre as amostras e seus respectivos controles ocorreu porque provavelmente o tempo de 2 horas é insuficiente para uma redução de consistência significativa da polpa de pimenta.

Entretanto, esse tempo foi escolhido com base em trabalhos da literatura sobre maceração enzimática de polpa de frutas.

A adição de água por si só favoreceu o escoamento da polpa tanto nos controles quanto nas amostras maceradas, com tendência a se tornar mais homogênea, ou seja, apresentando menores diferenças entre o escoamento da polpa e da fase aquosa, com o aumento da concentração de água. Uma exceção foi observada no controle com 10% de água, no qual não foi observado deslocamento da polpa, resultando em maior diferença entre o escoamento da polpa na amostra macerada e seu controle.

De acordo com Aquino (2008), a adição de água à polpa de bacuri submetida ao tratamento enzimático por enzimas de maceração melhora a ação dessas enzimas, por atuarem mais uniformemente nos componentes da polpa.

Bagger-Jørgensen e Meyer (2004) estudaram a maceração enzimática de groselha de 1 a 4 horas e verificaram que a degradação enzimática da pectina para liberação de suco ocorreu na primeira hora de reação. Abdullah *et al.* (2007) recomendam 20 minutos de maceração enzimática de polpa de carambola para a clarificação do suco, Tadakittisarn *et al.* (2007) escolheram o tempo de 120 minutos para a extração de suco de banana através de maceração por enzimas pectinolíticas.

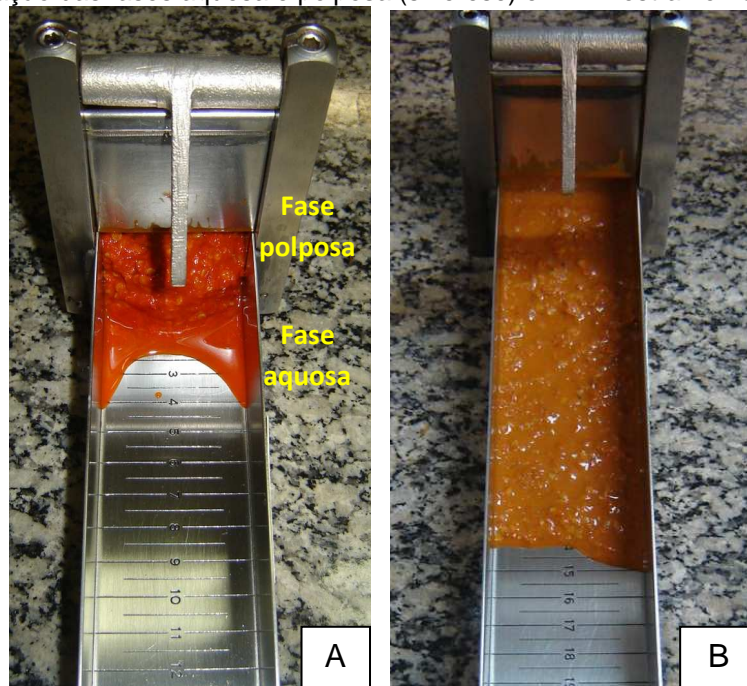
Provavelmente o tempo de maceração enzimático de 2 horas não foi suficiente para que ocorresse uma redução de consistência significativa na polpa de pimenta, por esse motivo não foi observada diferença entre os escoamentos das polpas e dos controles com o aumento da proporção de água adicionada. Assim, tempos maiores de maceração devem ser testados.

4.4.2 Avaliação de uma preparação enzimática pectinolítica na maceração enzimática de polpa de pimenta.

As polpas maceradas enzimaticamente por até 6 horas com Pectinex XXL nas concentrações de 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ (75, 375 e 750 μL de enzimas, respectivamente), bem como os experimentos controle (não macerados enzimaticamente), apresentaram durante o escoamento na análise de consistência, um fenômeno conhecido como sinerese, que consistiu na separação das fases

aquosa e polposa (Figura 26A). Esse fenômeno também foi observado após tratamento enzimático de polpa de bacuri por Aquino (2008). Bourne (2002) cita que em alguns casos, a separação das fases aquosa e polposa pode ser desconsiderada, avaliando-se apenas a distância percorrida pela polpa. Quando a separação de fases é intensa, mede-se também a distância percorrida pelo líquido. A Figura 26B mostra o exemplo de uma polpa homogênea.

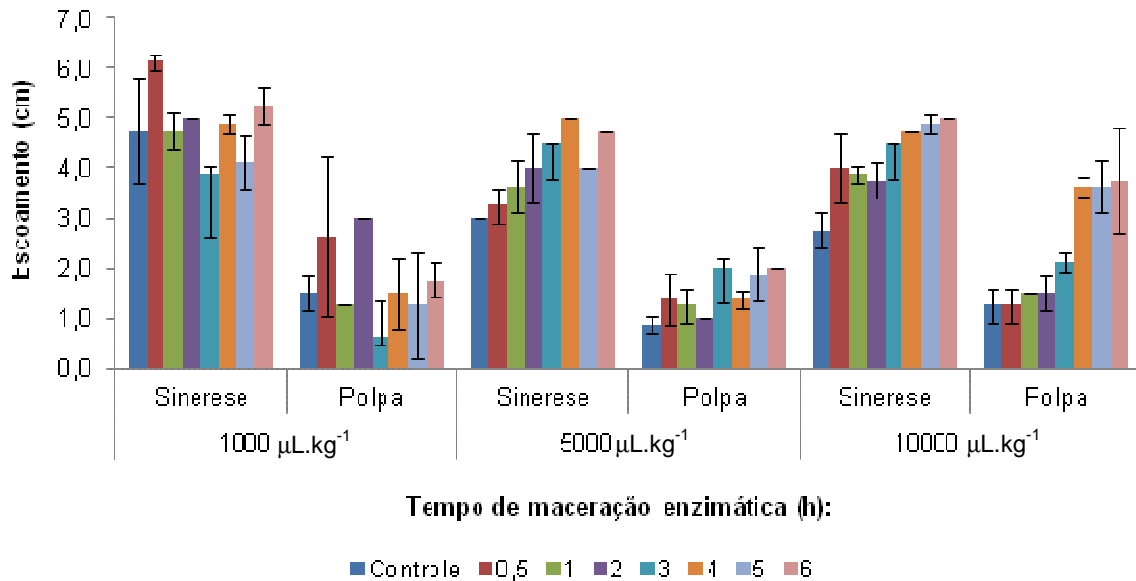
Figura 26 - Análise de consistência em consistômetro de Bostwick. **A:** Amostra apresentando a separação das fases aquosa e polposa (sinerese) e **B:** Amostra homogênea.



A separação das fases aquosa e polposa ocorreu com adição de $1000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$, e mesmo com o aumento da concentração de Pectinex XXL para $5000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ e $10000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$, até o tempo de 6 horas de maceração enzimática, a separação de fases persistiu (Figura 27).

Com exceção da aplicação de $1000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$, que não apresentou uma tendência no comportamento do escoamento da polpa ao longo do tempo de maceração, as polpas escoam mais durante a análise de consistência à medida que o tempo de maceração aumentou, considerando-se as demais concentrações de enzima testadas. Ainda assim, na concentração de $5000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$, devido às barras de erros, sugere-se que não houve diferença no escoamento da polpa na maioria dos tempos analisados.

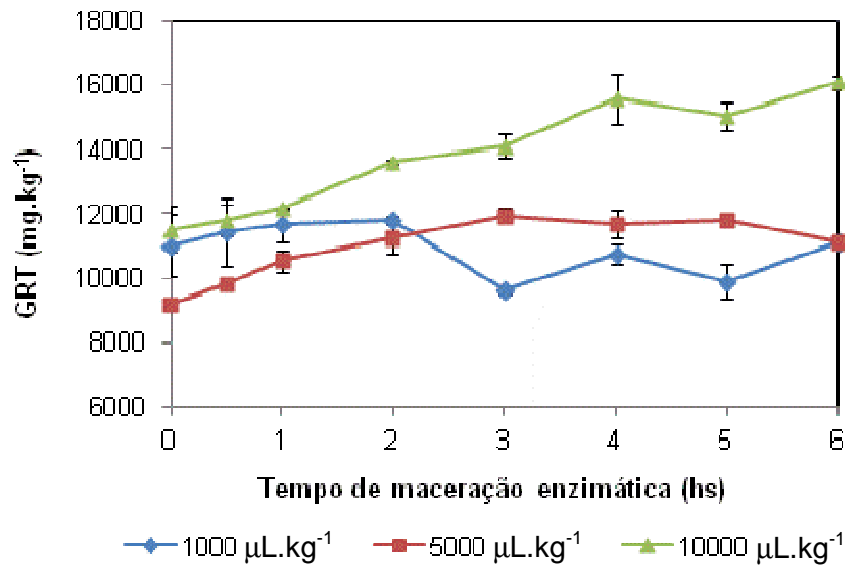
Figura 27 - Escoamento das fases polposa e aquosa em consistômetro de Bostwick em vários tempos de maceração enzimática com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL.



A polpa de pimenta, quando macerada por enzimas como pectinases, celulasas e hemicelulasas, pode produzir açúcares fermentescíveis a partir de polissacarídeos e provocar a ruptura da matriz da parede celular, liberando carboidratos intracelulares (KASHYAP *et al.*, 2001) que podem ser consumidos em aerobiose por micro-organismos presentes na própria polpa.

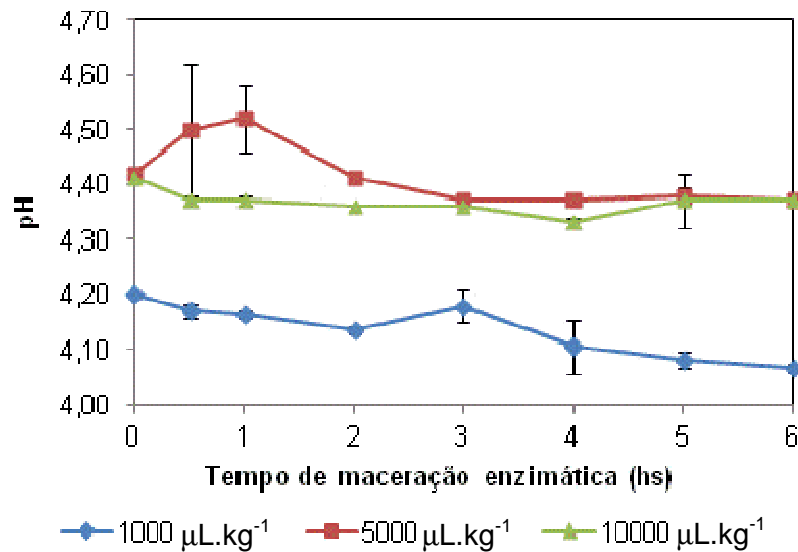
A concentração de grupos redutores totais (GRT), que consiste basicamente de açúcares redutores, aumentou em todas as polpas quando maceradas enzimaticamente por até 6 horas, independentemente da concentração de enzima aplicada (Figura 28). Esse comportamento provavelmente relacionou-se à ação das enzimas pectinolíticas presentes nas preparações enzimáticas, que atuam hidrolisando a pectina, resultando na liberação de grupos redutores. Houve uma elevação da concentração de GRT com o aumento da concentração da Pectinex XXL. O incremento da concentração de GRT pode favorecer a posterior fermentação da polpa de pimenta, pois aumenta a disponibilidade de açúcares fermentescíveis para as bactérias ácido-láticas, as principais responsáveis por esse processo. A liquefação e sacarificação da biomassa é uma das funções das enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas) explicadas por Kashyap *et al.* (2001).

Figura 28 - Grupos redutores totais ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL em até 6 horas.



Notou-se decréscimo nos valores de pH ao longo de 6 horas de maceração enzimática utilizando-se 1000 $\mu\text{L.g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL. (Figura 29). Esse efeito pode estar associado à liberação de ácido péctico pela ação de uma classe de enzimas chamadas pectinametilesterase. Segundo Koblitz (2010), elas atacam a ligação éster de moléculas de pectina, desmetoxilando ácidos galacturônicos esterificados com metanol, resultando em ácido péctico e metanol. Empregando-se 5000 e 10000 $\mu\text{L.g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL, não se verificou um comportamento linear do pH ao longo do tempo, a variação entre o tempo de 6 horas de maceração enzimática e o inicial foi muito pequena, em torno de 0,05 (Figura 29).

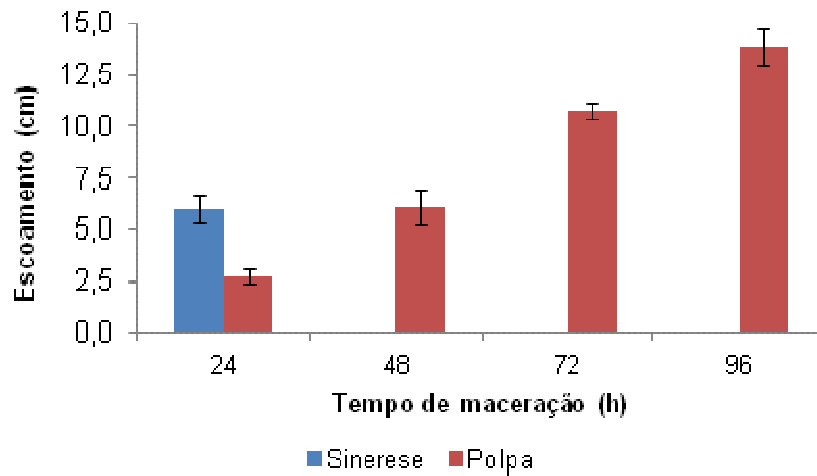
Figura 29 - Variação do pH ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L.g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL em até 6 horas.



Durante a quebra enzimática da pectina, unidades de ácido galacturônico não esterificados são liberadas (KYAMUHANGIRE *et al.*, 2002), explicando o aumento da acidez total titulável e redução do pH ao longo do tempo de maceração enzimática. Foi comprovada na maceração enzimática de maçã (POLL, 1993) e de banana (KYAMUHANGIRE *et al.*, 2002) que a alta acidez e o baixo pH observados ocorrem devido à liberação de ácido galacturônico resultante da ação da pectinametilesterase.

Um teste com Pectinex XXL 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$, por um tempo mais prolongado de maceração enzimática, mostrou que mesmo com 24 horas, as fases se separaram, mas a partir de 48 horas as amostras apresentaram-se homogêneas (Figura 30). A Figura 26B ilustra a polpa homogênea durante a análise de consistência.

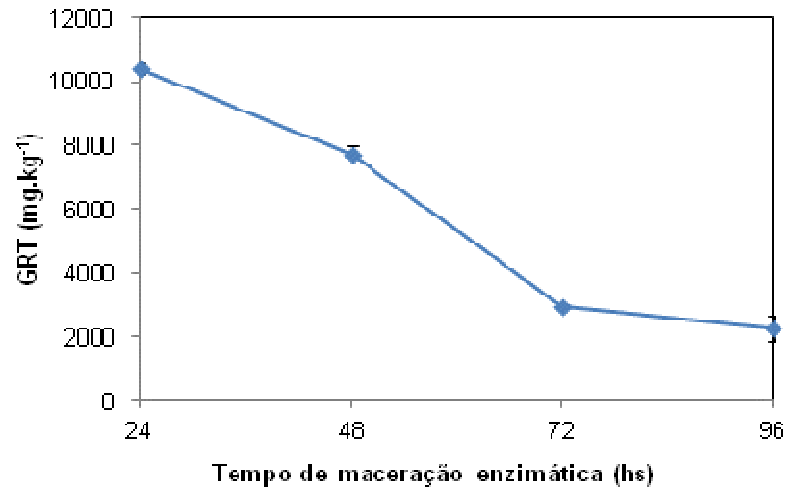
Figura 30 - escoamento das fases aquosa e polposa em consistômetro de Bostwick após 24 a 96 horas de maceração enzimática com $1000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL.



Esse tempo, porém, foi considerado muito longo para a maceração enzimática de polpa de pimenta, que posteriormente pode ser fermentada naturalmente, em microaerofilia, por bactérias ácido-láticas autóctones. Quando a polpa de pimenta foi macerada enzimaticamente por 48 horas em Erlenmeyer, sob agitação, a intensa aeração permitiu o crescimento de bolores aeróbios, que consumiram os açúcares redutores, reduzindo a disponibilidade desses compostos para a posterior fermentação pelas bactérias ácido-láticas autóctones.

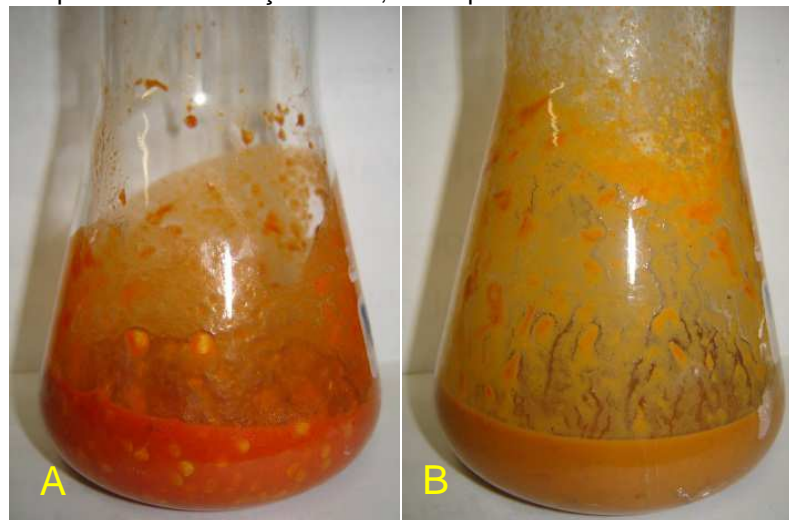
Nas amostras maceradas enzimaticamente por até 96 horas com $1000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL, a partir de 24 horas, foi detectada uma redução na concentração de GRT (Figura 31). O desenvolvimento dos bolores, que foram visualizados nas paredes do Erlenmeyer, pode ter desencadeado o consumo dos GRT, em maior proporção do que foi liberado pela ação enzimática.

Figura 31 - Grupos redutores totais ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com $1000 \mu\text{L}\cdot\text{g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL de 24 a 96 horas.



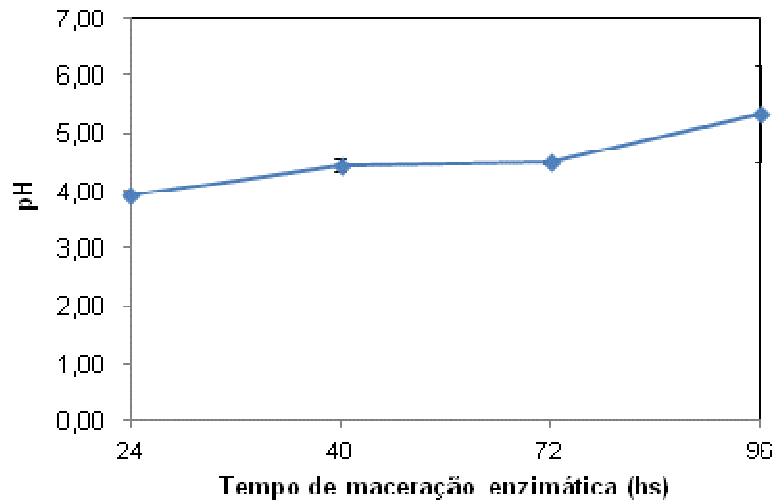
Observou-se visualmente uma degradação na coloração característica da polpa de pimenta (Figura 32A), a qual adquiriu um aspecto mais escurecido (Figura 32B) e um crescimento acentuado de bolores nas paredes dos Erlenmeyers, provavelmente relacionado à incorporação de ar gerada durante a agitação. A agitação pode ter acelerado as reações de oxidação causadas pelas enzimas peroxidase e polifenoloxidasas, naturalmente presentes na polpa, resultando no escurecimento da amostra em estudo.

Figura 32 - Polpa de pimenta **A**: Condição inicial; **B**: Polpa macerada enzimaticamente por 96 horas.



