

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MANUELLA MACÊDO BARBOSA

**OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES E FLAVONÓIDES A
PARTIR DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU POR
MACERAÇÃO ENZIMÁTICA**

FORTALEZA – CE

2010

MANUELLA MACÊDO BARBOSA

**OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES E FLAVONÓIDES A
PARTIR DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU POR
MACERAÇÃO ENZIMÁTICA**

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

Área de Concentração:
Processos Químicos e Bioquímicos

Orientador: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito

FORTALEZA - CE

2010

MANUELLA MACÊDO BARBOSA

**OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES E FLAVONÓIDES A
PARTIR DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU POR
MACERAÇÃO ENZIMÁTICA**

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

Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos

Aprovada em _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito (orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra (co-orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Lourdes Maria Corrêa Cabral

EMBRAPA- Rio de Janeiro

*“Buscai primeiro o Reino de Deus e todas as
outras coisas vos serão acrescentadas.”*

À minha Família

AGRADECIMENTOS

A DEUS por cada dia da minha vida e por cada oportunidade.

A JESUS por sua infinita misericórdia.

A Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e a todos os seus funcionários, pela oportunidade de realizar o mestrado em Engenharia Química e pelos ensinamentos.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo durante o período de realização do mestrado.

A Embrapa Agroindústria Tropical por me permitir realizar os experimentos em sua unidade.

Ao Orientador, Dr. Edy Sousa de Brito, e ao co-orientador, Dr. Gustavo Adolfo Saavedra, pela paciência, dedicação e conhecimentos compartilhados.

A todos os amigos dos Laboratórios de Bioprocessos e de Físico-Química pela ajuda e bons momentos.

Ao meu noivo, Adriano, por sempre acreditar na minha capacidade e estar ao meu lado.

Ao meu irmão, Rafael, pelo carinho e dedicação dispensados à minha pessoa.

À minha mãe, Ana Cláudia, a minha avó, Maria Augusta e a minha tia, Eliane, pela preocupação, apoio, dedicação e carinho.

Às professoras Luciana, Henriette e Lourdes por participarem da banca examinadora, contribuindo com seus conhecimentos.

A todos que conheço e que convivi durante todo esse período.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

01- Estrutura isoprênica dos carotenóides	18
02- Reação entre carotenóides e radicais livres	21
03- Últimas etapas da biossíntese de carotenóides	28
04- Bioconversão de carotenóides e retinil ésteres em diferentes formas ativas de vitamina A	31
05- Estrutura dos flavonóides	35
06- Etapas da biossíntese para a formação da chalcona intermediária básica C ₁₅	37
07- Estrutura da parede celular da célula vegetal	40
08- Estrutura da molécula de pectina	42
09- Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina	44
10- Fluxograma de obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju com e sem adição de complexo enzimático	50
11- Extratos ordenados com maiores intensidade de coloração amarela	61
12- Gráfico do número de prensagens versus parâmetro <i>b</i> de cor instrumental para a obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju	65
13- Teores de carotenóides em mg/l dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju	66
14- Valores dos parâmetros <i>b</i> de cor instrumental dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju	69
15- Teores de perda de massa em percentagem dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju	71
16- Teores de açúcares redutores em mg/l dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju	72
17- Teores de sólidos solúveis totais (°Brix) dos extratos obtidos a partir do	74

bagaço do pedúnculo do caju		
18-	Valores de pH dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju	76
19-	Perfil granulométrico dos extratos obtidos do bagaço do pedúnculo do caju após a extração do pigmento	78
20-	Diferentes granulometrias dos bagaços tratados com e sem enzimas	79
21-	Teores de carotenóides em mg/l dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerado por uma e duas horas	82
22-	Valores dos parâmetros <i>b</i> de cor instrumental dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas	83
23-	Valores de perda de massa em percentagem dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas	85
24-	Teores de açúcares redutores obtidos nos extratos produzidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas	86
25-	Valores de sólidos solúveis totais dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas	88
26-	Valores de pH para os extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas	89
27-	Gráfico da compressão da mola (mm) em prensa do tipo Expeller versus força (N)	109

LISTA DE TABELAS

01-	Atividade em % de alguns carotenóides pró-vitamina A	30
02-	Teores de quercetina miricetina e kaempferol em frutas frescas	39
03-	Parâmetros <i>b</i> de cor instrumental dos extratos do bagaço do pedúnculo do caju obtido em bancada	61
04-	Valores dos parâmetros <i>b</i> de cor instrumental dos extratos iniciais	63
05-	Teores de pectina, hemicelulose e celulose após a extração de pigmentos e quinta passagem pela prensa de fibra de caju com e sem tratamento enzimático	80
06-	Tabela dos valores de quercetina, miricetina, kaempferol e flavonóides totais nos extratos do bagaço do pedúnculo do caju	91
07-	Caracterização físico e química do resíduo e do sobrenadante resultante da centrifugação do EBC	94
08-	Perda de compostos de interesse ao longo da concentração a vácuo do bagaço do pedúnculo do caju	94
09-	Correlação entre a distância de compressão da mola utilizada com a força exercida sobre o sistema da prensa expeller	109

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	14
2.0 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3.0 REVISÃO DE LITERATURA ..	17
3.1 Estrutura dos carotenóides.....	17
3.2 Propriedade dos carotenóides ..	19
3.2.1 Solubilidade.....	19
3.2.2 Antioxidante ..	20
3.2.3 Cromóforo.....	21
3.2.4 Isomerização.....	22
3.2.5 Oxidação.....	23
3.2.6 pH.....	23
3.3 Função dos carotenóides.....	24
3.4 Biossíntese de carotenóides.....	26
3.5 Bioconversão em vitamina A e biodisponibilidade.....	29
3.6 Fontes de carotenóides.....	33
3.7 Flavonóides.....	34
3.8 Biossíntese de flavonóides.....	36
3.9 Atividade biológica dos flavonóides.....	37
3.10 Fontes de flavonóides.....	38
3.11 Parede celular e enzimas pectinolíticas.....	39
3.12 Obtenção de carotenóides a partir de resíduos agroindustriais.....	45
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Materiais.....	47

4.2 Avaliação da aplicação de preparação enzimática na maceração de bagaço de caju em bancada.....	47
4.2.1 Razão bagaço: água, concentração enzimática e tempo de maceração.....	47
4.2.2 Temperatura.....	48
4.3 Obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (EBC).....	48
4.3.1 Avaliação do número de extrações sucessivas.....	50
4.3.2 Tratamento enzimático.....	51
4.3.3 Extrato do bagaço do pedúnculo do caju concentrado.....	51
4.4 Procedimentos analíticos.....	52
4.4.1 Determinação da compressão da mola utilizada na prensa do tipo Expeller.....	52
4.4.2 Determinação de pH.....	52
4.4.3 Determinação de Sólidos Solúveis Totais.....	53
4.4.4 Determinação de Açúcares Redutores.....	53
4.4.5 Determinação da cor instrumental.....	54
4.4.6 Determinação do teor de carotenóides.....	55
4.4.7 Determinação dos teores de quercetina, miricetina e kaempferol.....	55
4.4.8 Caracterização da fibra de caju após prensagem	56
4.4.9 Determinação do teor de amido.....	57
4.4.10 Vitamina C	58
4.4.11 Fenóis totais	59
4.4.12 Níveis de retenção dos compostos de interesse	59
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1 Avaliação da aplicação de preparação enzimática na maceração de bagaço em bancada ..	61
5.1.1 Razão bagaço: água, concentração enzimática e tempo ..	61
5.1.2 Temperatura	63
5.2 Avaliação da obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (EBC).....	64
5.2.1 Avaliação do número de extrações sucessivas.....	64

5.2.2 Avaliação da aplicação de preparado enzimático para obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (EBC)..	65
5.2.2.1 Efeito da presença de preparado enzimático e da temperatura na obtenção de compostos carotenóides a partir do extrato do bagaço do pedúnculo do caju.....	65
5.2.2.2 Influência do tempo de maceração enzimática para a obtenção de compostos carotenóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju.....	81
5.3 Determinações analíticas.....	93
5.3.1 Caracterização físico-química do resíduo e do sobrenadante do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (EBC)..	94
5.3.2 Perdas ocasionadas por evaporação do extrato do bagaço do pedúnculo do caju.....	94
6.0 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS.....	109
Anexo A.....	109

RESUMO

Os corantes artificiais vêm preocupando a população mundial por sua natureza tóxica, em substituição a esses compostos, fontes alternativas de corantes naturais estão sendo buscadas pelos pesquisadores. O bagaço do pedúnculo do caju, subproduto da indústria de sucos, apresenta quantidade apreciável de carotenóides, compostos com poder corante e biologicamente ativo, além de apresentar teores de flavonóides, sendo uma fonte promissora de corantes naturais. Este trabalho teve como objetivo estudar a obtenção de carotenóides e flavonóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática. O bagaço de caju utilizado foi proveniente da indústria de sucos e a preparação enzimática foi a Pectinex Ultra-SPL. A pesquisa teve início com a seleção dos melhores parâmetros de proporção bagaço: água, concentração enzimática, tempo e temperatura de maceração, em escala de bancada, cujo procedimento baseou-se na determinação do parâmetro *b* de cor instrumental. Definidos esses parâmetros, os experimentos foram conduzidos em escala de planta piloto, nas quais os extratos foram obtidos por cinco ciclos de prensagem/diluições sucessivas. O extrato foi centrifugado, obtendo-se um resíduo e um sobrenadante, que foi concentrado a vácuo. Foi realizada caracterização físico-química dos extratos brutos, concentrados e do resíduo. Os resultados revelaram que as melhores condições de maceração do bagaço do caju para a obtenção de carotenóides foi a temperatura de 30°C, proporção 1:1 (bagaço: água), adição de 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico e tempo de incubação de 1 hora. Já para o teor de flavonóides, adição de preparado enzimático pectinolítico, combinado com um aumento de 10°C na temperatura, aumentaram o teor desses compostos nos extratos. A concentração do extrato resultou em perda dos teores de carotenóides, vitamina C e compostos fenólicos, gradativamente, com o aumento dos níveis de concentração.

Palavras-chaves: pectinases, resíduos agroindustriais, compostos bioativos.

ABSTRACT

The artificial colors are worrying the world's population by its toxic nature, instead of these compounds, alternative sources of natural dyes are being sought by researchers. The stalk of the cashew bagasse, a byproduct of the juice industry, has significant amount of carotenoids, compounds with coloring strength, biologically active, and present levels of flavonoids, are a promising source of natural dyes. This work aimed to study the obtention of carotenoids and flavonoids from the stem of the cashew apple pomace by enzymatic maceration. The cashew bagasse used was derived from the juice industry and preparation enzyme was Pectinex Ultra-SPL. The research began with the selection of the best parameters of proportion pomace: water, enzyme concentration, time and temperature of maceration, bench scale, whose procedure was based on the determination of the parameter b of instrumental color. Defined these parameters, the experiments were conducted at pilot plant scale, in which extracts were obtained by five cycles of pressing / dilution steps. The extract was centrifuged, yielding a supernatant and a residue, which was concentrated under vacuum. Was performed physicochemical characterization of crude extracts, concentrates and waste. The results revealed that the best conditions for maceration of crushed cashew to obtain carotenoids were 30 ° C, 1:1 (bagasse: water), adding 500 ppm of pectinolytic enzyme complex and incubation time of 1 hour . As for the content of flavonoids, addition of pectinolytic enzyme preparation, combined with an increase of 10 ° C in temperature, increased the content of these compounds in the extracts. The concentration of the extract resulted in loss of the levels of carotenoids, vitamin C and phenolic compounds gradually with increasing concentration levels.

Keywords: pectinase, agro-industrial residues, bioactive compounds.

1.0 INTRODUÇÃO

A criação de sistemas agroindustriais sustentáveis tem sido uma busca constante junto às cadeias produtivas agropecuárias. Ações estão sendo implementadas visando o desenvolvimento de tecnologias e processos que possibilitem o aproveitamento integral das matérias-primas agroindustriais. Neste aspecto, sobressaem-se as ações voltadas para o desenvolvimento de produtos diferenciados com boa agregação de valor, tornando o aproveitamento do resíduo das indústrias uma oportunidade no aumento de renda e redução nos custos de produção dos pequenos produtores. Além do apoio de institutos de pesquisa com recursos tecnológicos para a maioria dos produtos e o aprimoramento de processos, as cadeias produtivas carecem de inovações. A baixa competitividade das empresas vem sendo uma ameaça não somente para as próprias empresas, mas, também, para as cadeias produtivas dependentes dos produtos tradicionais. Um desafio, portanto, é aquele de como conseguir que as organizações criem e utilizem o conhecimento para inovar (FRANÇA *et al.*, 2008). A utilização de instrumentos e introdução de novas tecnologias, visando diminuir o desperdício das indústrias, possibilitará o surgimento e fortalecimento de novos elos nas cadeias produtivas, integrando-as e consolidando-as, além de diminuir o impacto ambiental (PAULI, 1998).

O aproveitamento integral é uma meta a ser alcançada pela indústria de beneficiamento da castanha e suco de caju (ALCÂNTARA, ALMEIDA & SILVA, 2007). Considerando que o aproveitamento do descarte das indústrias de processamento de caju pode tornar esse segmento mais competitivo e mais sustentável, as indústrias devem buscar soluções inovadoras para os problemas enfrentados em sua cadeia produtiva, agregando valor aos resíduos gerados durante beneficiamento (BARRETO *et al.*, 2007; FRANÇA *et al.*, 2008).

O bagaço, subproduto do processo de obtenção do suco de caju, representa cerca de 25 a 30% do peso do pedúnculo, sendo geralmente descartado ou utilizado para produção de pó para elaboração de ração animal (LEITE, 1994). Tal destino para o bagaço pode ser considerado pouco nobre, já que este constitui uma fonte de polifenóis e carotenóides, compostos de alto valor agregado em razão de suas propriedades funcionais e corantes (ABREU, 2001).

A manutenção da cor natural dos alimentos pode ser dificultada pelo processamento, que resulta freqüentemente em degradação de pigmentos e exige a adição de corantes. Os corantes sintéticos, embora mais baratos e mais estáveis quimicamente, enfrentam resistência por parte dos consumidores por sua natureza tóxica e preocupam os pesquisadores da área de alimentos. A substituição de corantes sintéticos por naturais também encontra obstáculos, devido ao seu alto custo e falta de fontes abundantes (BOBBIO & BOBBIO, 2001). A exploração de fontes de corantes naturais, como carotenóides em caju, assume importância na indústria de alimentos porque a cor desperta o interesse do consumidor, desempenhando papel mercadológico (BOBBIO & BOBBIO, 2001). A extração e posterior purificação dos carotenóides permitem sua utilização como corantes naturais para a fortificação da cor amarela em sucos e/ou qualquer outro alimento ao invés da utilização de corantes artificiais (CEREZAL & PIÑERA, 1996).

Os alimentos não são apenas para nutrir, mas oferecerem também compostos ou elementos biologicamente ativos, que proporcionam benefícios adicionais à saúde (GOMES, 2007). Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais têm sido desenvolvidas em diferentes centros de estudos devido à sua importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal (BROIZONI *et al.*, 2007). Entre os compostos bioativos estão os carotenóides, que além de serem corantes naturais dos alimentos, possuem também atividade biológica. Além da atividade pró-vitáminica A de alguns carotenóides, outros efeitos benéficos à saúde humana têm sido atribuído a estes compostos, pró-vitamínicos ou não, tais como: aumento da resposta imune e redução do risco de doenças degenerativas como o câncer, degeneração macular, catarata e doenças cardiovasculares (GAZIANO, 1993; KRINSKY, 1993; MAYNKEE, 1996; ASTROG, 1997; GESTER, 1997).

A proteção contra tais doenças, oferecida pelos carotenóides é associada especialmente à sua ação antioxidante, pela capacidade de seqüestrar o oxigênio singleto e reagir com radicais livres. Todavia, outros mecanismos são também conhecidos: a modulação do metabolismo carcinógeno, inibição da proliferação celular, incremento da diferenciação celular, estímulo da comunicação célula-célula e a filtração da luz azul (SENTANI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

2.0 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da aplicação de complexo enzimático pectinolítico na extração de carotenóides e flavonóides de bagaço de pedúnculo de caju.

2.2 ESPECÍFICOS

- i) Selecionar as melhores condições de maceração em escala laboratorial;
- ii) Avaliar o efeito do preparado enzimático sobre composição química do extrato do bagaço do pedúnculo do caju;
- iii) Avaliar o potencial na obtenção de carotenóides e flavonóides da preparação enzimática pectinolítica nas temperaturas de 30 e 40°C, aplicada ao bagaço do pedúnculo do caju;
- iv) Selecionar a melhor temperatura, tempo e concentração enzimática na maceração do bagaço de caju;
- v) Estudar a evolução dos compostos carotenóides e flavonóides ao longo de cada prensagem;
- vi) Verificar a diferença do rendimento em carotenóides entre os extratos macerados com água e os obtidos com complexo enzimático pectinolítico;
- vii) Avaliar os efeitos da concentração por evaporação sobre a composição dos extratos do bagaço do pedúnculo do caju.

3.0 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura dos carotenóides

Os carotenóides são notáveis por possuírem ampla distribuição na natureza, estruturas químicas diversas e funções variadas. Embora seja micronutrientes, presentes em níveis muito baixos (microgramas por grama), os carotenóides estão entre os constituintes alimentícios mais importantes. São pigmentos naturais responsáveis pelas cores de amarelo a laranja ou vermelho de muitas frutas, hortaliças, gema do ovo, crustáceos cozidos e alguns peixes. São também substâncias bioativas, com efeitos benéficos à saúde e alguns deles apresentam atividade pró-vitáminica A (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008).

Os carotenóides têm a estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com ordem invertida no centro (BOBBIO & BOBBIO, 2001). Os grupos metila centrais estão separados por seis carbonos, ao passo que os demais, por cinco. A característica de maior destaque nestas moléculas é um sistema extenso de duplas ligações conjugadas, responsáveis por suas propriedades e funções tão especiais. Este é o sistema cromóforo, que confere aos carotenóides suas cores atraentes (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008) (figura 1).

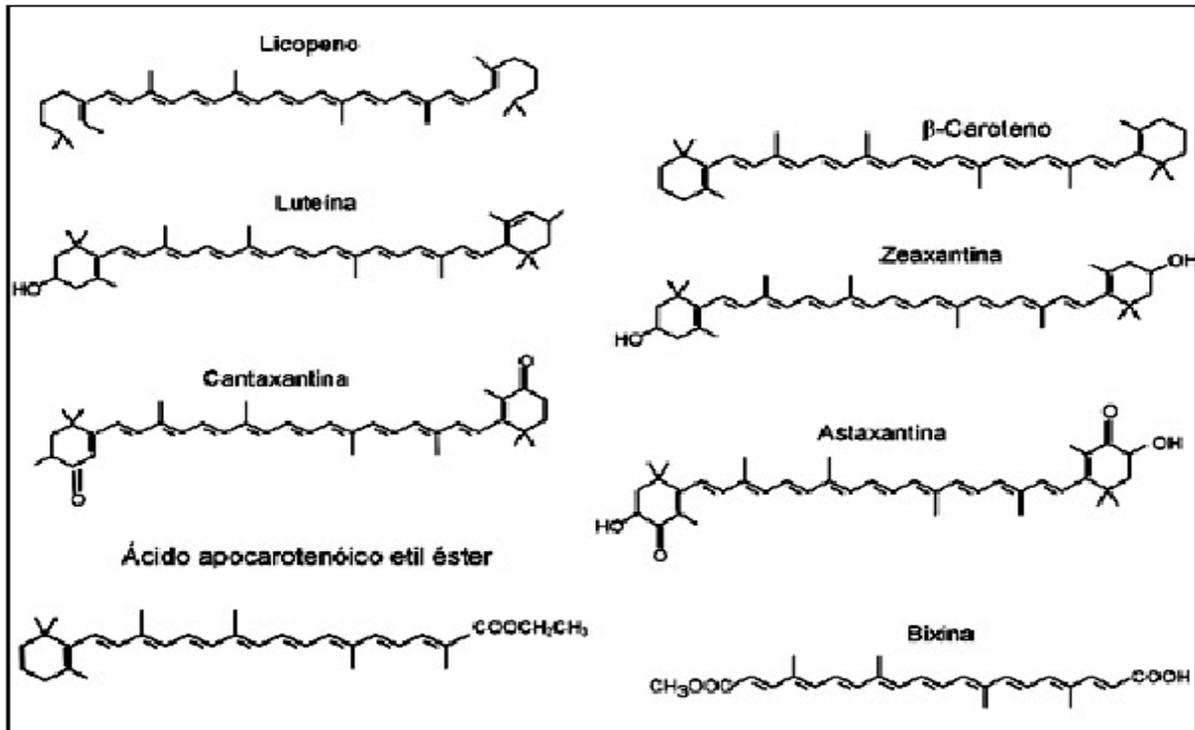


Figura 1- Estrutura isoprênica dos carotenóides.
(FONTE: BOBBIO E BOBBIO, 2001).

O esqueleto básico desta família de moléculas pode ser modificado de muitas maneiras, as quais incluem ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de grupos contendo oxigênio, rearranjos, encurtamento de cadeias ou combinações dessas modificações, resultando numa imensa variedade de estruturas (KULL & PFANDER, 1995; BOBBIO & BOBBIO, 2001). Existem, aproximadamente, 600 carotenóides encontrados na natureza, os quais são constituídos por dois grandes grupos, denominados: (1) carotenos, que são consistem em hidrocarbonetos puros; e (2) xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados (HAEGELLE *et al.* 2000; MALDONADE, 2003). Estes dois grupos principais podem ser subdivididos estruturalmente em sete subgrupos:

1. Hidrocarbonetos – São carotenóides que apresentam em sua estrutura somente átomos de carbono e hidrogênio. Este grupo é representado pelos carotenos (α , β , γ e ζ) e pelo licopeno. Ao lado destes, encontram-se na natureza derivados super-hidrogenados (com até 76 átomos de hidrogênio), incolores, denominados fitoenos e fitofluenos.
2. Alcoóis – São carotenóides que possuem um grupo hidroxila (OH^-) ligado aos anéis iononas da cadeia. Abrangem as verdadeiras xantofilas, como a criptoxantina (3-hidroxi- β -caroteno), encontrado em frutos e no milho amarelo; a zeaxantina (3,3'-diidroxi- β -caroteno),

também chamada luteína, que se encontra nas folhas verdes, nas flores, nos frutos, no corpo lúteo e na gema do ovo.

3. Cetonas – São carotenóides que possuem grupos carbonilas ligados aos anéis iononas. São exemplos: a equinenona (4-ceto- β -caroteno), encontrada em invertebrados marinhos; a cantaxantina (4,4-diceto- β -caroteno), presente em cogumelos; a astacina (3,3',4,4'-tetraceto- β -caroteno) responsável pela cor da carcaça de crustáceos.
4. Epóxidos – São carotenóides que apresentam oxigênio entre carbonos, formando ciclos. Pertence a este grupo a flavoxantina (5,6,5,6'-di-epoxi-zeaxantina).
5. Éteres – São carotenóides que apresentam oxigênio entre carbonos. Exemplo: a espiriloxantina (dimetoxil-licopeno).
6. Ácidos – São carotenóides que possuem grupos carboxila ligados na extremidade da cadeia carbônica, pois não possuem anéis ionona. Cognominaram-se ácidos carotênicos, cujo exemplo principal é a crocetina, pigmento do açafrão. Trata-se, todavia, de derivado diterpênico; tem 20 átomos de carbono formando cadeia poli-insaturada, tetrametilada e dicarbolxílica.
7. Ésteres – São carotenóides que apresentam o grupo carboxil entre carbonos. Englobam: a) ésteres de ácido carotênico, como a bixina, pigmento vermelho do urucum; a crocina, diéster da crocetina com duas unidades de gentiobiose; b) ésteres das xantofilas com ácidos graxos comuns (VILLELA *et al.*, 1976).

3.2 Propriedade dos Carotenóides

3.2.1 Solubilidade

Os carotenóides são moléculas lipossolúveis e, portanto, solúveis em solventes orgânicos clássicos, como o éter de petróleo, metanol, sulfeto de carbono e acetona. São insolúveis na água, exceto quando formando complexos com proteínas (carotenoproteínas). Os carotenóides aparecem dissolvidos nos lipídios e, em alguns casos, formando soluções coloidais (WILEY & SONS, 1960; VILLELA, 1976).

3.2.2 Antioxidantes

Os carotenóides possuem propriedades antioxidantes, sendo conhecidos por reagirem com o oxigênio singlete, que constitui uma forma altamente reativa do oxigênio molecular, o qual apresenta dois elétrons de spins opostos ocupando orbitais diferentes ou não. Os carotenóides protegem as células de danos oxidativos provocados por radicais livres (são átomos ou moléculas altamente reativos, contendo um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais externos, que formam um campo magnético e atraem qualquer composto situado próximo à sua órbita externa) e por espécies reativas de oxigênio (EROs) (constituem moléculas não radicalares derivadas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (SHAMI & MOREIRA, 2004). Os carotenóides desempenham um papel importante na prevenção de doenças associadas aos processos de estresse oxidativo como câncer, a catarata, arteriosclerose e retardo do processo de envelhecimento (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

A proteção antioxidante é fornecida pelos carotenóides acíclicos, que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas; por exemplo, o licopeno é mais eficaz que o β -caroteno, pois o licopeno possui onze duplas ligações conjugadas e cadeia acíclica, enquanto o β -caroteno possui nove duplas ligações conjugadas e cadeia cíclica nas extremidades (DI MASCIO, KAISER & SIES, 1989; MCBRIDE, 1996). Esses carotenóides são capazes de seqüestrar espécies reativas de oxigênio, como o radical peroxil (ROO^\bullet) e o oxigênio singlete (1O_2) (FOOTE, CHANG E DENNY, 1970), estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância. Os carotenóides são, por conseguinte, capazes de retirar do meio espécies altamente reativas (BURTON & INGOLD, 1984). A ordem crescente de capacidade para seqüestrar o oxigênio singlete por parte dos carotenos e xantofilas é: licopeno, astaxantina ou cantaxantina, β -caroteno ou bixina, luteína e crocina (FONTANA *et al.*, 2000).

Por serem apolares, os carotenóides ficam mergulhados nas membranas seqüestrando radicais gerados neste ambiente (TRUSCOTT, 1996).

Os carotenóides ao combaterem as espécies reativas do oxigênio, podem interagir de três maneiras diferentes: transferência de elétrons; remoção de íons de hidrogênio ou remoção de espécies radicalares, respectivamente, reações 1, 2 e 3 da figura 02:



Figura 02 – Reação entre carotenóides e radicais livres.

Legenda: ROO[•]: radical; CAR.: carotenóides

(FONTE: YOUNG & LOWE, 2001)

POOL-ZOBEL *et al.* (1997), conduzido um estudo experimental com seres humanos, não-fumantes, com idade entre 27 e 40 anos, observaram que frutas, legumes e verduras, como espinafre, cenoura, tomate, possuem um efeito protetor contra o câncer, exercido pelos carotenóides, por meio da redução de lesões do DNA, identificadas tanto pela redução da oxidação das bases pirimídicas do DNA, quanto pelo menor número de quebras da fita do DNA linfócito. Esse efeito também pode ser evidenciado por PORRINI & RISO (2000), por meio da suplementação com purê de tomate. Entre as décadas de 80 e 90, numerosos estudos retrospectivos (caso-controle) e prospectivos (coorte) realizado em vários países mostraram consistentemente uma forte associação inversa entre o consumo alimentar de β-caroteno, ou a sua concentração plasmática, e a incidência de câncer, particularmente, câncer de pulmão (ZEIGLER, 1991; BLOCK *et al.*, 1992; VAN POPPEL & GOLDBOHM, 1995). Essa reação inversa também foi observada com a incidência de doenças cardiovasculares (GAZIANO, 1993; MANSON *et al.*, 1993; KOHLMEIER & HASTING, 1995).

3.2.3 Cromóforo

Para que haja a produção de cor, um carotenóide precisa ter pelo menos, sete duplas ligações conjugadas. O fitoeno e o fitoflueno possuem, respectivamente, três e cinco duplas ligações conjugadas, por isso são considerados carotenóides incolores. Nos

carotenóides, a cor pode variar do incolor até o vermelho (FRANCIS, 1986). Os carotenóides incolores absorvem na região ultravioleta, abaixo de 350 nm a 400 nm (VILLELA, 1976).

A mudança de cor dos carotenóides ocorre à medida que o número de duplas ligações aumenta, pois há um deslocamento no espectro de absorção da molécula (FRANCIS, 1986), ou seja, a capacidade de absorver a luz visível depende da estrutura da molécula (VILLELA, 1976). Os comprimentos de onda máximos de absorção variam na faixa de 410 a 510 nm (FONTANA *et al.*, 2000).

3.2.4 Isomerização

Os isômeros cis são menos estáveis termicamente do que as formas trans. A maior parte dos carotenóides, portanto, ocorrem na natureza predominantemente e completamente na forma todo-trans (BRITTON, 1995).

Agentes como calor, ácidos, luz, oxigênio e enzimas, como lipoxigenases, provocam a alteração nos carotenóides, resultando em formação de isômeros cis, epóxidos, diminuição da cor, perda de atividade pró-vitamina A e quebra da cadeia com formação de apocarotenóides (carotenóides com menos de 40 átomos de carbono) (COSTA, ORTEGA-FLORES & PENTEADO, 2002; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, VACARIO & HEREDIA, 2004^a).

Os trans carotenos podem converter-se em cis carotenos pelo processamento de alimentos, tais como: cocção, desidratação e trituração (RODRIGUEZ-AMAYA E AMAYA FARFAN, 1992).

O isômero cis é mais polar, portanto menos solúvel em óleos e solventes hidrocarbonados, e também se cristaliza menos. No alimento, o isômero cis aumenta com o processamento térmico, mas ao ser consumido, na dieta, o intestino converte a forma cis para a forma todo-trans, sendo mais absorvida (ROCK *et al.*, 1998).

O isômero cis tem menor atividade pró-vitáminica A que a forma trans, sendo, portanto, muito importante evitar a formação do isômero cis durante o processamento de

alimentos ricos em carotenóides (MELÉNDEZ-MARTINEZ, VACARIO & HEREDIA, 2004^a).

3.2.5 Oxidação

A oxidação é a principal causa da degradação dos carotenóides em alimentos. Estes compostos são facilmente oxidados em função do grande número de duplas ligações conjugadas. No tecido intacto, os pigmentos estão protegidos da oxidação; entretanto, danos físicos aos tecidos ou a sua extração aumentam a sua suscetibilidade à oxidação. Os carotenóides podem sofrer oxidação na presença de luz, calor e compostos pró-oxidantes. Em função de sua estrutura insaturada e conjugada, os produtos de sua degradação são muito complexos. Uma autooxidação intensa irá resultar na quebra dos pigmentos e descoloração (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, VACARIO & HEREDIA, 2004^b).

A principal causa de perda dos carotenóides durante a análise é a degradação oxidativa. A oxidação natural de carotenóides depende da sua estrutura, sendo os mais facilmente oxidáveis o ζ -caroteno, luteína e violaxantina. Ao final da oxidação ocorre a perda total da cor e da atividade biológica, pois podem ser formados apocarotenóides; por exemplo, na degradação do β -caroteno são formados β -apo-10'-carotenal e β -apo-8'-carotenal (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

3.2.6 pH

Os carotenóides são estáveis na faixa de pH da maioria dos alimentos (pH de 3,0 a 7,0) (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

No entanto, alguns carotenóides não são relativamente resistentes a alguns valores extremos de pH (ácidos e alcalis), podendo sofrer isomerização cis/trans de certas duplas

ligações. Isto ocorre principalmente na manipulação em laboratórios com fins analíticos. Por exemplo, algumas xantofilas são instáveis em meio alcalino e os epóxi-carotenóides são instáveis em meio ácido (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, VACARIO & HEREDIA, 2004^b).

3.3 Funções dos Carotenóides

Nas indústrias de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corantes, com o objetivo de repor a cor perdida durante o processamento e armazenagem, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Mais recentemente, com o crescente interesse pela saúde, os carotenóides também têm sido adicionados aos alimentos devido às suas atividades biológicas, a fim de enriquecer o produto alimentar (MALDONADE, 2003). A presença de pequenas quantidades de carotenóides pode ajudar na prevenção da rápida oxidação dos constituintes dos alimentos sequestrando o oxigênio singleto (SCHROEDER & JOHNSON, 1995).

Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais têm sido desenvolvidas em diferentes centros de estudos, devido à sua importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal. Os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos, impedindo a formação de radicais livres (HALLIWELL, 1995).

Os carotenóides parecem desempenhar alguns papéis fundamentais na saúde humana, sendo essenciais para a visão devido à sua atividade de pró-vitamina A. O β -caroteno, α -caroteno e a β -criptoxantina, são pró-vitaminas A. Basicamente, a estrutura da pró-vitamina A (retinol) é a metade da molécula do β -caroteno, com uma molécula de água adicionada ao final da cadeia poliênica. Conseqüentemente, o β -caroteno é o carotenóide de maior potência vitamínica A e ao qual se atribui 100% de atividade. A exigência mínima para um carotenóide possuir atividades vitamínica A é ter um anel β substituído, com uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Assim, o α -caroteno e a α -criptoxantina, têm cerca de 50 % da atividade do β -caroteno, ao passo que a luteína, zeaxantina e licopeno não possuem atividade (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008).

Apesar de muitas hipóteses comprovadas, suas funções não estão completamente elucidadas *in vivo*, recentemente, efeitos benéficos de carotenóides contra cânceres, doenças de coração e degeneração macular foram reconhecidos e estimularam intensas investigações sobre o papel destes compostos como antioxidantes e como reguladores da resposta imune (GAZIANO, 1993; KRINSKY, 1993; ASTORG, 1997; OLSON, 1999; DELGADO - VARGAS *et al.* 2000;). Tais atividades fisiológicas não possuem relação com a atividade vitamínica A e têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes, especificamente, à sua capacidade de seqüestrar o oxigênio singlete e interagir com os radicais livres (PALOZZA & KRINSKY, 1992).

Entretanto, outros mecanismos de ação dos carotenóides contra as doenças crônicas foram relatados, tais como a modulação do metabolismo de substâncias cancerígenas, inibição da proliferação celular, realce da diferenciação celular, estimulação da comunicação intercelular e filtragem da luz azul (ASTORG, 1997; OLSON, 1999; STAHL, ALE-AGHA & POLIDORI, 2002).

Os carotenóides mais pesquisados por seu envolvimento na saúde humana são o β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina. Além de serem os principais carotenóides no sangue humano (EPLER, ZEIGLER & CRAFT, 1993), são também, com exceção da zeaxantina, os mais comumente encontrados nos alimentos, sendo o β -caroteno o mais largamente distribuído (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993).

Devido à grande ênfase dada à atividade antioxidante como modo de ação contra doenças, a capacidade antioxidante dos alimentos tem sido largamente determinada *in vitro*, por vezes correlacionada às concentrações das substâncias bioativas nos alimentos, de forma a prever o seu efeito na saúde humana. Os antioxidantes, entretanto, possuem diversos modos de ação, e os métodos que determinam a atividade antioxidante medem diferentes ações e são determinados sob diferentes condições (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA E AMAYA-FARFAN, 2008). CAVALCANTE *et al.* (2003) estudaram a atividade antioxidante de compostos fenólicos, carotenos e vitamina C, presentes em suco de caju e cajuína, pelo teste de varredura do radical DPPH, pela sua capacidade de doar hidrogênio, constatando que, tanto o suco de caju, quanto à cajuína apresentaram boa atividade antioxidante, devido à ação combinada desses compostos. BROINIZI *et al.* (2007) estudaram a atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto do caju, em sistema β -caroteno/ácido linoléico e pelo teste de varredura do radical livre, e observaram que

as frações de ácidos fenólicos, exibiram expressiva atividade antioxidante, superior aos extratos do bagaço do pedúnculo do caju estudados no sistema β -caroteno e DPPH. Entretanto, no teste de Rancimet realizado, os extratos aquosos e alcoólicos do bagaço do pedúnculo do caju apresentaram maior proteção á oxidação em relação às frações e ao BHT. BARRETO *et al.* (2007) determinara a atividade anti-radical livre de derivados do bagaço do pedúnculo do caju e observaram que o extrato resultante do bagaço retentado apresentou um nível superior de atividade anti-radical livre em relação ao extrato concentrado.

Devido à alta taxa de insaturação, fatores tais como o calor, luz e ácidos ocasionam a isomerização dos carotenóides trans, que é a forma mais estável na natureza, para a forma cis, promovendo ligeira perda na cor e na atividade pró-vitamínica. São também susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, reação esta que depende da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, prooxidantes e antioxidantes, alta temperatura, exposição à luz (MALDONADE, 2003). Há tempos se atribui atividade vitamínica mais baixa às pró-vitaminas A na forma cis, em relação aos isômeros trans (ZECHMEISTER, 1962). Recentemente, foi relatado que o trans- β -caroteno é preferencialmente absorvido em humanos (GAZIANO *et al.*, 1995; STAHL, 1995; BEN-AMOTZ & LEVY, 1996).

3.4 Biossíntese de carotenóides

Os carotenóides são sintetizados somente pelas plantas e por microrganismos, sendo as plantas as maiores fontes de carotenóides, os quais são responsáveis por conferir as cores características das frutas, como morango, laranja, maracujá e caju (BOBBIO E BOBBIO, 2001).

Os carotenóides acumulam-se em cloroplastos de todas as plantas verdes como uma mistura de α e β carotenos, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina, estando complexadas não-covalentemente com proteínas. Os carotenóides também se encontram em microrganismos, nos quais são sintetizados pela rota metabólica dos isoprenóides (MALDONADO-ROBLEDO *et al.*, 2003).

A biossíntese dos carotenos inicia-se com um precursor primário, representado pelo acetato, que segue o processo da biogênese de esteróis até as unidades isoprenóides ativas: isopentenil-pirofosfato (C₅), geranyl pirofosfato (C₁₀) e farnesil pirofosfato (C₁₅), a partir daí, diversificam-se os carotenos produzidos (VILLELA *et al.*, 1976). A primeira etapa da biossíntese do carotenóide envolve a formação de geranylgeranyl pirofosfato e a sua conversão em fitoeno, através da ação da enzima fitoeno esterase. Esse primeiro caroteno não apresenta coloração. Através de uma série de desidrogenações, outros carotenos são formados (MALDONADE, 2003). As últimas etapas do caminho biossintético dos carotenóides, destacando a formação dos principais carotenóides em alimentos são apresentados na figura 03.

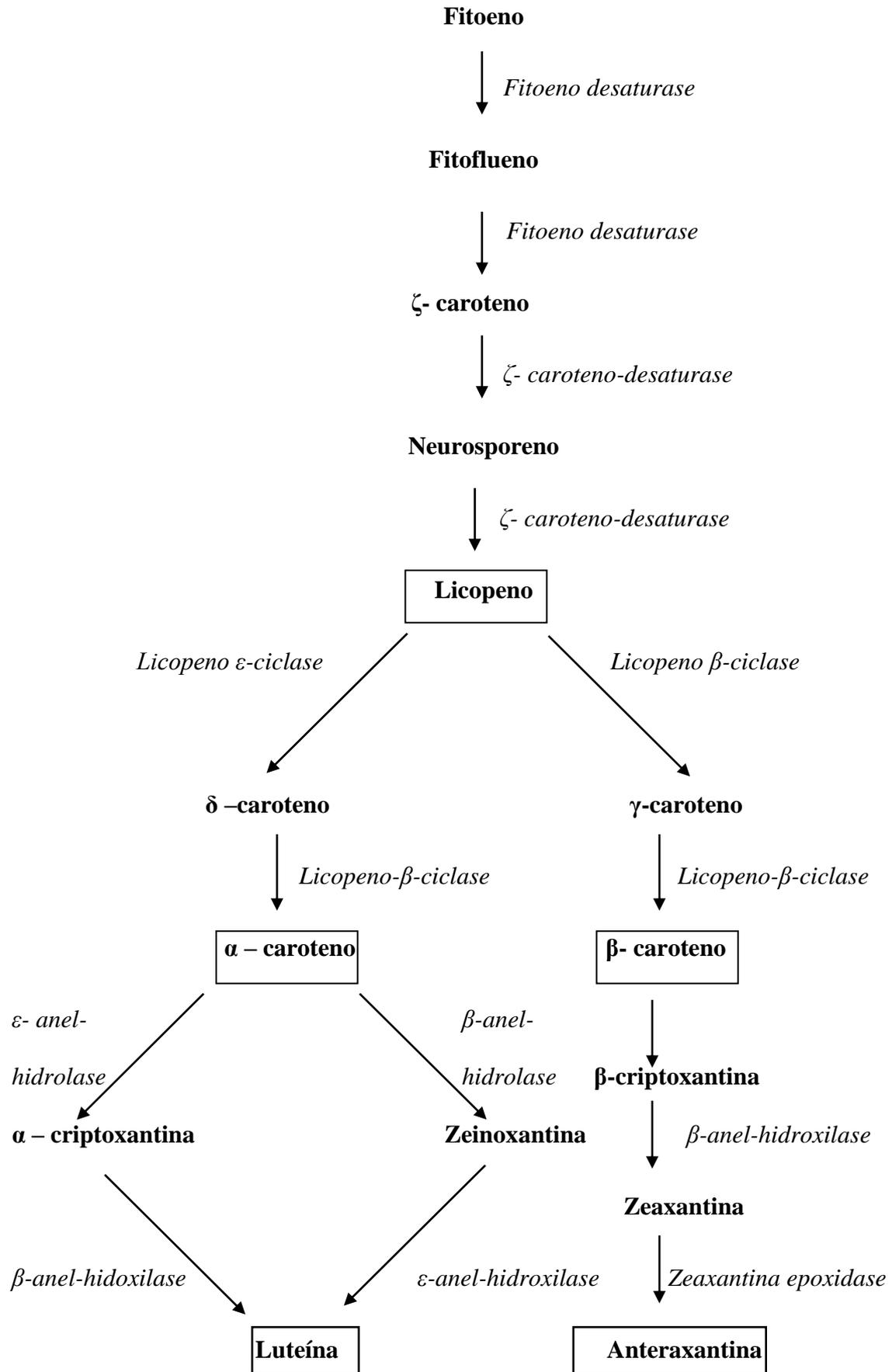


Figura 03 – Últimas etapas da biossíntese de carotenóides. Os carotenóides principais em alimentos encontram-se destacados.

(FONTE: RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008).

A estrutura α e β -caroteno são ciclizadas nas duas extremidades da cadeia e diferem apenas em uma posição de uma dupla ligação do anel, enquanto o γ -caroteno é ciclizado em apenas numa extremidade da cadeia (WEIL, 2000).

3.5 Bioconversão em vitamina A e biodisponibilidade

Os alimentos de fonte vegetal são fontes indiretas de vitamina A, pois contêm carotenóides pró-vitamina A (α , β e γ -caroteno) que são consumidos através de frutos e vegetais, como goiaba, nectarina, cenoura, couve e pimentões; são convertidos em vitamina A no organismo humano. Além de alimentos de origem vegetal, alguns alimentos de origem animal são fontes diretas de vitamina A, como por exemplo, o fígado, a carne bovina, peixe, manteiga, leite, óleo de fígado de bacalhau (SACKHEIM & LEHMAN, 2001).

A vitamina A é importante para o crescimento, desenvolvimento, manutenção dos tecidos epiteliais, reprodução, sistema imunológico e, em especial, para o funcionamento do ciclo visual na regeneração de fotorreceptores (OLSON, 1999).

A vitamina A é um sólido amarelo claro, que contém em sua estrutura um anel β -ionona; possui um sistema de cinco duplas ligações conjugadas que confere propriedades espectrais (próximo de 325 nm) usadas para sua determinação, identificação e qualificação (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, VACARIO & HEREDIA 2004^a).

Quimicamente, é classificada como um álcool de alta massa molecular, lipossolúvel, conhecida como retinol, uma estrutura totalmente trans (“todo-trans-retinol”) (SACKHEIM & LEHMAN, 2001).

Dos mais de 600 carotenóides conhecidos, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A. Os carotenóides precursores possuem pelo menos um anel β -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos. Entre os carotenóides, o β -caroteno é o mais abundante em alimentos e o que apresenta maior

atividade de vitamina A (tabela 01). Tanto os carotenóides precursores de vitamina A, como os não precursores, como a lutína, a zeaxantina e o licopeno, parecem apresentar função protetora contra o câncer (KIM *et al.*, 2001).

Tabela 01 – Atividade em % de alguns carotenóides pró-vitamina A.

Carotenóides	Atividade %
β – caroteno	100
α – caroteno	50-54
γ – caroteno	42-50
3,4-deshidroxi- β -caroteno	75
β – caroteno-5,6-epóxido	21
α - caroteno-5,6-epóxido	25
3-oxo- β – caroteno	52
3- hidroxí- β – caroteno (criptoxantina)	50-60
4- hidroxí- β – caroteno	48
β – 2' - apo- carotenal	Ativo
β – 8' - apo- carotenal	72
Licopeno	Inativo
Luteína	Inativa
3,3'-dihidroxi- β – caroteno (zeaxantina)	Inativo

(FONTE: SAUNDERS, RAMALHO & ACCIOLLY, 2000).

O β – caroteno é convertido a retinol através da ação da 15-15'- β -caroteno dioxigenase. A enzima citossólica requer um detergente e oxigênio molecular, necessita de grupos sulfidrilas livres , contém provavelmente ferro ou cobre e apresenta pH ótimo = 7,5 – 8,5 (OLSON, 1999).

A clivagem enzimática dos carotenóides ocorre principalmente na mucosa intestinal, embora a enzima possa atuar em outros tecidos, como fígado, e ao que se sabe, a atividade enzimática na mucosa intestinal depende do nível de proteína da dieta (GRONOWSKA-SENGER & WOLF, 1970).

Em vertebrados, a clivagem simétrica central versus assimétrica do β - caroteno na biossíntese de vitamina A e seus derivados é um assunto que tem gerado controvérsias. Em

um estudo, KIEFER *et al.* (2001) identificaram e caracterizaram a catálise oxidativa assimétrica da pró-vitamina a de uma enzima, constatando que em invertebrados existem tanto clivagem simétrica como assimétrica dos carotenos, revelando a grande complexidade do metabolismo dos carotenóides.

A clivagem central divide o β – caroteno na dupla ligação central (15-15') e o produto resultante é o retinal, que pode ser convertido de forma reversível a retinol (vitamina A) e irreversível á ácido retinóico. Na clivagem assimétrica, são formados β - apocarotenais, que podem ser convertidos a retinal (KIEFER *et al.* 2001).

No organismo, o retinol, o retinal e o ácido retinóico são formas ativas da vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

O retinol (vitamina A) é convertido a retinal por ação da enzima retinol dioxigenase e o retinal pode ser convertido em ácido retinóico ou retinol pelas enzimas retinal oxigenase e retinol dioxigenase, respectivamente. O ácido retinóico sofre apenas degradação oxidativa, ou seja, não sofre conversão (BRODY, 1994).

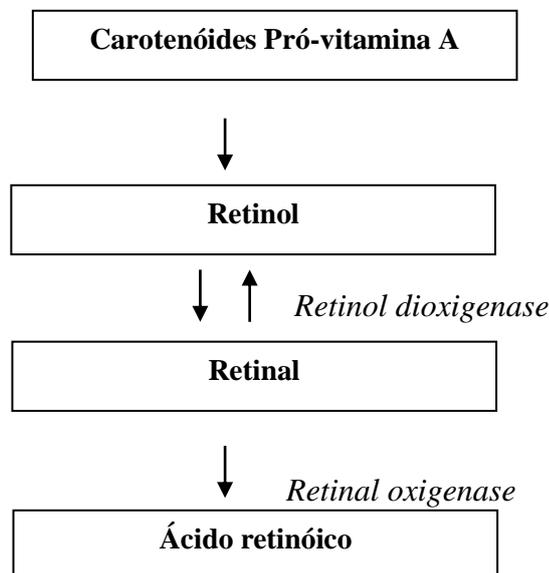


Figura 04 – Bioconversão de carotenóides e retinil ésteres em diferentes formas ativas de vitamina A (FONTE: BRODY, 1994).

Pesquisas sugerem que os atuais fatores de conversão da vitamina A são atividade equivalente de retinol (RAE), no qual 1 μ g RAE = unidades comumente utilizadas; 1 RE de

retinol (vitamina A); 1 µg de retinol (vitamina A); 2 µg de β-caroteno em óleo; 12 µg de β-caroteno em mistura de alimentos; 24 µg de outros carotenóides (precursores de vitamina A) em mistura de alimentos (NAS E NCR).

A biodisponibilidade se define como a fração de um determinado nutriente, no caso, carotenóides, que pode ser aproveitado pelo organismo (AMBRÓSIO, SIQUEIRA & CAMPOS, 2006).

Ao mencionar a biodisponibilidade de carotenóides, outros dois termos importantes são amplamente utilizados na literatura: bioconversão e bioeficácia. Bioconversão é a proporção biodisponível de carotenóides convertidos a retinol, enquanto bioeficácia é a eficiência com a qual os carotenóides ingeridos são absorvidos e convertidos em retinol. Não raramente, os três termos se confundem e, muitas vezes, o termo biodisponibilidade envolve tanto a bioconversão como a bioeficiência (AMBRÓSIO, SIQUEIRA & CAMPOS, 2006).

As informações científicas acerca da biodisponibilidade de carotenóides baseiam-se, principalmente, na determinação dos níveis séricos, plasmáticos ou das frações lipoprotéicas após a ingestão desses. Outros métodos da determinação da biodisponibilidade dos carotenóides também são utilizados, como métodos de balanço, pelo qual o conteúdo de carotenóides ingeridos é medido nas fezes, medida dos carotenóides radioativos na linfa ou estudos cinéticos usando carotenóides isotopicamente marcados (AMBRÓSIO, SIQUEIRA & CAMPOS 2006).

Em termos gerais, os carotenóides são menos disponíveis que a vitamina A pré-formada porque estão ligados à matriz dos vegetais, os requerimentos para a absorção intestinal são superiores aos da vitamina A e ainda devem ser enzimaticamente clivados e armazenados como vitamina A ou caroteno em vários tecidos (OLSON, 1999).

Um conjunto de fatores exerce influência na biodisponibilidade dos carotenóides, tais como: tipos de carotenóides, ligação molecular, quantidade de carotenóides consumidos em uma refeição, matriz na qual os carotenóides são incorporados, fatores de absorção e bioconversão, estado nutricional do indivíduo, fatores genéticos e fatores inerentes ao indivíduo (WEST & CASTENMILLER, 1998).

3.6 Fontes de Carotenóides

Estima-se que nas folhas, os carotenóides estejam nos cloroplastos, mascarados pela clorofila, ou seja, os carotenóides acompanham as clorofilas numa relação de três a quatro partes de clorofila por uma parte de carotenóide; e nas frutas, os carotenóides encontram-se nos cloroplastos, sendo que a quantidade de carotenóides aumenta durante a maturação, porque parte da clorofila se perde com a intensificação da cor (GOODWIN, 1952; PARKER, 1956; SAUNDERES, RAMALHO & ACCIOLLY, 2000; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, 2004^a). Nos seres vivos, a maior concentração está no tecido adiposo e no fígado, sendo encontrados também no plasma, coração, músculos, rins, pulmão pele e cérebro (BENDICH & OLSAN, 1989).

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1999), as frutas dividem-se em dois grupos, de acordo com os carotenóides predominantes: β -caroteno (Ex.: bocaiúva, buriti, manga, goiaba, tucumã) e β -criptoxantina (Ex.: cajá, nectaria, mamão papaia, pequi, pitanga). No entanto, podem apresentar predominância de outros carotenóides, dependendo da fruta; por exemplo, no pequi, predomina a zeaxantina; na goiaba, no mamão papaia e na pitanga, predomina o licopeno.

As frutas palmáceas, buriti, tucumã, bocaiúva, bacuri e umari, são ricas fontes de β -caroteno, sendo que o buriti é o produto alimentar detentor de maior concentração conhecida de β -caroteno, dentro da vasta gama já analisada de alimentos brasileiros (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008).

As frutas não-palmáceas, melão de polpa amarela e acerola, altamente rica em vitamina C, são também boas fontes de β -caroteno. O β -caroteno é também o principal carotenóide do caju amarelo e vermelho, da nêspira e do marolo, embora esteja presente em baixos níveis nesta fruta (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008).

ASSUNÇÃO & MERCADANTE (2002) quantificara os teores dos seguintes carotenóides em diferentes variedades de caju: β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno e 9-cis + 13-cis- β -caroteno, encontrando níveis mais altos em caju vermelho do que no amarelo, sendo ambos os tipos considerados boas fontes de carotenóides. Segundo PINHEIRO & SANT'ANA *et al.* (1998) as cenouras são fontes de carotenóides, apresentando altos teores de

α e β -carotenos. SILVA & MERCADANTE (2002) estudaram a presença de carotenóides em maracujá-amarelo através de cromatografia líquida de alta eficiência e encontraram os seguintes carotenóides: β -criptoxantina, prolicopeno, cis- ζ -caroteno, ζ -caroteno, β -caroteno, 13-cis- β -caroteno, neurosporeno e γ -caroteno. Na abóbora, pêssego e nas laranjas se encontram a luteína, mas suas fontes mais ricas são a couve e o espinafre. CAVALCANTE (1991) pesquisou os principais carotenóides da pitanga e da acerola *in natura*, encontrado como carotenóide prioritário na pitanga, o licopeno e na acerola, o autor encontrou fitoflueno, β -criptoxantina, β -caroteno e α -caroteno.