Nesse teste mais prolongado de 96 horas de maceração, as polpas apresentaram um perfil constante de pH, com pouca variação durante esse período (Figura 33). Esse fato pode estar associado ao crescimento dos micro-organismos, cujas colônias foram visualmente observadas.

Figura 33 - Variação do pH ao longo da maceração enzimática da polpa de pimenta com 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{L}\cdot\text{g}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex XXL de 24 a 96 horas.



Inferese desses experimentos que a maceração enzimática de polpa de pimenta esta não deve ocorrer por um tempo superior a 6 horas, quando realizada sob agitação em Erlenmeyer aberto.

4.4.3 Efeito da ação de enzimas pectinolíticas na maceração enzimática estática de polpa de pimenta.

As amostras com 15% de água (Figura 34) apresentaram, considerando-se todos os tempos de maceração enzimática, um escoamento médio de 6,00 cm no consistômetro de Bostwick, enquanto as que foram adicionadas de 20% de água (Figura 35) mostraram um escoamento médio de 7,4 cm, sendo significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 34 - Comparação do efeito da maceração entre quatro enzimas pectinolíticas com adição de 15% de água.

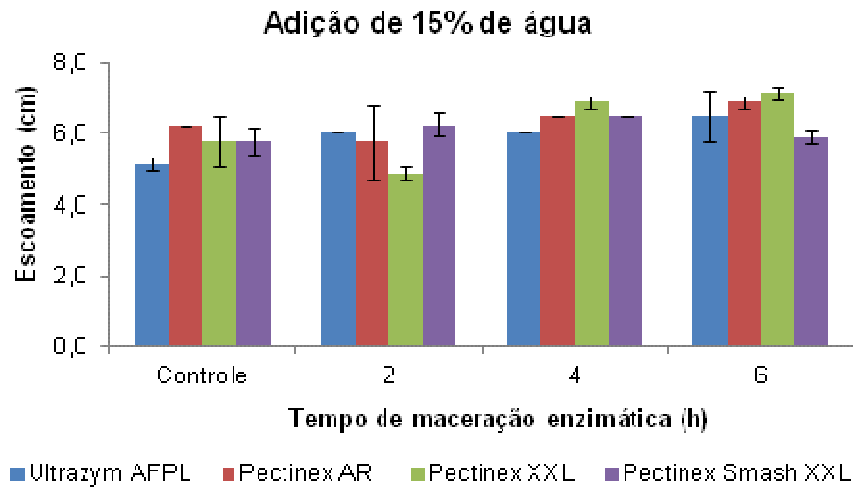
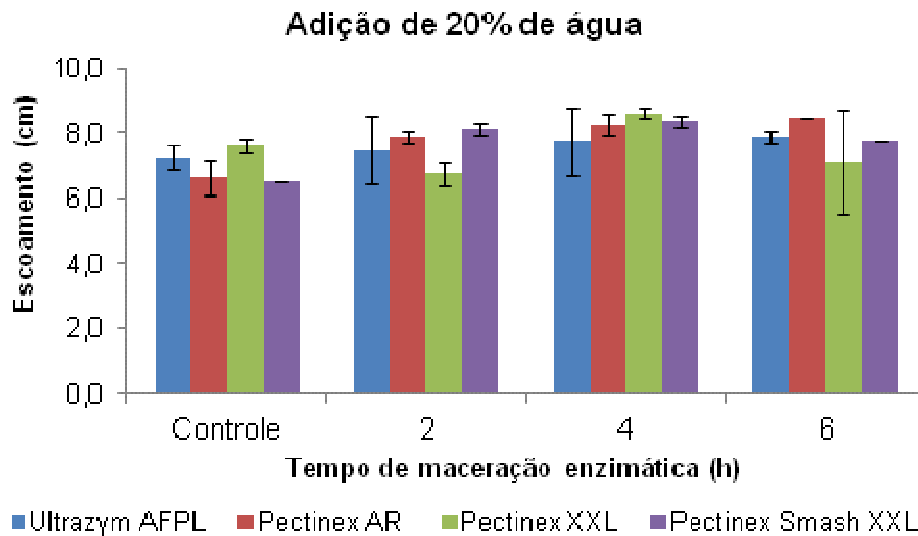


Figura 35 - Comparação do efeito da maceração entre quatro enzimas pectinolíticas com adição de 20% de água.



O fato de o escoamento médio das amostras com 20% de água ter sido maior está relacionado com o maior percentual de água adicionado, que contribui para um maior fluxo da polpa na análise de consistência. Como havia o interesse pelas condições que proporcionassem maior fluxo de polpa, avaliou-se estatisticamente o escoamento de todas as amostras adicionadas de 20% de água. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na distância percorrida no consistômetro entre as enzimas Ultrazym AFPL, Pectinex XXL, Pectinex AR e Pectinex Smash XXL. Entretanto, a redução da consistência, ou seja, a diferença do escoamento

apresentou um resultado diferente, onde Pectinex AR e Pectinex Smash XXL foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Tabela 8).

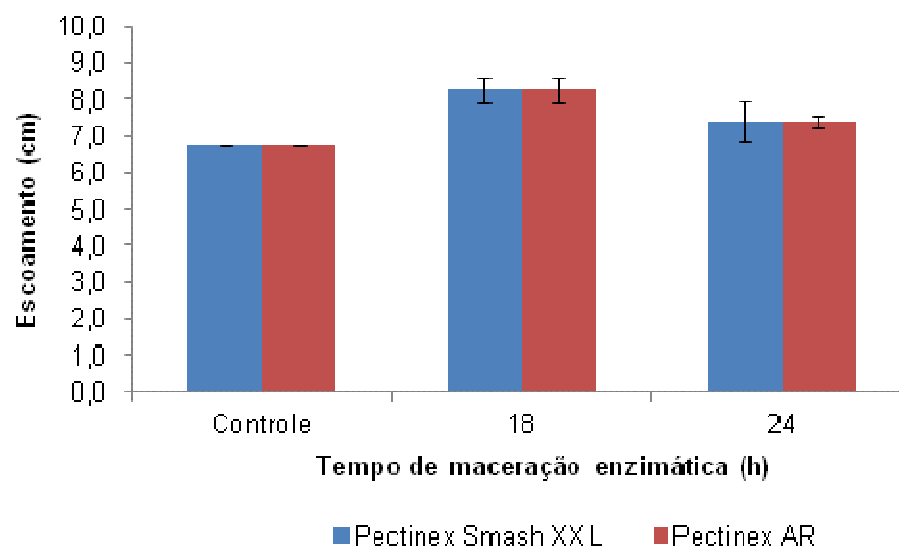
Tabela 8 - Diferença do escoamento das polpas, com 20% de água, maceradas com 4 preparações enzimáticas diferentes, considerando-se a média de todos os tempos de maceração.

Preparação enzimática	Diferença do escoamento (cm)*
Ultrazym AFPL	0,5 ^b
Pectinex XXL	0,3 ^b
Pectinex AR	1,6 ^a
Pectinex Smash XXL	1,6 ^a

*Diferença entre o escoamento da polpa após o tempo de maceração enzimática e no tempo inicial. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Na maceração realizada em 18 e 24 horas, com as enzimas Pectinex Smash XXL e Pectinex AR, não foi observada diferença no escoamento entre as enzimas, sendo o maior resultado observado em 18 horas (Figura 36). Nesse tempo, o escoamento foi 22,2% maior que o controle, enquanto em 24 horas, houve uma redução desse valor para 9,3%. O aumento da consistência com o tempo, caracterizado pela redução do escoamento, é um fato que já foi observado também na maceração de purê de abóbora em Moura *et al.* (2011).

Figura 36 - Comparação do efeito da maceração entre duas enzimas pectinolíticas com adição de 20% de água.



Diante das diferentes composições em enzimas das preparações comerciais utilizadas, o resultado relacionou-se aos tipos de enzimas presentes e suas atividades. Pectinex Smash XXL também foi a enzima mais eficiente na extração de suco de cenoura no trabalho de Sun *et al.* (2006).

Neste caso, Pectinex AR e Pectinex Smash XXL poderiam ser utilizadas com a finalidade de reduzir a consistência da polpa de pimenta tabasco, pois não apresentaram diferença significativa nos resultados de redução de consistência. O tempo de 18 horas, apesar de longo para um processo de maceração enzimática, foi o considerado melhor com resultado bastante diferente dos outros tempos testados.

4.4.4 Efeito da adição de celulase na maceração enzimática de polpa de pimenta com enzimas pectinolíticas.

A diferença do escoamento da polpa de pimenta após maceração enzimática com $1000 \mu\text{L.kg}^{-1}$ de Pectinex AR por 18 horas foi de 1,5 cm (Tabela 9); enquanto a combinação Pectinex AR e Celluclast, utilizando mesma quantidade de cada enzima foi de 3,2 cm. A redução de consistência da polpa com mistura de enzimas foi mais que o dobro da redução somente pela ação da enzima pectinolítica. A ANOVA mostrou que os valores foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) (Tabela 9).

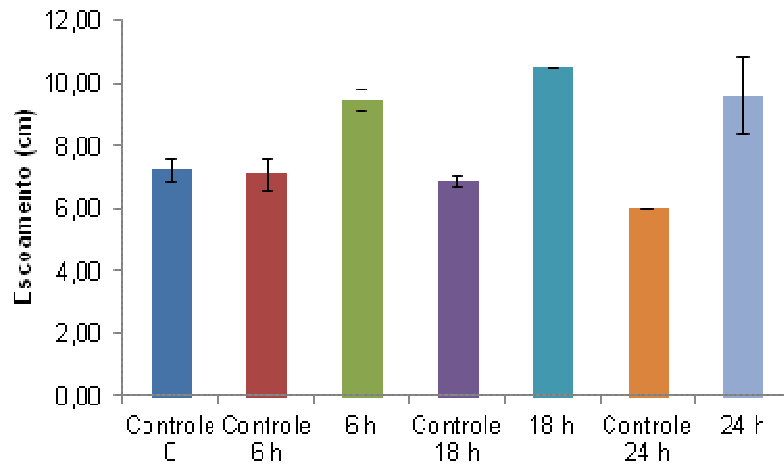
Tabela 9 - Diferença do escoamento da polpa de pimenta macerada com Pectinex AR e Celluclast.

Enzimas de maceração	Diferença do escoamento (cm)*
Pectinex AR $1000 \mu\text{L.kg}^{-1}$	1,5
Pectinex AR $1000 \mu\text{L.kg}^{-1}$ + Celluclast $1000 \mu\text{L.kg}^{-1}$	3,2

*Diferença entre o escoamento da polpa após 18 horas de maceração enzimática e no tempo inicial

Como a condição escolhida para os experimentos posteriores foi $1000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e de Celluclast, um teste foi realizado a fim de verificar o melhor tempo de maceração enzimática da polpa de pimenta (Figura 37).

Figura 37 - Escoamento das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente com 1000 μL .gpolpa-1 de Pectinex AR e Celluclast de 6 a 24 horas.



Com relação às amostras controle, observou-se que com o tempo de incubação as polpas ganharam consistência, havendo, portanto redução no escoamento, fato já verificado anteriormente. As polpas tratadas enzimaticamente apresentaram escoamento maior que o controle inicial e que os controles de cada tempo analisado, entretanto o valor para a polpa macerada por 18 horas foi maior que o da polpa de 6 horas. Prosseguindo com a maceração enzimática até 24 horas, o escoamento reduziu.

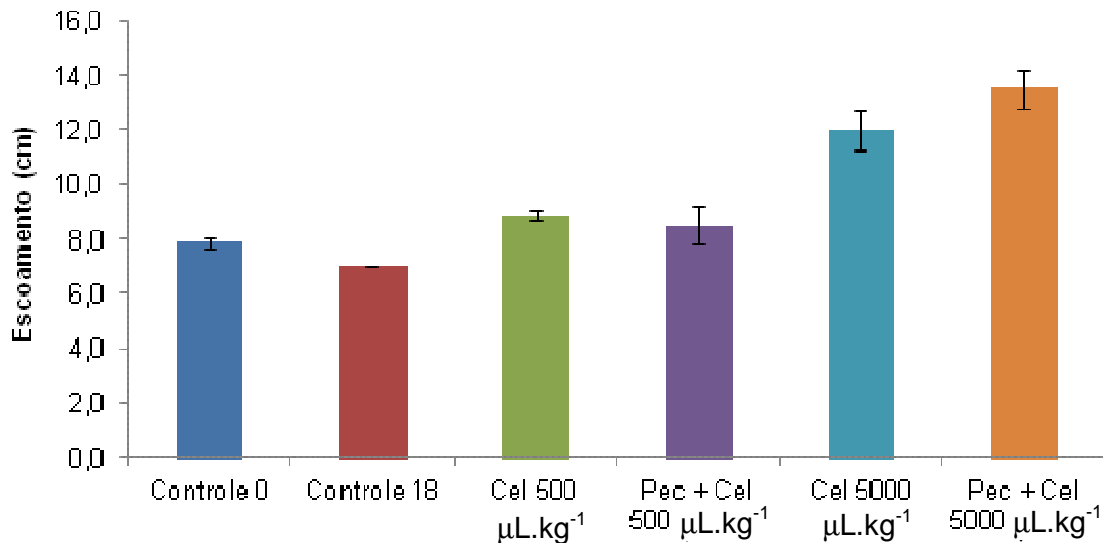
A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de escoamento das amostras controle ($p > 0,05$), e que os controles diferiram significativamente ($p < 0,05$) das polpas maceradas enzimaticamente.

Apesar de não ter havido diferença entre as amostras tratadas com enzimas, o tempo de maceração de 24 horas foi considerado muito longo, o que não é interessante, considerando-se a produção em larga escala, uma vez que gera mais custo com energia para manter a temperatura de maceração enzimática. Por meio de observação visual, notou-se que a amostra macerada durante 18 horas apresentou melhor separação entre sementes e polpa quando comparada à amostra de 6 horas. Por esses motivos decidiu-se manter a maceração enzimática da polpa de pimenta por 18 horas.

A Figura 38 mostra os valores de escoamento das polpas maceradas enzimaticamente (com a combinação de pectinase e celulase) e das amostras controle, no tempo inicial e após 18 horas de incubação. Observou-se que o controle

18 teve sua consistência aumentada durante a incubação, apresentando escoamento menor que o controle 0. Uma vez que os controles apresentaram mesma composição, ambos sem adição de enzimas, esse comportamento foi inesperado.

Figura 38 - Polpa de pimenta macerada enzimaticamente com a combinação Pectinex AR e Celluclast durante 18 horas.



Controle 0: polpa nas mesmas condições das amostras sem adição de enzimas analisada no tempo inicial e sem incubação; Controle 18: polpa nas mesmas condições das amostras sem adição de enzimas analisada após incubação; Cel 500 $\mu\text{L.kg}^{-1}$: polpa macerada com 500 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ da enzima Celluclast; Pec + Cel 500 $\mu\text{L.kg}^{-1}$: polpa macerada com 500 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e mesma concentração de Celluclast; Cel 5000 $\mu\text{L.kg}^{-1}$: polpa macerada com 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ da enzima Celluclast; Pec + Cel 5000 $\mu\text{L.kg}^{-1}$: polpa macerada com 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e mesma concentração de Celluclast.

As amostras tratadas enzimaticamente apresentaram escoamento maior que os controles, entretanto apenas os tratamentos com 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ tanto de Celluclast como da combinação Celluclast e Pectinex AR foram significativamente diferentes das outras amostras ($p < 0,05$), inclusive dos controles (Tabela 10).

Como a consistência inicial da polpa varia dependendo do lote, para comparação com testes anteriores, a diferença no escoamento é o parâmetro mais adequado, uma vez que compara o escoamento da amostra após o tempo de maceração enzimática/incubação (no caso de amostra controle) com o escoamento da polpa no tempo inicial, sem adição de enzimas (Controle 0).

Tabela 10 - Diferença do escoamento da polpa de pimenta nos testes de maceração enzimática com Celluclast e com a combinação Pectinex AR e Celluclast.

Amostra	Diferença do escoamento (cm)*
Controle 18 (Controle de 18 h)	-0,9 ^b
Celluclast 500 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$	1,0 ^b
Celluclast 500 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ + Pectinex AR 500 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$	0,6 ^b
Celluclast 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$	4,1 ^a
Celluclast 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ + Pectinex AR 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$	5,6 ^a

*Diferença entre o escoamento da polpa após 18 horas de incubação e no tempo inicial
Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Desta forma, comparando-se os dados da Tabela 9 com os da Tabela 10, e avaliando-se a quantidade de enzima utilizada *versus* redução de consistência, nota-se que a aplicação de 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e de Celluclast simultaneamente é a melhor condição em termos de custo benefício. Isso porque nos dois experimentos em que foram aplicados 5000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de enzima(s), apesar de terem sido responsáveis pelos melhores resultados de redução de consistência, a quantidade de enzima é considerada elevada para essa finalidade, tornando o processo dispendioso. Além disso, a consistência da polpa não reduz proporcionalmente à quantidade de enzima aplicada. Por exemplo, considerando-se que com 1000 $\mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e Celluclast a redução na consistência foi de 3,2 cm, esperava-se que com cinco vezes mais de cada enzima, a redução de consistência quintuplicasse, entretanto o aumento no valor foi de aproximadamente 1,7 vezes.

A concentração de capsaicínides aumentou nas polpas que foram incubadas tanto com adição quanto sem adição das enzimas de maceração (Tabela 11). Todas as polpas maceradas enzimaticamente e o controle de 18 horas, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre si quanto aos teores de capsaicina e de dihidrocapsaicina, mas foram significativamente diferentes do controle inicial. Isso mostra que o tempo de incubação influenciou no conteúdo de capsaicínides, e não somente as enzimas de maceração. O tempo e temperatura de incubação podem ter favorecido a ação de enzimas pectinolíticas endógenas da polpa controle.

Tabela 11 - Concentração de capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina) nas polpas maceradas com enzima pectinolítica e/ou celulolítica.

Amostra	Capsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Dihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Nordihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Capsaicinoides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Controle 0	888,72 \pm 140,60 ^a	410,45 \pm 41,17 ^a	48,75 \pm 9,60 ^b	1347,92 \pm 191,38 ^b
Controle 18	1505,56 \pm 6,77 ^b	645,90 \pm 39,33 ^b	77,59 \pm 1,90 ^{ab}	2229,06 \pm 47,99 ^a
Cel 500 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	1587,42 \pm 7,12 ^b	715,53 \pm 0,27 ^b	80,76 \pm 1,82 ^a	2383,71 \pm 8,67 ^a
Pec + Cel 500 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	1637,94 \pm 1,29 ^b	746,76 \pm 32,50 ^b	92,39 \pm 2,01 ^a	2477,09 \pm 31,78 ^a
Cel 5000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	1563,99 \pm 108,93 ^b	659,10 \pm 44,78 ^b	75,06 \pm 15,31 ^{ab}	2298,15 \pm 169,01 ^a
Pec + Cel 5000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	1540,04 \pm 18,23 ^b	715,50 \pm 57,58 ^b	80,86 \pm 5,94 ^a	2336,41 \pm 69,87 ^a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Controle 0: polpa nas mesmas condições das amostras sem adição de enzimas analisada no tempo inicial e sem incubação; Controle 18: polpa nas mesmas condições das amostras sem adição de enzimas analisada após incubação; Cel 500 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$: polpa macerada com 500 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ da enzima Celluclast; Pec + Cel 500 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$: polpa macerada com 500 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e mesma concentração de Celluclast; Cel 5000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$: polpa macerada com 5000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ da enzima Celluclast; Pec + Cel 5000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$: polpa macerada com 5000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e mesma concentração de Celluclast.