3.7 Flavonóides

Flavonóides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais encontrados com grande frequência na natureza, unicamente em vegetais (BOBBIO & BOBBIO, 2001). Esses compostos não nutritivos apresentam atividade antioxidante, anti-mutagênica e anti-cancerígena em diferentes sistemas (ANDERSON *et al.* 2000; MIDDLETON & KANDASWAMI, 1992).

Todos os flavonóides têm a estrutura $-C_6-C_3-C_6-$ sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos. São compostos bem caracterizados por medidas espectroscópicas, não só dos próprios compostos, mas também de compostos e complexos formados pela adição de determinados reagentes (BOBBIO & BOBBIO, 2001). A estrutura básica dos flavonóides consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos interligados via carbono heterocíclico do pirano, que pode conter um grupo carbonila, denominado anel C (figura 05). Os anéis aromáticos são denominados A e B. A posição do anel B é a base para se distinguir a classe dos flavonóides (posição 2 do anel heterocíclico) e a posição 3, a subclasse dos isoflavonóides (ARAÚJO, 2004).

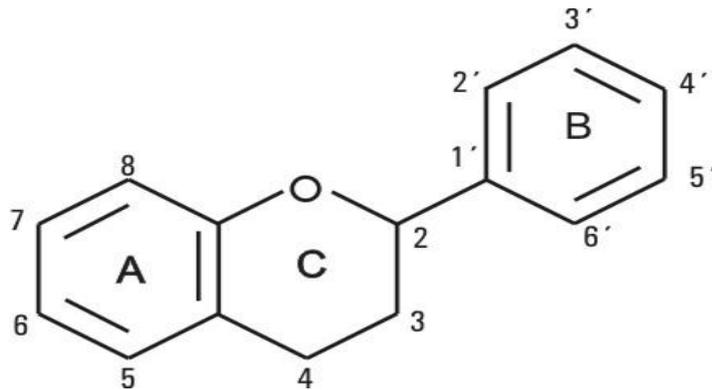


Figura 05- Estrutura dos flavonóides.
(FONTE: TRUEBA, 2003)

O anel A é derivado do ácido acético (acetil CoA) e malonato (carbonos de 5 até 8), enquanto o anel B e os três carbonos da ponte são derivados do ácido shiquímico via biossíntese do aminoácido fenilalanina (2 até 4 e 1' até 6'). Os flavonóides são classificados pelo grau de oxidação dos três carbonos que formam a interligação com os anéis (ARAÚJO, 2004).

A variação estrutural no anel C subdivide os flavonóides em seis principais classes: flavonóis (por exemplo, quercetina kaempferol, miricetina), contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C; flavonas (exemplo: catequina) contendo apenas a hidroxila no carbono 3, porém sem dupla ligação entre os C-2 e o C-3; flavanonas contendo apenas a carbonila no carbono 4, também sem dupla ligação entre os C-2 e o C-3; antocianidinas (por exemplo, cianidina, pelargonidina) apenas contendo a hidroxila no carbono 3; isoflavonas (por exemplo, a ginisteína, a daidzeína) em qual o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (ROSS & KASUM, 2002).

Os flavonóides são encontrados na natureza na forma livre ou de glicisídios associados açúcares e a taninos. O açúcar, quando presente está ligado de preferência nas hidroxilas das posições três a sete das agliconas (BOBBIO & BOBBIO, 2001).

3.8 Biossíntese dos flavonóides

Os flavonóides, junto com os isoprenóides e alcalóides, compreendem as três maiores classes de produtos secundários produzidos pelas plantas superiores, e são parte essencial na adaptação à vida destes num ambiente adverso e inconstante, na maioria das espécies de plantas, o excesso de luz e alta radiação UV desencadeia um aumento na síntese e acúmulo de compostos não fotossintéticos relacionados à via dos fenil propanóides contendo o esqueleto $C_3 - C_6$ (fenil propano), derivados do ácido cinâmico, sintetizado do ácido shíquimico (SHIRLEY, 1996; DICARLO, MASCOLO & IZZO, 1999; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Os flavonóides são sintetizados pela combinação das vias metabólicas do ácido shíquimico e do acetil Co-A carboxilase. A chalcona sintetase é a enzima que catalisa a formação da chalcona intermediária básica C_{15} , da qual todos os flavonóides são formados, pela condensação de três moléculas de malonil- CoA com uma molécula de 4-coumaroil-CoA, ($C_3 - C_6$). Além do 4-coumaroil CoA, que é o principal substrato fisiológico para a formação das chalconas, a chalcona sintase de algumas espécies de plantas aceita como substrato o cafeoil-CoA ou o feruloil-CoA. O substrato éster da CoA do ácido cinâmico vem da fenilalanina. A fenilalanina amônio liase canaliza o esqueleto $C_6 - C_3$ da fenilalanina via o ácido trans-cinâmico pelo metabolismo fenilpropanóide. A introdução da função hidróxi na posição 4 do ácido trans-cinâmico é catalisada pela cinamato 4-hidroxilase, fornecendo o 4-coumarato. O ácido hidróxi-cinâmico é ativado para futuras reações, pela formação de um éster da CoA (4-coumaroil- CoA), substrato preferido pelo a chalcona sintase. O segundo substrato da chalcona sintase, o malonil-CoA, é sintetizado da acetil-CoA e CO_2 . Através de subseqüentes hidroxilações e reduções, as plantas sintetizam as diferentes classes de flavonóides (figura 06) (DICARLO, MASCOLO & IZZO, 1999; ROBARDS & ANTOLOVICH, 1997; WINKEL-SHIRLEY, 2001; DIXON *et al.*, 2002).

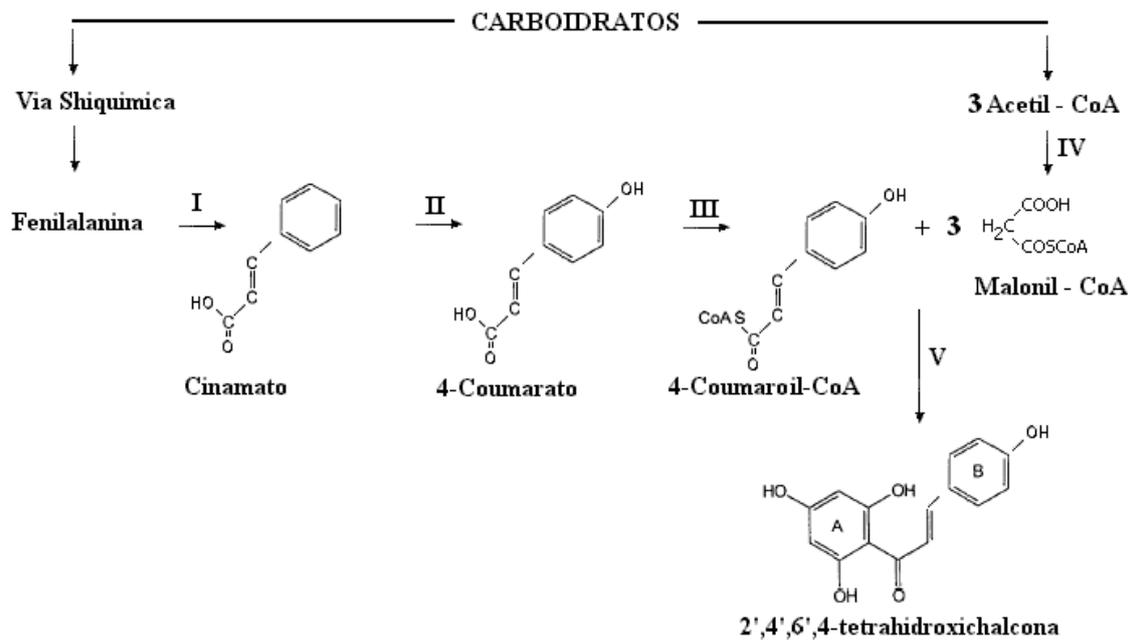


Figura 06- Etapas da biossíntese para a formação da chalcona intermediária básica C_{15} , da qual todos os flavonóides são formados. As enzimas são: I- Fenil amônia liase; II – Cinamato 4-hidroxilase; III- 4-coumarato: CoA ligase; IV- Acetil CoA carboxilase; V- Chalcona síntese.

(FONTE: DICARLO, MASCOLO & IZZO, 1999).

3.9 Atividade biológica dos flavonóides

O potencial dos flavonóides em reduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares e câncer é normalmente explicado pelos efeitos biológicos como antioxidantes (DISILVETRO, 2001; NIELSEN *et al.*, 1999; FIANEDR & SCHENEIDER, 2000), antiestrogênicos (MIKISICEK, 1995; MAKELA, 1995) e inibidores da proliferação celular (KUNTZ, WENZEL & DANIEL, 1999; WENZEL *et al.*, 2000). Existem estudos, porém, que relatam o efeito prooxidante destes em certas condições (SAHU & GRAY, 1996), sendo ainda necessárias mais pesquisas sobre este assunto. Além disso, os estudos têm sido conduzidos principalmente com flavonóides agliconas ou glicosídeos. Até muito recentemente, metabólitos de flavonóides raramente eram usados, principalmente porque dados sobre sua identidade eram raros e padrões químicos para apenas poucos metabólitos podiam ser adquiridos comercialmente (ERLUND, 2004). Tem-se colocado ainda que os flavonóides, e

seus metabólitos *in vivo*, não agem como os convencionais antioxidantes doadores de hidrogênio (WILLIAMS & SPENCER, 2004). As evidências sugerem que os efeitos celulares dos flavonóides podem ser mediados pela sua interação com proteínas específicas, fundamentais para a cascata intracelular sinalizante (SCHROETER *et al.*, 2002). Podem interagir seletivamente dentro da via sinalizante de proteína kinase mitogênio ativada (KOBUCHI *et al.*, 1999; KONG *et al.*, 2000). Os flavonóides parecem ser capazes de proteger neurônios contra stress oxidativo mais eficientemente que o ascorbato, mesmo quando o último foi utilizado em concentrações 10 vezes maiores, o que apóia uma atividade não antioxidante (SCHROETER *et al.*, 2000).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonóides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação plaquetária, e de ativar sistemas enzimáticos incluindo ciclooxigenases e lipoxigenases (COOK & SAMMAN, 1996). Esses efeitos são devidos a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (COOK & SAMMAN, 1996). Outros estudos também têm mostrado que os flavonóides quercetina, rutina e naringina inibem a biossíntese de eicosanóides (resposta antiprostanoide e antiinflamatória) (PELZER *et al.*, 1998), protegem a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (previnem formação de placa aterosclerótica), previnem agregação plaquetária (efeitos antitrombóticos), e promovem relaxamento de músculo liso (efeito antihipertensivo e antiarrítmico). Além disso, flavonóides têm também apresentado propriedades antivirais e carcinostáticas (PELZER *et al.*, 1998). Os flavonóides estimulam as enzimas com atividade antioxidante como catalases e a superóxido dimutase (SUDHEESH *et al.*, 1999).

MORAZZONI & MALANDRINO (1988) em seus estudos concluíram que a rutina e quercetina se comportam como eficientes seqüestradores de O₂.

3.10 Fontes de flavonóides

As frutas apresentam variação na composição de flavonóides devido a diferentes fatores como variedades/ cultivares e partes dos frutos. A composição é dependente do grau de incidência de luz, uma vez que a formação dos flavonóides é influenciada pela luz. São

localizados principalmente nas folhas, flores e nas frutas, em suas partes externas, pele ou casca, decrescendo em concentração até o centro delas (KÜHNAU, 1976; ROBARDS & ANTOLOVICH, 1997).

HOFFMANN-RIBANNI, HUBER & RODRIGUEZ-AMAYA (2009) estudaram a quantidade de quercetina, miricetina e kaempferol, em frutas brasileiras frescas e processadas, e encontraram os valores médios da tabela 02:

Tabela 02 – Teores de quercetina miricetina e kaempferol em frutas frescas.

Fruta	Concentração em mg/100g de peso fresco		
	Miricetina	Quercetina	Kaempferol
Acerola	nd	5,0	1,2
Maçã	nd	7,5	<LQ
Caju	2,0	1,3	<LQ – 0,3
Figo	nd	1,3	Nd
Jaboticaba	nd	1,1	Nd
Laranja	nd	0,3	nd
Pitanga	3,7	6,2	0,4
Morango	nd	0,8	0,7

LQ – limite de quantificação, miricetina= 0,26 mg/100g; quercetina= 0,23 mg/100g; kaempferol = 0,26 mg/100g; nd: não detectado.
(FONTE: HOFFMANN-RIBANNI *et al.*,2009).

BRITO *et al.* (2007) estudou e quantificou flavonóides por cromatografia líquida em pedúnculo de caju e encontrou os seguintes compostos em extrato metanol-água: 3-*O*-galactosídeo, 3-*O*-ramhanosídeo, 3-*O*-xilopiranosídeo, 3-*O*-arabinopiranosídeo, 3-*O*-aribinofuranosídeo de quercetina e miricetina, bem como kaempferol 3-*O*-glucosídeo.

3.11 Parede celular vegetal e enzimas pectinolíticas

A parede celular é responsável pela resistência e rigidez dos tecidos vegetais e, ao mesmo tempo, tem a habilidade de se expandir durante os períodos de crescimento. Além de

servir como suporte à estrutura das células, desempenha funções importantes, como absorção e transporte de água e minerais, secreções, atividade enzimática entre outras (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

A parede celular é composta de várias camadas e diferentes macromoléculas, sendo responsável pelas características de textura dos frutos. A lamela média é a camada mais externa que faz a coesão entre as células e, por isso, é designada como cimento celular, sendo composta principalmente de pectinas. A parede celular primária se localiza após a lamela, consiste de microfibrilas de celulose trançadas em um conjunto em um padrão irregular, embebidas numa matriz amorfa composta de hemiceluloses, pectina e proteínas. A parede celular secundária liga-se imediatamente ao lado de dentro da parede primária, consiste de microfibrilas de celulose embebidas em matriz amorfa de hemicelulose e lignina (extensiva) (FIGURA 7) (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

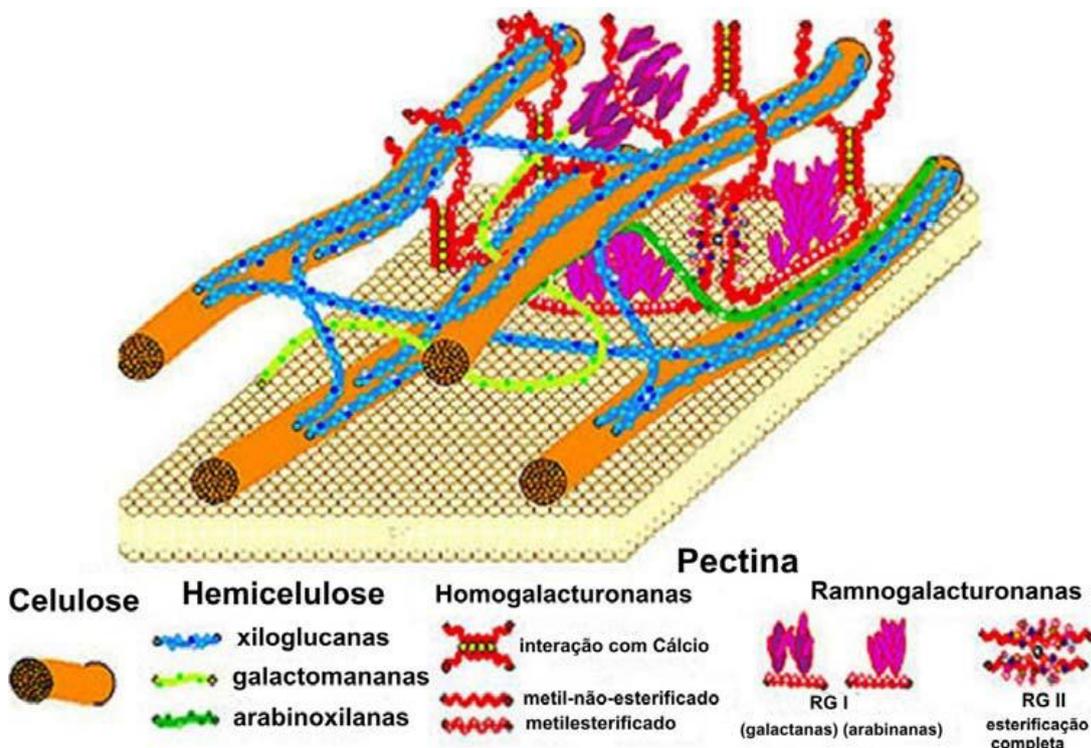


Figura 07- Estrutura da parede celular da célula vegetal.
(FONTE: bmb.msu.edu).

Substâncias pécnicas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias das células vegetais superiores (ALKORTA *ET al.*, 1998; ALMEIDA, BRANYK & MORADA-FERREIRA, 2005). Quimicamente são complexos coloidais de polissacarídeos ácidos, compostos de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (KASHYAP *et al.*, 2000; GUMMADI & PANDA, 2005; LIMBERG *et al.*, 2000) e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (KASHYAP *et al.*, 2000; SAKAY *et al.*, 1993).

A Sociedade Americana de Química classificou as substâncias pécnicas em: protopectina, ácido pectínico, ácido pécnico e pectina, sendo estes três total ou parcialmente solúveis em água (KASHYAP *et al.*, 2000; ALKORTA *et al.*, 1998).

Protopectina é insolúvel em água, é a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais (WHITAKER, 1996) e, em condições de hidrólise restrita, produzem ácidos pectínicos ou pectina (KASHYAP *et al.*, 2000; SAKAY *et al.*, 1993; MAIORANO, 1990). Ácido pécnico é uma designação aplicada a substâncias pécnicas compostas de ácido poligalacturônico coloidal (KASHYAP *et al.*, 2000; SAKAY *et al.*, 1993), onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil éster (KASHYAP *et al.*, 2000; SAKAY *et al.*, 1993; WHITAKER, 1996) e seus sais são pectatos neutros ou ácidos (MAIORANO, 1990). Ácido pectínico é um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico coloidal com poucos grupos metil éster (SAKAY *et al.*, 1993; WHITAKER, 1996).

O termo geral pectina (Figura 8) designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas (SAKAY *et al.*, 1993). Consiste em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido α -1, 4-D-galacturônico e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais (GUMMADI, 2005; ALKORTA *et al.*, 1998; LANG E DÖRNENBURG, 2000).

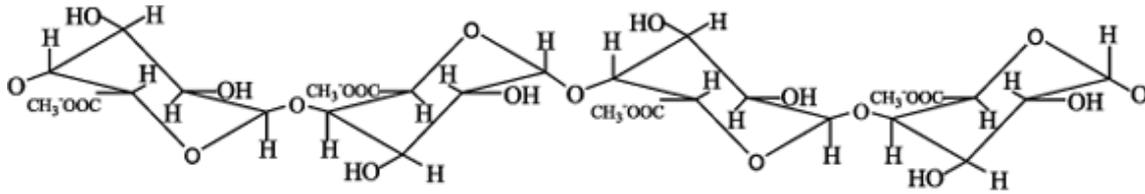


Figura 08 – Estrutura da molécula de pectina (FONTE: UENOJO E PASTORE, 2007).

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas, hidrolisando as ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizante ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (UENOJO & PASTORE, 2007).

UENOJO E PASTORE (2007) classificam as pectinases com base no ataque ao esqueleto galacturônico, preferência ao substrato (pectina, protopectina ou ácido pécico), ação por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica ou terminal em (figura 09):

- a) Desesterificante ou desmetoxilante: removem os grupos metil-éster, como, por exemplo, a pectina esterase;
- b) Despolimerizantes: catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécicas, como por exemplo, hidrolases (polimetilgalacturonases e poligalacturonases) e as liases (pectina liase).

As hidrolases são:

- Polimetilgalacturonases (PMG): hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos pela separação das ligações α (1 \rightarrow 4), podendo ser endo- ou exo-PMG.
- Poligalacturonases (PG): (EC 3.2.1.15), hidrolisam ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) entre dois resíduos de ácido galacturônico. É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise seqüencial) do ácido pécico. As exo-poligalacturonases são subdivididas em Exo-PG-1 (EC 3.2.1.67), que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e Exo-PG-2 (EC

3.2.1.82), que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres.

As Liases são:

- Pectina-liase (PMGL): pectina liase, polimetilgalacturonato liase ou PMGL (EC 4.2.2.10) catalisa a β -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados, sem absorção de água. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo- ou exo-.
 - Pectato liase (PGL): poligalacturonato liase catalisa a separação de ligações α (1 \rightarrow 4) de ácido pécico, de modo endo- ou exo-, por trans-eliminação, requer Ca^{2+} para atividade. São subdivididas em Exo-Pectato-Liase (EC 4.2.2.9), que hidrolisa as ligações do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando principalmente ácidos digalacturônicos insaturados livres e Endo-Pectato-Liase (EC 4.2.2.2), que hidrolisa as ligações internas do ácido poligalacturônico, liberando oligogalacturonatos insaturados livres.
- c) Protopectinases: solubilizam a protopectina para formar pectina.

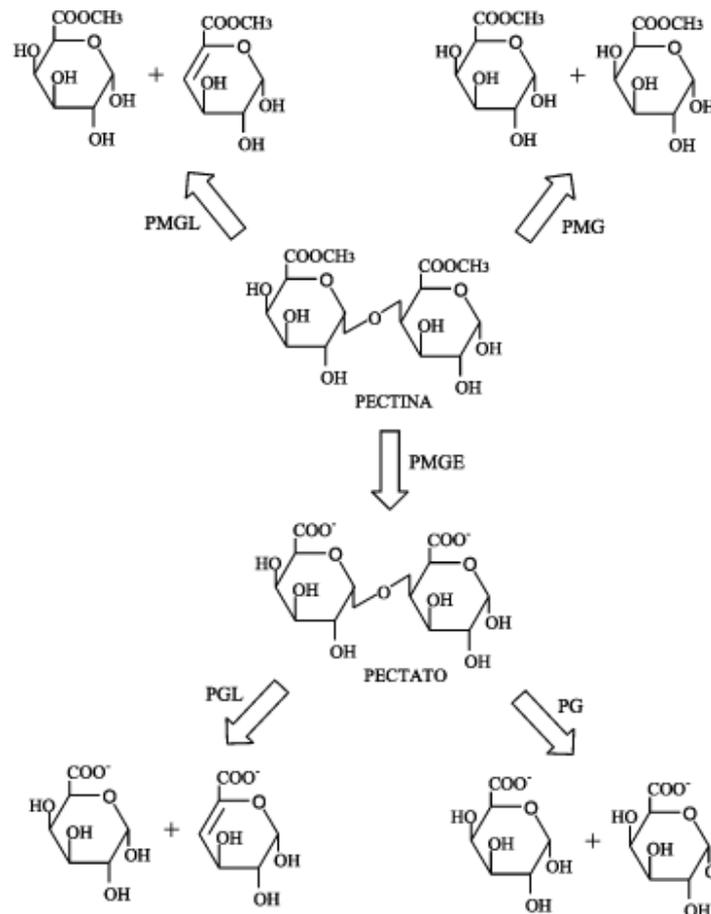


Figura 09- Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase; PMG: polimetilgalacturonase; PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase); PG: poligalacturonase. (FONTE: UENOJO & PASTORE, 2007).

As pectinases são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade, melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação (GUMMADI & PANDA, 2005; ALMEIDA, BRANYIK & MORADA-FERREIRA, 2005; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2004; SORENSEN *et al.*, 2004; LIMA, ALEGRE & MEIRELES, 2000), no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau (ALMEIDA, BRANYIK & MORADA-FERREIRA, 2005); para melhorar a extração de óleos vegetais (TARAGANO & PILOSOFF, 1999); na extração de polpa de tomate (ALMEIDA, BRANYIK & MORADA-FERREIRA, 2005).

3.12 Obtenção de compostos bioativos a partir de resíduos agroindustriais

O consumo de carotenóides no mercado está aumentando. No novo Relatório do Mercado Global de Carotenóides, a Companhia de Comunicações Empresarial INC (BCC), projeta que o valor do mercado mundial de carotenóides, todo comercialmente usado, subirá para mais de \$ 1 bilhão antes de 2009, a uma taxa de crescimento anual de 3% ao ano. Atualmente, o mercado é calculado a \$ 887 milhões (GUZMAN, 2005).

Por muitos anos, o representante mais proeminente dos carotenóides, o β -caroteno, foi usado como corante de alimentos. O mercado de β -caroteno foi calculado em mais de \$ 242 milhões em 2004, um aumento de \$ 30 milhões comparado a 1999 (GUZMAN, 2005).

Extratos naturais contendo carotenóides extraídos de urucum, açafrão, páprica e tomate têm sido já usados para colorir alimentos. No entanto, a quantidade de pigmentos existente na natureza está longe de suprir a demanda destes compostos, para serem usados em substituição aos corantes sintéticos, muitos deles suspeitos de ação tóxica, e alguns já proibidos de serem usados em alimentos. Alguns flavonóides, assim como os carotenóides, são substitutos em potencial dos corantes sintéticos (BOBBIO & BOBBIO, 2001).

As ações voltadas para o desenvolvimento de produtos diferenciados com boa agregação de valor, tornando o processamento do pedúnculo do caju uma oportunidade de aumento de renda e redução nos custos de produção dos pequenos produtores tem sido uma busca constante junto às cadeias produtivas agropecuárias (OLIVEIRA & IPIRANGA, 2009). Como o aproveitamento do pedúnculo do caju é estimado em apenas 12% de sua produção, e o bagaço, subproduto do processo de extração do suco de caju, é geralmente descartado (MERCADANTE & RODRIGUZ-AMAYA, 1998), o aproveitamento tanto do pedúnculo como do bagaço é extremamente interessante, pois estes constituem uma fonte de compostos de alto valor agregado em razão de suas propriedades funcionais em alimentos (ABREU, 2001).

AZEREDO *et al.* (2006) estudaram a obtenção de compostos carotenóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju, resíduo do processamento da indústria de sucos, pela adição

de pectinases ao bagaço, concluindo que o extrato do bagaço era uma boa fonte de carotenóides. ÇINAR (2004) estudou a obtenção de compostos carotenóides em casca de laranja, batata doce e cenoura usando a combinação de celulases e pectinases. BROIZONI *et al.* (2007), estudaram a atividade antioxidante de extrato do bagaço do pedúnculo do caju, após a extração do suco e observou que esse extrato possuía uma boa atividade antioxidante. ALVAREZ *et al.*,(2006) estudaram a o conteúdo de carotenóides totais em casca de algumas variedades de laranjas venezuelanas, utilizando éter de petróleo e hexano, e obteve como melhor resposta um teor de 140 mg de carotenóides/ Kg de casca. BARRETO *et al.* (2007) estudaram a presença de compostos bioativos em extrato do bagaço do pedúnculo de caju retentado, concentrado e bruto e observou que o retentado apresentou um nível significativamente maior de fenóis totais, carotenóides totais e atividade antioxidante livre.