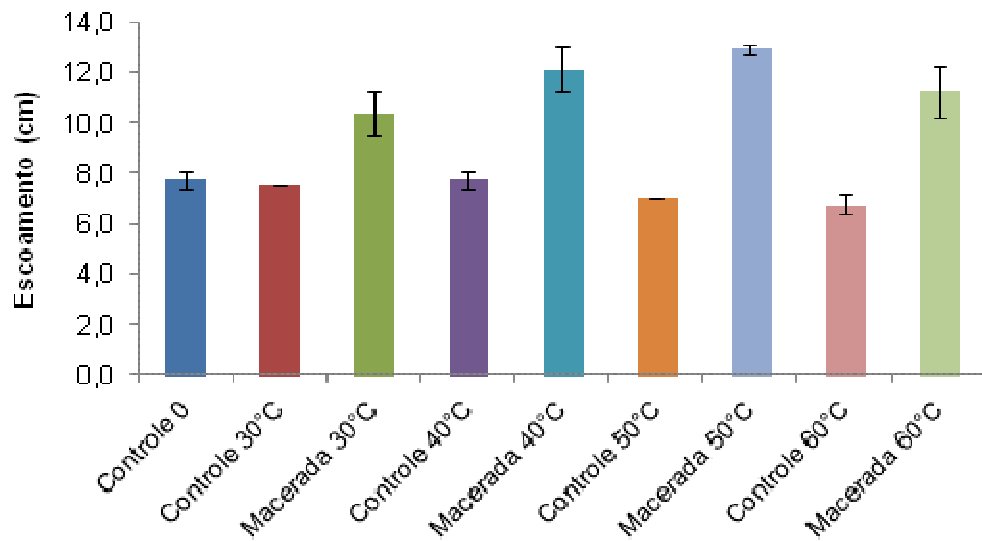
Dentre os testes realizados nessa etapa, verificou-se que a combinação de 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e Celluclast é a condição que proporciona maior diferença do escoamento da polpa de pimenta sem a utilização de uma quantidade elevada de enzima.

4.4.5 Efeito da temperatura na ação das enzimas de maceração.

Avaliando-se a Figura 39, as polpas maceradas a 40, 50 e 60°C apresentaram escoamentos semelhantes, observando-se as barras de erro, mas amostra macerada enzimaticamente a 50°C foi significativamente maior que todas as outras ($p < 0,05$).

Percebeu-se novamente o ganho de consistência das amostras controle, dessa vez com o aumento da temperatura, da mesma forma que já havia sido observado com o aumento do tempo de incubação.

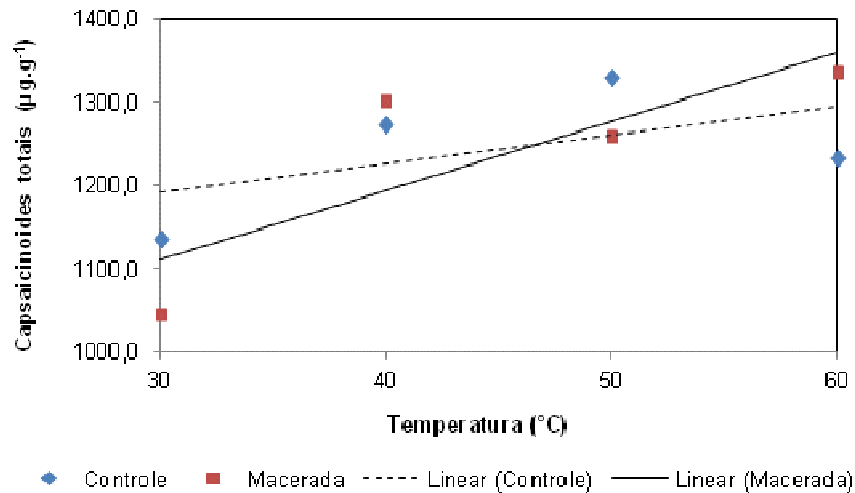
Figura 39 - Escoamento da polpa de pimenta em diferentes temperaturas de maceração enzimática.



As amostras controle não diferiram significativamente das polpas tratadas enzimaticamente ($p > 0,05$), mas verificou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) da temperatura na concentração de capsaicinoides das polpas de pimenta. Isso mostra que a incubação da polpa de pimenta nas temperaturas testadas por si só já auxilia a liberação de capsaicinoides, e que essa liberação aumenta com a elevação da temperatura. As concentrações dos principais capsaicinoides nas polpas avaliadas estão disponíveis no Apêndice G.

A Figura 40 mostra variação dos capsaicinoides nas polpas maceradas e nos seus respectivos controle em cada temperatura estudada. A concentração de capsaicinoides tende a aumentar com o aumento da temperatura.

Figura 40 - Capsaicinoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas.



Pela Tabela 12, verifica-se que a regressão linear foi significativa ($p < 0,05$) tanto para os controles quanto para as amostras tratadas enzimaticamente, entretanto o coeficiente de determinação foi baixo.

Tabela 12 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos capsaicinoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas.

Amostra	R ²	Equação do modelo	p _{valor}
Controle	0,2982	$Y = 1087,62 + 3,46x$	0,0341
Polpa macerada	0,6722	$Y = 863,59 + 8,26x$	0,0161

Os parâmetros L*, a* e b* de cor instrumental, que indicam luminosidade, intensidade de cor vermelha e intensidade de cor amarela, respectivamente, apresentaram de modo geral um decréscimo nos seus valores com o aumento da temperatura de incubação, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros de cor instrumental das amostras maceradas enzimaticamente em diferentes temperaturas e seus respectivos controles.

Amostra	L*	a*	b*	ΔE
Controle 0 h	36,42 ± 1,38 ^{bc}	35,31 ± 2,29 ^c	20,37 ± 1,15 ^{bc}	--
Controle 30°C	35,66 ± 1,62 ^a	33,59 ± 1,38 ^{abc}	20,16 ± 1,28 ^{bc}	1,89
30°C	38,48 ± 1,76 ^{abc}	36,10 ± 2,39 ^c	21,97 ± 1,44 ^b	2,72
Controle 40°C	33,67 ± 0,18 ^{abc}	33,74 ± 0,84 ^{ac}	18,66 ± 0,11 ^{bc}	3,60
40°C	31,63 ± 1,33 ^{bc}	29,66 ± 1,00 ^{abc}	17,11 ± 0,84 ^c	8,09
Controle 50°C	33,55 ± 2,21 ^{abc}	30,78 ± 1,09 ^{abc}	18,47 ± 1,72 ^{bc}	5,69
50°C	30,01 ± 0,52 ^c	27,43 ± 1,34 ^{ab}	15,82 ± 0,60 ^c	11,13
Controle 60°C	34,83 ± 2,43 ^{abc}	30,09 ± 2,98 ^{abc}	19,41 ± 1,62 ^{bc}	5,54
60°C	32,53 ± 0,01 ^{abc}	26,70 ± 1,06 ^b	17,49 ± 0,83 ^{bc}	9,88

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Um fato interessante é que a polpa macerada a 30°C apresentou valores maiores do que o controle inicial e aquele incubado a 30°C. Em temperaturas maiores os valores referentes aos controles em cada temperatura diminuíram, mas se mantiveram maiores que suas respectivas polpas tratadas com enzimas. Ou seja, após maceração enzimática a 30°C, há uma intensificação na luminosidade da polpa, assim como na sua coloração vermelha e amarela. A partir de 40°C, há uma redução desses parâmetros, tanto na polpa macerada com enzimas quanto nos controles, sendo essa redução mais intensa nas polpas maceradas.

A magnitude da diferença de cor (ΔE) entre as polpas, maceradas e não maceradas, e o controle 0h evidenciou bem essa tendência, onde o maior valor de ΔE ocorreu na polpa macerada a 50°C (11,13), seguida da polpa tratada enzimaticamente a 60°C (9,88) e da avaliada a 40°C (8,09).

A redução mais acentuada dos parâmetros de cor nas polpas maceradas enzimaticamente pode ser explicada pela ocorrência de escurecimento enzimático, e consequente formação de pigmentos escuros, já que essa reação é acelerada pelo aumento da temperatura.

As enzimas Pectinex AR e Celluclast apresentam maiores atividades em temperaturas acima de 30°C. Segundo Wang; Xu; Jin (2009) sob certas condições, as antocianinas, que são pigmentos responsáveis pela cor vermelha de alguns frutos, pode ser hidrolisada por enzimas pectinolíticas e convertidas a formas incolores. Entretanto não foi encontrado na literatura relatos de degradação de carotenoides por essas enzimas.

Por meio de análise visual, as polpas maceradas enzimaticamente a 50°C e 60°C foram as que se apresentaram menos consistentes, com melhor separação de sementes, com menos polpa aderida às sementes. Apesar de ter apresentado maior ΔE , a polpa macerada a 50°C apresentou coloração mais aceitável que a de 60°C, quando comparadas com a cor de produtos elaborados a base de pimenta. A Figura 41 ilustra as polpas maceradas em cada temperatura, em duplicata.

Figura 41 - Polpas de pimenta maceradas enzimaticamente, em duplicata, a 30, 40, 50 e 60°C, respectivamente.



Diante de todas as observações, a temperatura de 50°C foi escolhida para as etapas de maceração enzimática posteriores.

4.5 Fermentação da polpa de pimenta associada à maceração enzimática.

O acompanhamento microbiológico das polpas revelou que a maceração enzimática (Tabela 14), de forma geral, promoveu a redução da população de microorganismos. Isso pode ser observado comparando-se as polpas não macerada com sal (NMCS) e macerada com sal (MCS), onde ambas possuem sal, mas a primeira não foi tratada enzimaticamente, enquanto a segunda foi macerada pela ação da preparação enzimática pectinolítica Pectinex AR e celulolítica Celluclast.

A ausência de enterobactérias nas três diferentes polpas a partir da segunda semana, reforça a afirmação de Crisóstomo *et al.* (2008) de que o processo fermentativo láctico, conduzido por bactérias ácido-láticas homofermentativas contribuiu fortemente para a eliminação de enterobactérias aumentando a segurança microbiológica da polpa. No trabalho desses autores, também se verificou a redução da microbiota deteriorante.

Tabela 14 - Populações de enterobactérias, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras nas polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS).

Tempo (semanas)	Enterobactérias (UFC.g ⁻¹)			Bactérias ácido-láticas (UFC.g ⁻¹)			Bolores e leveduras (UFC.g ⁻¹)		
	NMCS	MCS	MSS	NMCS	MCS	MSS	NMCS	MCS	MSS
0	2,13×10 ⁹	< 10	< 10	2,35×10 ⁹	1,50×10 ⁴	2,26×10 ⁶	< 100	< 100	< 100
1	1,50×10 ¹	5,15×10 ²	1,50×10 ¹	4,83×10 ⁸	2,50×10 ⁴	3,05×10 ⁸	2,49×10 ⁵	< 100	1,97×10 ⁵
2	< 10	< 10	< 10	6,00×10 ⁴	4,13×10 ⁴	2,85×10 ⁷	1,05×10 ⁴	6,18×10 ²	4,38×10 ⁴
3	< 10	< 10	< 10	2,90×10 ⁴	5,95×10 ³	4,54×10 ⁶	9,15×10 ³	1,43×10 ³	3,68×10 ³
4	< 10	< 10	< 10	2,56×10 ⁵	2,08×10 ⁵	2,45×10 ⁷	2,53×10 ⁵	2,12×10 ⁵	2,53×10 ⁴
5	< 10	< 10	< 10	2,55×10 ⁵	5,75×10 ⁴	1,18×10 ⁵	3,18×10 ⁵	1,89×10 ³	< 100
6	< 10	< 10	< 10	1,24×10 ⁷	1,25×10 ⁴	1,71×10 ⁵	5,30×10 ⁵	< 100	3,05×10 ⁴

Vale lembrar que o tempo necessário para completa eliminação das enterobactérias da polpa de pimenta é variável e pode estar relacionado com a sua microbiota inicial, além de outras características intrínsecas da polpa e características resultantes de tratamentos culturais, manuseio pós-colheita, dentre outros. Essa diferença pode ser observada uma vez que no presente experimento e no realizado por Crisóstomo *et al.* (2008), as enterobactérias estavam ausentes na polpa após duas semanas de fermentação, enquanto no experimento do item 4.2 (Tabela 3), isso só ocorreu depois de três semanas. Os experimentos citados foram realizados com o mesmo tipo de pimenta, tabasco (*Capsicum frutescens* L.). Verificou-se que a maceração enzimática não exerceu influência no tempo para redução da população de enterobactérias.

Pode-se afirmar então que a polpa de pimenta macerada enzimaticamente e posteriormente fermentada é segura microbiologicamente podendo ser comercializada, pois segundo Crisóstomo *et al.* (2008), no pacote tecnológico atual, a polpa está apta para ser exportada após quatro semanas de fermentação.

Comparando-se as polpas macerada com sal (MCS) e macerada sem sal (MSS), as quais foram tratadas com enzimas de maceração, diferenciando-se apenas pela presença de sal, observou-se maior quantidade, em todos os tempos de fermentação, de bactérias ácido-láticas na MSS, apesar do impacto da maceração enzimática na microbiota autóctone da polpa de pimenta. Como já foi comprovado e discutido anteriormente nos experimentos do item 4.2, o sal tem a função de selecionar as bactérias ácido-láticas homofermentativas, responsáveis por

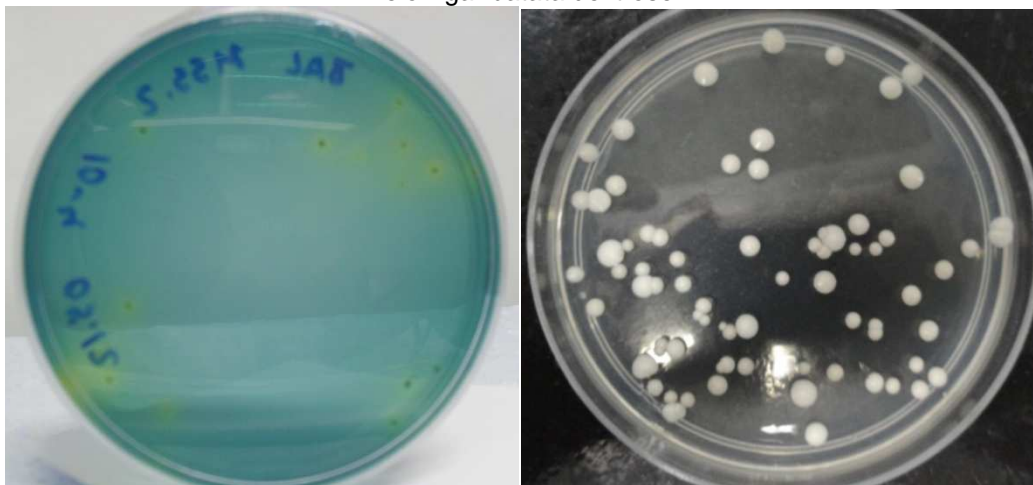
produzir somente ácido láctico durante a fermentação, sem produção de gases, que são indesejáveis nesse processo. Isso significa que apesar de a polpa MCS apresentar durante toda a fermentação menor população de bactérias ácido-láticas, provavelmente as homofermentativas predominaram. Tal ocorrência pode ser confirmada observando-se a Figura 45, onde a presença de gás pode ser visualizada na polpa MSS, o que não ocorreu na NMCS e nem na MCS.

Os bolores e leveduras apresentaram comportamentos diferentes nas duas polpas. Estes começaram a serem detectados após uma semana de fermentação na polpa MSS, enquanto na MCS só foram contabilizadas depois de duas semanas. Segundo Di Cagno *et al.* (2009a), a fermentação autóctone de vegetais é geralmente caracterizada pela sucessão de bactérias ácido-láticas hetero e homofermentativas, em presença ou não de leveduras, que são responsáveis pelo processo fermentativo em várias etapas.

Nas três polpas, NMCS, MCS e MSS, houve crescimento de leveduras, assim como aconteceu na polpa de pimenta estudada por Crisóstomo *et al.* (2008), sendo que na amostra analisada por eles, a presença de bolores e leveduras foi detectada desde antes da fermentação, o que pode ser justificada pela forma com que essas polpas foram processadas. Já nas polpas aqui avaliadas, as leveduras começaram a se desenvolver provavelmente depois que as bactérias ácido-láticas se multiplicaram e modificaram as condições do meio, propiciando seu crescimento.

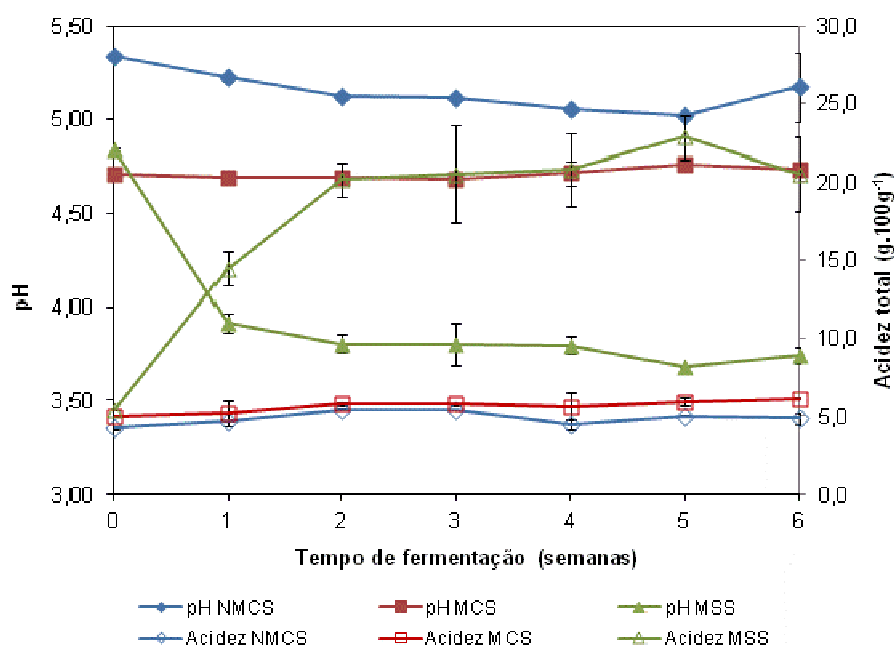
A Figura 42 ilustra as colônias bactérias ácido-láticas e leveduras oriundas das polpas de pimenta analisadas. Em todas as polpas, o pH teve uma tendência a reduzir, sendo que na MCS este se manteve praticamente constante (Figura 43). A polpa MSS apresentou uma queda acentuada de pH, assim como uma elevação também acentuada na acidez total titulável. Esta foi inicialmente tratada com uma combinação de Pectinex AR e Celluclast por 18 horas a 50°C e em seguida foi incubada à 30°C por 4 semanas, sem adição de sal, como ocorreu na polpa MCS. Assim, a maior acidez e menor pH nessa polpa, são explicados por dois fatores: a continuidade da ação das enzimas de maceração durante o processo fermentativo, liberando portanto mais grupos redutores, utilizados como fonte de carbono pela microbiota autóctone; e a ausência de sal, que permitiu maior multiplicação das bactérias ácido-láticas, e conseqüentemente, maior produção de ácidos.

Figura 42 - Contagem de microrganismos em placa: **A**: Colônias de bactérias ácido-láticas, com produção de ácido representada pelo halo esverdeado, em meio HDD; **B**: Colônias de leveduras em meio Agar batata dextrose.



Apesar de a acidez total titulável das polpas MCS e NMCS terem seguido perfis semelhantes ao longo da fermentação (Figura 43), a NMCS apresentou maior pH desde o tempo inicial. Já as duas polpas maceradas enzimaticamente inicialmente detinham pHs semelhantes, alterando-se de forma distinta durante o processo fermentativo. Considerou-se como tempo 0 para as amostras maceradas enzimaticamente, o momento em que foram incubadas nas condições definidas para a fermentação, após as 18 horas de maceração enzimática. Assim, as polpas maceradas apresentaram menores valores de pH no início devido à presença de ácidos resultantes da ação das enzimas pectinolíticas. Sabe-se que a pectinametilesterase (PME) é uma das enzimas que liberam ácidos carboxílicos e ácidos galacturônicos, reduzindo o pH da polpa.

Figura 43 - Variação do pH e da acidez total titulável ao longo da fermentação das polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS) durante 6 semanas.



A maceração enzimática nas amostras MSS e MCS gerou maiores concentrações iniciais de grupos redutores totais (GRT), devido à liberação destes pela ação das enzimas Pectinex AR e Celluclast que foram adicionadas às polpas (Figura 44).