BOLAÑOS *et al.* (2004) estudaram a obtenção, purificação e concentração de xantofilas, como a luteína, através do extrato de margaridas em hexano para utilização como suplemento e aditivo alimentares. LAVECCHIA & ZUORRO (2008) estudaram a obtenção de licopeno de pele de tomate, subproduto da indústria de processamento, por métodos enzimáticos, empregando pectinases, celulases e hemicelulases. FU *et al.* (2008) estudaram a extração de luteína e apigenina por métodos enzimáticos, utilizando pectinases, celulases e β -glucosidades a partir de legumes, encontrando precentuais bastate elevados em relação aos legumes não tratados enzimaticamente.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O bagaço de caju, cedido pela empresa Sucos do Brasil S.A., localizada em Pacajus/CE, foi armazenado em sacos plásticos de polietileno, transportado imediatamente para a Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza/CE, Laboratório de Processos Agroindustriais. O bagaço de caju foi separado em sacos plásticos de polietileno menores (quatro quilos por embalagem). As embalagens foram seladas e armazenadas em freezer.

A preparação enzimática utilizada nos experimentos foi Pectinex Ultra SPL, gentilmente cedida pela Novozymes Brasil Ltda.

4.2 Aplicação de preparação enzimática na maceração

4.2.1 Razão bagaço: água, concentração enzimática e tempo

Para a avaliação da proporção bagaço: água, concentração enzimática e tempo de maceração foram conduzidos, doze experimentos.

Inicialmente deixou-se doze quilos de bagaço descongelando em temperatura ambiente por uma noite, aproximadamente 16 horas. Pesou-se em um bécker plástico (4000 ml) um quilograma de bagaço de caju. Adicionou-se água nas seguintes proporções: 1:1 e 1:2 (bagaço: água), para estudar a melhor proporção bagaço: água em escala de bancada. A mistura foi mantida a uma temperatura de 30°C em banho-maria da marca MARCONI, com circulação de água, por uma hora. Uma parte do extrato obtido foi removida, transferida para outro bécker e observado visualmente após uma hora. O extrato removido para observação foi

devolvido ao bécker inicial e a mistura permaneceu por duas e três horas no banho-maria, repetindo-se o procedimento anterior para observação visual da coloração amarela do extrato a fim de verificar o impacto do tempo de extração. Estes experimentos, conduzidos sem enzimas, foram definidos como grupos controles. Nos experimentos conduzidos com enzimas, testaram-se as concentrações de 250 e 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico adicionados antes da manutenção da mistura em banho-maria e procedeu-se como descrito anteriormente.

4.2.2 Temperatura

Realizaram-se seis experimentos para a avaliação do efeito da temperatura sob a obtenção dos carotenóides. Misturou-se quatro quilogramas de bagaço de caju a quatro quilogramas de água (proporção 1:1, massa/massa). A mistura foi mantida em banho-maria nas temperaturas de 30 e 40°C, sendo que o experimento conduzido na temperatura de 30°C permaneceu em banho-maria por uma e duas horas. A cada hora retirou-se uma amostra do extrato para a observação visual da coloração amarela do extrato, que foi devolvido á mistura inicial para a manutenção da proporção bagaço: água. Esses experimentos foram os grupos controles, pois foram conduzidos sem enzimas. Para a condução dos experimentos com adição de preparado enzimático pectinolítico, adicionou-se 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico antes da manutenção da mistura em banho-maria e procedeu-se como descrito anteriormente.

4.3 Obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (EBC)

Após os experimentos iniciais, selecionaram-se as condições que forneceram extratos com maiores intensidades de coloração amarela para a obtenção dos extratos em planta piloto.

Para a obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (EBC) foram realizados seis experimentos, sendo três com adição de complexo enzimático pectinolítico e três experimentos representando os grupos controle (sem enzimas). Os experimentos foram conduzidos nas temperaturas de 30° e 40°C, com proporção de bagaço: água (1:1, massa/massa) e permaneceram em banho-maria por uma hora (tempo de maceração). No experimento conduzido na temperatura de 30°C variou-se o tempo de maceração em que a mistura permaneceu em banho-maria, sendo realizado um experimento com tempo de permanência de uma hora e outro experimento com tempo de permanência de duas horas.

Os extratos foram obtidos segundo o processo descrito por ABREU (2001) com adaptações. Inicialmente, o bagaço foi descongelado por uma noite, aproximadamente, 16 horas em temperatura ambiente. O método consistiu em umidificar quatro quilogramas de bagaço, misturando a quatro quilogramas de água, homogeneizar a mistura manualmente, aquecer em banho-maria com circulação de água por uma hora, na temperatura de 30°C, no primeiro experimento e 40°C, no segundo experimento. Após essa etapa, ajustou-se o comprimento da mola utilizada na prensa para 21,7 centímetros correspondendo a uma força de 804,61 N. Prensou-se o bagaço umidificado, obtendo-se o primeiro extrato. Pesou-se o bagaço resultante da primeira prensagem, umidificou-se novamente na proporção de 1:1 (massa/massa) peso de bagaço: peso de água e prensou-se, obtendo-se o segundo extrato. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes (Figuras 10 A). Em todas as etapas do processo, pesou-se a quantidade de bagaço resultante em cada extração e a quantidade de água adicionada ao bagaço em cada etapa da prensagem e construiu-se um gráfico para o acompanhamento da perda de massa durante o processo. Os extratos foram armazenados em garrafas plásticas de polietileno envoltas em papel alumínio para evitar a degradação dos compostos carotenóides pela luz.

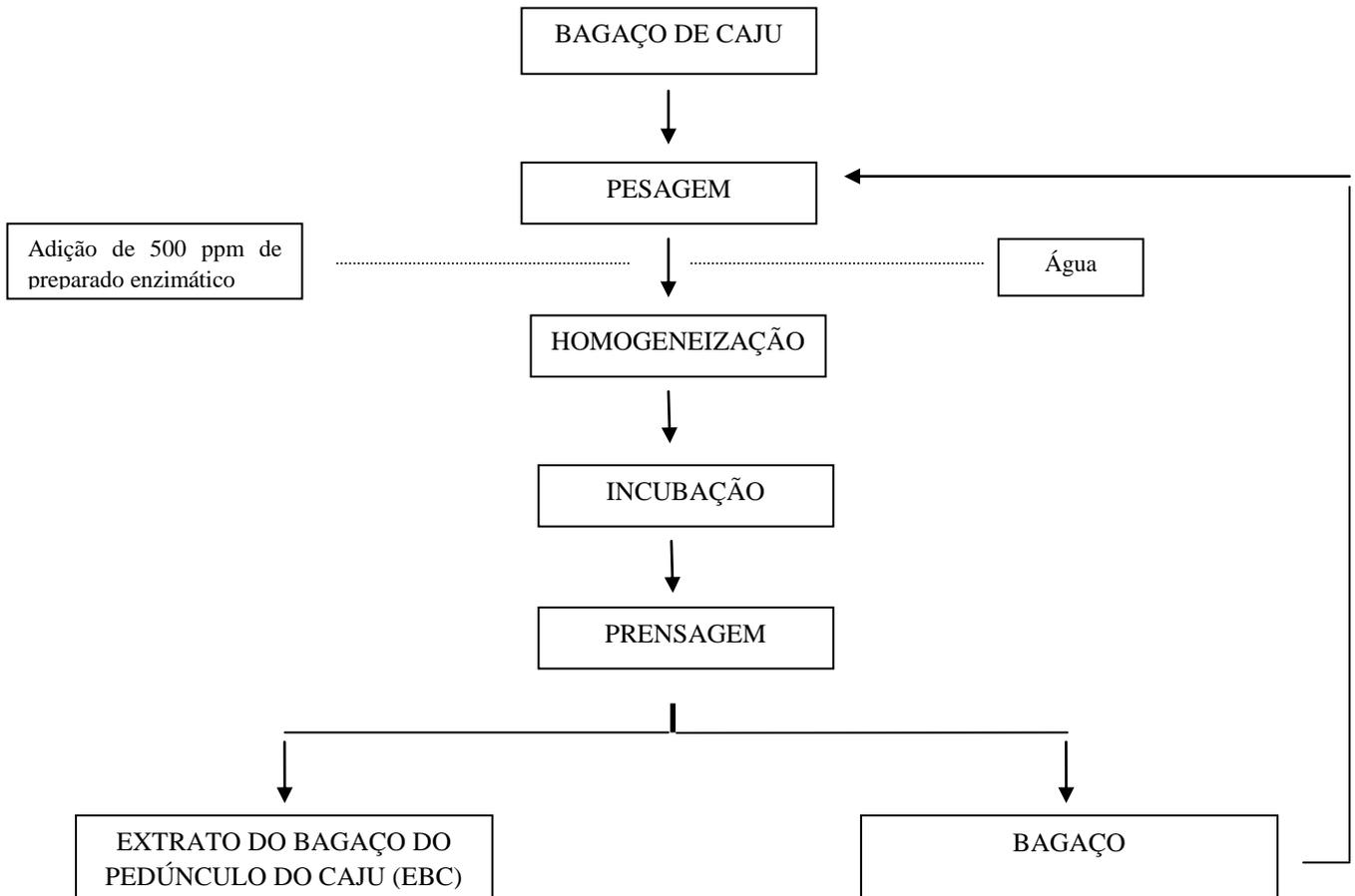


Figura 10 - Fluxograma de obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju com e sem adição de complexo enzimático pectinolítico.

4.3.1 Avaliação do número de extrações sucessivas

Para a avaliação do número de extrações sucessivas, realizaram-se dois experimentos, nos quais foram obtidos dez extratos. Inicialmente, misturou-se quatro quilogramas de bagaço à quatro quilogramas de água (proporção 1:1, massa/massa), sem enzimas, na temperatura de 30°C. Antes da primeira passagem pela prensa, a mistura foi aquecida em banho-maria Marconi, com circulação de água. Ajustou-se o comprimento da mola da prensa do tipo Expeller (fabricada por CEIL) para 21,7 centímetros.

4.3.2 Tratamento enzimático

Para a obtenção do pigmento extraído com enzima, repetiu-se o procedimento descrito no item 3.3 anterior, nas duas temperaturas e condições pré-estabelecidas até a quinta extração. Para a condução dos três experimentos com enzimas, adicionou-se uma concentração de 500 ppm do complexo enzimático pectinolítico, medido em pipetador automático, antes da primeira passagem pela prensa e homogeneizou-se manualmente. A mistura permaneceu vinte minutos em repouso, para um melhor desempenho da enzima ao meio bagaço: água e foi levado ao banho-maria por uma hora a fim verificar a ação da temperatura na obtenção de compostos carotenóides.

4.3.3 Extrato do bagaço do pedúnculo do caju concentrado

O extrato do bagaço do caju foi obtido conforme a metodologia descrita no item 3.3. As condições de obtenção do extrato foram temperatura de 27°C (temperatura ambiente) e proporção 1:1 (peso de bagaço: água). Prensou-se a mistura bagaço: água até a retirada de praticamente todo o pigmento do bagaço para obtenção de uma fase líquida total resultante da mistura dos extratos obtidos na prensagem. Filtrou-se a fase líquida total para eliminação de partículas de fibra e concentração do filtrado sob vácuo da ordem de 10^{-3} a 10^{-5} atm, para a obtenção de um extrato com teor em sólidos na faixa de 1% a 50% p/p.

A mistura dos extratos de bagaço de caju (EBC) obtido nas condições descritas acima foi centrifugada a 15000 rpm por 20 minutos em centrífuga Biofuge Stratos, fabricada por Heraeus Instruments. Tanto o resíduo quanto o sobrenadante foram analisados quanto aos compostos de interesse, e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador TECNAL –TE - 120 a vácuo a 60°C, até reduções volumétricas de 25, 50, 75 e 90% do volume inicial.

4.4 Procedimentos analíticos

4.4.1 Determinação da compressão da mola utilizada na prensa do tipo EXPELLER (mola utilizada em suspensão de motocicleta)

Utilizou-se uma mola usada em suspensão de motocicletas. A compressão da mola foi determinada comprimindo-se a mola gradativamente em intervalos de 10 mm e medindo-se a respectiva força em Newtons correspondente a cada uma das compressões. O experimento de compressão da mola para a medição da força foi realizado em um equipamento de ensaios universais da marca INSTRON (modelo 8802), conduzido no laboratório de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Ceará (UFC). O comprimento inicial da mola em repouso era de 242,45 milímetros.

Os resultados relacionando a força à compressão sofrida pela mola foram plotados em um gráfico construído no programa excel e calculou-se a equação da reta “Força X compressão da mola”.

4.4.2 Determinação de pH

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro digital QUIMIS modelo Q400A, calibrado com soluções tampão de pH 4,0, 7,0 e 10. Pipetou-se 10 ml de cada amostra do extrato do bagaço de pedúnculo de caju em um Becker de vidro de 50 ml e mediu-se o pH inserindo os eletrodos do pHmetro diretamente na solução, conforme o método descrito pela AOAC (1992).

4.4.3 Determinação de Sólidos Solúveis Totais

As determinações de sólidos solúveis foram realizadas em refratômetro digital (ATAGO PR-101) com escala de 0 a 45° Brix, através de leitura direta. Inicialmente, calibrou-se o refratômetro com água destilada e enxugou-se o prisma com papel toalha. Homogeneizou-se a amostra e transferiu-se 2 gotas, pipetadas com pipeta de Pasteur, de cada uma das amostras, para o prisma do refratômetro, desprezando-se partículas grandes do bagaço do caju, presente no extrato. Os resultados foram expressos em °Brix, de acordo com a AOAC (1992).

4.4.4 Determinação de açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi realizado segundo MILLER (1959), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Devido à presença de diferentes teores de açúcares redutores nos extratos estudados, realizaram-se três diluições diferentes. Nos extratos obtidos através da primeira e segunda prensagem, tomou-se 10 ml das amostras e diluiu-se em balão volumétrico de 200 ml, aferindo-se o volume com água destilada. No extrato obtido através da terceira prensagem, tomou-se 10 ml da amostra e diluiu-se em balão volumétrico de 100 ml, aferindo-se o volume com água destilada. Nos extratos resultantes da quarta e quinta prensagens, tomou-se 10 ml das amostras, diluiu-se em balão volumétrico de 50 ml e aferiu-se o volume com água destilada. Após a diluição, as amostras foram homogeneizadas e filtradas em papel filtro qualitativo para retirada das partículas de bagaço. Para a determinação de açúcares totais no sobrenadante e no resíduo da centrifugação diluiu-se 10 ml do sobrenadante e 10 g do resíduo em 50 ml de água destilada, homogeneizou-se e filtrou-se em papel de filtro. Transferiu-se com auxílio de pipeta volumétrica, 25 ml do filtrado para um Becker de 50 ml. Após essa etapa, acidulou-se fortemente com 2 ml de ácido clorídrico P.A., aqueceu-se em banho-maria para extração a 75°C por 30 minutos. Esfriou-se em banho de gelo, neutralizou-se com NaOH a 20%, utilizando-se como indicador o papel de tornassol. Transferiu-se as amostras para um balão volumétrico de 50 ml e aferiu-se o volume com água destilada, homogeneizou-se e filtrou-se com papel de filtro qualitativo. Procedeu-se

o preparo dos tubos como descrito conforme descrito abaixo para açúcares redutores nos extratos. Para a quantificação de açúcares redutores nos extratos adicionou-se em tubos de ensaio 1 ml do filtrado e 1 ml de DNS e homogeneizou-se em agitador para tubos de ensaio por cerca de 1 minuto. Todos os tubos foram levados para o banho-maria a uma temperatura de 100°C por 5 minutos, resfriados em banho de gelo, adicionados de 8 ml de água destilada, homogeneizados novamente e submetidos à leitura em espectrofotômetro, realizada a 540 nm. A curva de calibração foi montada adicionando-se a seis balões volumétricos de 10 ml em quantidades crescentes de 0; 2; 4; 6; 8 e 10 ml de uma solução de glicose de concentração de 1mg/ml, completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se. Transferiu-se 1 ml de cada uma das seis soluções de glicose preparadas como descrito acima para tubos de ensaio, adicionou-se em cada tubo 1 ml de DNS, homogeneizou-se em agitador para tubos, levou-se ao banho-maria a 100°C por 5 minutos, resfriou-se, adicionou-se 8 ml de água destilada, homogeneizou-se e realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 540 nm. O branco da curva consistiu na mistura de 1 ml de água a 1 ml de DNS e procedendo-se como descrito acima. Cada um dos pontos da curva foi realizado em duplicata. Expressou-se o resultado em mg/l.

4.4.5 Determinação de cor instrumental

A determinação da cor instrumental foi realizada em colorímetro do tipo MINOLTA CR-300 com leitura direta dos valores L^* , a^* e b^* . Inicialmente, o equipamento foi calibrado nos padrões X, Y e Z de cor instrumental. Após a calibração, aproximadamente 10 ml de cada amostra foi transferida para uma cápsula plástica de atividade de água e mediu-se diretamente a cor instrumental com o equipamento. O sistema CIElab (Comission International de d'Eclairage), possibilita sua medição através dos parâmetros de cores: L^* = luminosidade (0= preto e 100=branco), a^* (-80 até zero= verde, do zero ao + 100= vermelho) e b^* (-100 até zero= azul e do zero ao + 70= amarelo) (MODESTA et al, 2005).

4.4.6 Determinação do teor de Carotenóides

A realização do teor de carotenóides foi determinada segundo o método descrito por HIGBY (1962). Tomou-se 10 ml de cada uma das amostras, adicionou-se 30 ml de álcool isopropílico e 10 ml de hexano da marca Synth em um tubo para centrífuga com capacidade de 50 ml, envolto com papel alumínio e agitou-se em homogeneizador de tubos por aproximadamente 1 minuto. Após a agitação, o conteúdo foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se a fase de cor amarela e transferiu-se para outro tubo de centrífuga envolto com papel alumínio com pipeta de Pasteur. Repetiu-se o procedimento de lavagem com hexano e centrifugação até a retirada de toda a fase amarela. A mistura solvente (hexano) e carotenóides (fase amarela) resultante de todas as lavagens foi filtrado utilizando um funil de vidro contendo algodão pulverizado com sulfato de sódio anidro P.A. para um balão volumétrico de 100 ml envolto em papel alumínio, lavou-se o algodão com hexano e pressionou-se o algodão no funil para que não ficasse pigmento no algodão. Adicionou-se ao balão 5 ml de acetona e aferiu-se o balão com hexano. O branco consistiu na adição de 5 ml de acetona em um balão volumétrico de 100 ml e aferição do balão com hexano. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro Varian a 450 nm e expressou-se o resultado em mg%.

4.4.7 Determinação dos teores de Quercetina, Miricetina e Kaempferol

O teor de flavonóides, miricetina, quercetina e kaempferol, foi determinado conforme a metodologia descrita por BRITO *et al* (2007). Os padrões de miricetina, quercetina dihidratada, kaempferol e metanol P.A., foram produzidos pela empresa Sigma Chemical Co. A água utilizada no HPLC foi preparada com água destilada usando o sistema Mili-Q (Milipore Lab., Laboratório de Solos da Embrapa Agroindústria Tropical). Utilizou-se a coluna Zorbax (4.6 x 150 mm) com fluxo de 1ml/minuto. A temperatura foi ajustada para 30°C. A fase móvel consistiu na combinação de A (água: ácido fórmico, 99,7:0,3 volume/volume) e B (metanol: ácido fórmico, 99,7:0,3 volume/volume).

Inicialmente 3,0 ml da amostra foram misturados a 4,5 ml de metanol (40:60%) usando sonicação por 60 minutos a temperatura ambiente. O solvente foi separado do sólido por centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos. Então, 7,5 ml do extrato foi seco e redissolvido em 1 ml de metanol: água (60:40), obtendo-se um volume final de aproximadamente de 1,1 ml . O extrato concentrado foi filtrado em cartucho SPE, nessa etapa lavou-se o extrato com 10 ml de água para retirar os açúcares. Os flavonóides absorvidos foram eluídos com 10 ml de metanol. Secou-se o extrato de metanol em rotaevaporador TECNAL e redissolveu-se em 1 ml de metanol: água (60:40%). Adicionou-se 0,1 ml de HCl (37%) e aqueceu-se a 85°C por duas horas . Adicionou-se 0,4 ml de metanol e sonicou-se por dez minutos. A solução foi filtrada e 50 µl foram injetados em HPLC Varian Pro Star 355 RI Detector.

4.4.8 Caracterização de fibra de caju após as prensagens

Para a obtenção da fibra de caju após a extração do pigmento, realizaram-se dois experimentos. Pesou-se quinhentos gramas de bagaço, após a extração do pigmento, com e sem adição de complexo enzimático, tratado a 30°C e macerado por uma hora, lavou-se com nove litros de álcool comercial 96°GL e com um litro de acetona P.A. Secou-se a fibra em exaustor e o material resultante foi peneirado em tamisador contendo peneiras com aberturas de 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,120 e abaixo de 0,120 mm. As frações foram agrupadas de acordo com a proximidade de tamanho granulométrico da seguinte maneira: fibra retida na peneiras com abertura de 16; 8; 4 e 2 mm; fibra retida em 1; 0,5 e 0,25 mm; e fibra retida em 0,120 e abaixo de 0,120 mm. Para a obtenção do resíduo insolúvel em álcool (AIR) da fibra do bagaço de caju após a extração do pigmento, pesou-se 30 g de cada uma das frações que foram separadas por semelhança de granulometria, homogeneizou-se em blender com 300 ml de etanol fervente (80% volume/volume), deixou-se a solução em aquecimento em chapa metálica a 80°C por 1 hora. Centrifugou-se a 10.000 rpm , na temperatura de 40°C por 10 minutos. Filtrou-se a vácuo, coletando-se o resíduo. Enxaguou-se o resíduo com etanol 80% até obter-se um extrato com filtrado claro. Deixou-se o extrato agitando-se em *shaker* orbital (TE-420 marca TECNAL) a 150 rpm com 50 ml de acetona por 12 horas. Em seguida, filtrou-se com papel filtro e secou-se em exaustor por 24 horas. Assim obteve-se o AIR (resíduo insolúvel em álcool) e pesou-se.

Realizou-se a análise do teor de pectina, celulose e hemicelulose segundo SCHIEBER (2005) nas três frações da fibra. Coletou-se 0,8 g do AIR e diluiu-se em 50 ml de solução alcalina de EDTA (0,05 M de NaOH; 0,5 mM de EDTA) para a agitação por 1 hora a 30°C. Em seguida, centrifugou-se a 10000 rpm por 20 minutos. Esta operação de adição de EDTA, agitação e centrifugação foi repetida, reservando o resíduo para a quantificação de hemicelulose. Juntaram-se os sobrenadantes resultantes da centrifugação, ajustou-se o pH para 6,5 com HCl. Colocou-se a solução na diálise em membranas Dialysis tubing cellulose de tamanho 25 x 16 mm (SIGMA-ALDRICH) com água destilada por 48 horas, trocando-se a água de 12 em 12 horas. Coletou-se o líquido das membranas após 48 horas de diálise e adicionou-se álcool comercial (álcool: líquido 3:1), deixando-se em repouso por 24 horas. Após o repouso, a solução foi centrifugada a 10000 rpm por vinte minutos, secou-se a solução em estufa a 60°C e pesou-se, obtendo-se, assim, o teor de pectina. Para a determinação de hemicelulose, o resíduo reservado na análise de pectina foi lavado com 100 ml de água, em filtração à vácuo, e agitado por cinco horas com 50 ml de solução de NaOH 16% a 30°C. Centrifugou-se a 10000 rpm por 20 minutos, lavou-se o resíduo duas vezes com 50 ml de água destilada e reservou-se o resíduo para a quantificação de celulose. Ajustou-se o pH do sobrenadante para 4,5 usando HCl e colocou-se a solução em membrana de diálise, repetindo as etapas de quantificação de pectina. A celulose + lignina foi determinada lavando-se o resíduo reservado em filtração a vácuo, com água destilada e adicionando-se 100 ml de água destilada. Colocou-se a solução na diálise, repetindo as etapas acima. Após a pesagem, a amostra foi incinerada em forno mufla a 550°C. Os resultados foram determinados através da relação do peso de cada carboidrato determinado com o peso do AIR total da amostra e expresso em percentagem. Para determinar celulose + lignina, primeiramente, calculou-se o peso das cinzas para ser abstraído e, em seguida, procedeu-se o mesmo cálculo feito com a pectina e a hemicelulose.

4.4.9 Determinação do teor de amido

A determinação de amido no bagaço do pedúnculo do caju após a extração do suco foi realizada segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico. Tomou-se 5 g da amostra, colocou-se aproximadamente 30 ml de água. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Realizaram-se três lavagens com água

destilada, descartando-se o sobrenadante. Transferiu-se o resíduo para um erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de água destilada. Adicionou-se 5 ml de HCl P.A. O material foi colocado no refluxo e deixou-se ferver por duas horas. Esperou-se o material esfriar, neutralizou-se o material com Na_2CO_3 (20%), utilizando-se papel de tornassol. Filtrou-se o material em funil de vidro com papel filtro qualitativo, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 100 ml e aferiu-se com água destilada. Agitou-se o balão, tendo o cuidado de destampá-lo a cada agitação para a saída do gás proveniente do Na_2CO_3 . Retirou-se uma alíquota de 1 ml, transferiu-se para um tubo de ensaio, adicionou-se 1 ml de DNS, agitou-se em agitador de tubos e levou-se ao banho-maria a 100°C por 5 minutos. Esfriou-se em banho de gelo, adicionou-se 8 ml de água destilada, agitou-se, novamente, em agitador de tubos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A curva de calibração foi construída conforme descrito no item 4.2.4.

4.4.10 Vitamina C

A vitamina C foi determinada por método espectrofotométrico segundo STROHECKER E HENNING (1967) com adaptações. Para a construção da curva padrão, adicionou-se em uma série de balões de 100 ml, 1; 2; 3; 4 e 5 ml de solução de ácido ascórbico 0,1%. Completou-se o volume com ácido oxálico 0,4%. Inicialmente, zerou-se o espectrofotômetro com água destilada, ao comprimento de onda de 520 nm. Em um tubo de ensaio, transferiu-se 1ml de ácido oxálico 0,4%, adicionou-se 9 ml da solução corante de DFI (2,6-dicloro-fenol-indofenol 0,02%) e realizou-se a leitura L_1 . Adicionou-se ao tubo de ensaio alguns cristais de ácido ascórbico, para descorar a solução e realizou-se a leitura L_{1A} . De cada balão, transferiu-se um 1ml da solução para dois tubos de ensaio. Em um dos tubos, adicionou-se 9 ml de água destilada, zerou-se novamente o aparelho com esta solução. No outro tubo, adicionou-se 9 ml de DFI e realizou-se a leitura L_2 . Adicionou-se a este tubo de ensaio alguns cristais de ácido ascórbico e realizou-se a leitura L_{2A} . Repetiu-se esta operação para cada um dos balões volumétricos. Plotou-se a curva de L contra a concentração, onde:

$$L = (L_1 - L_{1A}) - (L_2 - L_{2A})$$

C= concentração de ácido ascórbico em mg/100 ml.