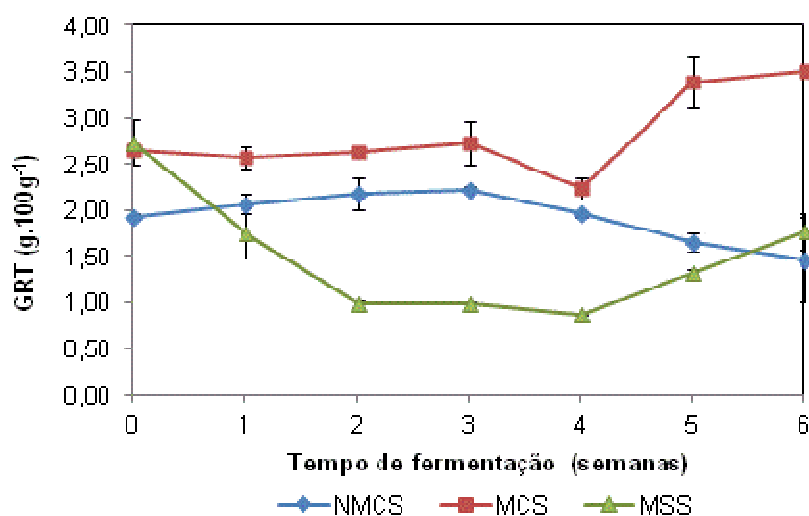
Na polpa MSS a concentração de GRT decresceu consideravelmente até a 4ª semana de fermentação, com posterior elevação até a 6ª semana. Tal fato está relacionado ao comportamento da microbiota presente na polpa, uma vez que na 5ª semana de fermentação, a população de bactérias ácido-láticas reduziu duas casas decimais enquanto a de bolores e leveduras foi menor que 100. Assim, a elevação de GRT a partir desse tempo possivelmente está relacionada com a redução de micro-organismos consumidores de GRT e simultânea ação das enzimas de maceração liberando GRT. Nessa amostra, o consumo de GRT ocorreu ao mesmo tempo em que os mesmos eram liberados pela ação enzimática, durante a incubação para o processo fermentativo, já que não houve adição de sal para inibir a atividade das enzimas. Os GRT podem também serem originários da ação de enzimas produzidas por micro-organismos presentes na polpa de pimenta, pois

segundo Sakai *et al.* (1993) vários fungos e bactérias e poucas leveduras produzem endopoligalacturonases.

Na polpa MCS, a concentração de GRT se manteve praticamente constante até a 3ª semana de fermentação, com uma redução acentuada na 4ª semana, seguida de elevação até o final do experimento. O aumento da concentração de GRT em polpas com sal já foi verificado em experimento anterior (item 4.2) e na fermentação realizada por García-Martínez *et al.* (2006), com pimenta jalapeño, mas ainda sem explicação comprovada. Além disso, esta amostra apresentou as maiores concentrações de GRT ao longo da fermentação, estando relacionada com a menor quantidade de micro-organismos nessa polpa quando comparada com as outras duas.

Na polpa NMCS não houve o enriquecimento de GRT pela maceração enzimática, e associado ao seu consumo pela microbiota presente, provavelmente por esse motivo a redução ocorreu após a 3ª semana de fermentação. O fato curioso, relacionado ao aumento dos GRT, também ocorreu até a 3ª semana. Como a polpa não foi adicionada de sal, a elevação pode ter se dado pela ação de enzimas pectinolíticas endógenas, que atuaram degradando a parede celular liberando GRT.

Figura 44 - Variação dos grupos redutores totais (GRT) ao longo da fermentação das polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS) durante 6 semanas.



Enzimas como pectinases, celulasas e hemicelulasas são necessárias para a produção de açúcares fermentescíveis a partir de polissacarídeos, e para o rompimento da matriz da parede celular, liquefazendo-a e liberando carboidratos intracelulares. Essas enzimas são utilizadas nas indústrias de açúcar de beterraba e de amido de batata para tornar os constituintes da parede celular disponíveis como bioprodutos (KASHYAP *et al.*, 2001).

Dentre os parâmetros de cor instrumental, aquele que indica intensidade de coloração vermelha (a^*) foi o único que não apresentou alteração significativa ($\alpha > 0,05$) entre os tempos de fermentação em todas as amostras (Tabela 15). O mesmo aconteceu com o parâmetro b^* , que indica intensidade de cor amarela, na polpa MSS, e com a luminosidade (L^*) nas amostras MCS e MSS. Observou-se que a fermentação tendeu a reduzir os parâmetros de cor ao longo do tempo.

Tabela 15 - Parâmetros de cor instrumental das polpas de pimenta Não Macerada Com Sal (NMCS), Macerada Com Sal (MCS) e Macerada Sem Sal (MSS).

Tempo*	L^*			a^*			b^*			ΔE		
	NMCS	MCS	MSS	NMCS	MCS	MSS	NMCS	MCS	MSS	NMCS	MCS	MSS
0	43,6 ± 0,4 ^a	35,7 ± 2,3 ^a	39,03 ± 2,09 ^a	23,1 ± 1,2 ^a	19,7 ± 1,5 ^a	22,6 ± 0,7 ^a	25,0 ± 0,9 ^a	19,5 ± 1,4 ^a	21,8 ± 1,6 ^a	--	--	--
	40,9 ± 1,1 ^{ab}	34,7 ± 0,3 ^a	40,27 ± 2,22 ^a	23,3 ± 0,7 ^a	18,2 ± 0,9 ^a	23,0 ± 2,1 ^a	23,2 ± 0,9 ^{ab}	18,8 ± 0,7 ^{ab}	21,9 ± 2,6 ^a	2,8	1,4	2,1
2	36,8 ± 0,9 ^c	33,2 ± 0,8 ^a	37,70 ± 0,51 ^a	25,4 ± 0,9 ^a	18,1 ± 1,4 ^a	23,5 ± 0,5 ^a	20,0 ± 1,2 ^b	17,3 ± 0,7 ^{ab}	20,2 ± 0,3 ^a	6,9	2,7	2,0
	38,5 ± 0,4 ^{bc}	32,8 ± 2,1 ^a	37,94 ± 0,95 ^a	24,8 ± 1,1 ^a	17,2 ± 0,2 ^a	21,3 ± 3,2 ^a	20,9 ± 0,0 ^b	16,9 ± 1,6 ^{ab}	19,7 ± 0,2 ^a	5,3	3,2	3,1
4	40,2 ± 0,4 ^{abc}	31,2 ± 0,7 ^a	40,52 ± 0,87 ^a	24,2 ± 1,6 ^a	18,8 ± 0,2 ^a	20,6 ± 2,4 ^a	22,4 ± 0,7 ^{ab}	15,9 ± 0,4 ^{ab}	21,4 ± 0,7 ^a	3,5	4,9	2,4
	38,0 ± 1,9 ^{bc}	32,5 ± 2,1 ^a	40,62 ± 1,72 ^a	21,9 ± 0,6 ^a	18,2 ± 0,4 ^a	24,4 ± 0,1 ^a	20,7 ± 1,2 ^b	16,1 ± 1,6 ^{ab}	20,9 ± 0,8 ^a	5,7	3,4	1,9
6	37,8 ± 0,0 ^{bc}	31,6 ± 0,1 ^a	39,29 ± 1,36 ^a	24,1 ± 0,2 ^a	17,0 ± 0,3 ^a	22,1 ± 1,3 ^a	19,7 ± 0,9 ^b	14,8 ± 0,0 ^b	19,8 ± 1,4 ^a	5,9	4,5	0,7

*Tempo em semanas

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

A polpa MCS apresentou os menores valores de luminosidade, de intensidade de cor vermelha e de intensidade de cor amarela, estando de acordo com o que foi observado visualmente (Figura 45), onde esta apresentou um tom

vermelho mais escurecido que as outras duas. Já a polpa NMCS, que é a formulação normalmente utilizada atualmente para a fermentação de polpa de pimentas, foi a que obteve os maiores valores em todos os parâmetros, apresentando-se com coloração mais alaranjada e intensa. Assim, comparando-se essas duas polpas, pode-se inferir que a maceração enzimática alterou a coloração da polpa de pimenta tornando-a mais escura, o que pode tornar o molho de pimenta elaborado a partir desta polpa, mais atraente para o consumidor ou não.

Figura 45 - Polpa macerada com sal (MCS), Polpa macerada sem sal (MSS), Polpa não macerada com sal (NMCS).



O sal é outro fator que também afeta a coloração das polpas de pimenta, contribuindo para maiores valores de luminosidade, coloração vermelha e coloração amarela, como foi mostrado no item 4.2, quando se comparou a fermentação da polpa de pimenta com e sem sal, sem aplicação de enzimas. A polpa NMCS apresentou maior intensidade de coloração alaranjada (Figura 45), comprovada pelos maiores resultados dos parâmetros de cor instrumental. Tal fato se deve à contribuição do sal e a ausência de maceração enzimática na mesma. Entretanto, comparando-se as polpas MCS e MSS, percebe-se que o sinergismo maceração enzimática e presença de sal na polpa de pimenta, mostrou um resultado diferente do que se poderia esperar, que seria uma polpa com coloração mais intensa na que possui sal.

A polpa não macerada com sal (NMCS), cuja formulação corresponde à que é utilizada para a fabricação comercial de polpa de pimenta manteve-se consistente e apresentou-se com uma coloração laranja mais intensa que

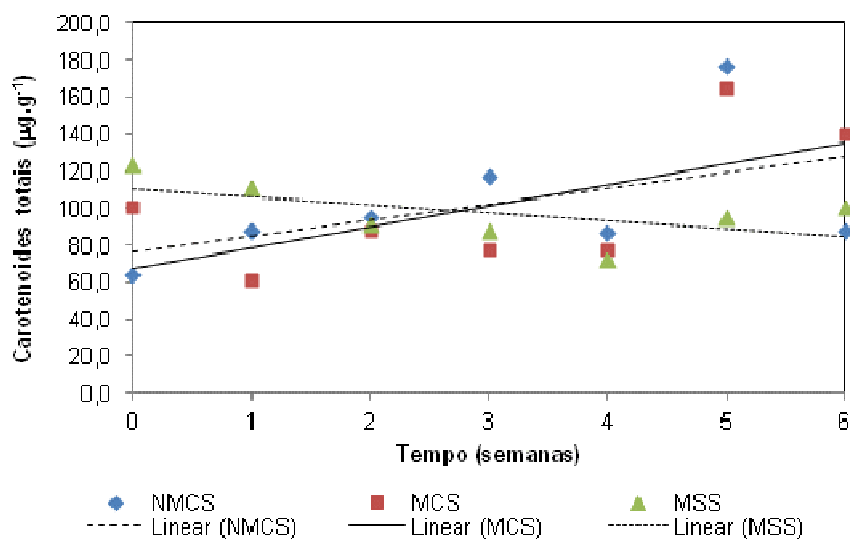
inicialmente. Esta foi utilizada como controle para as amostras maceradas. A polpa macerada sem sal (MSS) tornou-se visualmente mais fluida do que no estado inicial, devido à maceração enzimática. Não houve alteração significativa na coloração da polpa, como ocorreu nas amostras que foram adicionadas de sal. A polpa macerada com sal (MCS) apresentou separação de fases bem evidente durante a fermentação, que pôde ser observada a partir da primeira semana, intensificando-se a cada semana. A polpa com as sementes se mantiveram na parte inferior do recipiente, enquanto uma fase líquida surgiu na parte superior do conteúdo. Esta amostra também teve sua coloração alterada, tornando-se mais escura que no início e até mesmo com relação às outras amostras, como mostra a Tabela 15. O manuseio da polpa de pimenta dessa forma pode facilitar o processo de separação do extrato e as cascas e sementes, que é realizada por peneiramento por industrializadores de molho de pimenta.

Os principais carotenoides das pimentas vermelhas maduras são capsantina, capsorrubina, β -caroteno e zeaxantina (KADAKAL *et al.*, 2001), por isso os resultados estão expressos em zeaxantina. As concentrações de carotenoides totais de cada tipo de polpa em cada tempo de fermentação estão apresentadas no Apêndice H.

De uma maneira geral, o conteúdo de carotenoides não variou entre as amostras, uma vez que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre elas, entretanto o tempo influenciou significativamente ($p < 0,05$). Uma análise estatística para avaliar a influência da maceração enzimática e da presença de sal no teor de carotenoides das polpas revelou que a adição de sal à polpa previamente macerada não afetou a concentração de carotenoides, diferentemente de quando a polpa foi somente fermentada com sal (item 4.2), onde o nível desses compostos foi reduzido.

A Figura 46 apresenta o comportamento dos carotenoides durante a fermentação em cada tipo de polpa avaliada.

Figura 46 - Teor de carotenoides totais, expressos em zeaxantina, na Polpa macerada com sal (MCS), Polpa macerada sem sal (MSS), Polpa não macerada com sal (NMCS).



Como apresenta a Tabela 16, as regressões lineares foram significativas ($p < 0,05$) na maioria das polpas. As equações mostram que apenas na polpa MSS houve uma tendência de decréscimo no conteúdo de carotenoides com o tempo. Tal fato pode estar relacionado à ação de enzimas oxidativas, que são inibidas nas outras polpas devido à presença do sal.

Tabela 16 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos carotenoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas.

Amostra	R ²	Equação do modelo	p _{valor}
NMCS	0,2566	Y = 76,80 + 8,51x	0,0813
MCS	0,4211	Y = 67,67 + 11,28x	0,0072
MSS	0,3143	Y = 110,44 - 4,33x	0,0104

Associada à ação das enzimas de maceração, a liberação de carotenoides para o meio extracelular pode estar relacionada ao efeito osmótico do sal. Tem sido reportada a aplicação de enzimas na extração de capsaicoides e carotenoides de pimentas (*Capsicum annuum* L.) usando etanol como solvente (SANTAMARIA *et al.*, 2000).

O teor de capsaicoides totais foi significativamente diferente ($p < 0,05$) tanto entre os tratamentos quanto entre os tempos de fermentação, sendo a polpa

MCS a que apresentou menor concentração média de capsaicinoides. Uma análise estatística para avaliar a influência da maceração enzimática e da presença de sal no teor de capsaicinoides das polpas revelou que tanto o tratamento enzimático quanto a adição de sal contribuiu para a redução das concentrações de capsaicinoides, enquanto na polpa somente fermentada (item 4.2) o sal não provocou alteração significativa ($p>0,05$) no teor desses compostos. As Figuras 47, 48 e 49 ilustram o comportamento dos principais capsaicinoides nas polpas de pimenta. Os valores estão apresentados no Apêndice I.

Figura 47 - Concentração de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina e capsaicinoides totais na polpa não macerada com sal (NMCS).

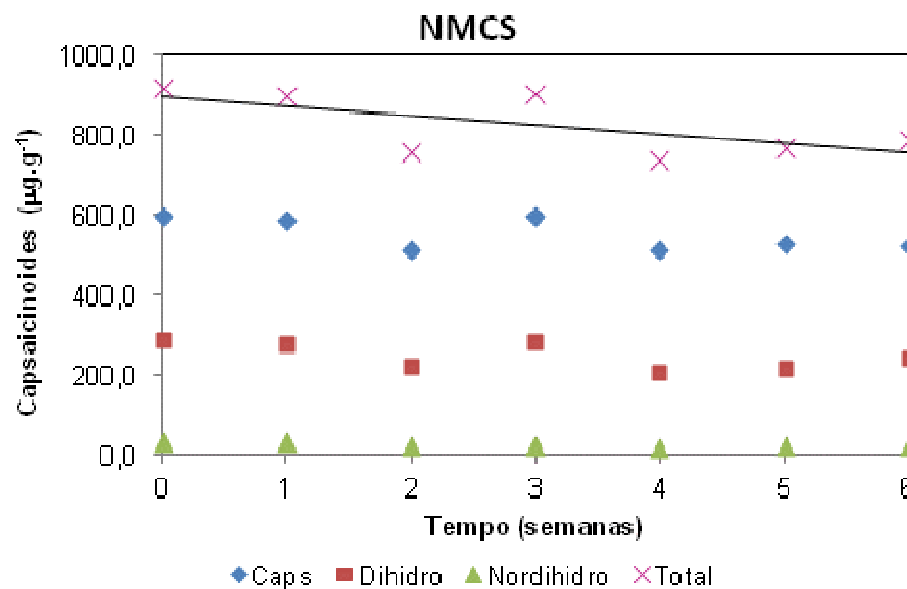


Figura 48 - Concentração de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina e capsaicinoides totais na polpa macerada com sal (MCS).

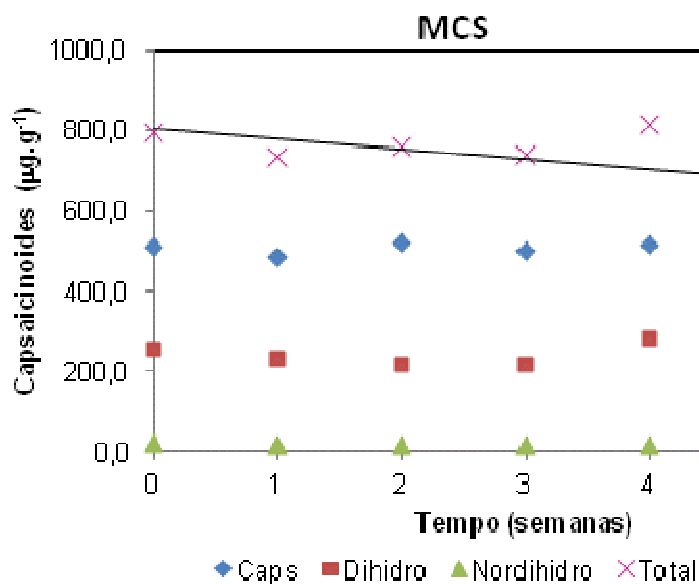
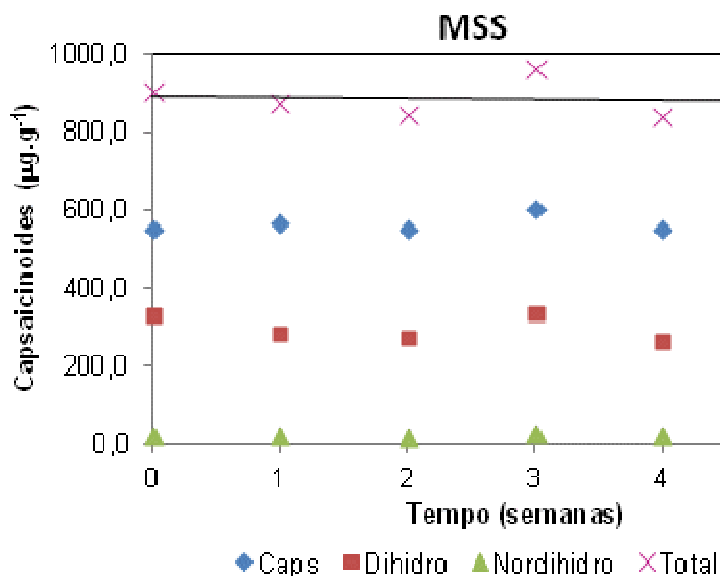


Figura 49 - Concentração de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina e capsaicinoides totais na polpa macerada sem sal (MSS).



A regressão linear foi significativa ($p < 0,05$) para as polpas NMCS e MCS, e indicou uma redução na concentração de capsaicinoides nessas polpas com o passar do tempo de fermentação (Tabela 17).

Tabela 17 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear referente aos capsaicinoides totais das polpas de pimenta maceradas enzimaticamente e seus controles em diferentes temperaturas.

Amostra	R ²	Equação do modelo	p _{valor}
NMCS	0,4286	Y = 896,23 – 23,52x	0,0151
MCS	0,4839	Y = 803,43 – 24,97x	0,0134
MSS	0,0177	Y = 888,95 – 2,60 x	0,7490

O tratamento enzimático associado à fermentação de vegetais já foi relatado por Kashyap *et al.* (2001). Eles citam trabalhos em que enzimas de maceração são utilizadas para melhorar em algum aspecto o processo fermentativo. Por exemplo, preparações comerciais contendo pectinases, celulases e hemicelulases removem a camada de mucilagem de grãos de café que serão posteriormente fermentados. Em chás, o tratamento enzimático com pectinases acelera o processo de fermentação e melhora a propriedade de formar espuma de chá instantâneo em pó, devido à degradação das pectinas.