Para a determinação de vitamina C em cada amostra, pesou-se 5 g da amostra em um bécker. Adicionou-se 40 ml de ácido oxálico 0,4% e agitou-se por 5 minutos. Transferiu-se a mostra para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com ácido oxálico. Filtrou-se a solução em papel de filtro qualitativo e procedeu-se como no preparo da curva padrão para determinação de L_1 e L_2 . Transferiu-se 1 ml do filtrado para dois tubos de ensaio, em um deles adicionou-se 9 ml de água destilada e zerou-se novamente o aparelho com esta solução. No outro tubo, adicionou-se 9 ml de DFI e realizou-se a leitura L_2 . Adicionou-se a este tubo de ensaio alguns cristais de ácido ascórbico e realizou-se a leitura L_{2A} . Expressou-se o resultado em mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra.

4.4.11 Fenóis Totais

Para a determinação dos taninos utilizou-se a metodologia descrita por REICHER, SIERAKAWSKI E CORRÊA (1981). Preparou-se o reagente fosfotungstíco-fosfomolibdico conforme descrito por REICHER et al (1981). Para a determinação dos fenóis totais, os padrões (ácido tânico), para a construção da curva, e 5 g das amostras foram previamente diluídos, adicionou-se 3 ml do reagente fosfotungstíco, 5 ml de carbonato de sódio a 25% e diluiu-se para 50 ml. Após 30 minutos de repouso, as soluções foram filtradas em papel de filtro qualitativo e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 760 nm. Os resultados foram expressos em g de ácido tânico por 100 g de amostra.

4.4.12 Níveis de Retenção dos Compostos de Interesse

Os níveis de retenção dos compostos de interesse, tais como carotenóides, fenólicos totais e ácido ascórbico, foram calculados segundo a equação 1:

$$RC(\%) = \frac{TC_C(\%) \times \left(\frac{V_C}{V_E} \right)}{TC_E(\%)} \times 100 \quad (1)$$

Equação 1- Níveis de retenção de compostos de interesse, onde: RC = nível de retenção dos compostos de interesse; TC_C = teor dos compostos no concentrado; (V_C/V_E) = relação entre o volume do concentrado, no nível de concentração avaliado, e o volume do extrato inicial; TC_E = teor dos compostos no extrato (EBC).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da aplicação de preparação enzimática na maceração de bagaço em bancada

5.1.1 Influência da razão bagaço: água, concentração enzimática e tempo

A figura 11 e tabela 03 mostram os extratos ordenados com maiores intensidades de coloração amarela obtidos nos experimentos iniciais.

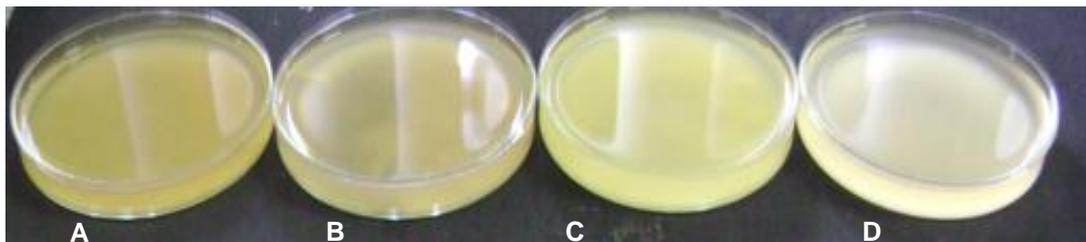


Figura 11 - Extratos ordenados com maiores intensidade de coloração amarela.

Tabela 03- Parâmetros b de cor instrumental dos extratos do bagaço do pedúnculo do caju obtido em bancada.

Tratamentos	Parâmetro b de cor instrumental
A	8,2
B	6,5
C	4,4
D	3,0

As maiores intensidades de coloração amarela foram obtidas, respectivamente, no extrato aquecido à temperatura de 30°C, com 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico,

na proporção de 1:1 (peso de bagaço: água) (condição A, figura 11 A); extrato do bagaço do pedúnculo do caju obtido sem enzima, à temperatura de 30°C, na proporção de 1:1 (peso de bagaço: água) (condição B, figura 11 B); extrato do bagaço do pedúnculo do caju obtido à temperatura de 30°C, com 250 ppm de complexo enzimático pectinolítico, na proporção de 1:2 (peso de bagaço: água) (condição C, figura 11 C) e extrato do bagaço do pedúnculo do caju obtido sem enzima, à temperatura de 30°C, na proporção de 1:2 (peso de bagaço: água) (condição D, figura 11 D).

No extrato do bagaço do pedúnculo do caju obtido na condição A, o complexo enzimático pectinolítico, em conjunto com a força mecânica impressa pela prensagem do bagaço, agiu sobre a fibra do caju hidrolisando as unidades de ácido poligalacturônico e liberando uma maior quantidade de pigmentos carotenóides, esse extrato também se encontrava menos diluído devido à proporção de água: bagaço ser de 1:1. O extrato obtido na condição B foi o segundo extrato com maior intensidade de coloração amarela, pois o pigmento encontrava-se menos diluído do que os obtidos na proporção 1:2 (bagaço: água), além do que a força mecânica da prensa agindo sobre o bagaço contribuiu para a liberação de parte dos pigmentos carotenóides. Já o extrato obtido na condição C foi o terceiro a apresentar maior intensidade de coloração amarela, nesse extrato a concentração enzimática foi menor, houve, dessa forma, menor ação das enzimas sobre a fibra do caju para a liberação de pigmentos carotenóides, além do que, nesses extratos os pigmentos encontravam-se mais diluídos, proporção 1:2 (bagaço: água). O extrato que apresentou menor intensidade de coloração amarela foi o obtido na condição D, pois neste extrato, os pigmentos carotenóides encontravam-se mais diluídos e houve somente a ação mecânica da prensagem sobre o bagaço, já que não apresentou a adição de enzimas.

ÇINAR (2005) estudou o efeito da aplicação de 1.0 ml de pectinase/ 100 g de material na extração de pigmentos carotenóides analisados por método espectrofotométrico provenientes de cenouras, casca de laranja e batata doce e observou que houve maior teor de pigmentos carotenóides nos experimentos conduzidos por 24 horas de maceração enzimática, indicando que a aplicação de enzimas maximizou a obtenção desses pigmentos. SUN *et al.* (2005) estudou a concentração enzimática de Pectinex Ultra SPL e de Pectinex Smash XXL para otimizar a extração de compostos carotenóides de cenoura e observou que a melhor condição foi obtida na concentração de 0,10% de Pectinex XXL em relação ao peso de cenoura utilizado no experimento. AZEREDO *et al.* (2006) estudou a ação de 1000 mg/Kg de

preparado enzimático de Pectinex Ultra SPL macerado por uma hora para a obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju e após a realização de cinco prensagens, obteve um ganho de 29,57%, em relação ao somatório dos teores de carotenóides, ao longo das extrações. Já a maceração e prensagem, realizadas somente com água, para a obtenção desses pigmentos resultaram em um somatório 20,97% de carotenóides ao longo das prensagens. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, onde houve maior intensidade de coloração amarela nos extratos obtidos com enzimas.

5.1.2 Temperatura

A tabela 04 contém os resultados de parâmetros *b* de cor instrumental para os extratos obtidos em escala de bancada:

Tabela 04- Valores de parâmetro *b* de cor instrumental dos extratos iniciais.

Condição	Parâmetro <i>b</i> de cor instrumental
30°C, 500 ppm, 1 hora, 1:1 (A)	27,7
40°C, 500 ppm, 1 hora, 1:1 (B)	23,3
30°C, sem enzimas, 1 hora, 1:1 (C)	20,31

As maiores intensidades de coloração amarela foram obtidas, respectivamente, no extrato processado na condição A; seguido pelo extrato obtido na condição B; e por último, extrato obtido na condição C (tabela 04).

O extrato obtido na condição A, apresentou maior coloração amarela, devido, provavelmente, ao maior teor de compostos carotenóides. Já o extrato obtido na condição B apresentou menor intensidade de coloração amarela do que o extrato processado nas mesmas condições a 30°C. Isso ocorre porque os carotenóides são compostos termolábeis e facilmente oxidáveis e embora a temperatura de tratamento não tenha sido muito elevada, o tempo de permanência de uma hora nessa temperatura fez com que parte desses compostos se degradassem. Os extratos obtidos nas condições C apresentaram menores intensidades de coloração amarela do que os obtidos com enzimas, condições A e B, isso, provavelmente

ocorreu porque não houve ação do preparado enzimático na parede celular da célula vegetal, hidrolisando os compostos de parede e facilitando a extração desses compostos (tabela 04).

Já os extratos mantidos por duas e três horas no banho-maria também apresentaram degradação desses compostos, devido, certamente, ao tempo prolongado de processamento, o que fez com que esses extratos apresentassem menor intensidade de coloração amarela.

AZEREDO *et al.* (2006) utilizou uma temperatura de 30°C durante a maceração enzimática do bagaço do caju para a obtenção do extrato contendo pigmentos carotenóides, que segundo a autora é a temperatura ótima do complexo enzimático pectinolítico, confirmando os resultados obtidos neste trabalho. Já SUN *et al.* (2005), estudando a obtenção de compostos carotenóides provenientes de cenoura, incubou a polpa a uma temperatura de 40-45°C, considerada a temperatura ótima pelo autor. No entanto, a polpa de cenoura foi previamente branqueada em água, o que faz com que os tecidos vegetais fiquem mais amolecidos para ação das enzimas, o que diminuiu o tempo de maceração para 40 minutos, diminuindo o tempo de exposição desses compostos a essa temperatura, enquanto que a constituição da parede celular do bagaço do caju é mais fibrosa, diminuindo o acesso do complexo enzimático pectinolítico, necessitando, dessa forma, de mais tempo de permanência na temperatura de 40°C, o que pode ter levado à degradação de parte desses compostos, fenômeno que ocorreu, simultaneamente, à provável oxidação dos compostos pelo oxigênio.

5.2 Avaliações da obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo de caju (EBC)

5.2.1 Avaliação do número de extrações sucessivas

A figura 12 apresenta os valores dos parâmetros b de cor instrumental para sucessivas prensagens do bagaço do pedúnculo do caju:

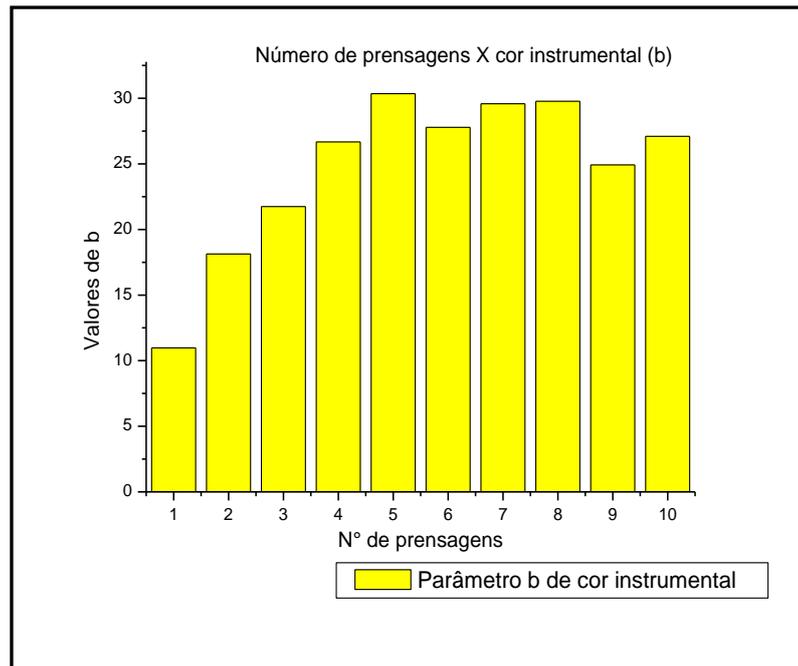


Figura 12 - Gráfico do número de prensagens versus parâmetro b de cor instrumental para a obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju.

O parâmetro b de cor instrumental, que foi positivo em todas as prensagens, indicando coloração amarela, foi crescente até a quinta prensagem, apresentou-se praticamente constante nas prensagens de número seis, sete e oito e diminuiu nas prensagens nove e dez. Dessa forma, realizaram-se cinco extrações sucessivas, devido aos valores crescentes desse parâmetro (figura 12).

AZEREDO *et al.* (2006) e BARRETO *et al.* (2007) em seus estudos objetivando extrair compostos carotenóides de bagaço de caju também utilizaram cinco passagens do bagaço pela prensa, nas quais obtiveram melhores resultados.

5.2.2 Avaliação da aplicação de preparado enzimático para obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (EBC)

5.2.2.1 Efeito da presença de preparado enzimático e da temperatura na obtenção de compostos carotenóides a partir do extrato do bagaço do pedúnculo do caju

Os teores de carotenóides nos extratos obtidos nas diferentes condições estudadas se encontram na figura 13.

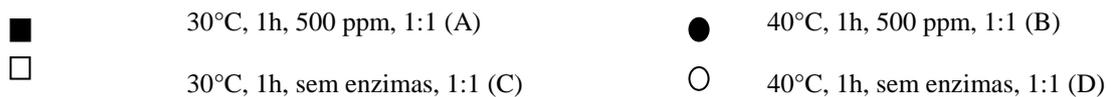
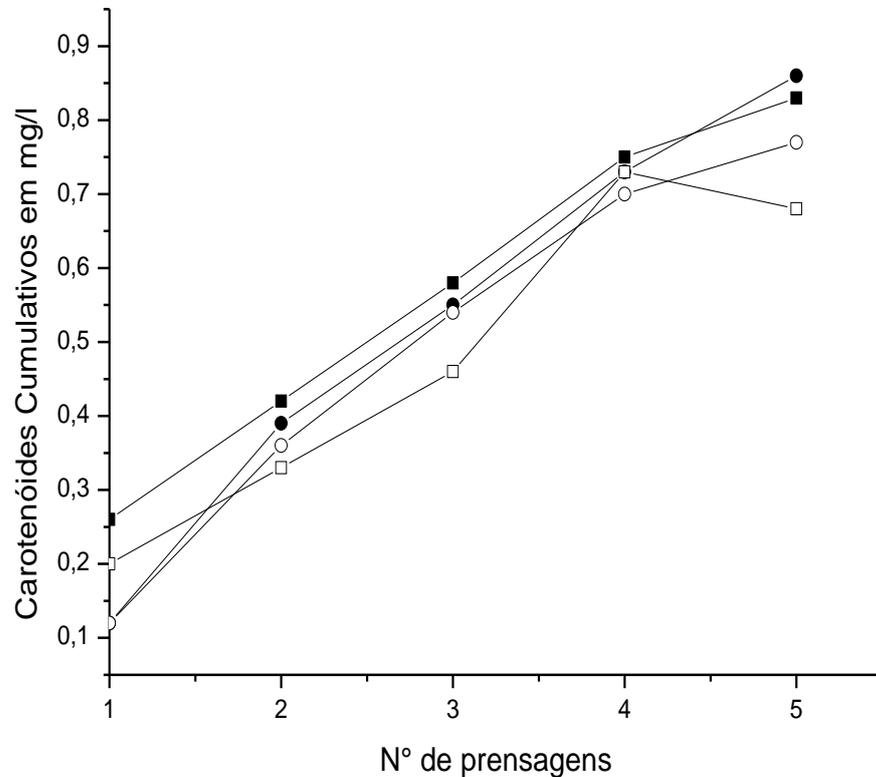


Figura 13 – Teores de Carotenóides em mg/l dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.

Nos extratos obtidos com 500 ppm complexo enzimático pectinolítico, nas temperaturas de 30°C (condição A) e 40°C (condição B), macerados por uma hora, na proporção de 1:1 (bagaço: água) os valores de carotenóides totais, expressos em β -caroteno, foram semelhantes. Dessa forma, observou-se que nas duas temperaturas houve ação do complexo enzimático pectinolítico aplicado em bagaço de caju, já que estes experimentos apresentaram maiores teores de carotenóides, indicando que houve uma maior hidrólise dos tecidos celulares da fibra de caju nestas temperaturas, liberando maior teor de carotenóides (figura 13).

O extrato obtido condições A, apresentou valores maiores de carotenóides do que os obtidos nas mesmas condições, sem enzimas (condição C), apresentando, na quinta prensagem, um ganho de 18%. Já nos extratos obtidos nas condições B, os valores de carotenóides foram semelhantes até a quarta prensagem, aos dos extratos processados nas mesmas condições sem enzimas (condição D), havendo um ganho de 10,5% na condição B em relação aos valores obtidos na condição D, na quinta prensagem (figura 13).

Com relação aos extratos processados sem enzimas, os extratos obtidos nas condições D, apresentaram, na quinta prensagem um ganho de 11,7%, em relação aos extratos obtidos nas condições C. Isso foi provavelmente, devido à maior ação da temperatura de 40°C sobre os tecidos celulares da fibra do caju, condição em que a fibra do caju ficou mais amolecida do que na temperatura de 30°C, facilitando a expulsão do conteúdo intracelular durante a prensagem, onde se encontravam os pigmentos carotenóides (figura 13).

Segundo ÇINAR (2005) celulasas e pectinases hidrolisam a pectina e celulose liberando carotenóides da parede da célula vegetal e aumentando a eficiência da extração. O autor estudou a concentração de pigmentos carotenóides, pela medição dos valores de absorvância, obtidos a partir de cenouras, batata doce e casca de laranja macerados por 6, 12, 18 e 24 horas com uma concentração de 100 ppm de pectinases por Kg de material, em casca de laranja e em batata doce, obtendo valores de absorvância cumulativos de 2,4 e 1,4, respectivamente. Já em cenouras, o autor utilizou uma combinação de 1000 ppm de pectinases e 50 ppm de celulasas por cada Kg de material, obtendo uma absorvância cumulativa de 1,15. Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente. Observou-se que os extratos do bagaço do pedúnculo do caju obtidos com 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico macerados por uma hora nas temperatura de 30 e 40°C apresentaram, valores de absorvância de cumulativas de 2,16 e 2,24, respectivamente. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos pelo autor em casca de laranja, no entanto, no presente experimento, a maceração enzimática foi somada ao efeito mecânico da prensagem, o que resultou em resultados semelhantes em tempo de maceração menor, 1 hora.

AZEREDO *et al.* (2006) estudou a extração de pigmentos carotenóides por cinco prensagens sequenciais e adição de 1000 mg de Pectinex Ultra SPL/ Kg de bagaço de pedúnculo de caju e encontrou uma eficiência global em somatório dos carotenóides totais ao longo das prensagens de 29,57%. Já no experimento em que o bagaço foi submetido ao congelamento, adicionado à mesma quantidade de enzimas e prensado cinco vezes, a

eficiência global foi de 46,72%. Segundo a autora, o bagaço de pedúnculo de caju continha uma concentração inicial de 27 mg/kg de carotenóides.

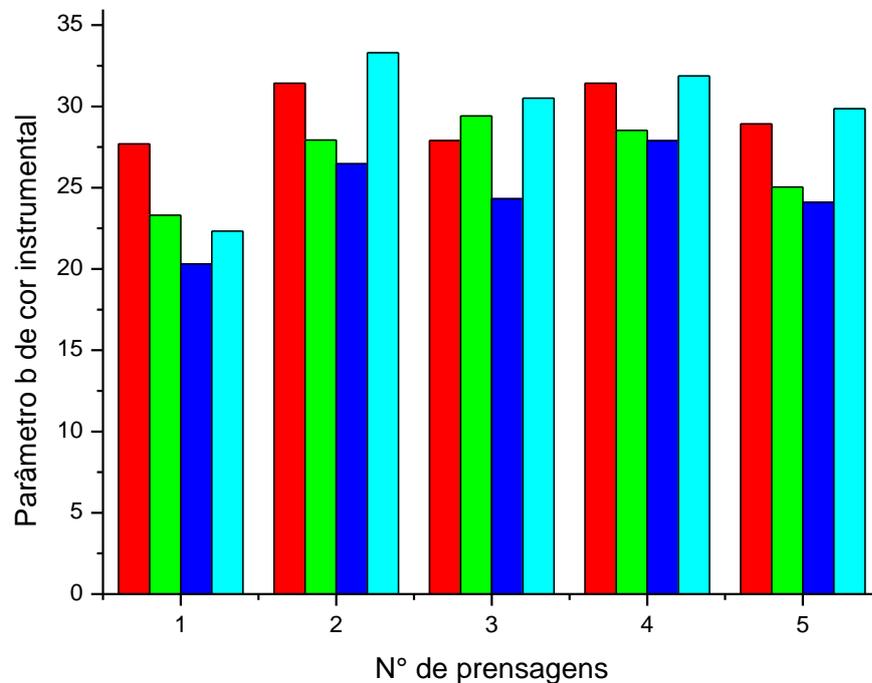
BARRETO *et al.* (2007), acompanhou o grau de retenção de compostos bioativos, como carotenóides totais, em mistura dos extratos do bagaço do pedúnculo do caju bruto, concentrado e no retentado, resultantes de cinco ciclos de prensagem/diluição e filtrado, encontrando um teor significativamente maior de carotenóides no retentado, devido ao caráter lipofílico destes compostos, os mesmos praticamente não foram extraídos durante a prensagem, permanecendo preferencialmente no retentado. Foram detectados traços de carotenóides no extrato bruto da safra de caju colhidos em 2005, e apenas um baixo teor foi detectado no extrato concentrado. O teor de carotenóide médio encontrado no retentado foi de 43,3 μg , enquanto que o valor encontrado nos extratos brutos na safra de 2005 foi de 0,02 μg e nas safras de 2007 foi de 0,9 μg . Os valores encontrados neste trabalho foram maiores do que os obtidos pelo autor em até 100 vezes (900 μl), pois o processo de prensagem foi auxiliado pela adição do complexo enzimático pectinolítico.

Assunção e Mercadante (2002) estudaram diferentes variedades de pedúnculo de caju vermelho e amarelo coletados no Brasil, sendo três variedades provenientes da Região Nordeste, estado do Piauí, e duas provenientes da Região Sudeste, estado de São Paulo. A autora observou que β -caroteno e β -cryptoxantina foram os carotenóides presentes em maior quantidade nas variedades provenientes da região Nordeste, encontrando valores totais de carotenóides de $174 \pm 39,7 \mu\text{g}/100\text{g}$ para o caju amarelo, $204 \pm 41,5 \mu\text{g}/100\text{g}$ para o caju vermelho e $119 \pm 16,7 \mu\text{g}/100\text{g}$ para o caju vermelho redondo.

ROMAN-SALGADO *et al.* (2008) estudou a aplicação de enzimas não comerciais em pimenta-malagueta para obtenção de carotenóides por método espectrofotométrico e encontrou valores superiores em 110% em relação ao grupo controle, sem adição de enzimas, encontrando 7,1 g de carotenóides/ kg de material na pimenta tratada enzimaticamente.

Para o acompanhamento do efeito da aplicação do complexo enzimático pectinolítico para a obtenção de compostos carotenóides foram realizadas as análises de cor instrumental, perda de massa, açúcares redutores, sólidos solúveis totais, pH, perfil granulométrico, teores de pectina, celulose e hemicelulose, teores de miricetina, kaempferol e quercetina.

A figura 14 mostra os valores de parâmetro *b* de cor instrumental para os extratos estudados.



- 30°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (A)
- 40°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (B)
- 30°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (C)
- 40°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (D)

Figura 14 – Valores dos parâmetros *b* de cor instrumental dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.

Os valores *b* de cor instrumental, assim como os teores de carotenóides, foram maiores nos extratos obtidos na condição A do que nos extratos obtidos nas condições B, com exceção da terceira extração. Essas diferenças dos valores de parâmetro *b* de cor instrumental foram mais expressivas nas primeiras e segundas extrações, onde se observou uma maior ação do complexo enzimático pectinolítico, já que o preparado foi adicionado antes da primeira prensagem e esse efeito foi combinado ao mecânico da prensagem. Isso facilita a dilaceração dos tecidos celulares expulsando os compostos carotenóides e aumentando a intensidade de coloração amarela (figura 14).

Nos extratos obtidos nas condições A, em todas as prensagens, os valores dos parâmetros b de cor instrumental foram maiores do que os extratos obtidos nas condições C, com exceção da terceira prensagem, na qual os valores foram próximos. Isso provavelmente deveu-se ao à ação combinada das enzimas com o efeito mecânico da prensagem, liberando os compostos intracelulares dos tecidos vegetais da fibra do caju, onde se encontram os carotenóides (figura 14).

Nos extratos processados nas condições B e D, os maiores valores de parâmetro b de cor instrumental foram obtidos nos extratos incubados sem enzimas, indicando que apesar de haver uma ação enzimática pectinolítica nesta temperatura, essa ação não foi tão expressiva quanto à observada na condição A. Esses resultados diferiram dos resultados obtidos para carotenóides, provavelmente por essa ser uma análise instrumental, onde parâmetros como luminosidades interferem em seus resultados (figura 14).

Já nos extratos obtidos sem adição de complexo enzimático pectinolítico, condições C e D, observou-se que, semelhantemente aos valores obtidos para carotenóides, os maiores valores de parâmetro b de cor instrumental foram obtidos nas condições D, devido ao efeito da temperatura de 40°C, em que foi processado esse extrato, sobre a fibra do bagaço do pedúnculo do caju, que favoreceu ao amolecimento da fibra aquecida em água durante a incubação, facilitando a dilaceração dos tecidos pela prensa no momento das extrações (figura 14).

BARRETO *et al.* (2007) estudaram os parâmetros a^* , b^* e L^* de cor instrumental para o extrato bruto proveniente do bagaço do pedúnculo do caju e encontrou valores de b^* iguais a 23,1. Todos os valores encontrados neste trabalho para os extratos obtidos com enzimas foram superiores ao encontrado pelos autores, indicando que ação do complexo facilitou a extração desses compostos. Segundo os autores, o principal carotenóide encontrado no extrato foi o *all-trans-β*-criptoxantina, seguido pelo *all-trans-β*-caroteno, que possuem coloração entre o amarelo e o laranja, contribuindo para um maior valor de b^* .

A figura 15 representa os teores de perda de massa em percentagem dos extratos estudados.