Dos experimentos realizados nessa etapa, a separação de fases ocorrida na formulação que foi submetida à maceração enzimática foi o resultado de maior impacto, devido à possibilidade de contribuir de forma positiva na produção industrial de molho de pimenta, facilitando a separação do extrato e aumentando o seu rendimento.

4.6 Avaliação do rendimento do processo.

Na Tabela 18 estão os valores, em massa, dos componentes de cada formulação que foram utilizados para os cálculos de rendimento do extrato após separação do resíduo com auxílio de peneira.

Tabela 18 - Composição das formulações e rendimento em extrato após a separação da polpa de pimenta.

Formulação	Polpa de pimenta (g)	Cloreto de sódio (g)	Água (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
PCF	140,04	14,01	0,00	59,34	38,52
PCFA	140,05	14,01	28,08	91,84	50,42
PACF	140,05	14,01	28,02	90,00	49,43
PAMCF	140,06	14,01	28,12	105,88	58,12

PCF: Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação; **PCFA:** Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação-Água; **PACF:** Polpa-Água-Cloreto de sódio-Fermentação; **PAMCF:** Polpa-Água-Cloreto de sódio-Maceração enzimática-Fermentação.

A formulação PCF foi a que resultou claramente em menor rendimento dentre todas. As formulações PCFA e PACF, que tiveram mesma quantidade de água adicionada, diferenciando-se apenas pelo momento em que a adição ocorreu, sendo antes da incubação na formulação PACF e depois da incubação na formulação PCFA, apresentaram rendimentos em extrato semelhantes.

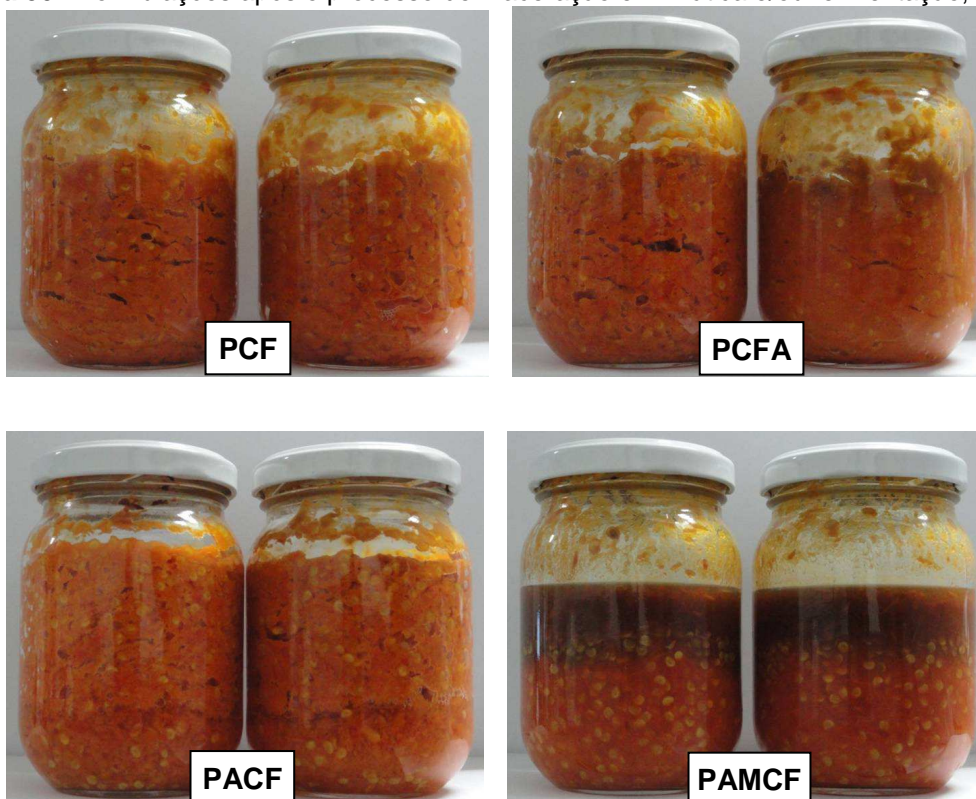
Comparando-se o rendimento das amostras PACF e PAMCF, que possuem a mesma quantidade de água na sua formulação, e que se diferenciam apenas pela presença de enzimas na amostra PAMCF, o aumento no rendimento foi de 17,5%. Kyamuhangire *et al.* (2002), ao comparar os rendimentos dos sucos obtidos de bananas pelo método mecânico e enzimático, observaram que o último foi 6% maior, e considerado alto pelos autores. Sun *et al.* (2007) citam pesquisas em que o tratamento enzimático com pectinase e celulase aumentaram significativamente o rendimento em suco.

Tochi *et al.* (2009) compararam o suco de abacaxi obtido sem e com tratamento enzimático, por ação de pectinases e da combinação pectinases/celulases, e obtiveram rendimento máximo de aproximadamente 95% em suco, o que ocorreu quando a combinação de enzimas foi utilizada. Isso correspondeu a um aumento de 25% de rendimento quando comparado com o controle. Dessa forma, foi possível inferir que o maior rendimento de extrato na amostra PAMCF está relacionado à ação das enzimas de maceração aplicadas à polpa.

A Figura 50 ilustra as polpas após incubação, recém-retiradas da B.O.D., enquanto a Figura 51 representa os extratos obtidos após separação da polpa. A formulação PAMCF, por apresentar fases separadas após a incubação, conforme

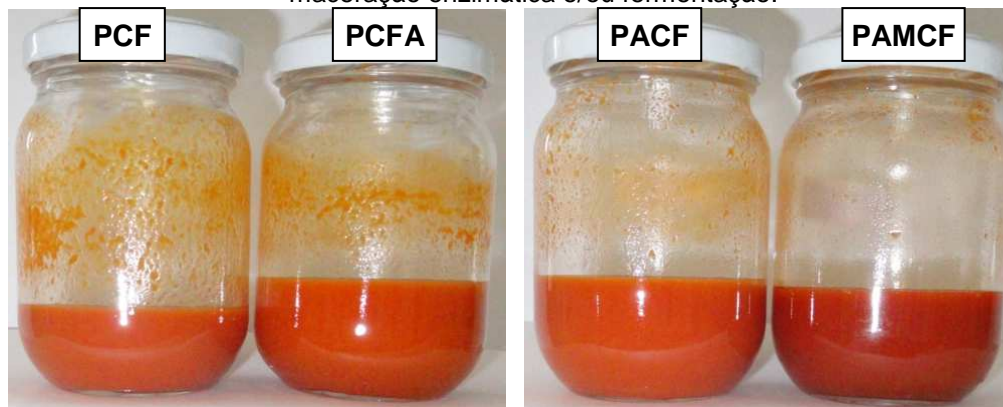
mostra a Figura 50, detém maior facilidade de separação das fases líquida e sólida por meio de peneira. O extrato PAMCF também se diferenciou dos outros pela coloração mais avermelhada, enquanto os outros possuíam um tom mais alaranjado (Figura 51). Isso pode tornar o produto elaborado a partir dele mais aceito sensorialmente pelos consumidores, ou não. O resíduo da amostra PAMCF também apresentou característica diferente dos outros, primeiramente pela quantidade, confirmada pelo menor rendimento e visualmente, observou-se menos polpa aderida às cascas e sementes. Demir *et al.* (2001) cita que a maceração enzimática reduz a quantidade de resíduos de frutas.

Figura 50 - Formulações após o processo de maceração enzimática e/ou fermentação, em duplicata.



PCF: Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação; **PCFA:** Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação-Água; **PACF:** Polpa-Água-Cloreto de sódio-Fermentação; **PAMCF:** Polpa-Água-Cloreto de sódio-Maceração enzimática-Fermentação.

Figura 51 - Extratos obtidos da separação em peneira das formulações após o processo de maceração enzimática e/ou fermentação.



PCF: Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação; **PCFA:** Polpa-Cloreto de sódio-Fermentação-Água; **PACF:** Polpa-Água-Cloreto de sódio-Fermentação; **PAMCF:** Polpa-Água-Cloreto de sódio-Maceração enzimática-Fermentação.

Schoudhari e Ananthanarayan (2007) citam um trabalho realizado no qual os autores verificaram a ocorrência de licopeno, pigmento que faz parte do grupo dos carotenoides, em diferentes frações do tomate, como película, fração insolúvel em água; e a fração fibrosa, que inclui fibras e sólidos solúveis. Eles obtiveram como resultados que 72 a 92% do licopeno estavam associados à fração insolúvel em água e à película. Os extratos de tomate e principalmente a película contêm elevadas quantidades de licopeno.

No primeiro experimento, o extrato PACF diferiu significativamente ($\alpha > 0,05$) em termos de carotenoides, apenas da amostra PCFA, enquanto no segundo experimento foi significativamente diferente ($\alpha < 0,05$) das outras três amostras. As concentrações de carotenoides para cada amostra não diferiram significativamente ($\alpha > 0,05$) entre os dois experimentos realizados (Tabela 19).

Da média dos experimentos, PCFA apresentou maior concentração de carotenoides no extrato ($176,22 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$), seguido de PCF ($156,83 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$), PAMCF ($133,46 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$); enquanto PACF ($86,42 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$) resultou em menor concentração.

Tabela 19 - Carotenoides nos extratos obtidos da separação da fase líquida e resíduo das formulações.

Extrato	Concentração de carotenoides expressa em zeaxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)	
	Experimento 1	Experimento 2
PCF	167,98 \pm 10,60 ^{ab}	145,67 \pm 0,92 ^a
PCFA	208,40 \pm 33,60 ^a	144,05 \pm 2,49 ^a
PACF	100,38 \pm 8,29 ^b	72,46 \pm 23,18 ^b
PAMCF	133,06 \pm 8,28 ^{ab}	133,87 \pm 10,29 ^a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Processos modernos de produção de sucos de frutas e vegetais geralmente usam enzimas como importantes auxiliares para obter sucos com maiores rendimentos e maiores conteúdos de sólidos solúveis (SUN *et al.*, 2007). De acordo com o processo de maceração enzimática, as pectinas da parede celular e da lamela média da fruta são degradadas pela atividade de pectinases. Além de aumentar o rendimento em suco em até 20%, essa técnica também tem efeito positivo para se alcançar altas concentrações de carotenoides (DEMIR *et al.*, 2001).

A Tabela 20 expõe os valores de capsaicinoides totais dos extratos nos dois experimentos realizados. Não houve diferença significativa ($\alpha > 0,5$) entre as amostras do mesmo experimento, assim como não houve diferença entre os experimentos para uma mesma amostra. O apêndice J apresenta a concentração dos principais capsaicinoides em cada amostra.

Tabela 20 – Capsaicinoides totais nos extratos obtidos da separação da fase líquida do resíduo das formulações.

Amostra	Capsaicinoides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)	
	Experimento 1	Experimento 2
PCF	309,33 \pm 60,21	444,22 \pm 72,71
PCFA	361,96 \pm 62,23	334,69 \pm 109,27
PACF	371,64 \pm 134,94	310,04 \pm 141,89
PAMCF	454,58 \pm 97,31	375,43 \pm 2,15

Lopes e Okura (2005) citam algumas propriedades da capsaicina, principal composto do grupo dos capsaicinoides: faz bem para o humor; estimula a

produção de endorfina; pode atuar como anticoagulante, evitando a trombose; atua como uma aspirina natural, solubilizando coágulos sanguíneos; possui função de expectorante e descongestionante; dissolve o muco dos pulmões; é indutor da termogênese (efeito de transformar parte das calorias dos alimentos em calor); é antioxidante e tem ação antibacteriana; e induz a liberação de endorfinas, que são analgésicos naturais.

4.7 Análise sensorial dos molhos de pimenta

Em uma sessão de grupo de foco com dois consumidores de pimentas, foi escolhida a proporção extrato:vinagre:sal 10:10:1, respectivamente, como sendo a mais agradável sensorialmente para um molho de pimenta. Portanto essa formulação foi utilizada nos experimentos de análise sensorial, onde o Molho 1 foi preparado com o extrato resultante da separação do PACF (polpa não macerada enzimaticamente), e o Molho 2 foi preparado com o extrato resultante da separação do PAMCF (polpa macerada enzimaticamente).

Antes das análises, as amostras de molho de pimenta foram avaliadas microbiologicamente conforme a legislação vigente (BRASIL, 2001). Os resultados das análises de *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes confirmaram a segurança microbiológica dos molhos, como pode ser verificado na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados das análises para verificação da segurança microbiológica dos molhos de pimenta.

Análises microbiológicas	Resultado em ambas as amostras	
	(Molho 1 e Molho 2)	
		Padrão
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g
Coliformes termotolerantes	< 10 UFC.g ⁻¹	5 × 10 ² UFC.g ⁻¹

Os molhos apresentaram uma tendência em separar fases (Figura 52), sendo aquele elaborado a partir da amostra macerada o que mais separou e com maior rapidez. Sakho *et al.* (1998), em seu estudo sobre maceração enzimática de polpa de manga, relatam que no teste de estabilidade utilizando centrifugação, a polpa não tratada enzimaticamente não apresentou formação de sobrenadante. Já após vários tempos de reação e maiores quantidades de enzima, os resultados

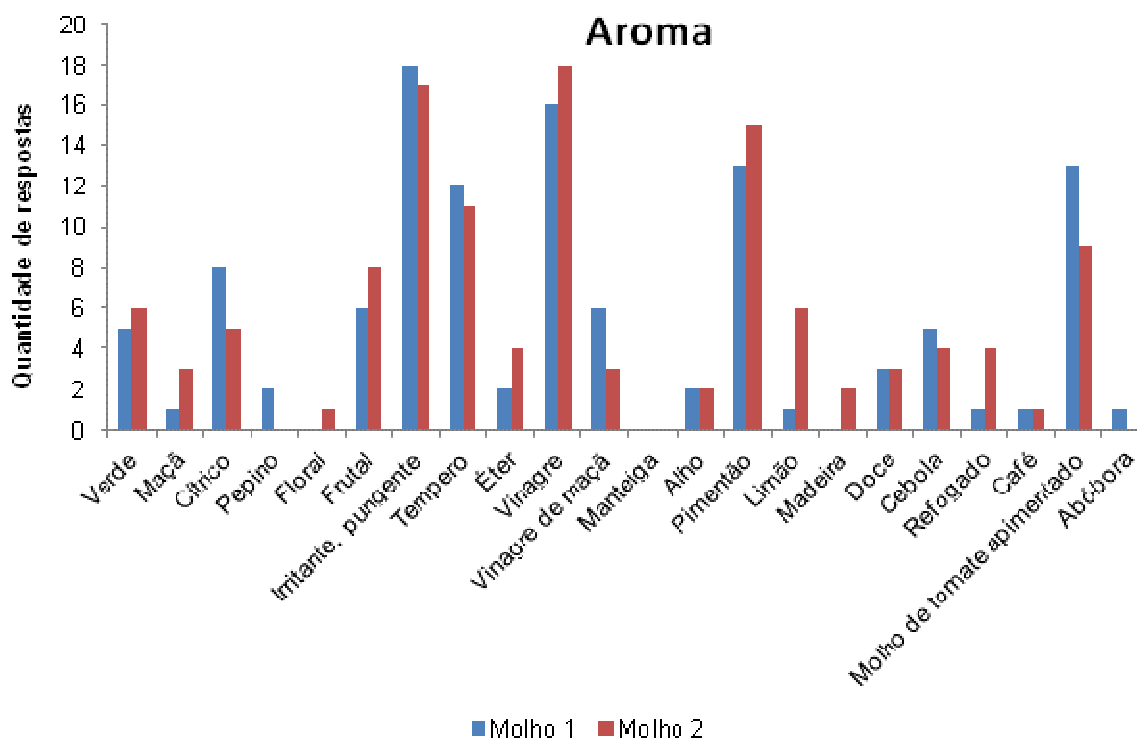
mostraram que a separação de fases aumentou com o tempo de reação e ocorreu mais rapidamente à medida que a concentração de enzima aumentou.

Figura 52 - Molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2) apresentando separação de fases.



No teste "Check All That Apply" (CATA) (Figura 53), não foram verificadas grandes diferenças entre os termos escolhidos pelos provadores para descreverem o aroma das duas amostras de molho de pimenta. Segundo os julgadores, os descritores que melhor caracterizaram os molhos foram: irritante/pungente, tempero, vinagre, pimentão e molho de tomate apimentado. Apenas um provador citou o aroma de abóbora, que não fazia parte dos termos presentes na ficha sensorial, e que foi percebido no Molho 1.

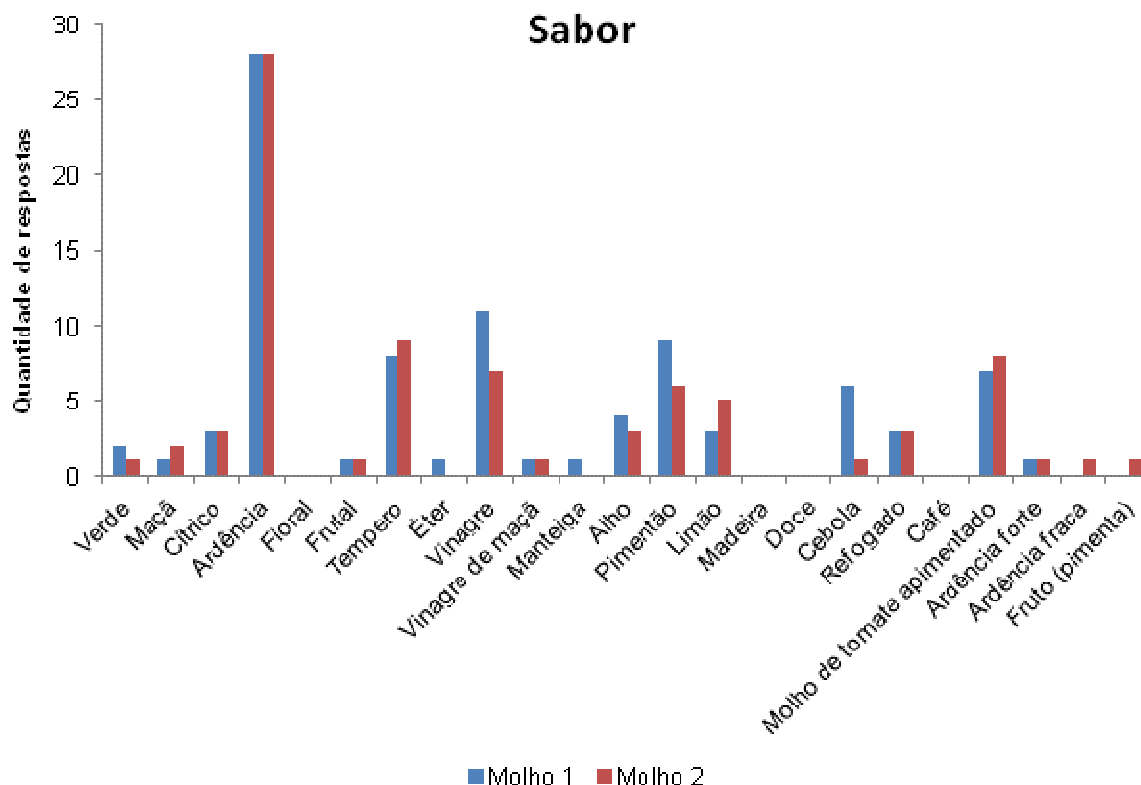
Figura 53 - Descritores que caracterizam os molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2) para o atributo aroma.



Quanto ao atributo sabor, a característica de ardência foi a mais citada entre os julgadores para as duas amostras (Figura 54). Os descritores de sabor vinagre, pimentão e cebola foram mais percebidos no Molho 1, sem maceração enzimática, enquanto tempero, limão e molho de tomate apimentado foram os descritores mais citados no Molho 2.

A ardência forte, ardência fraca e o sabor de pimenta eram termos que não estavam presentes na ficha sensorial e que foram adicionados pelos provadores, sendo o primeiro percebido nas duas amostras, e os outros dois somente no Molho 2. Esse resultado leva a crer que o Molho 2 tem a característica de ardência menos intensa que o Molho 1, o que só pode ser confirmado através de um teste de intensidade.

Figura 54 - Descritores que caracterizam os molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2) para o atributo sabor.



Tochi *et al.* (2009) compararam o suco de abacaxi obtido sem e com tratamento enzimático, por ação de pectinases e da combinação pectinases/celulases, e obtiveram rendimento máximo de aproximadamente 95% em suco, o que ocorreu quando a combinação de enzimas foi utilizada. Entretanto, sensorialmente o suco obtido sem adição de enzimas recebeu melhores notas quanto à aceitação global.

Diante dos resultados, infere-se que, pelos testes CATA, não foram observadas grandes diferenças entre as amostras quanto aos atributos de aroma e sabor, sendo que os julgadores observaram características semelhantes em ambos os molhos. Por isso, foi necessária a aplicação de testes de intensidade dos atributos que foram escolhidos pelos provadores com maior frequência.

Os testes de intensidade dos principais atributos de aroma revelaram que não há diferença significativa ($\alpha > 0,05$) entre os dois molhos, exceto para o aroma frutal, que segundo os julgadores, é mais intenso no molhos proveniente da polpa macerada enzimaticamente (Tabela 22).

Quanto ao sabor, a ardência foi significativamente diferente ($\alpha < 0,05$) e maior no molho obtido a partir da polpa não macerada enzimaticamente (Tabela 23), coerente com o estudo anterior (item 4.5) que mostrou a maior concentração de capsaicinoides na polpa não macerada com sal quando comparada com a polpa macerada com sal.

Tabela 22 – Valores de intensidade dos atributos de aroma dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2).

Amostra	Intensidade de atributos de aroma					Molho de tomate apimentado
	Frutal	Irritante	Pimentão	Pimenta	Cítrico	
Molho 1	3,33 ^b	2,79 ^a	3,62 ^a	5,02 ^a	3,16 ^a	3,37 ^a
Molho 2	4,59 ^a	3,69 ^a	3,89 ^a	5,39 ^a	3,03 ^a	3,50 ^a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente ($\alpha > 0,05$).

Tabela 23 - Valores de intensidade dos atributos de sabor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2).

Amostra	Intensidade de atributos de sabor	
	Molho de tomate picante	Ardência
Molho 1	4,14 ^a	7,16 ^a
Molho 2	4,68 ^a	5,64 ^b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente ($\alpha > 0,05$).

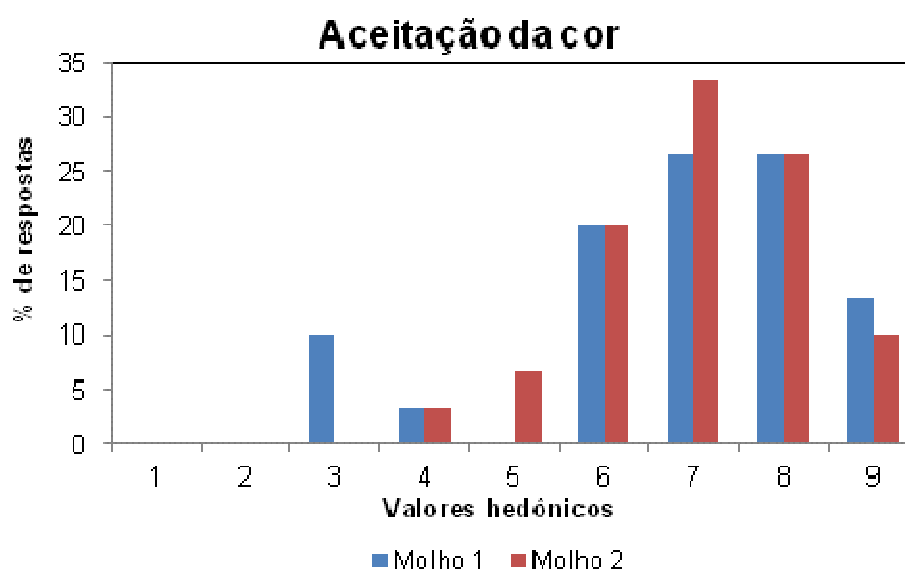
No teste sensorial de aceitação de cor foi pedido para que os provadores não levassem a separação de fases em consideração no momento do julgamento, evitando-se que isso acontecesse também através de agitação periódica das amostras nos tubos de ensaio.

Não houve diferença significativa entre as médias de aceitação da cor entre as duas amostras ($\alpha > 0,05$), sendo que o Molho 1 (proveniente da polpa não macerada enzimaticamente) obteve valor hedônico médio de 6,8; enquanto o Molho 2 (proveniente da polpa macerada) obteve 7,0; ambos valores associados à categoria "gostei" da escala hedônica.

No entanto, analisando-se o gráfico de distribuição de frequências das respostas quanto à aceitação da cor dos molhos de pimenta (Figura 55) observa-se

o comportamento dos consumidores diante de cada amostra. As categorias do “desgostei muitíssimo” ao “desgostei ligeiramente” são consideradas região de rejeição da escala hedônica, enquanto as categorias do “gostei ligeiramente” ao “gostei muitíssimo” são consideradas região de aceitação. A categoria “nem gostei, nem desgostei”, localizada no meio da escala, equivale à região de indiferença.

Figura 55 - Histograma de frequência da análise de aceitação da cor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2).



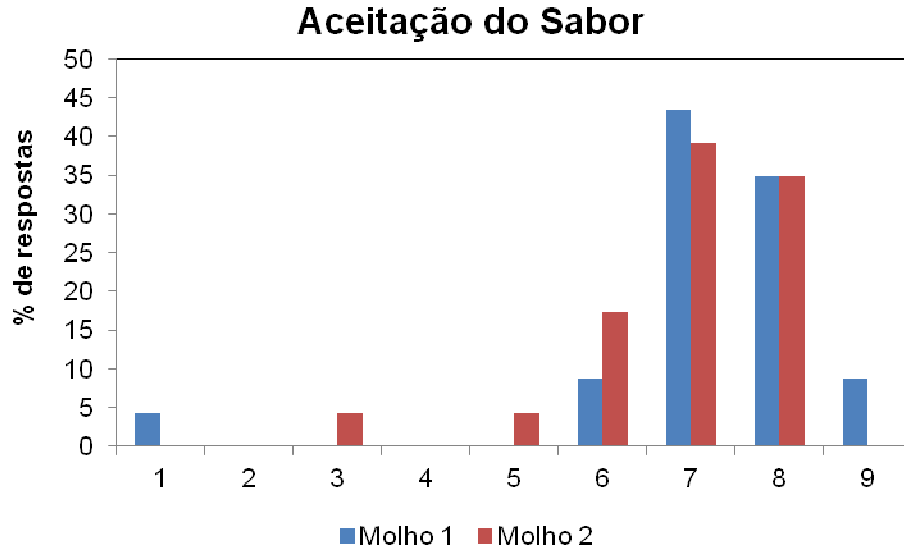
As distribuições de frequências, tanto do Molho 1 quanto do Molho 2, ficaram deslocadas para a região de aceitação, com moda 7 (categoria "gostei"), obtendo o Molho 2 maior porcentagem de respostas nessa categoria. O Molho 1 apresentou maior porcentagem de respostas na categoria 9 ("gostei muitíssimo), mas a diferença foi de apenas 3,3%. Somado a isso, o Molho 1 apresentou mais respostas na região de rejeição do gráfico (13,3%) do que o Molho 2 (3,3%).

Como foi mencionado, nos testes de maceração enzimática, a ação da enzima modifica a coloração da polpa, e conseqüentemente do molho elaborado a partir dela. Até então não se sabia se essa alteração na coloração seria positiva ou negativa para o consumidor. Por meio desse teste sensorial, pôde-se perceber que a cor do Molho 2 foi tão bem aceita quanto a do Molho 1, com a vantagem de ter sido menos rejeitada.

Os molhos avaliados apresentaram aceitação do sabor semelhante, sem diferença significativa ($\alpha > 0,05$), tendo o Molho 1 valor hedônico médio 7,2, enquanto

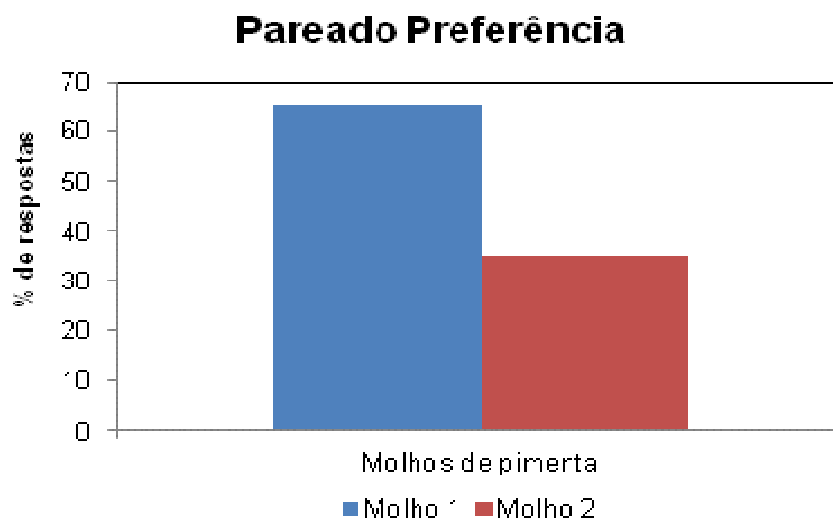
o do Molho 2 foi 6,9; ou seja, ambos relacionados à categoria "gostei" da escala hedônica (Figura 56).

Figura 56 - Histograma de frequência da análise de aceitação do sabor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2).



O histograma do teste pareado-preferência, mostra que o Molho 1 foi o mais preferido pelos consumidores, conforme mostra a Figura 57; e foi significativamente diferente ($\alpha < 0,05$) do Molho 2. Como os julgadores que participaram do teste consistiram em consumidores e apreciadores de pimenta principalmente pela sua principal característica, a ardência, essa diferença de aceitação pode estar relacionado ao fato de o Molho 1 ter apresentado maior intensidade de ardência, como relataram os julgadores (Tabela 23).

Figura 57 - Histograma de preferência do sabor dos molhos de pimenta elaborados a partir de polpa de pimenta não macerada (Molho 1) e macerada (Molho 2).



Kyamuhangire *et al.* (2002) relatam que não houve diferença sensorial quanto à intensidade do aroma entre sucos de banana extraído mecanicamente e por ação enzimática. Entretanto o aroma do suco extraído mecanicamente foi o mais preferido pelos provadores, obtendo também maior aceitação global.

Pelos resultados dos testes sensoriais pode-se verificar que os molhos elaborados a partir da polpa de pimenta macerada com as enzimas Pectinex AR e Celluclast (Molho 2), e da polpa não macerada (Molho 1) apresentaram características de sabor e de aroma semelhantes, embora o Molho 2 tenha maior intensidade de aroma frutal e menor ardência. Provavelmente devido à maior ardência, o Molho 1 foi o que obteve maior preferência entre os julgadores, que eram consumidores apreciadores de molho de pimenta, mas vale ressaltar que ambas as amostras apresentaram aceitação semelhante.

Apesar de as duas amostras não terem apresentado diferença significativa ($\alpha > 0,05$) quanto à cor, o Molho 2 obteve pequena superioridade quanto a esse atributo. Assim, a maceração enzimática pode ser uma alternativa para a produção de um molho diferenciado, com menor pungência, que provavelmente seria mais preferido por pessoas que não toleram esse atributo.

5 CONCLUSÕES

Dentre as condições de maceração enzimática estudadas, a melhor é em frascos fechados, com $1000 \mu\text{L.kg}_{\text{polpa}}^{-1}$ de Pectinex AR e igual quantidade de Celluclast simultaneamente, adição de 20% de água e a 50°C . Nessas condições o tempo de maceração deve ser de 18 horas.

No processo utilizando maceração enzimática da polpa de pimenta ocorre separação de fases, que facilita a obtenção do líquido base (extrato) para elaboração do molho de pimenta. Vale ressaltar que a maceração enzimática resultou em maior rendimento, de 17,5% a mais que na polpa não macerada, e proporcionou maior recuperação de capsaicinoides, conferindo mais propriedades benéficas, quando comparado com as amostras não maceradas.

Provavelmente devido à maior ardência, o molho elaborado a partir da polpa de pimenta não macerada enzimaticamente foi o mais aceito quanto ao sabor, o que pode estar relacionado ao fato de os julgadores serem consumidores frequentes de molho de pimenta, e, portanto apreciadores desse atributo. Como ambos os molhos apresentaram características semelhantes de aroma e sabor, de aceitação do sabor e de aceitação da cor, com maior superioridade nesse atributo para o molho macerado, uma análise de preferência com provadores que não toleram uma ardência mais intensa, poderia mostrar um resultado contrário, já que ambos foram igualmente bem aceitos.

Assim, esse processo pode ser aplicado para aumentar o rendimento de extrato de pimenta, com menos geração de resíduos, e produzir molhos de pimenta com menor pungência, para agradar a um público que não aprecia a elevada ardência dos molhos de pimenta tradicionais.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Elaborar um sistema para minimizar a intensa incorporação de ar durante a trituração da polpa de pimenta;

Acompanhar a fermentação da polpa de pimenta por períodos mais prolongados, com diferentes concentrações de sal, avaliando o efeito da presença de oxigênio, a fim de compreender melhor esse complexo processo;

Estudar outras preparações enzimáticas comerciais, a fim de se encontrar uma que em temperaturas próximas a ambiente e em até 6 horas de maceração, tenha elevada capacidade de reduzir a consistência da polpa de pimenta;

Estudar a causa da redução da sensação de ardência em polpas de pimenta maceradas e fermentadas simultaneamente apesar da maior recuperação de capsaicinoides no extrato.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. G. L.; SULAIMAN, N. M.; AROUA, M. K.; NOOR, M. J. M. M. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 65–71, July. 2007.

AHMED, J.; SHIVHARE, U. S.; RAMASWAMY, H. S. A fraction conversion kinetic model for thermal degradation of color in red chilli puree and paste. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 35, p. 497–503, 2002.

AQUINO, A. C. **Otimização da maceração enzimática na 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.

ARAÚJO, W. M. C.; MONTEBELLO, N. P.; BOTELHO, R. B. A.; BORGIO, L. A. **Alquimia dos alimentos**. Brasília, Editora Senac, 2011.

ARAÚJO, E. R.; DO RÊGO, E. R.; SAPUCAY, M. J. L. C.; DO RÊGO, M. M.; DOS SANTOS, R. M. C. Elaboração e análise sensorial de geléia de pimenta com abacaxi. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n. 3, Campina Grande, p. 233-238, 2012.

ARES, G.; BARREIRO, C.; DELIZA, R.; GIMÉNEZ, A.; GÁMBARO, A. Application of a check-all-that-apply question to the development of chocolate milk desserts. **Journal of Sensory Studies**, v. 25, p. 67–86, 2010.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Washington, DC, 2000.

BAGGER-JØRGENSEN, R.; MEYER, A. S. Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on the release of phenols into blackcurrant juice. **Eur Food Res Technol**, v. 219, p. 620–629, 2004.

BASTOS, M. S. R.; GURGEL, T. E. P.; FILHO, M. S. M. S, LIMA, I. F. B.; SOUZA, A. C. R.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 240-242, abr. 2002.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; ROS-GARCÍA, J. M.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 867–878, 2005.

BAYINDIRLI, A. Introduction to enzymes. In: BAYINDIRLI, A. (Org.). **Enzymes in fruit and vegetable processing: Chemistry and engineering applications**. CRC Press, 2010, 391 p.

BENNETT, D.J.; KIRBY, G.W. Constitution and biosynthesis of capsaicin. **J. Chem. Soc. (C)**. p. 442-446, 1968

BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaúde, 2007.

BOURNE, M. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. 2nd Edition, London: Academic Press, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.12 de 2 jan. 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.276 de 22 set. 2005. Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial da União**, Brasília. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.205 de 14 nov. 2006. Regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas. **Diário Oficial da União**, Brasília. 2006.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. agrotec.**, v.24 (Edição Especial), p.137-152, dez., 2000.

BUGGENHOUT, S. V.; SILA, D. N.; DUVETTER, T.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part III—Texture Engineering. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.8, p.105-117, 2009.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas de gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, série Documentos. n. 94, 2006. 27p.

CARVALHO, R. F. **Cultivo e processamento de pimenta**. Dossiê técnico. Rede de Tecnologia da Bahia, 2007.

CHITWOOD, R. L.; PANGBORN, R. M.; JENNINGS, W. GC/MS and sensory analysis of volatiles from three cultivars of *Capsicum*. **Food Chemistry**, v. 11, p. 201-216, 1983.

CIE - Commission Internationale de l'Eclairage. **Colorimetry**. 2nd Ed., Vienna: CIE publication, 1996.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ, Petrópolis, RJ: EPUB, 288p., 2008.

CONTRERAS-PADILLA, M.; YAHIA, E. M. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 2075-2079, 1998.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**. n. 36, p. 255-261, 2000.

CRISÓSTOMO, J.R.; FURTADO, R.F.; BARRETO, P.D.; DE MIRANDA, F.R.; GONDIM, R.S.; BLEICHER, E.; RODRIGUEZ, S.M.M.; PINTO, G.A.S.; DE BRITO, E.S.; LIMA, J.A.A.; PEREIRA, R.C.A.; FILHO, R.R.R.; FREITAS, J.G.; FILHO, L.L.M.M.; FILHO, F.A.C.R. **Pesquisa e desenvolvimento para o agronegócio pimenta no Ceará**. Documentos: Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza-CE, nov. 2008.

DA COSTA, L. M.; DE MOURA, N. F.; MARANGONI, C.; MENDES, C. E.; TEIXEIRA, A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, suppl. 1, p. 51-59, 2010.

DA COSTA, C. S. R.; HENZ, G. P. Usos e modos de consumo. In: **Cultivo de pimentas**. Sistemas de produção 4, versão eletrônica, Embrapa hortaliças. Dezembro, 2004. Disponível em:
< <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/usos.htm#topo>>. Acesso em: 09 dez 2012.

DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOGLU, K.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3. Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 47, p. 275-280, 2001.

DE OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* spp.** 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

DI CAGNO, R.; SURICO, R. F.; MINERVINI, G.; DE ANGELIS, M.; RIZZELLO, C.G.; GOBBETTI, M. Use of autochthonous starters to ferment red and yellow peppers (*Capsicum annum* L.) to be stored at room temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, p.108–116, 2009a.

DI CAGNO, R.; SURICO, R. F.; PARADISO, A.; DE ANGELIS M.; SALMON, J; BUCHIN, S.; DE GARA, L.; GOBBETTI, M. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.473–483, 2009b.

DI CAGNO, R.; CODA, R.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v. 33, p. 1–10, 2013.

DOOLEY, L.; LEE, Y. S.; MEULLENET, J. F. The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. **Food Quality and Preference**, v. 21, p. 394–401, 2010.

DUARTE, C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; GOUVEIA, A. F.; DA COSTA, S. B.; LEITÃO, A. E.; BERNARDO-GIL, M. G. Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. of Supercritical Fluids*, v. 30, p. 155–161, 2004.

DUTRA, A. S.; FURTADO, A. A. L.; DELIZA, R.; FERREIRA, J. C. S. Cinética da degradação da textura de pimentas em conserva. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 267-274, jul./dez. 2007.

DUTRA, F. L. A.; BRANCO, I. G.; MADRONA, G. S.; HAMINIUK, C. W. I. Avaliação sensorial e influência do tratamento térmico no teor de ácido ascórbico de sorvete de pimenta. **Revista Brasileira de Tecnologia Industrial**, v. 04, n. 02, p. 243-251, 2010.

ETCHELLS, J.L.; JONES, I.D. AND HOFFMAN, M.A. Brine preservation of vegetables. **Proc. Inst. Food Tech.** p.176-182, 1943.

FLORES, N. C.; VANLEEuwEN, D.; PENNOCK, R. D. The effect of calcium on microbial quality and consistency of chile pepper (*Capsicum annum* cv. *Mesilla Cayenne*) mash during fermentation. **LWT**, v.40, p.1482–1487, 2007.