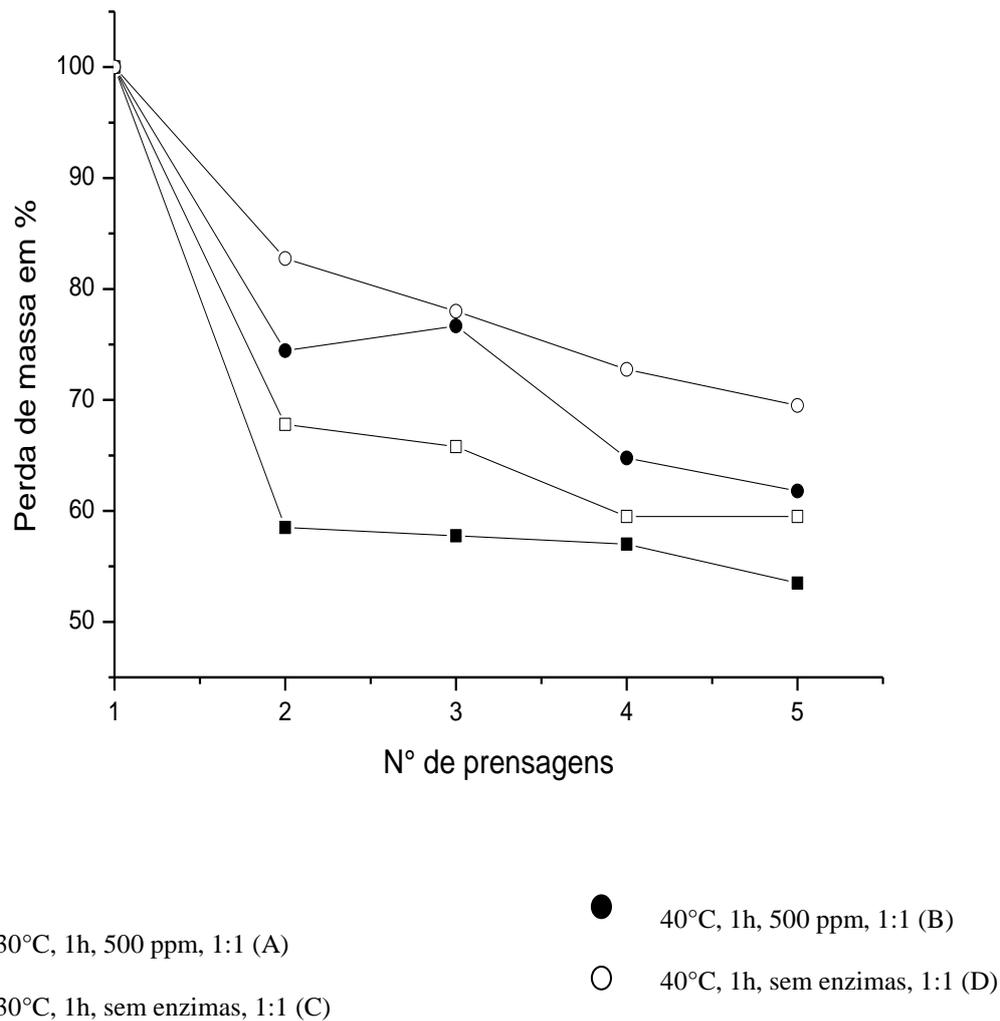


Figura 15 – Teores de perda de massa em porcentagem dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.

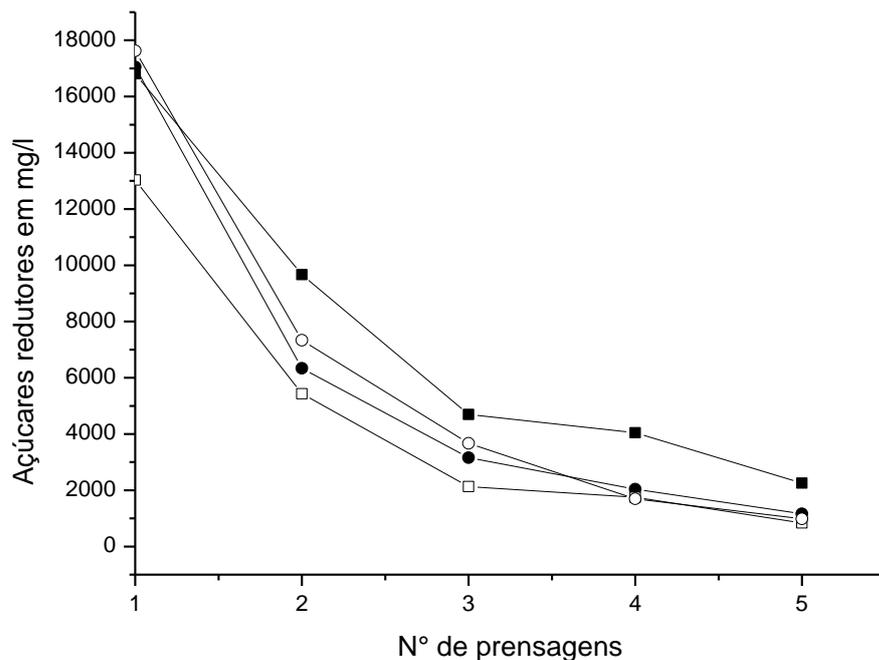
Os extratos obtidos com adição de complexo enzimático pectinolítico (condições A e B) apresentaram maior percentagem de perda de massa do que os seus respectivos grupos controles, sem adição de preparado enzimático (condições C e D). Isso provavelmente deveu-se à ação combinada das enzimas pectinolíticas à força mecânica da prensa sobre a fibra do caju, dilacerando a célula e liberando o seu conteúdo intracelular, ocasionando maior perda de líquido pelas células e aumentando a perda de massa nos extratos adicionados de enzimas (figura 15).

O extrato obtido no experimento A apresentou maior teores de perda de massa do que os processados nas condições B. Esse fato pode ser explicado pela ação do preparado enzimático pectinolítico em função da temperatura. No experimento conduzido na condição

A, temperatura de 30°C, pode ter ocorrido um melhor desempenho do complexo enzimático pectinolítico do que no experimento conduzido na temperatura de 40°C (condição B), ocasionando uma maior perda de massa (figura 15).

Durante a obtenção dos extratos do bagaço do pedúnculo do caju, os maiores teores de perda de massa em percentagem, entre os extratos obtidos sem enzimas, foram encontrados, respectivamente, nos extratos obtidos nas condições C e D. Esse fato deveu-se a ação da força mecânica impressa pela prensa durante o processamento, liberando o conteúdo de líquido contido nos cloroplastos, no qual se encontravam os carotenóides (figura 15).

A figura 16 representa os teores de açúcares redutores dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.



- | | | | |
|---|--------------------------------|---|--------------------------------|
| ■ | 30°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (A) | ● | 40°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (B) |
| □ | 30°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (C) | ○ | 40°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (D) |

Figura 16 – Teores de açúcares redutores em mg/l dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.

Dentre os extratos obtidos com adição de preparado enzimático pectinolítico, o que apresentou maior teor de açúcares redutores foi o processado nas condições A, indicando que houve maior ação de hidrólise das enzimas pectinolíticas na pectina presente na parede celular nessas condições. A hidrólise dos componentes de parede celular levou a uma maior concentração de açúcares redutores, havendo a redução dos polissacarídeos presentes na parede celular que compõe a fibra de caju. Já nos extratos obtidos nas condições B, os teores de açúcares redutores foram menores do que os valores obtidos na temperatura de 30°C. Observou-se que ao longo das prensagens, os valores de açúcares redutores foram diminuindo gradativamente, indicando que os extratos foram ficando mais pobres nesses compostos (figura 16).

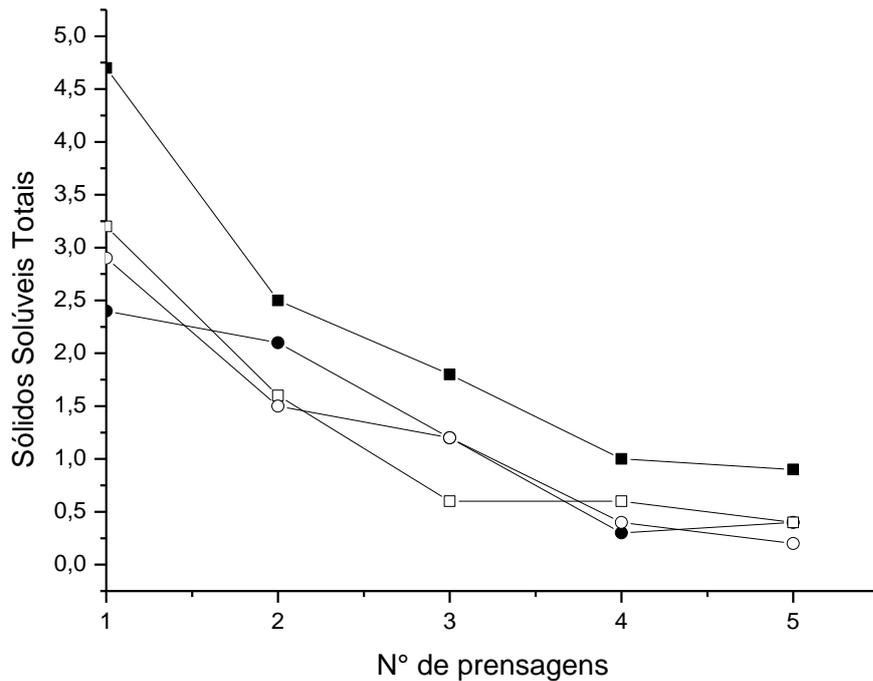
Dentre os processos estudados, observou-se que os extratos obtidos na condição A, apresentou maior teor de açúcares redutores do que os extratos dos grupos controles, sem enzimas (condição C). Esse mesmo comportamento não foi observado nos extratos processados nas condições B e D, onde os extratos obtidos com enzimas apresentaram menores teores de açúcares redutores do que os grupos controles, sem enzimas. Dessa forma, houve um melhor desempenho do complexo enzimático pectinolítico, quando adicionado ao bagaço de caju, na temperatura de 30°C (figura 16).

O teor de açúcares redutores nos extratos obtidos sem adição de complexo enzimático pectinolítico foram maiores nos extratos obtidos nas condições D e B, respectivamente. Os açúcares presentes nos extratos obtidos sem enzimas são resultantes, somente, dos açúcares aderidos nas fibras do caju restantes da extração do suco, já que não houve ação das enzimas pectinolíticas na parede celular da fibra do caju durante a obtenção desses extratos (figura 16).

Segundo Çinar (2005), a utilização de pectinases e celulases para a hidrólise da pectina e celulose presente na parede celular ocasiona um aumento na produção de açúcares. Brandão *et al.* (2003) estudando a composição química de pedúnculos de caju *in natura*, encontrou um valor de 8,1% de açúcares redutores em glicose. Simões *et al.* (2001) estudou a caracterização físico-química de pedúnculos de caju CCP-76 em diferentes estágios de desenvolvimento e encontrou valores compreendidos entre 7,57 a 9,60% para os estágios de maturação mais avançados. Souza Filho *et al.* (1991) estudando a variação de parâmetros físico-químicos em suco de caju clarificado com 120 mg de enzima pectinases adicionada a

700 ppm de gelatina em tempos de armazenagem de zero, 30, 60, 90 e 120 dias, encontrou valores variando entre 8,74 e 9,62% de açúcares redutores.

A figura 17 apresenta os resultados obtidos para os sólidos solúveis totais dos extratos resultantes a partir do bagaço do pedúnculo do caju.



- 30°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (A)
- 40°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (B)
- 30°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (C)
- 40°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (D)

Figura 17 - Teores de sólidos solúveis totais (°Brix) dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.

Os sólidos solúveis totais ou °Brix, representam os sólidos solúveis presentes no extrato que são solúveis em água, sendo constituído, no caso do extrato do bagaço do pedúnculo do caju, em sua maioria por açúcares.

Dentre os extratos obtidos com adição de complexo enzimático pectinolítico, os que apresentaram maiores teores de sólidos solúveis foram os extratos processados nas condições A, indicando que o desempenho do complexo enzimático pectinolítico foi maior na

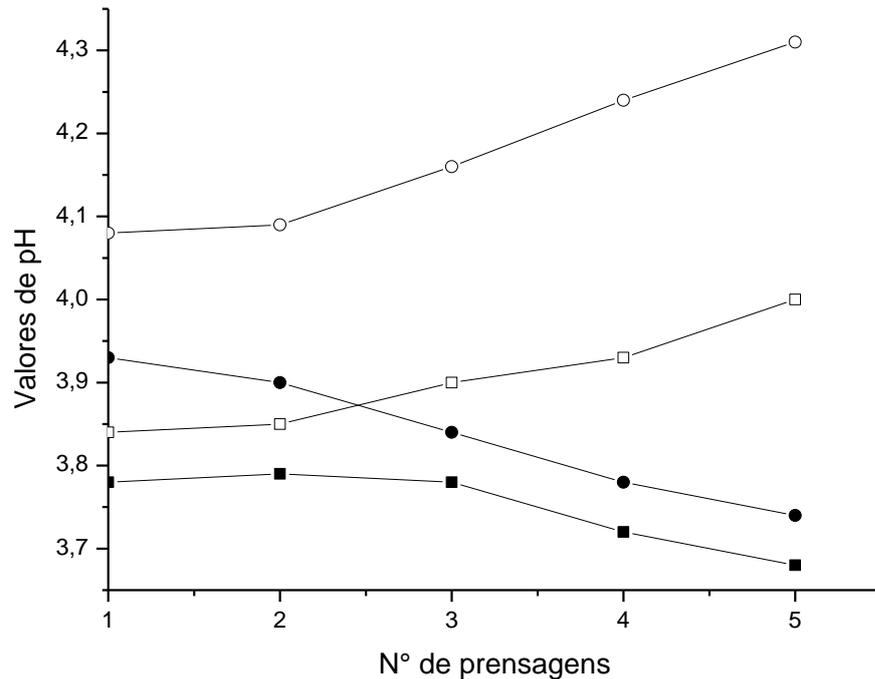
temperatura de 30°C. Isso provavelmente deveu-se à ação de hidrólise que o complexo exerceu sobre a parede celular da fibra do caju, reduzindo os teores de componentes de parede celular, tais como pectinas, celuloses e hemiceluloses a açúcares redutores, aumentando, assim, o teor de sólidos solúveis totais (figura 17).

Os extratos obtidos nas condições B e D apresentaram teores de sólidos solúveis semelhantes a partir da terceira prensagem, o que também ocorreu com os resultados obtidos para açúcares redutores, indicando que, provavelmente, a ação do complexo não foi muito efetiva na temperatura de 40°C, em relação á hidrólise dos componentes de paredes. Já todos os experimentos conduzidos nas condições A apresentaram maiores teores de sólidos solúveis do que os processados nas condições C (figura 17).

Nos extratos obtidos sem adição de complexo enzimático pectinolítico, os valores de sólidos solúveis encontrados nos experimentos C e D foram semelhantes em todas as prensagens, com exceção da terceira, sendo esses teores devido aos sólidos solúveis restantes da extração do suco, adicionados aos obtidos pelo efeito de mecânico de prensagem. Assim como nos resultados obtidos para açúcares redutores, em todos os extratos, ao longo das prensagens, os extratos foram ficando mais pobre em sólidos solúveis totais (figura 17).

Brandão *et al.* (2003) estudaram as características físico-químicas de caju in natura e encontrou valores de sólidos solúveis totais de 9,8° Brix. Lavinas *et al.* (2006) estudou a estabilidade de suco de caju armazenado sob diferentes condições de temperatura, encontrando valores entre 10,50 e 11,67° Brix. Souza Filho *et al.* (1991) estudaram a variação de parâmetros físico-químicos em suco de caju clarificado com 120 mg de enzima pectinaes adicionadas a 700 ppm de gelatina em tempos de armazenagem de zero, 30, 60, 90 e 120 dias e encontrou, no tempo zero, um valor de 10,40 °Brix. Os valores encontrados neste trabalho foram menores do que os encontrados pelos autores supracitados, pois durante a obtenção do extrato do bagaço do pedúnculo do caju, a maior parte dos sólidos solúveis totais já haviam sido extraídos durante a obtenção do suco.

A figura 18 mostra os resultados obtidos para os valores de pH dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.



- 30°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (A)
- 40°C, 1h, 500 ppm, 1:1 (B)
- 30°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (C)
- 40°C, 1h, sem enzimas, 1:1 (D)

Figura 18 – Valores de pH dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju.

Dentre os extratos obtidos com adição de complexo enzimático pectinolítico, os que apresentaram menores valores de pH foram os extratos os processados nas condições A, seguidos pelos extratos obtidos nas condições B. Esses valores permaneceram praticamente constantes até a segunda extração, sofrendo uma leve queda a partir da terceira extração. Isso provavelmente se deveu ao fato de que o complexo enzimático pectinolítico hidrolisou as unidades de ácido poligalacturônico á unidades menores, fazendo com que o pH sofresse um leve declínio a partir da terceira extração. No entanto, observou-se que os valores de pH foram menores na temperatura de 30°C, indicando um melhor desempenho do complexo enzimático pectinolítico nessa temperatura (figura 18).

Já nos extratos obtidos sem adição de preparado enzimático, os maiores valores de pH foram obtidos nas condições de tratamento D, seguido pelos valores obtidos nas condições C. Observou-se que nesses extratos houve um comportamento diferente em relação aos

tratamentos conduzidos com enzimas, havendo uma tendência de crescimento nos valores do pH a partir da terceira prensagem. Isso ocorreu devido à falta do complexo enzimático pectinolítico, não havendo a hidrólise dos ácidos poligalacturônicos presentes na pectina da parede celular (figura 18).

Segundo Uenojo e Pastore (2006), as enzimas pectinolíticas depolimerizantes, como as poligalacturonases, hidrolisam as α -1,4- ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico. Já as pectinas liases catalisam a β - eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram a ligação por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato pectina. Isso, provavelmente, explica os decrescentes valores de pH nas faixas de temperatura entre 30 e 40°C.

Brandão *et al.* (2003) estudaram as características físico-químicas de caju in natura e encontrou valores de pH de 4,01, sendo esse valor maior do que os encontrados nos extratos obtidos com enzimas e do que os valores dos extratos obtidos sem enzimas na temperatura 40°C. No entanto esse valor foi semelhante ao valor obtido no experimento conduzido na temperatura de 30°C, sem adição de enzimas pectinolíticas. Já Simões *et al.* (2001) estudando pedúnculo de caju anão CPP-76 colhidos em diferentes estádios de desenvolvimentos, encontrou valores de pH variando entre 4,50 e 4,70, valores próximos aos encontrados no extrato do bagaço do pedúnculo do caju, obtido na temperatura de 30°C, sem enzimas. Lavinias *et al.* (2006) estudou a estabilidade de suco de caju armazenado sob diferentes condições de temperatura, obtendo valores de pH variando entre 4,27 a 4,32.

A figura 19 representa o perfil granulométrico das frações de bagaço retidas nas peneiras de diferentes aberturas, após a retirada de todo o pigmento e dos componentes solúveis.

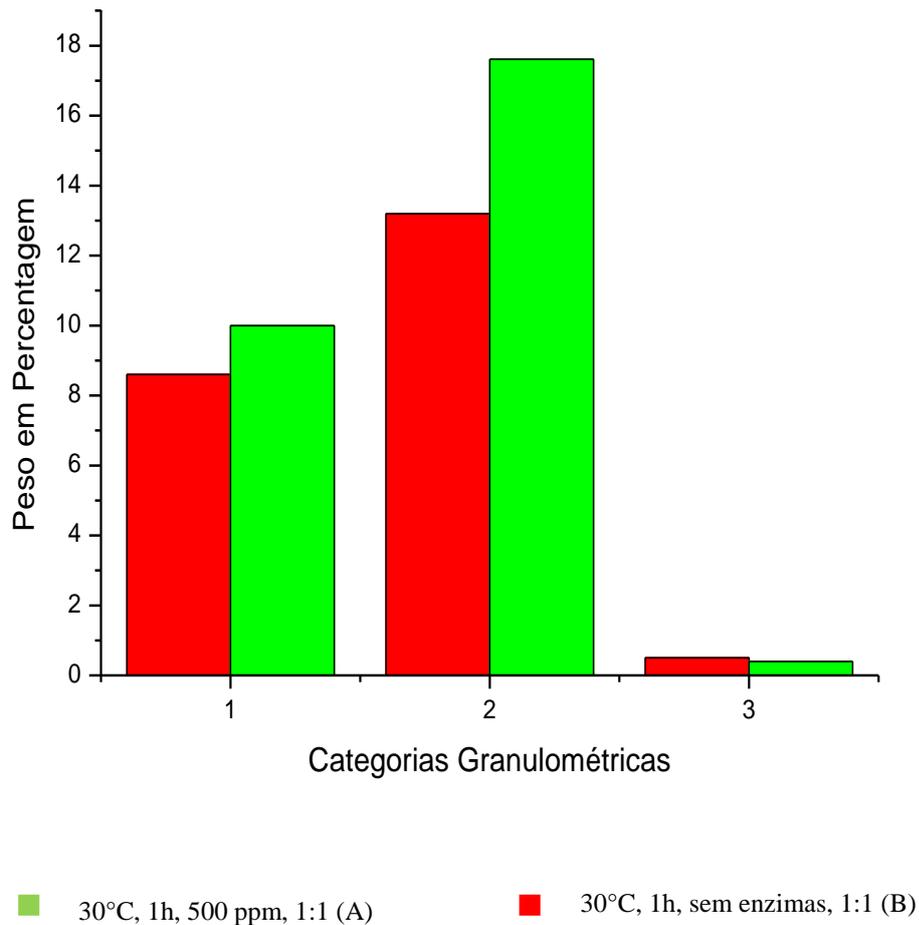


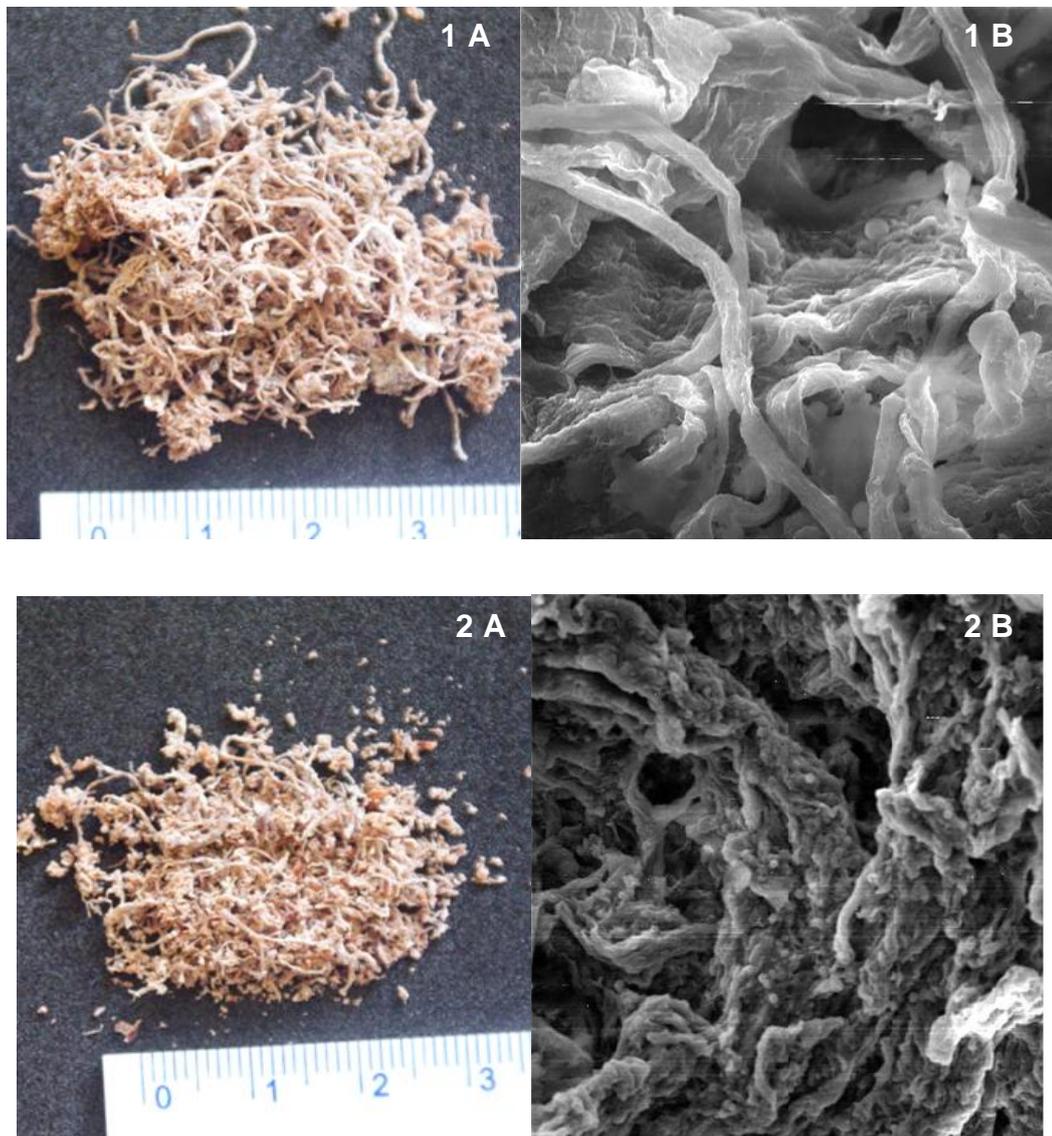
Figura 19 – Perfil granulométrico dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju após a extração do pigmento.

Observou-se que o perfil granulométrico da fibra do bagaço de caju, após a quinta prensagem, nas condições A, apresentou o seguinte comportamento: o tipo 1 representa o bagaço retido nas peneiras de abertura entre 2 e 16 mm, que deteve 10% da massa inicial de 500 g; o tipo 2, representa o bagaço retido nas peneiras de abertura entre 0,25 e 2 mm, que deteve 17,61% da massa inicial e o tipo 3 representa o bagaço retido nas peneiras de abertura menor ou igual a 0,25 mm, que deteve 0,4% da massa inicial. Observou-se que houve uma maior concentração da massa, após a maceração enzimática no tipo 2 (figuras 19 e 20).

Já o perfil granulométrico da fibra do bagaço do caju após a quinta prensagem, nas condições B, apresentou o comportamento descrito a seguir: 8,6% da massa inicial detida

na categoria 1, peneiras de abertura entre 2 e 16 mm; 13,20% detida na categoria 2, peneiras de abertura entre 0,25 e 2 mm e 0,5% detida na categoria 3, peneiras de abertura igual ou menor que 0,25 mm (figuras 19 e 20).

Observou-se que na segunda categoria, fibra retida entre as peneiras de abertura entre 0,25 e 2 mm, houve maior retenção na fibra tratada enzimaticamente, o que superou a fibra sem tratamento enzimático em 4,41%. Isso se deveu ao fato de que a fibra com diâmetro maior, retida nas peneiras de abertura entre 2 e 16 mm, foi hidrolisada pelo complexo enzimático pectinolítico, diminuído assim sua granulometria, já que na condição inicial de maceração não havia a fibra de menor granulometria, que só fez-se presente após a obtenção do AIR (figuras 19 e 20).