FURTADO, A. A. L.; DUTRA, A. S. Elaboração de molhos de pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 267, p. 52-56, Belo Horizonte, mar./abr., 2012.

GARCÍA-MARTÍNEZ, I.; GONZÁLEZ, N. G. M.; GONZÁLEZ, L. R. G.; PINEDA, F. N. Estudios preliminares de la fermentación de chile jalapeño (*Capsicum annum* L.). **Investigación Universitaria Multidisciplinaria**, Año 5, n. 5, p. 36-42, diciembre. 2006.

GIMENO, O.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on texture and colour of dry fermented sausages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 873-877, 1999.

GIMENO, O.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations. **Meat Science**, v. 57, p. 23-29, 2001.

GÖKMEN, V. Selection of the indicator enzyme for blanching of vegetables. In: BAYINDIRLI, A. (Org.). **Enzymes in fruit and vegetable processing: Chemistry and engineering applications**. CRC Press, 2010, 391 p.

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

GUZMAN, I.; HAMBY, S.; ROMERO, J.; BOSLAND, P. W.; O'CONNELL, M. A. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. **Plant Science**, v. 179, p. 49–59, 2010.

HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. Acid-producing microorganisms. In DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods**. 4^a ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001.

HENRIQUE, C. S.; CARMO, E. C.; SANTIAGO, L. S.; ABREU, F. R. A produção da pimenta tabasco no estado do ceará: um diagnóstico logístico. Anais do XXIII Encontro Nac. de Eng. de Produção - Ouro Preto, MG, Brasil, 21 a 24 de out de 2003.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some aspects of the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, v. 27, n. 1, p. 42-49, 1962.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IAL: São Paulo, 2008. 4. ed. 1020 p.

JAY, J.M. Fermentation and fermented dairy products. In JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 6^a ed. Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, 2000.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931–2944, 2005.

JEN, J. J.; ROBINSON, M. L. Pectolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, Mysoure, v.49, p.1085-1087, 1984.

JI, F. D.; JI, B. P.; LI, B.; HAN, B. Z. Note. Microbial changes during the salting process of traditional pickled chinese cabbage. **Food Sci Tech Int.**, v. 13, n.1, p. 11-16, 2007.

JOSHI, V. K.; SHARMA, S.; THAKUR, N. S. Effect of temperature, salt concentration and fermentation type (inoculated vs. natural) on lactic acid fermentation behavior and quality of carrot. **Acta Alimentaria**, v. 37, n. 2, p. 205-219, 2008.

JUNIOR, S. B. **Caracterização química da fração volátil e estudo do potencial antioxidante em pimentas do gênero *Capsicum***. 2010. 163f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

KADAKAL, Ç.; POYRAZOĞLU, E.; YEMİŞ, O.; ARTIK, N. Pungent and colour compounds of red peppers. **Journal of Engineering Sciences**, v. 7, p. 359-366, 2001.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S., TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KOH, F.M.; **Physicochemical properties of pepper mash fermented in wood and plastic**. 2005. 86 f. (Master of science) - Department of Food Science, Louisiana State University, Louisiana, 2005.

KRAIKRUAN, W.; SUKPRAKARN, S.; MONGKOLPORN, O.; WASEE, S. Capsaicin and dihydrocapsaicin contents of thai chili cultivars. **Kasetsart J. Nat. Sci.**, v. 42, p. 611-616, 2008.

KYAMUHANGIRE, W.; MYHRE, H.; SØRENSEN, H. T.; PEHRSON, R. Yield, characteristics and composition of banana juice extracted by the enzymatic and mechanical methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 478-482, 2002.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food. Principles and practices**. 2nd Edition. New York: Chapman and Hall, 1998. 819 p.

LEE, S.M.; KIM, S.Y.; LEE, J.; YU, K.W.; CHANG, I.; SUH, H.J. Nonpungent *Capsicum* fermentation by *Bacillus subtilis* and the addition of rapidase. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.81, p.257–262, 2008.

LETRA, J. F.; NOJIMA, M. A.; NOGUEIRA, I. B. R.; PEREIRA, E. S. **Processamento de conservas e temperos**. São Paulo: USP-DT, 2007. 37 p. Dossiê técnico. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br/acessoDT/55>>. Acesso em: 19 jan. 2013.

LIU, L.; CHEN, X.; LIU, J.; DENG, X.; DUAN, W.; TAN, S. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum annuum* and related products by capillary electrophoresis with a mixed surfactant system. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1228–1232, 2010.

LOPES, E. V.; OKURA, M. H. Estudo de vida-de-prateleira e análise sensorial de conserva e molho de pimenta biquinho. **FAZU em Revista**, Uberaba, n.2, p.97-106, 2005.

LOURENS, K.; PELLERIN, P. **Enzymes in Winemaking**. Disponível em: <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0411enzymes.php3>>. Acesso em: 11 fevereiro 2013.

MARUVADA, R.; MCFEETERS, R.F. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic softening in low salt cucumber fermentations. **Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1108-1117, 2009.

MILLER, G. L. Use of DNS a reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.

MINAS GERAIS. **Pimenta é o tema do novo Informe Agropecuário da EPAMIG.** Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/noticias/215>>. Acesso: 11 novembro 2012.

MONTAÑO, A.; CASADO, F. J.; DE CASTRO, A.; SÁNCHEZ, A. H.; REJANO, L. Vitamin content and amino acid composition of pickled garlic processed with and without fermentation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 7324-7330, 2004.

MOURA, C. L. A.; AQUINO, A. C.; PINTO, G. A. S. Avaliação da maceração enzimática de purê de abóbora (*Cucurbita moschata*). In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul. CD-ROM.

MUGULA, J.K., NARVHUS, J.A.; SØRHAUG, T. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 307– 318, 2003.

NOVOZYMES. **Product Data Sheet.** Disponível em: <http://www.brenntag.com/en/downloads/Products/Food/Novozymes/Cellulast_1_5L.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2013.

OBLINGER, J. L; KENNEDY JR, J. E.; LANGSTON, D. M. Microflora recovered from foods on violet red bile agar with and without glucose and incubated at different temperatures. **Journal of Food protection**, v. 45, n. 10, p. 948-952, 1982.

ÖZAY, G.; BORCAKLI. Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. **Food Research International**, v. 28, n. 6, p. 553-559, 1996.

PARAMITHIOTIS, S.; HONDRODIMOU, O.L.; DROSINOS, E.H. Development of the microbial community during spontaneous cauliflower fermentation. **Food Research International**, v. 43, p. 1098–1103, 2010.

PERUCKA, I.; OLESZEK, W. Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 71, p. 287-291, 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.

PLENGVIDHYA, V.; BREIDT JR. F.; FLEMING, H. P. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. **International Journal of Food Microbiolog**, v. 93, p. 287-296, 2004.

POLL, L. The effect of pulp holding time and pectolytic enzyme treatment on the acid content in apple juice. **Food Chemistry**, v. 47, p.73-75, 1993.

PORTAL São Francisco. Pimenta. Disponível em:
<<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/pimenta/pimenta-1.php>>. Acesso em: 03 janeiro 2013.

RAHIM, R. A.; MAT, I. Phytochemical contents of *Capsicum frutescens* (Chili Padi), *Capsicum annum* (Chili Pepper) and *Capsicum annum* (Bell Peper) aqueous extracts. **International Conference on Biological and Life Sciences**, v.40, IPCBEE, IACSIT Press, Singapore, p. 164-167, 2012.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. C. Introdução e importância econômica. In: **Sistema de produção de pimentas (*Capsicum spp.*)**. Sistemas de produção 4, versão eletrônica, Embrapa hortaliças. Dezembro, 2004. Disponível em:
< <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>>. Acesso em: 09 dezembro 2012.

REILLY, C. A.; CROUCH, D. J.; YOST, G. S. Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin *Capsicum* and pepper spray products. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 3, p. 502-509, 2001.

RODRIGUES, S.; FRENANDES, F. A. N. **Advances in fruit processing technologies**. CRC Press, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington DC: ILSI Press, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008, 100 p.

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**, v. 43, p. 1295–1305, 2008.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, J. Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties and applications. **Advances en Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SAKHO, M.; CHASSAGNE, D.; JAUS, A.; CHIARAZZO, E.; CROUZET, J. Enzymatic maceration: effects on volatile componentes of mango pulp. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 6, 1998.

SANATOMBI, K.; SHARMA, G. J. Capsaicin content and pungency of different *Capsicum spp.* cultivars. **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj**, v. 36, n. 2, p. 89-90, 2008.

SÁNCHEZ, A. H.; DE CASTRO, A.; REJANO, L.; MONTAÑO, A. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation, **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 5975-5980, 2000.

SANTAMARIA, R. L.; REYES-DUARTE, M. D.; BARZANA, E.; FERNANDO, D.; GAMA, F. M.; MOTA, M., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chilli guajillo puya (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3063–3067, 2000.

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

SCHOUDHARI, S. M.; ANANTHANARAYAN, L.. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. **Food Chemistry**, v. 102, p. 77–81, 2007.

SCHWEIGGERT, U., CARLE, R.; SCHIEBER, A. Conventional and alternative processes for spice production – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 260-268, 2007.

SCHWEIGGERT, U., SCHIEBER, A; CARLE, R. Effects of blanching and storage on capsaicinoid stability and peroxidase activity of hot chili pepper (*Capsicum frutescens* L.). **Inovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 217-224, 2006.

SCOVILLE, W. L. Note on Capsicums. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 1, p. 453-454, 1912.

SERVILI, M.; MINNOCCI, A.; VENEZIANI, G.; TATICCHI, A.; URBANI, S.; ESPOSTO, S.; SEBASTIANI, L.; VALMORRI, S.; CORSETTI, A. Compositional and tissue modifications induced by the natural fermentation process in table olives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 6389–6396, 2008.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, p. 951–957, 2008.

SOBIOLOGIA. Disponível em:

<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal14.php>. Acesso em: 11 fevereiro 2013.

SUN, T.; POWERS, J. R.; TANG, J. Effect of enzymatic macerate treatment on rutin content, antioxidant activity, yield, and physical properties of asparagus juice. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 4, p. 267-271, 2007.

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.

TABASCO. **How we make original red sauce**. Disponível em:

<<http://www.tabasco.com/tabasco-products/how-its-made/making-original-tabasco-sauce/>>. Acesso em 19 jan. 2013.

TADAKITTISARN, S.; HARUTHAITHANASAN, V.; CHOMPREEEDA, P.; SUWONSICHON, T. Optimization of pectinase enzyme liquefaction of banana 'Gros Michel' for banana syrup production. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 41, p. 740-750, 2007.

TEIXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Rev. Inst. Latic. "Cândido testes"**, v. 64, n. 336, jan/fev, p. 12-21, 2009.

TOCHI, B. N.; WANG, Z.; XU, S. Y.; ZHANG, W. The influence of a pectinase and pectinase/hemicellulases enzyme preparations on percentage pineapple juice recovery particulates and sensory attributes. **Pak. J. Nutr.**, v. 8, p. 1184-1189, 2009.

TOURNAS, V.; STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B.; KOCH, H. A.; BANDLER, R. Yeasts, Molds and Mycotoxins. In: Food Drug Administration (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8rd ed. Gaithersburg: AOAC International, 2001. Chap. 18. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.html>>. Acesso em: 25 outubro 2009.

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

VALVERDE, R. M. V. **Composição bromatológica da pimenta malagueta in natura e processada em conserva**. 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2011.

VAN RUTH, S. M.; ROOZEN, J. P. Gas chromatography/sniffing port analysis and sensory evaluation of commercially dried bell peppers (*Capsicum annuum*) after rehydration. **Food Chemistry**, v. 51, p. 165-170, 1994.

de parâmetros iniciais para maceração de película comestível de cajá (*Spondias mombin* L.). XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2009, Natal. Anais... Natal. CD-ROM.

WALL, M. M.; BOSLAND, P. W. Analytical methods for color and pungency of chiles (*Capsicums*). **Developments in Food Science**, v. 39, p. 347-373, 1998.

WALL, M. M.; WADDELL, C. A.; BOSLAND, P. W. Variation in β -carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. **HortScience**, v. 36, n.4, p. 746-749, 2001.

WANG, W. D.; XU, S. Y.; JIN, M. K. Effects of different maceration enzymes on yield, clarity and anthocyanin and other polyphenol contents in blackberry juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2342-2349, 2009.

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

YAO, J.; NAIR, M. G.; CHANDRA, A. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Scotch Bonnet (*Capsicum annuum*) and Quantification of Capsaicin and Dihydrocapsaicin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1303-1305, 1994.

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

ZEWDIE, Y.; P.W. BOSLAND. Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for *Capsicum* species. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 29, p. 161-169, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A – FICHA SENSORIAL UTILIZADA PARA ESCOLHA INICIAL DOS DECRITORES DE AROMA E SABOR PARA MOLHO DE PIMENTA.

Amostra _____	
<input type="checkbox"/> Verde, gramíneo	<input type="checkbox"/> Vinagre
<input type="checkbox"/> Feijão verde fresco	<input type="checkbox"/> Manteiga
<input type="checkbox"/> Pepino	<input type="checkbox"/> Alho
<input type="checkbox"/> Rosa	<input type="checkbox"/> Pimentão
<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Peixe
<input type="checkbox"/> Frutal	<input type="checkbox"/> Chocolate
<input type="checkbox"/> Maçã (S)	<input type="checkbox"/> Caramelo
<input type="checkbox"/> Cítrico (S)	<input type="checkbox"/> Café
<input type="checkbox"/> Eucalipto	<input type="checkbox"/> Limão
<input type="checkbox"/> Óleo de cedro	<input type="checkbox"/> Cebola
<input type="checkbox"/> Irritante, pungente	Outros
<input type="checkbox"/> Doce	_____
<input type="checkbox"/> Éter	_____
<input type="checkbox"/> Madeira	_____
<input type="checkbox"/> Tempero	_____

APÊNDICE B – FICHA SENSORIAL DO TESTE DE ACEITAÇÃO DA COR E CARACTERIZAÇÃO DO AROMA E DO SABOR DOS MOLHOS DE PIMENTA.

ANÁLISE SENSORIAL DE MOLHO DE PIMENTA

Nome: _____ Data: ____/____/____ Prov: _____

Você está recebendo amostras de MOLHO DE PIMENTA, por favor, faça a ACEITAÇÃO DA COR, indicando o quanto gostou ou desgostou dela, e a caracterização descritiva do AROMA e SABOR, marcando a partir de descritores listados abaixo. ATENÇÃO: Você poderá escolher quantas opções desejar e/ou anotar no espaço em branco um novo termo.

COR

Avalie a cor de cada amostra, marcando na escala hedônica o quanto você gostou ou desgostou:

Amostra _____

- Gostei MUITÍSSIMO
 Gostei MUITO
 Gostei
 Gostei Pouco
 Nem Gostei/Nem Desgostei
 Desgostei Pouco
 Desgostei
 Desgostei Muito
 Desgostei MUITÍSSIMO

Amostra _____

- Gostei MUITÍSSIMO
 Gostei MUITO
 Gostei
 Gostei Pouco
 Nem Gostei/Nem Desgostei
 Desgostei Pouco
 Desgostei
 Desgostei Muito
 Desgostei MUITÍSSIMO

AROMA

Faça uma leve agitação com movimentos circulares, destampe a taça, sinta o cheiro da amostra e indique o tipo de aroma que você está percebendo:

Amostra _____

- | | | | | | |
|----------------------------------|---|---|-----------------------------------|---|---------------|
| <input type="checkbox"/> Verde | <input type="checkbox"/> Frutal | <input type="checkbox"/> Vinagre | <input type="checkbox"/> Pimentão | <input type="checkbox"/> Refogado | Outros: _____ |
| <input type="checkbox"/> Maçã | <input type="checkbox"/> Irritante,
pungente | <input type="checkbox"/> Vinagre de
maçã | <input type="checkbox"/> Limão | <input type="checkbox"/> Café | _____ |
| <input type="checkbox"/> Cítrico | <input type="checkbox"/> Tempero | <input type="checkbox"/> Manteiga | <input type="checkbox"/> Madeira | <input type="checkbox"/> Molho de
tomate | _____ |
| <input type="checkbox"/> Pepino | <input type="checkbox"/> Éter | <input type="checkbox"/> Alho | <input type="checkbox"/> Cebola | <input type="checkbox"/> apimentado | _____ |
| <input type="checkbox"/> Floral | | | | | |

Amostra _____

- | | | | | | |
|----------------------------------|---|---|-----------------------------------|---|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Verde | <input type="checkbox"/> Frutal | <input type="checkbox"/> Vinagre | <input type="checkbox"/> Pimentão | <input type="checkbox"/> Refogado | Outros: _____ |
| <input type="checkbox"/> Maçã | <input type="checkbox"/> Irritante,
pungente | <input type="checkbox"/> Vinagre de
maçã | <input type="checkbox"/> Limão | <input type="checkbox"/> Café | _____ |
| <input type="checkbox"/> Cítrico | <input type="checkbox"/> Tempero | <input type="checkbox"/> Manteiga | <input type="checkbox"/> Madeira | <input type="checkbox"/> Molho de
tomate | _____ |
| <input type="checkbox"/> Pepino | <input type="checkbox"/> Éter | <input type="checkbox"/> Alho | <input type="checkbox"/> Doce | <input type="checkbox"/> Cebola | <input type="checkbox"/> apimentado |
| <input type="checkbox"/> Floral | | | | | |

SABOR

Em uma fatia de pão, coloque um pouco do MOLHO, Prove a amostra e descreva do sabor da mesma. Para limpar seu paladar e eliminar a pungência tome um pouco de leite.

Amostra _____

- | | | | | |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Verde | <input type="checkbox"/> Tempero | <input type="checkbox"/> Alho | <input type="checkbox"/> Refogado | Outros: _____ |
| <input type="checkbox"/> Maçã | <input type="checkbox"/> Éter | <input type="checkbox"/> Pimentão | <input type="checkbox"/> Café | _____ |
| <input type="checkbox"/> Cítrico | <input type="checkbox"/> Vinagre | <input type="checkbox"/> Limão | <input type="checkbox"/> Molho de
tomate | _____ |
| <input type="checkbox"/> Floral | <input type="checkbox"/> Vinagre de
maçã | <input type="checkbox"/> Madeira | <input type="checkbox"/> Doce | <input type="checkbox"/> apimentado |
| <input type="checkbox"/> Frutal | <input type="checkbox"/> Manteiga | <input type="checkbox"/> Cebola | | |
| <input type="checkbox"/> Ardência | | | | |

Amostra _____

- | | | | | |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Verde | <input type="checkbox"/> Tempero | <input type="checkbox"/> Alho | <input type="checkbox"/> Refogado | Outros: _____ |
| <input type="checkbox"/> Maçã | <input type="checkbox"/> Éter | <input type="checkbox"/> Pimentão | <input type="checkbox"/> Café | _____ |
| <input type="checkbox"/> Cítrico | <input type="checkbox"/> Vinagre | <input type="checkbox"/> Limão | <input type="checkbox"/> Molho de
tomate | _____ |
| <input type="checkbox"/> Floral | <input type="checkbox"/> Vinagre de
maçã | <input type="checkbox"/> Madeira | <input type="checkbox"/> Doce | <input type="checkbox"/> apimentado |
| <input type="checkbox"/> Frutal | <input type="checkbox"/> Manteiga | <input type="checkbox"/> Cebola | | |
| <input type="checkbox"/> Ardência | | | | |

**APÊNDICE C – FICHAS DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS TESTES DE
ACEITAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE DESCRITORES PARA
O SABOR DOS MOLHOS DE PIMENTA E TESTE DE PREFERÊNCIA,
ELABORADAS NO SOFTWARE FIZZ.**

Análise do Sabor de Molho de Pimenta

Nome: TEXT _____ 1

Data: TEXT _____ 1

- Você está recebendo 02 amostra de molho de pimenta embebida no pão.
- Faça a avaliação da ACEITAÇÃO DO SABOR e Avaliação dos DESCRITORES seguindo instruções adiante.
- Entre uma prova e outra das amostras beba um pouco de leite.

Próxima página

Prove a 1ª Amostra e marque o quanto você gostou ou desgostou do SABOR dela:

001 Aceitação do Sabor

Gostei muitíssimo

Gostei muito

Gostei

Gostei pouco

Não gostei nem desgostei

Desgostei pouco

Desgostei

Desgostei muito

Desgostei muitíssimo

Comentário: TEXT _____ 2

Próxima página

Agora, avalie a INTENSIDADE de cada característica do SABOR DO MOLHO DE PIMENTA utilizando a escala correspondente.

SABOR

Molho de Tomate Picante

Fraco

Forte

Ardência/Pungência

Fraco

Forte

Próxima página

TERMINADA A AVALIAÇÃO DA 1ª AMOSTRA, TOME UM POUCO DE LEITE E PROSSIGA COM O TESTE DA MESMA FORMA QUE A ANTERIOR

Próxima página

Prove a 2ª Amostra e marque o quanto você gostou ou desgostou do SABOR dela:

002 Aceitação do Sabor

Gostei muitíssimo
 Gostei muito
 Gostei
 Gostei pouco
 Não gostei nem desgostei
 Desgostei pouco
 Desgostei
 Desgostei muito
 Desgostei muitíssimo

Comentário: _____

TEXT _____ 2

Próxima página

Agora, avalie a 2ª Amostra quanto a INTENSIDADE a característica do SABOR DO MOLHO DE PIMENTA utilizando a escala correspondente.

SABOR

Molho de Tomate Picante

Fraco Forte

Ardência/Pungência

Fraco Forte

Próxima página

Por fim, ordene as amostra em ordem CRESCENTE DE PREFERÊNCIA, adotando (1) para a MENOS preferida e (2) para a MAIS preferida.

001

002

<1> <2>

Menos Preferida	Mais Preferida

Próxima página

APÊNDICE D – FICHAS DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE DESCRITORES PARA O AROMA DOS MOLHOS DE PIMENTA, ELABORADAS NO SOFTWARE FIZZ.

Análise do Aroma de Molho de Pimenta – Escala Intensidade

Nome: TEXT _____ 1

Data: TEXT _____ 1

- Você está recebendo 02 amostra de molho de pimenta codificada.
 - Faça a avaliação dos DESCRITORES DO AROMA seguindo instruções adiante.
 - Com a amostra tampada, faça movimentos circulares, destampe-a e leve até o nariz para que você possa sentir o aroma e avaliar cada descritor.
 - Entre uma prova e outra das amostras cheire o café em pó.

Próxima página

Por favor, avalie a intensidade de cada característica do MOLHO DE PIMENTA utilizando a escala correspondente.

AROMA

Frutal 001

Fraco

Forte

Irritante

Fraco

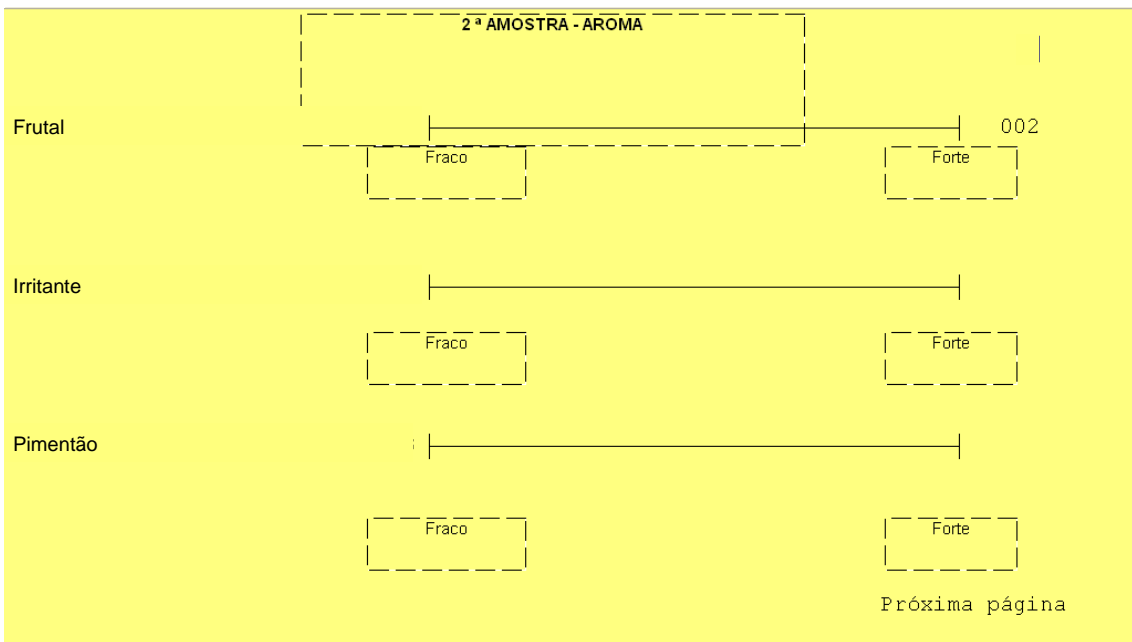
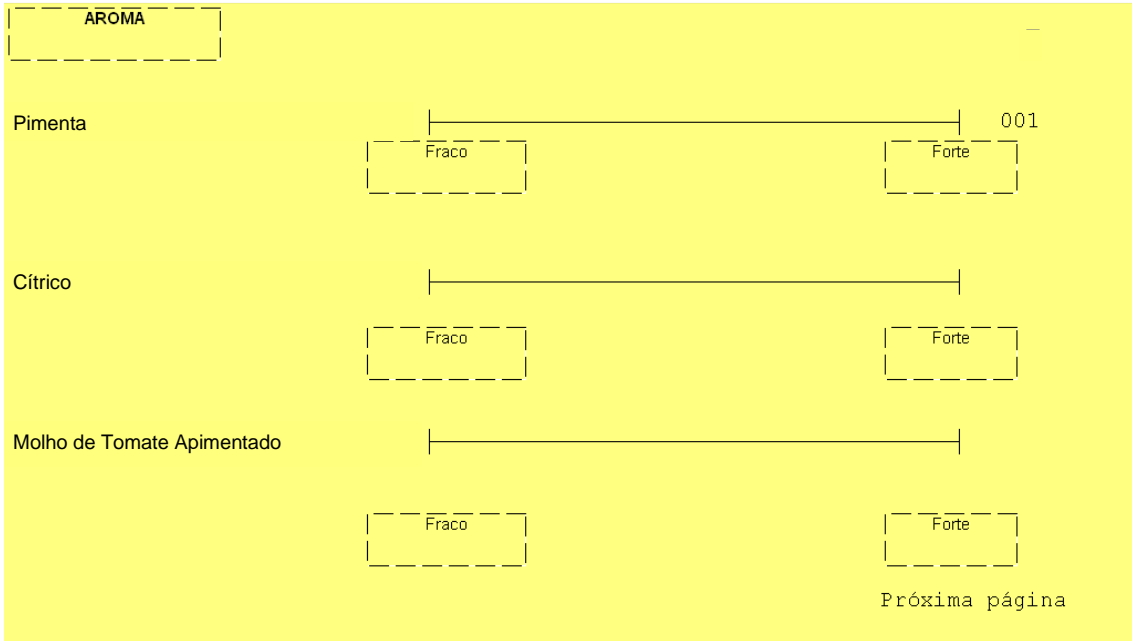
Forte

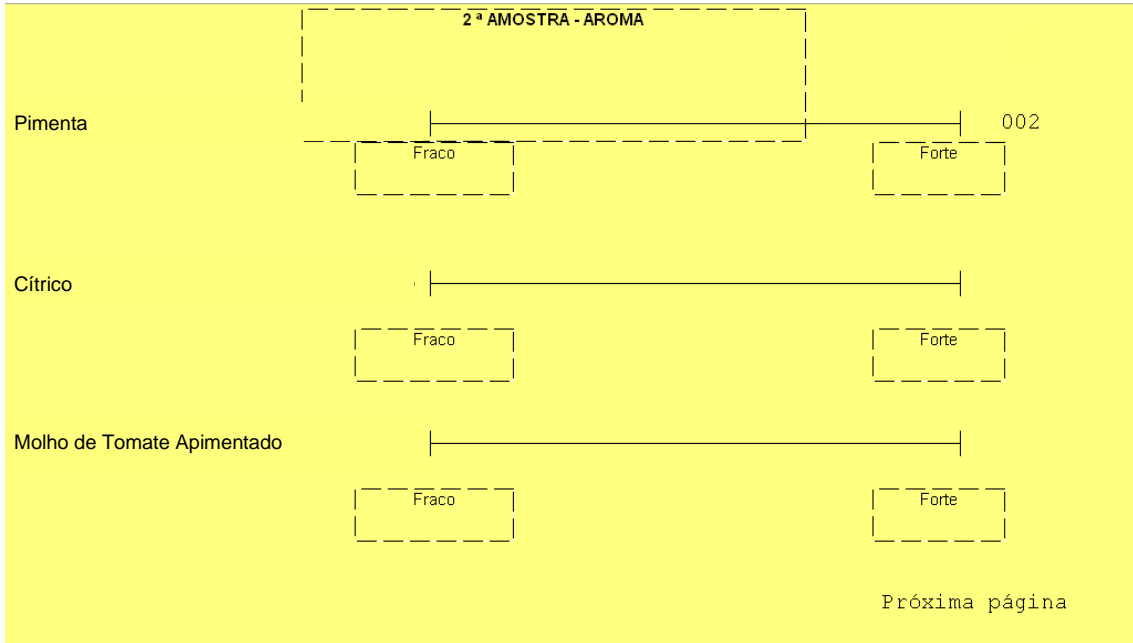
Pimentão

Fraco

Forte

Próxima página





**APÊNDICE E – CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS NAS POLPAS
DE PIMENTA, EM DENSIDADE ÓTICA (D.O.).**

Tempo (semanas)	D.O. g ⁻¹ amostra	
	Sem sal	Com sal
0	60,17 ± 1,94 ^A	59,74 ± 1,63 ^A
1	60,12 ± 1,91 ^A	56,97 ± 1,69 ^A
2	58,58 ± 4,76 ^A	60,62 ± 0,10 ^A
3	60,51 ± 0,39 ^A	56,21 ± 0,35 ^B
4	59,60 ± 1,67 ^A	58,85 ± 4,74 ^A
6	64,64 ± 0,11 ^A	59,23 ± 0,92 ^B
9	61,93 ± 1,04 ^A	58,39 ± 1,73 ^A

Médias com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) na linha pelo teste de Tukey. A ausência de letras minúsculas na coluna indica que não houve diferença estatística entre as amostras ($p > 0,05$).

APÊNDICE F – PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DAS POLPAS DE PIMENTA FERMENTADAS.

Tempo*	Capsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		Dihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		Nordihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
	Sem sal	Com sal	Sem sal	Com sal	Sem sal	Com sal
0	1122,7 \pm 16,4 ^{CA}	1011,52 \pm 8,4 ^{aA}	591,5 \pm 15,8 ^{CA}	527,0 \pm 10,7 ^{aB}	88,32 \pm 0,6 ^{aA}	78,24 \pm 0,6 ^{aB}
1	1012,4 \pm 5,1 ^{aA}	1069,7 \pm 16,3 ^{aA}	526,4 \pm 12,4 ^{abA}	552,2 \pm 7,3 ^{aA}	97,84 \pm 14,1 ^{abA}	103,50 \pm 1,1 ^{bcA}
2	1032,0 \pm 10,2 ^{aA}	1097,8 \pm 28,1 ^{aA}	532,8 \pm 0,0 ^{abB}	579,55 \pm 1,7 ^{aA}	84,66 \pm 2,3 ^{aB}	109,79 \pm 1,1 ^{CA}
3	1045,5 \pm 2,3 ^{aA}	1022,28 \pm 9,0 ^{aA}	552,3 \pm 3,4 ^{bcA}	540,97 \pm 3,4 ^{aA}	112,93 \pm 0,6 ^{ba}	93,87 \pm 0,0 ^{bdB}
4	1016,80 \pm 30,5 ^{aA}	859,7 \pm 84,9 ^{ba}	533,6 \pm 19,2 ^{abA}	448,7 \pm 39,9 ^{ba}	110,80 \pm 0,6 ^{ba}	83,47 \pm 7,8 ^{adB}
6	950,20 \pm 6,7 ^{ba}	1026,2 \pm 11,2 ^{aA}	501,6 \pm 6,2 ^{ab}	542,9 \pm 8,4 ^{aA}	104,35 \pm 1,1 ^{abA}	100,64 \pm 2,8 ^{bcA}
9	1009,9 \pm 12,9 ^{aA}	810,1 \pm 5,6 ^{ba}	533,5 \pm 5,1 ^{abA}	434,6 \pm 1,7 ^{ba}	85,79 \pm 2,8 ^{aA}	77,41 \pm 0,0 ^{aA}

*Tempo em semanas

Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) na coluna pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) na linha pelo teste de Tukey.

**APÊNDICE G – PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DAS POLPAS MACERADAS
ENZIMATICAMENTE EM DIFERENTES TEMPERATURAS E SEUS
RESPECTIVOS CONTROLES.**

Amostra	Capsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Dihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Nordihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Controle 0 h	786,97 \pm 18,45 ^a	316,56 \pm 11,42 ^a	35,82 \pm 0,87 ^a
Controle 30°C	784,80 \pm 0,47 ^a	318,53 \pm 25,86 ^a	33,04 \pm 2,97 ^a
30°C	731,02 \pm 18,52 ^a	280,93 \pm 14,21 ^a	33,78 \pm 1,27 ^a
Controle 40°C	889,33 \pm 32,65 ^a	340,24 \pm 1,96 ^a	43,74 \pm 4,53 ^a
40°C	931,89 \pm 4,08 ^a	325,97 \pm 5,97 ^a	43,07 \pm 0,88 ^a
Controle 50°C	933,09 \pm 24,10 ^a	349,75 \pm 1,91 ^a	47,48 \pm 3,40 ^a
50°C	901,86 \pm 40,79 ^a	315,67 \pm 5,19 ^a	41,92 \pm 2,19 ^a
Controle 60°C	900,78 \pm 2,21 ^a	288,94 \pm 45,29 ^a	42,84 \pm 0,25 ^a
60°C	939,74 \pm 57,44 ^a	342,10 \pm 133,62 ^a	53,02 \pm 16,90 ^a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

APÊNDICE H – CAROTENOIDES TOTAIS DAS POLPAS NÃO MACERADA COM SAL (NMCS), MACERADA COM SAL (MCS) E MACERADA SEM SAL (MSS).

Tempo (semanas)	Carotenoides ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) expressos em zeaxantina		
	NMCS	MCS	MSS
0	70,71 \pm 19,00 ^{bA}	130,68 \pm 25,28 ^{bcA}	148,69 \pm 12,49 ^{aA}
1	96,95 \pm 9,91 ^{bAB}	79,62 \pm 12,91 ^{cb}	132,95 \pm 9,69 ^{abA}
2	105,00 \pm 20,04 ^{bA}	114,40 \pm 14,87 ^{cA}	110,31 \pm 2,68 ^{abA}
3	129,03 \pm 13,58 ^{abA}	101,23 \pm 4,25 ^{cA}	105,52 \pm 9,41 ^{abA}
4	95,73 \pm 6,44 ^{bA}	101,15 \pm 14,38 ^{cA}	86,19 \pm 3,55 ^{bA}
5	194,41 \pm 4,78 ^{aAB}	214,84 \pm 24,93 ^{aA}	114,08 \pm 26,85 ^{abB}
6	96,25 \pm 35,35 ^{bA}	181,79 \pm 5,99 ^{abA}	120,80 \pm 7,52 ^{abA}

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Médias com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) na linha, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

APÊNDICE I - PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DAS POLPAS NÃO MACERADA COM SAL (NMCS), MACERADA COM SAL (MCS) E MACERADA SEM SAL (MSS).

Tempo (semanas)	Capsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			Dihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			Nordihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	NMCS	MCS	MSS	NMCS	MCS	MSS	NMCS	MCS	MSS
0	597,1 \pm 9,9 ^{aA}	514,5 \pm 25,7 ^{aA}	552,0 \pm 30,0 ^{aA}	289,3 \pm 1,6 ^{aA}	260,5 \pm 21,4 ^{aA}	330,1 \pm 65,0 ^{aA}	31,0 \pm 1,9 ^{aA}	21,1 \pm 3,2 ^{aB}	21,1 \pm 1,4 ^{aB}
1	588,0 \pm 19,5 ^{abA}	485,5 \pm 32,4 ^{cC}	564,5 \pm 0,7 ^{aAB}	279,2 \pm 11,7 ^{abA}	232,7 \pm 57,4 ^{abA}	286,0 \pm 3,3 ^{aA}	31,1 \pm 4,8 ^{aA}	17,4 \pm 2,5 ^{aA}	21,1 \pm 2,3 ^{aA}
2	513,9 \pm 3,4 ^{ca}	522,9 \pm 44,4 ^{aA}	548,0 \pm 18,2 ^{aA}	223,6 \pm 1,0 ^{bcA}	218,0 \pm 7,7 ^{abA}	272,3 \pm 2,8 ^{aA}	22,0 \pm 1,1 ^{ba}	19,0 \pm 2,2 ^{aA}	20,5 \pm 2,9 ^{aA}
3	597,4 \pm 28,3 ^{bcA}	502,7 \pm 15,8 ^{aA}	560,0 \pm 37,4 ^{aA}	284,2 \pm 2,6 ^{aAB}	219,7 \pm 14,4 ^{abB}	333,5 \pm 31,6 ^{aA}	23,3 \pm 0,6 ^{abA}	17,7 \pm 0,2 ^{aA}	27,5 \pm 5,3 ^{aA}
4	513,4 \pm 2,9 ^{cb}	516,4 \pm 1,2 ^{aB}	548,2 \pm 27,6 ^{aA}	206,0 \pm 0,0 ^{cb}	281,0 \pm 13,4 ^{aA}	264,6 \pm 11,1 ^{aA}	20,0 \pm 0,7 ^{ba}	20,1 \pm 0,3 ^{aA}	22,7 \pm 1,8 ^{aA}
5	529,6 \pm 17,7 ^{aA}	434,6 \pm 28,0 ^{abB}	574,8 \pm 20,1 ^{aA}	219,2 \pm 7,7 ^{ca}	200,0 \pm 40,7 ^{abA}	284,2 \pm 7,4 ^{aA}	21,5 \pm 0,4 ^{ba}	14,1 \pm 0,1 ^{aB}	24,1 \pm 2,6 ^{aA}
6	524,7 \pm 8,4 ^{caB}	452,4 \pm 41,9 ^{aB}	565,6 \pm 9,8 ^{aA}	243,9 \pm 36,6 ^{bcA}	132,3 \pm 22,6 ^{bb}	282,7 \pm 1,6 ^{aA}	21,4 \pm 0,7 ^{baB}	17,0 \pm 2,6 ^{aB}	24,7 \pm 0,4 ^{aA}

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

APÊNDICE J – PRINCIPAIS CAPSAICINOIDES DOS EXTRATOS DE CADA TRATAMENTO

Extrato	Capsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)		Dihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)		Nordihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)	
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2
PCF	200,4 \pm 32,6 ^{aA}	281,6 \pm 45,5 ^{aA}	96,8 \pm 28,3 ^{aA}	148,2 \pm 25,4 ^{aA}	12,2 \pm 0,6 ^{bA}	14,4 \pm 1,8 ^{aA}
PCFA	255,0 \pm 65,8 ^{aA}	219,1 \pm 43,6 ^{aA}	86,4 \pm 5,4 ^{aA}	103,6 \pm 63,4 ^{aA}	20,5 \pm 1,9 ^{aA}	12,0 \pm 2,3 ^{aA}
PACF	229,4 \pm 62,0 ^{aA}	204,7 \pm 82,4 ^{aA}	130,2 \pm 71,8 ^{aA}	94,1 \pm 56,8 ^{aA}	12,1 \pm 1,1 ^{bA}	11,2 \pm 2,7 ^{aA}
PAMCF	256,7 \pm 97,1 ^{aA}	248,1 \pm 16,7 ^{aA}	179,0 \pm 0,2 ^{aA}	114,2 \pm 23,4 ^{aA}	18,9 \pm 0,0 ^{aA}	13,2 \pm 4,5 ^{aA}

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.