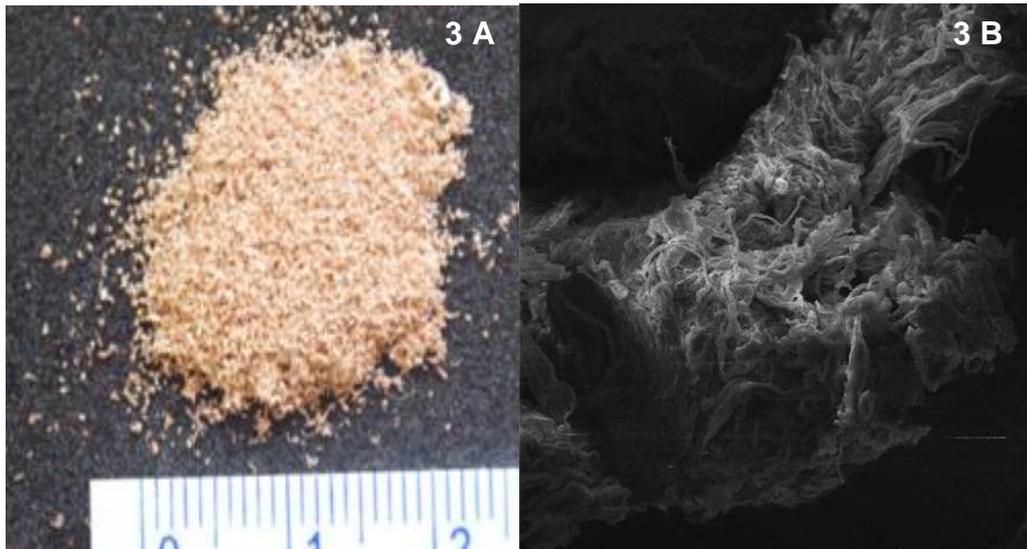


Figura 20 – Diferentes granulometrias dos bagaços tratados com e sem enzimas. 1 A e 1B- O bagaço retido nas peneiras de abertura entre 2 e 16 mm; 2 A e 2 B- O bagaço retido nas peneiras de abertura entre 0,25 e 2 mm; 3 A e 3 B-O bagaço retido nas aberturas igual ou menor que 0,25 mm.

A tabela 05 traz os resultados de pectina, celulose e hemicelulose das diferentes frações do AIR do bagaço do pedúnculo do caju:

Tabela 05 - Teores de pectina, hemicelulose e celulose após a extração de pigmentos e quinta passagem pela prensa nas frações de fibra de caju com e sem tratamento enzimático.

30°C, 1h, 1:1	2< θ <16		0,25< θ <2		$\theta \leq 0,25$	
	C/E	S/E	C/E	S/E	C/E	S/E
Pectina (% em peso seco)	51,75	78,82	56,21	59,26	46,91	40,29
Hemicelulose (% em peso seco)	26,75	18,51	25,28	21,48	40,03	44,71
Celulose + Lignina (% em peso seco)	21,5	2,67	18,51	19,26	13,06	15

Nas fibras de maior granulometria, retidas nas peneiras entre 2 e 16 mm e entre 0,25 e 2 mm, respectivamente, os teores de pectina foram maiores nas fibras que não sofreram tratamento enzimático, pois não houve a ação hidrolítica do complexo enzimático sobre essas fibras. O fato de ter ocorrido uma diminuição no teor de pectina somente nas fibras de maior granulometria, ocorreu porque essas fibras estavam mais expostas à ação das enzimas, devido ao seu maior tamanho, pois embora nas fibras de menor granulometria a superfície de contato fosse maior, facilitando a ação hidrolítica da enzima, no início do processo o bagaço apresentava-se intacto, então a fibra retida nas peneiras de abertura menor ou igual a 0,25 mm só apareceu em maior quantidade após a obtenção do AIR (tabela 05).

Já os teores de hemicelulose foram maiores nas fibras retidas nas peneiras entre 2 e 16 mm e entre 0,25 e 2 mm, na fibra com tratamento enzimático, já na fibra retida no diâmetro igual ou menor a 0,25 mm, o teor de hemicelulose foi maior na fibra tratada sem enzimas. Isso ocorreu porque não houve uma ação tão expressiva da hemicelulase nas fibras de maiores granulometrias, já que o complexo apresenta um maior teor de pectinases (tabela 05).

Já os teores de celulose foram maiores na fibra retida nas peneiras de abertura entre 2 e 16 mm, tratada enzimaticamente, do que na fibra não tratada, devido á pouca a atividade celulásica do complexo enzimático pectinolítico. Já para as frações retidas nas peneiras de abertura entre 0,25 e 2 mm e menor ou igual a 0,25 mm, os teores de celulose foram semelhantes, indicando que as fibras possuíam, nessas granulometrias, teores de celulose semelhantes, já que não houve uma ação tão expressiva do complexo enzimático pectinolítico nessas frações (tabela 05).

5.2.2.2 Influência do tempo de maceração enzimática para a obtenção de compostos carotenóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju

A figura 11 apresenta os valores de carotenóides cumulativos totais expressos em β -caroteno dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerado por uma e duas horas:

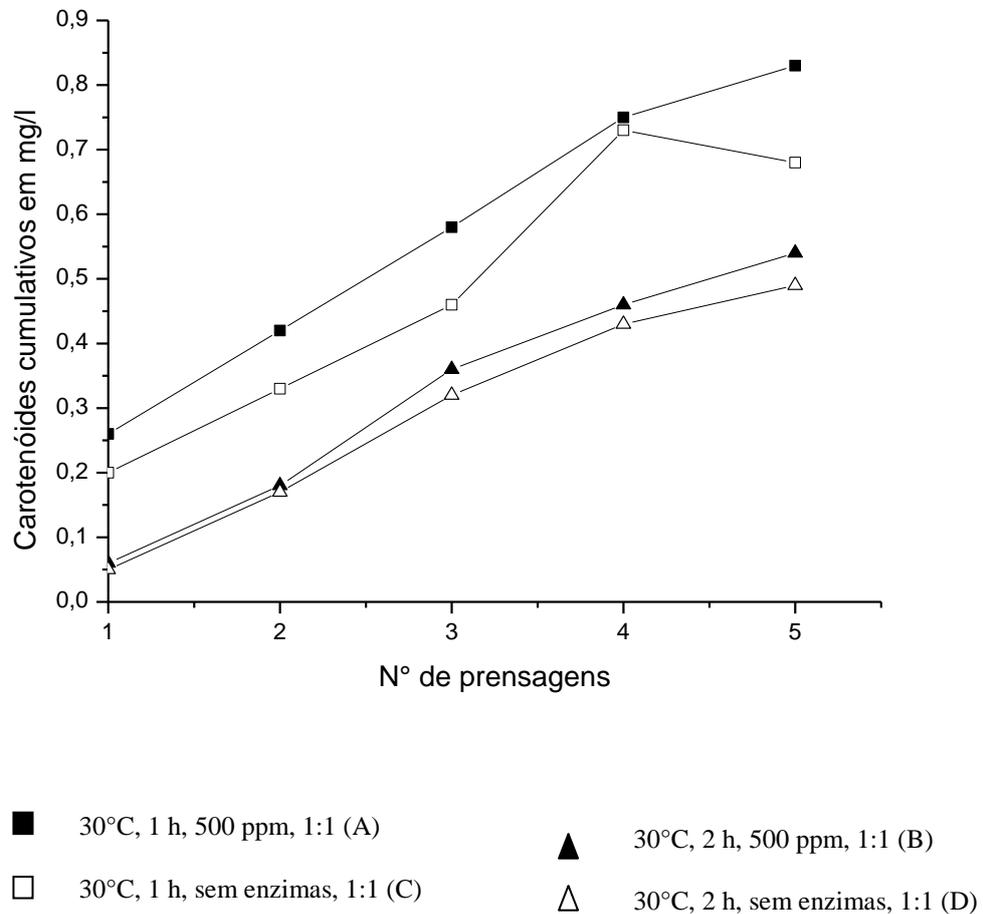


Figura 21 - Teores de Carotenóides em mg/l dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas.

Os maiores valores de carotenóides cumulativos foram encontrados nos extratos processados nas condições A, já os macerados por duas horas apresentaram valores menores. Isso provavelmente ocorreu devido ao tempo prolongado em que a mistura bagaço: água permaneceu nessa temperatura, o que ocasionou a degradação de parte dos compostos carotenóides, diminuindo os seus valores, fenômeno facilitado pela ação de oxigênio. Os extratos processados nas condições A obtiveram valores maiores de carotenóides cumulativos do que os obtidos em seus respectivos grupos controles, experimento C, sem enzimas, com exceção da terceira prensagem. Esse mesmo comportamento não foi encontrado dentre os extratos macerados por duas horas, nos quais os experimentos conduzidos nas condições B e D apresentaram valores semelhantes de carotenóides (figura 21).

Dentre os extratos obtidos sem enzimas, os extratos obtidos nas condições C apresentaram maiores valores de carotenóides do que os extratos processados nas condições D. Esses resultados confirmam os resultados obtidos nos extratos com enzimas, experimentos A e B, onde o prolongado tempo de incubação, provavelmente, facilitou a oxidação dos compostos carotenóides pela ação do oxigênio, além do que o prolongado tempo de permanência na temperatura de 30°C, embora branda, pode ter degradado parte desses compostos, que são termolábeis (figura 21).

Para o acompanhamento do tempo de maceração enzimática para a obtenção de compostos carotenóides foram realizadas as análises de cor instrumental, perda de massa, açúcares redutores, sólidos solúveis totais, pH, quercetina miricetina e kaempferol.

A figura 22 mostra os valores obtidos de parâmetro *b* de cor instrumental para os extratos macerados por uma e duas horas.

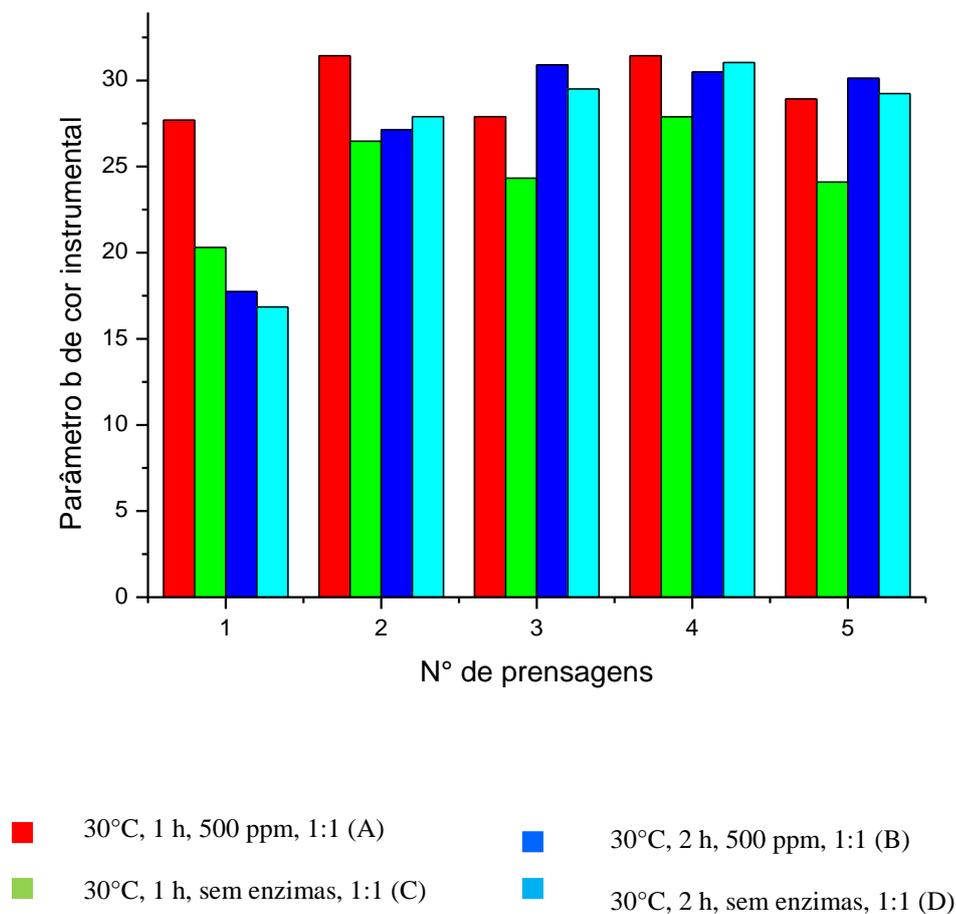


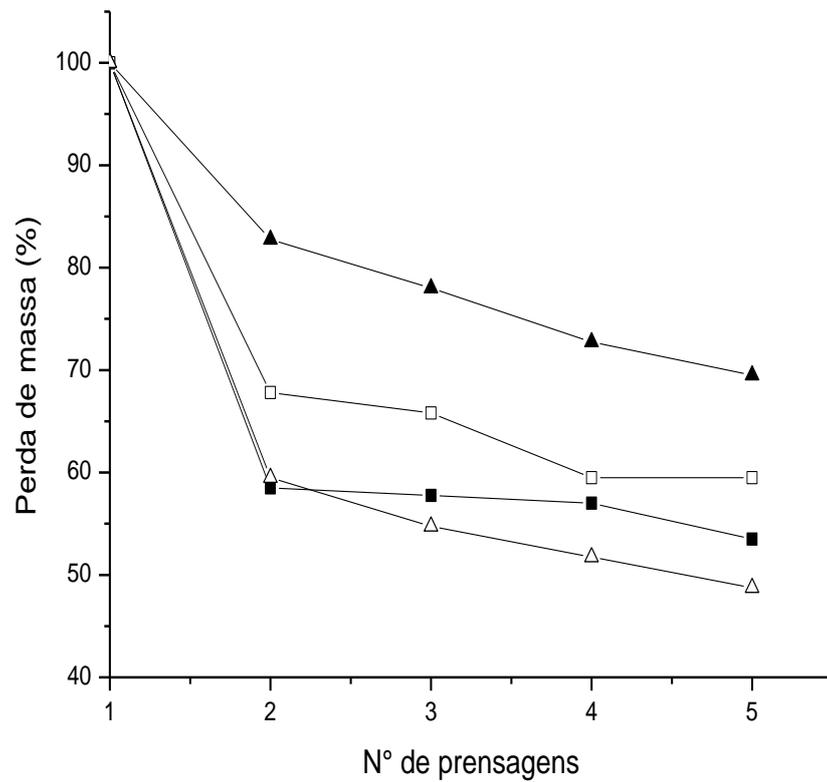
Figura 22 - Valores dos parâmetros b de cor instrumental dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas.

Os extratos obtidos nas condições A apresentaram maiores valores de parâmetro b de cor instrumental do que os macerados nas condições B, com exceção das terceira e quinta extrações, onde esses valores foram semelhantes. Esses valores foram maiores principalmente, nas primeiras e segundas extrações, onde se observou a maior ação das enzimas pectinolíticas, já que o complexo foi adicionado antes da primeira prensagem. Os valores obtidos para os parâmetros b de cor instrumental confirmam os valores de carotenóides obtidos nesses extratos (figura 22).

Nos extratos obtidos sem adição de complexo enzimático pectinolítico, nas condições D, os valores de parâmetro b de cor instrumental foram maiores, com exceção da primeira extração, onde esses valores foram menores do que os obtidos nas condições C e na segunda prensagem, nas quais esses valores foram semelhantes (figura 22).

Já nos extratos macerados por uma e duas horas, sem enzimas, condições B e D, os valores dos parâmetros b de cor instrumental, foram semelhantes, indicando que o tempo de permanência de duas horas de incubação não aumentou a obtenção desses compostos durante as prensagens (figura 22).

A figura 23 apresenta os valores obtidos para perda de massa durante a obtenção dos extratos do bagaço do pedúnculo do caju, macerados por uma e duas horas.



- | | | | |
|---|---------------------------------|---|---------------------------------|
| ■ | 30°C, 1 h, 500 ppm, 1:1 (A) | ▲ | 30°C, 2 h, 500 ppm, 1:1 (B) |
| □ | 30°C, 1 h, sem enzimas, 1:1 (C) | △ | 30°C, 2 h, sem enzimas, 1:1 (D) |

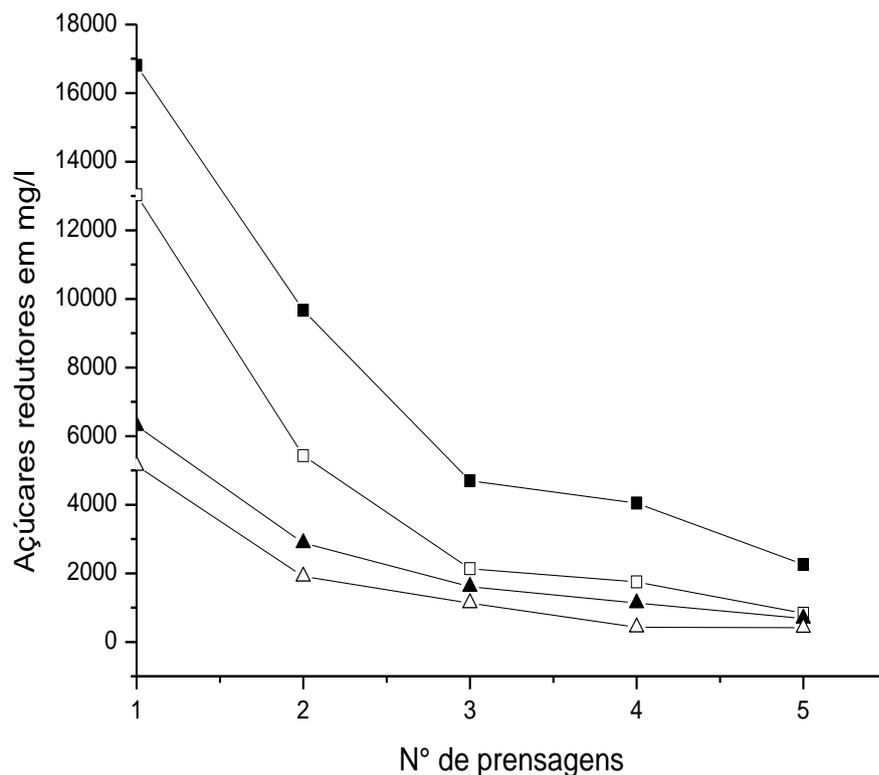
Figura 23 – Valores de perda de massa em porcentagem dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas.

Os extratos que apresentaram maiores teores de perda de massa foram os obtidos nas condições D, isso certamente pode ser explicado pelo tempo de permanência em banho-maria, duas horas de incubação, esse tempo mais prolongado fez com as fibras do bagaço do caju ficassem mais amolecidas e liberassem maior conteúdo intracelular durante as prensagens. Já os extratos obtidos nas condições B, com enzimas, apesar de apresentarem adição de preparado enzimático, apresentaram menores teor de perda de massa dentre os experimentos estudados. Provavelmente, esse fato ocorreu porque houve a desnaturação e desestabilização do complexo enzimático pectinolítico, fazendo com que as enzimas perdessem parte ou totalmente a sua atividade (figura 23).

Dentre os extratos obtidos com enzimas, os que apresentaram maiores teores de perda de massa foram os processados nas condições A, já que os extratos obtidos nas condições B, foram incubados por duas horas, diminuindo ou inativando a ação do complexo enzimático pectinolítico (figura 13).

Já dentre os extratos processados sem enzimas, os obtidos nas condições D apresentaram maiores valores de perda de massa do que os processados nas condições C, devido ao maior amolecimento dos tecidos, ocasionado pelo maior tempo de incubação a 30°C (figura 23).

A figura 24 apresenta os resultados obtidos para açúcares redutores dos extratos produzidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas.



■ 30°C, 1 h, 500 ppm, 1:1 (A)
 □ 30°C, 1 h, sem enzimas, 1:1 (C)

▲ 30°C, 2 h, 500 ppm, 1:1 (B)
 △ 30°C, 2 h, sem enzimas, 1:1 (D)

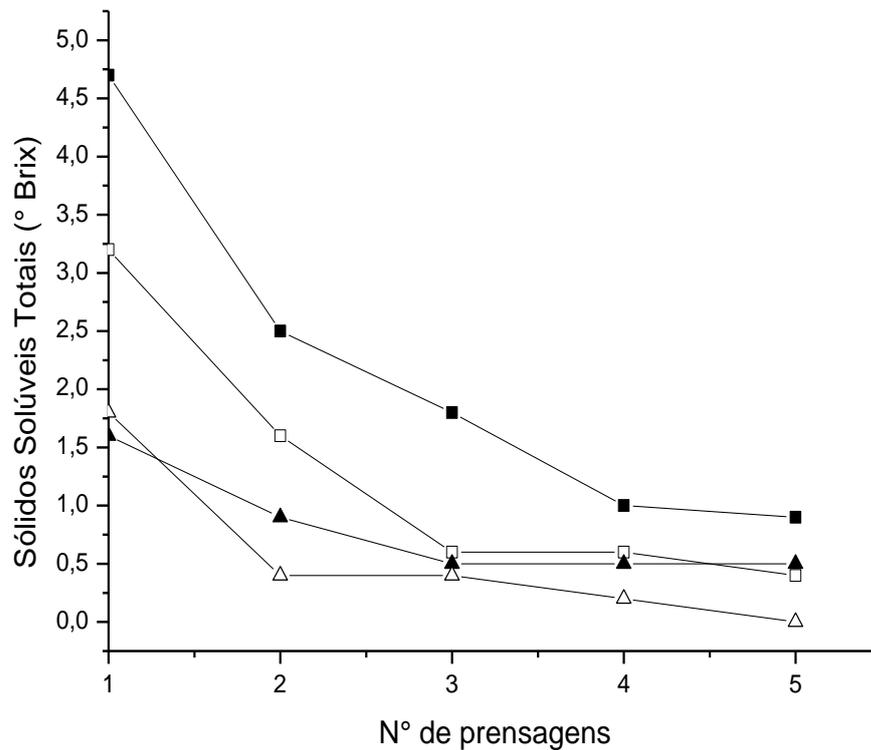
Figura 24 – Teores de Açúcares redutores obtidos nos extratos produzidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas.

Os maiores valores de açúcares redutores, dentre os extratos obtidos com enzimas, foram encontrados nos extratos processados na condição A, seguidos pelos extratos obtidos nas condições B. Isso indica que houve melhor desempenho do complexo enzimático pectinolítico aplicado ao bagaço do pedúnculo do caju no tempo de maceração de uma hora, pois houve maior hidrólise dos componentes presentes na parede celular do bagaço do caju, hidrolisando esses componentes a açúcares redutores, aumentando, dessa forma, o teor de açúcares. Os teores de açúcares redutores foram maiores nos extratos obtidos nas condições A do que nos obtidos nas condições C, indicando, que, provavelmente, o complexo enzimático foi efetivo nessas condições de tratamento, pois os extratos obtidos sem adição de enzimas apresentaram menores valores de açúcares redutores (figura 24).

Dentre os extratos obtidos sem enzimas, os que apresentaram maior teor de açúcares redutores foram os processados nas condições C, seguidos pelos extratos obtidos nas condições D. Isso, provavelmente, se deveu ao fato de que houve uma maior absorção de pelas células da parede celular da fibra do bagaço no tempo de incubação de duas horas, liberando maior conteúdo celular durante a prensagem e conseqüentemente, diluindo as quantidades de açúcares redutores (figura 24).

Dentre os extratos macerados por duas horas, condições B e D, os valores de açúcares redutores foram semelhantes, indicando que não houve um desempenho tão expressivo do complexo enzimático pectinolítico nesta temperatura, devido, provavelmente, á desestabilização ou desnaturação do complexo durante o tempo de incubação (figura 24).

A figura 25 mostra os valores de sólidos solúveis totais para os extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju, macerados por uma e duas horas.



- 30°C, 1 h, 500 ppm, 1:1 (A) ▲ 30°C, 2 h, 500 ppm, 1:1 (B)
 □ 30°C, 1 h, sem enzimas, 1:1 (C) △ 30°C, 2 h, sem enzimas, 1:1 (D)

Figura 25 – Valores de Sólidos Solúveis Totais dos extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerados por uma e duas horas.

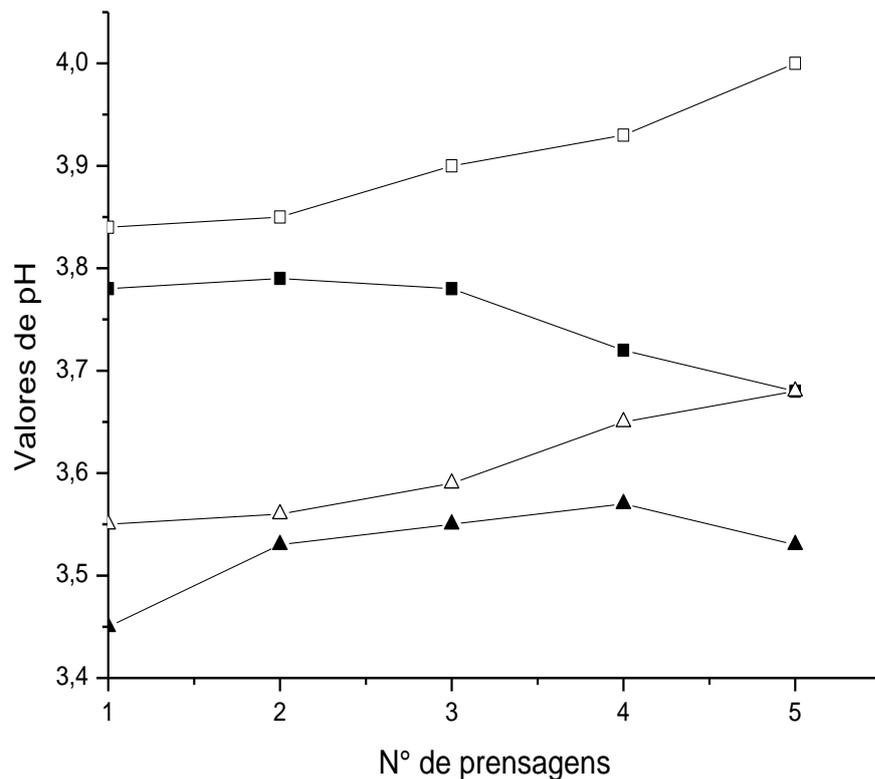
Os valores obtidos para sólidos solúveis totais confirmam os valores obtidos para açúcares redutores e assim como naqueles, os valores foram diminuindo ao longo das prensagens, indicando que o bagaço foi ficando mais pobre em sólidos solúveis ao longo das prensagens. Dentre os extratos obtidos com enzimas, os maiores valores de sólidos solúveis foram obtidos nos experimentos conduzidos nas condições A, seguidos pelos extratos processados nas condições B. Isso provavelmente ocorreu porque o desempenho do complexo enzimático aplicado em bagaço de caju foi melhor no extrato macerado por uma hora, pois no extrato macerado por duas horas pode ter ocorrido uma desnaturação enzimática (figura 25).

Os valores de sólidos solúveis totais foram superiores nos extratos obtidos nas condições A em relação aos valores obtidos nas condições C, indicando que houve a hidrólise

do ácido poligalacturônico às unidades menores de sólidos por ação do complexo enzimático presente na condição A (figura 25).

Já dentre os extratos macerados por duas horas, os valores de sólidos solúveis totais foram semelhantes nos extratos obtidos nas condições B e D. Uma das possíveis explicações para o baixo desempenho do complexo enzimático pectinolítico nas condições de processamento B, é o fato de ter ocorrido uma provável desnaturação enzimática do complexo (figura 25).

A figura 26 apresenta os resultados de pH obtidos para os extratos processados a partir do bagaço do pedúnculo do caju, macerados por uma e duas horas.



■ 30°C, 1 h, 500 ppm, 1:1 (A)
 □ 30°C, 1 h, sem enzimas, 1:1 (C)

▲ 30°C, 2 h, 500 ppm, 1:1 (B)
 △ 30°C, 2 h, sem enzimas, 1:1 (D)

Figura 26 – Valores de pH para os extratos obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju macerado por uma e duas horas.

Os extratos obtidos nas condições A apresentaram maiores valores de pH do que os extratos obtidos nas mesmas condições macerados por duas horas, condições B. No entanto no experimento macerado por uma hora os valores de pH permaneceram praticamente constante até a terceira prensagem, diminuindo na quarta e quinta prensagens. No experimento conduzido por duas horas os valores de pH foram aumentando ao longo de cada prensagem, diminuindo somente na quinta prensagem, indicando que o complexo enzimático pectinolítico não foi efetivo na hidrólise dos ácidos poligalacturônicos nesse experimento, devido ao tempo prolongado de aquecimento, o que pode ter levado a enzima a uma desnaturação térmica (figura 26).

Os extratos obtidos nas condições C apresentaram maiores valores de pH do que os extratos obtidos nas mesmas condições, macerados por duas horas, condições D. Em ambos os experimentos, os valores de pH foram crescentes ao longo das prensagens, devido à ausência do complexo enzimático pectinolítico agindo sobre as unidades de ácido poligalacturônicos, o que fez com que o pH diminuísse nos extratos obtidos com adição de enzimas (figura 26).

Souza Filho *et al.* (1991) estudou a variação de parâmetros físico-químicos em suco de caju clarificado com 120 mg de enzima pectinases adicionada a 700 ppm de gelatina em tempos de armazenagem de zero, 30, 60, 90 e 120 dias e encontrou um pH de 4,25 que sofreu um leve aumento para 4,40 com 120 dias de armazenagem, valores menores do que os encontrados neste trabalho, devido à utilização de um diferente complexo pectinolítico e de o material analisado não ser exatamente o suco de caju e sim o extrato resultante do bagaço do pedúnculo após a extração do suco.

A tabela 06 apresenta os resultados de flavonóides obtidos a partir do bagaço do pedúnculo do caju nas diferentes temperaturas e tempos de maceração ao longo das prensagens.

Tabela 06- Tabela dos valores de quercetina, mirecitina, kaempferol e flavonóides totais nos extratos de bagaço do pedúnculo do caju.

30°C	1 hora (mg/l)				2 horas			
	Miricetina	Quercetina	kaempferol	Total	Miricetina	Quercetina	kaempferol	Total
1°, C/E	0,07	0,26	0,03	0,36	–	0,18	0,33	0,51
5°, C/E	0,09	0,63	0,07	0,79	0,05	0,88	0,08	1,01
1°, S/E	0,75	2,42	0,18	3,35	1,31	1,96	0,15	3,42
5°, S/E	0,26	0,70	0,06	1,02	0,15	0,75	0,06	0,96
40°C								
1°, C/E	2,61	3,01	0,21	5,83	–	–	–	–
5°, C/E	0,58	1,09	0,06	1,73	–	–	–	–
1°, S/E	0,05	0,38	0,03	0,46	–	–	–	–
5°, S/E	0,72	0,94	0,07	1,73	–	–	–	–

Os teores de quercetina, miricetina e kaempferol foram analisados relacionando-se os tempos de maceração, temperatura e concentração enzimática, simultaneamente. Nos extratos obtidos com adição de 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico, na proporção de 1:1 (peso de bagaço:água), macerado por uma hora, esses valores foram maiores nos obtidos nas temperaturas de 40, seguidos pelos extratos obtidos na temperatura de 30°C, na primeira extração, ou seja, houve um acréscimo nesses compostos com aumento da temperatura. Já na quinta prensagem, dos extratos obtidos nas mesmas condições acima, o teor de mirecetina e quercetina foi aumentando gradativamente com o acréscimo de 10°C nas temperaturas em que foram conduzidos os experimentos, enquanto que os teores de kaempferol permaneceram praticamente constantes na quinta prensagem. Dentre os experimentos conduzidos com enzimas, o maior teor de flavonóides totais foi obtido na temperatura de 40°C, na primeira prensagem com enzimas, 5,83 mg/L (tabela 06). Isso provavelmente ocorreu devido à ação combinada das enzimas, prensagem e aumento de temperatura. Tanto o preparado enzimático como a prensagem, facilitaram a hidrolisando e

dilaceração dos tecidos celulares da fibra de caju, que já se encontravam mais amolecidos devido á ação da temperatura do tecido intracelular.

Já nos extratos obtidos nas mesmas condições descritas anteriormente, sem enzimas, nas primeiras extrações, à medida que a temperatura foi acrescida de 10°C, houve uma diminuição no teor de flavonóides. Na quinta prensagem dos extratos sem enzimas, os valores de kaempferol permaneceram constantes, já os valores de miricetina e quercetina aumentaram com o aumento de 10°C na temperatura em que foram conduzidos os experimentos. Dentre os experimentos conduzidos sem enzimas, o que apresentou maiores teores de flavonóides foi o conduzido na temperatura de 30°C, resultante da primeira prensagem, macerado por duas horas (tabela 06).

Em relação aos experimentos conduzidos na temperatura de 30°C, com adição de 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico, na proporção de 1:1 (peso de bagaço: água), macerado por duas horas, resultante da quinta extração, apresentou o maior teor de flavonóides totais de 1,01 mg/L. Já nos experimentos conduzidos nas mesmas condições, sem enzimas, os extratos resultantes da primeira extração, macerados por uma e duas horas, apresentaram teores semelhantes de flavonóides amarelos, 3,35 e 3,42 mg/L, respectivamente (tabela 06).

Brito *et al.* (2007) estudaram e quantificaram flavonóides em pedúnculo de caju por cromatografia líquida, encontrando um total de 0,15 mg/g de miricetina e 0,11 mg/g de quercetina. Todos os valores de quercetina encontrados no presente trabalho foram superiores aos obtidos pelos autores. No entanto, condições como clima, temperatura, radiação solar, período de colheita e outras condições geográficas influenciam no teor desses compostos na fruta, além do que o material analisado neste trabalho foi o extrato do bagaço do caju, que embora devesse apresentar menores valores de flavonóides que a fruta, pertence à outra safra e as matérias foram cultivados sobre diferentes condições geográficas. Lavecchia & Zuorro (2008) estudaram o efeito de quatro preparações enzimáticas comerciais de pectinases, celulases e hemicelulases para a extração de licopeno de pele de tomate, nas seguintes condições: temperatura de 25°C e tempo de incubação de 4 horas; temperatura de 40°C e tempo de incubação de 3 horas. Os autores encontraram 440 mg de licopeno/ 100 g de pele de tomate em base seca, sendo a melhor temperatura a de 40°C, confirmando os resultados obtidos nesse trabalho, indicando que o incremento da temperatura em conjunto com a maceração enzimática aumenta a extração desses compostos bioativos. FU *et al.* (2008)

estudaram a extração de luteolina e apigenina de *Cajanus cajan* através de tratamento enzimático com preparado comercial de celulase, β -glucosidade e pectinases, encontrando as melhores condições de extração com adição de 0,4 mg/ml de pectinases, incubando por 18 horas, na temperatura de 30-35°C, pH de 3,5-4,0, por sistema de cromatografia líquida, encontrando, nessas condições de tratamento valores de 0,268 mg/g para a luteolina e 0,132 mg/g para a apigenina. Os valores obtidos neste trabalho foram maiores do que os relatados pelo autor, na temperatura de 30°C, com enzimas, em condições semelhantes de temperatura e concentração enzimática, e em menor tempo de maceração (1 hora), sendo de 0,36, na primeira prensagem, e de 0,79, na quinta prensagem. Isso se explica pelo fato dos materiais estudados serem diferentes e além do que, a prensagem em conjunto com o preparado enzimático, facilitou a obtenção de um maior teor desses compostos no presente trabalho. Bolaños *et al.* (2005) estudaram a aplicação de preparados comerciais de celulase e endo-1,4- β -D-gluconases em pétalas de margaridas para a extração de xantofilas na temperatura de 28°C e tempo de maceração de 120 horas, encontrando teores de 29,3 g de xantofila/ Kg de flor.

5.3 Determinações analíticas

5.3.1 Caracterização Físico-química do Resíduo e do Sobrenadante do Extrato do Bagaço do Pedúnculo do Caju (EBC)

A caracterização físico-química do resíduo e sobrenadante resultante da centrifugação do extrato do bagaço do pedúnculo do caju pode ser observada na tabela 07 a seguir:

Tabela 07 - Caracterização física e química do resíduo e do sobrenadante da centrifugação do EBC.

Características Físico- químicas	Resíduo	Sobrenadante
Fenóis totais (mg/100g)	95,95	54,60
Ácido ascórbico (mg/100g)	8,62	6,80
Carotenóides totais (mg/100g)	10,50	0,072
Açúcares totais (g/100g)	0,85	1,84
Açúcares redutores (g/100g)	0,45	1,71
Sólidos solúveis totais (°Brix)	0,7	2,8
pH	3,65	4,08

Observou-se que tanto o resíduo quanto o sobrenadante resultante da centrifugação do extrato do bagaço do pedúnculo do caju são fontes de compostos antioxidantes, como fenóis totais, carotenóides e vitamina C. O resíduo da centrifugação apresentou maior teor de fenóis totais, vitamina C e carotenóides, 95,95; 8,62 e 10,50 mg/100 g, respectivamente, contra 54,60; 6,80 e 0,072 mg/ 100 g, presentes no sobrenadante. O teor de amido presente em bagaço in natura foi de 5,50%.

5.3.2 Perdas Ocasionadas por Evaporação no Extrato do Bagaço do Pedúnculo do Caju

A tabela 08 mostra os resultados de perda dos compostos de interesse durante a concentração:

Tabela 08 - Perdas de compostos de interesse ao longo da concentração a vácuo do extrato do bagaço do pedúnculo do caju.

Nível de concentração	Perdas com base no extrato inicial (%)		
	Carotenóides	Fenólicos totais	Ácido ascórbico
25%	13,54	-0,76	24,12
50%	17,36	9,92	26,40
75%	59,72	14,50	56,32

90%

57,33

25,19

74,94

Concentrou-se o sobrenadante do extrato do bagaço do pedúnculo do caju nos níveis de 25, 50, 75 e 90% de concentração e verificou-se que as perdas dos compostos carotenóides, fenólicos totais e vitamina C foram aumentando gradativamente como aumento do nível de concentração. Isso ocorreu porque os compostos carotenóides, vitamina C e ácido ascórbico permaneceram por um tempo prolongado sob a temperatura de 60°C, degradando esses compostos que são termossensíveis (tabela 08).

BARRETO *et al.* (2007) estudaram e quantificaram vitamina C, fenóis totais e carotenóides totais em material retentado do extrato do bagaço do pedúnculo do caju, concentrado e bruto, das safras de 2005 e 2007. Os autores observaram que o maior teor de vitamina C foi encontrado no extrato concentrado, indicando que o tratamento de concentração não influenciou nos teores desses compostos. No entanto, os autores utilizaram uma temperatura mais branda de concentração, 37°C, causando perdas significativamente menores nos teores desses compostos do que os valores encontrados neste trabalho. Para os teores de fenóis totais, os autores encontraram maiores valores no retentado do que no extrato, 188 mg/ 100g e 57 mg/100g, respectivamente. Os valores são próximos aos encontrados neste trabalho sendo de 95,95 mg/100g no resíduo resultante da centrifugação, que se assemelha ao retentado, e 54,60 mg/100 g para o sobrenadante resultante da centrifugação do extrato. O autor encontrou valores 60 vezes maior de carotenóides no retentado (54,9 µ/g) do que no extrato (0,9 µ/g) para a safra de 2007, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, onde os resultados foram 146 vezes maior no resíduo do que no sobrenadante.

6.0 CONCLUSÕES

- As melhores condições para a obtenção de compostos carotenóides em escala laboratorial foram a adição de 500 ppm de preparado enzimático pectinolítico, proporção bagaço: água 1:1 (massa/massa), tempo de maceração de uma hora e temperatura de 30°C;
- A aplicação de complexo enzimático pectinolítico no bagaço do caju para a obtenção do extrato aumentou a quantidade de açúcares redutores, sólidos solúveis totais, parâmetros *b* de cor instrumental, ocasionou diminuição do pH nos extratos, havendo redução nos teores de pectina e hemicelulose no bagaço tratado enzimaticamente;
- Em escala de planta piloto, as melhores condições para a obtenção de compostos carotenóides cumulativos foram obtidos nas temperaturas de 30°C, com adição de 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico, macerado por uma hora, na proporção de 1:1 (peso de bagaço: água) e cinco extrações sucessivas, pois apesar de extrato obtido na temperatura de 40°C apresentar um ganho de 3,5% em relação ao experimento conduzido na temperatura de 30°C, nas mesmas condições, na quinta prensagem, apresenta um gasto maior de energia, tornando o processo mais dispendioso;
- Todos os extratos obtidos com adição de complexo enzimático pectinolítico apresentaram maiores teores de compostos carotenóides, apresentando ganhos percentuais de 18 e 10,5%, nas temperaturas de 30°C e 40°C, respectivamente, em relação aos extratos obtidos sem enzimas;
- Os teores de flavonóides totais foram maiores nos extratos obtidos na temperatura de 40°C, com adição de 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico, macerado por uma hora, no primeiro ciclo de prensagem, indicando que a ação combinada da temperatura com preparado enzimático maximizou a obtenção desses compostos;
- O resíduo e o sobrenadante resultante da centrifugação da mistura dos dez extratos são ricos em compostos fenólicos e ácido ascórbico, sendo que o resíduo apresenta uma concentração em torno de 146 vezes maior em relação compostos carotenóides do que o sobrenadante;

- A concentração do extrato por evaporação não foi uma boa alternativa para a concentração de carotenóides, vitamina C e compostos fenólicos presentes no extrato, pois ocasionou perdas significativas nos teores desses compostos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. A. P. **Extrato de bagaço de caju rico em pigmento.** n. PI 0103885-0, 19 de junho de 2001.
- ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.9, n.2, p. 137-142, 2007.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial Application of pectic enzymes: a review. **Process Biochem.**, v.33, n.21, 1998.
- ALMEIDA, C.; BRANYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P. Use of two different carriers in a packed endopolygalacturonase production by a bed reactor for yeast strain. **Process Biochemistry**, v.40, n.5, p.1937-1942, 2005.
- ALVAREZ, M. J. M.; BELÉN, D. B.; GARCÍA, D.; MENDONZA, L. Evaluación del contenido de carotenóides totales em cáscaras de algunas variedades de naranjas venezolanas. **Revista da Facultat de Agronomia**, v. 23, n.3, Caracas, 2006.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; SIQUEIRA CAMPOS, F. A. C.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v.19, n.2, Campinas, 2006.
- ANDERSON, R. F.; AMARASINGHE, C.; FISHER, L.J.; MAK, W.B.; PACKER, J.E. Reduction in freeradical- induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. **Free Radic. Res.**, v.33, n.3, p.91-103, 2000.
- AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry.** 11. ed., Washington, 1992. 1115 p.
- AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry.** 16. ed. Washington, 1995.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**, 3º edição, Viçosa: UFV, 2004.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, n. 81, p. 495-502, 2002.
- ASTROG, P. Food carotenoids and câncer prevention: An overview of current research. **Trends Food Sci. Tech.**, v.81, n.12, p. 406-413, 1997.
- AZEREDO, H. M. C.; ABREU, F. A. P.; SOUSA, L. L.; SOUZA, A. C. R.; BRITO, E. S. Avaliação do impacto de pré-tratamento sobre a extração de carotenóides por prensagem seqüencial de bagaço de caju. **In: B. CEPPA: Curitiba**, v.24, n.2, p.397-404. Dez., 2006.
- BARRETO, G. P. M.; SOUZA, A. C. R.; AZEREDO, H. M. C.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos em subprodutos da castanha de caju. **Alim. Nutr.**, v. 18, n.2, p. 207-213, 2007.

- BEN-AMOTZ, A.; LEVY, Y. Bioavailability of a natural mixture compared with synthetic all-*trans* β -carotene in human serum. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 729-734, 1996.
- BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **Federação Americana Soc. Exp. Biol. (FASEB) Journal**, Bethesda, v. 3, p.1927-1932, 1989.
- BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 18, p. 1-29, 1992.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed., São Paulo: Varela, p. 103-118, 2001.
- BOLAÑOS, J. L. N.; RANGEL-CRUZ, C. L.; JIMENÉZ-ISLAS, H.; BOTELLO-ALVAREZ, E.; RICO-MARTÍNEZ, R. Pre-treatment on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold (*Taget erectas*) using hexane. **Food Research International**, v. 38, p.159-165, 2005.
- BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P. H. M. Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de pedúnculo de caju submetidos à desidratação osmótica solar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 139 - 145, 2003.
- BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C.P.; LIN, L. Z.; HARNLY, J. Determination of the flavonoids components of cashew apple by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, n.105, p. 1112-1118, 2007.
- BRITTON, G. W. Structures and properties of carotenoids in relation to function. **Fed. Am. Soc. Exp. Bio. (FASEB) Journal**, Bethesda, v. 9, n.15, p. 1551-1558, 1995.
- BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**, San Diego: Academic Press, cap.8, p.400-409, 1994.
- BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; OLIVEIRA E SILVA, A. M.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto do caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.7, n. 4, Campinas, 2007.
- BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. β -caroteno: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 244, p. 569-573, 1984.
- CAVALCANTE, M. L. **Composição de carotenóides e valor de vitamina A em pitanga (*Eugenia uniflora*) e acerola (*Malphigia glabra*)**. 87 p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos- Universidade estadual de Campinas, 1991, 87p.
- CAVALCANTE, A. A. C. M.; SALVADOR, M.; LEITE, A. S. RÜBENSAM, G.; HENRIQUES, J. A. P. Compostos fenólicos, carotenos e vitamina C na atividade antioxidante do suco de caju e cajuína. **I Congresso de Pesquisa e inovação da rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**. Rio Grande do Norte – Natal, 2006.

CEREZAL, P.; PIÑERA, R. Carotenoids in citrus fruit: general aspects, obtention from processing wastes and application. **Alimentaria**, n. 277, p.19-32, 1996.

CHITARRA, M. I. F; CHITARRA, A. B. **Pós- colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2º edição, Lavras: UFLA, 2005.

ÇINAR, I. Effects of cellulose and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. **Process Biochemistry**, v.40, p. 945-949, 2005.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources –review. **The Journal of Nutrition, Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

COSTA, M. A. L.; ORTEGA-FLORES, C. I.; PENTEADO, M. V. D. C. Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do β -caroteno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n. 3, p. 224-228, 2002.

DICARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n.4, p.337-353, 1999.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p. 532-538, 1989.

DISILVESTRO, R. A. Flavonoids as antioxidants. In: Widman REC, editores. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC, Press LLC, 2001.

DIXON, R. A.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C. J.; SRINIVASA REDDY M.S.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defense – a genomics perspective. **Mol. Plant Phatol.**, v.3, p.371-390, 2002.

EPLER, K. S.; ZEIGLER, R. G.; CRAFT, N. E. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in foods. **Journal of Chromatography**, v. 619, p. 37-48, 1993.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, p. 851- 874, 2004.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; VASUDEVA, T. G.; OTERO, R. R. C.; BIONES, A. I. **FEMS Microbiol. Lett.**, p. 237-261, 2004.

FIANDER, H.; SCHNEIDER, H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. **Cancer Lett.**,v.156, p.17-24, 2000.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.13, p. 40-45, 2000.

FOOTE, C. S.; CHANG, Y. C.; DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen X carotenoid quenching parallels biological protection. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 92, p. 5216-5218, 1970.

FRANÇA, F. M. C.; BEZERRA, F. F.; MIRANDA, E. Q.; SOUSA NETO, J. M. **Agronegócio do caju no Ceará: cenário atual e propostas inovadoras**. Fortaleza: Federação das Indústrias do Estado do Ceará, Instituto de Desenvolvimento Industrial do Ceará, 2008.

FRANCIS, F. J. **Handbook of food colorants patents**. Food and Nutrition Press., USA, 1986.

FU, Y. J.; LIU, W.; ZU, Y. G.; TONG, M. H.; LI, S. M.; YAN, M. M.; EFFERTH, T.; LUO, H. Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea leaves. **Food Chemistry**, v.111, p.508-512, 2008.

GAZIANO, J. M. H. The role of beta-carotene in prevention of cardiovascular disease. **Ann. New York Acad. Sci.**, v.691, p.148-155, 1993.

GESTER, H. Y. The potential role of lycopene for human health. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.16, p.109-126, 1997.

GOMES, F. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento do câncer. **Revista de Nutrição**, v. 20, n.5, Campinas, 2007.

GOODWIN, T. W. **The comparative biochemistry of carotenoids**. 1ª edição, Chapman & Hall, LTD: London, 1952.

GRONOWSKA-SENGER, A.; WOLF, G. Effect of dietary protein on the enzyme from rat and human intestine which converts β -carotene to retinal. **Journal Nutr.**, v.100, p. 300-308, 1970.

GUMMADI, S.N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochemistry**, v.38, p.987-996, 2003.

GUZMAN, D. **Value of carotenoids sector to cross billion dollar mark**. Chemical Market Reporter, New York, v. 268, n. 1, p. 33, 2005.

HAEGELE, A. D; GILLETE, C.; O'NEIL, C.; WOLF, P.; HEIMENDIGER, J.; SEDLACEK, S. Plasma xanthophylls carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Câncer epidemiol Biomarkers**, v.9, n.4, p. 421-425, 2000.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochemistry Pharmacol.**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

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

HOFFMAN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of food composition and analysis**, v. 22, p.263-268, 2009.

KASHYAP, D.R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnololy**, v.16, p. 277-282, 2000.

KIEFER, C.; HESSEL, S.; LAMPERT, J. M.; VOGT, K.; LEDERER, M. O.; BREITHAUPT, D. E. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. **Journal Biol. Chem.**, v.276. n. 27, p. 14110-14116, 2001.

KIM, D. J.; TAKASUKA, N.; KIM, J. M.; OTA, T.; ASAMOTO, M. Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. **Câncer Lett.**, v. 120, p.15-22, 1997.

KOBUCHI, H.; ROY, S.; SEM, C. K.; NGUYEN, H. G.; PACKER, L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. **Am. Journal. Physiol.**, v. 277, 1999.

KOHLMEIER, L.; KARK, J. D.; GOMEZ-GARCIA, E.; MARTINS, B. C.; STECK, S. E.; KARDINAAL, A. F. M.; RINGSTAD, J.; THAMM, M.; MASAE, V.; RIEMERSMA, R.; MARTIN-MORENO, J. M.; HUTTUNEN, J. K.; KOK, F. J. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, p. 618-626, 1997.

KONG, N. A.; YU, R.; CHEN, C.; MANDLEKAR, S.; PRIMIANO, T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. **Arch. Pharm. Res.**, v.23, p.1-16, 2000.

KRINSKY, N. I. Actions of carotenoids in biological systems. **Annu. Rev. Nutr.**,v. 13, n. 7, p. 561-587, 1993.

KÜHNAU, J. The flavonoids: a class of semi-essential foods components: their role in human nutrition. **World Review Nutrition Dietetics**, v.24, p.117-191, 1976.

KULL, D.; PFANDER, H. Appendix: List of new carotenoids. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.). **Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis**. Basel: Birkhäuser Verlag, p. 295-317, 1995.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur. Journal of Nutrition**, v.38, p.133-142, 1999.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.366-375, 2000.

LAVECCHIA, R.; ZUORRO, A. Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degrading enzymes. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 228, p. 153-158, 2008.

LAVINAS, F. C.; ALMEIDA, N. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju *in natura* armazenado em diferentes condições de estocagem. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 875 – 883, 2006.

LEITE, L.A.S. **A agroindústria do caju no Brasil. Políticas públicas e transformações econômicas.** Fortaleza: EMBRAPA – CNPAT, 1994. 195 p.

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. A. **Carbohydr. Polym.**,v. 50. n. 63, 2000.

LIMBERG, G.; KÖRNER, R.; BUCHHOLT, H. C.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. D. **Carbohydr. Res.**, v. 327, p.293, 2000.

MAIORANO, A. E. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, Brasil, 1990.

MAKELA, S.; POUTANE, M.; KOSTIAN, M. L.; LEHTIMAKI, N.; SALO, L. Inhibition of 17 -Bhydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. **In: 3rd Int. Conf. Phytoestrogens.**, 1995.

MALDONADE, I. R. **Produção de carotenóides por leveduras.** Dissertação de Doutorado-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- São Paulo, 2003.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ-CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ, SONOJA, R; SANCHEZ, S. **Appl. Microbil. Biotechnol.**, v. 62, p. 484, 2003.

MANSON, J. E.; GAZIANO, J. M.; JONAS, M. A. ; HENNEKENS, C. H. Antioxidants and cardiovascular disease: A review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 12, p. 426-432, 1993.

MAYNKEE, S. T. Beta-carotenoids, carotenoids and disease prevention in humans. **FASEB J.**, v.10, n. 7, p. 690-701, 1996.

MCBRIDE, J. It plants pigments pait an oxidants substance rainbow. **Agricultural Research**, Washigton, v.44, p. 4-8, 1996.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importância nutricional de los pigmentos carotenóides. **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 2, p. 149-155, 2004^a.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides em los alimentos. **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 2, p. 209-215, 2004^b.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 128–130.

MIDDLETON, E.; KANDASWANI, C. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 366, p.351-376, 1994.

MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**,v. 208, p.44-50, 1995.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagents for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 1959.

MODESTA, R.C.D.; GONÇALVES, E.B.; AMAURI OSENTHAL, A.; SILVA, A.L.S.; FERREIRA, J.C.S. Desenvolvimento do perfil sensorial e avaliação sensorial/instrumental de suco de maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, 2005.

MORAZZONI, P.; MALANDRINO, S. Anthrocyanins and their aglycons as scavengers of free radicals and antilipoperoxidant agents. **Pharmacol Res. Comm.**, v.20, p.254, 1988.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS/NCR). **Dietary Reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington (DC), 2001.

NIELSEN, S. E.; YOUNG, J. F., DANESHVAR, B.; LURIDSEN, S. T.; KNUTHSEN P. Effects of parsley intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subject. **Br. Journal Nutr.**, v.81, p. 447-445, 1999.

OLIVEIRA, L. G. L.; IPIRANGA, A. S. R. Sustentabilidade e inovação na cadeia produtiva do caju no Ceará. **Revista Eletrônica de Gestão Organizacional, Gestão. Org.**, 2009.

OLSON, J. A. Bioavailability of carotenoids. **Archivos latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, n. 1, p. 21-25, 1999.

PALOZZA, P.; KRISNSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 403-420, 1992.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. **FASEB Journal**, v. 10, n.5, p.542-555, 1996.

PAULI, G. Upsizing: **Como gerar mais renda, criar mais postos de trabalho e eliminar a poluição**. 2. ed. Porto Alegre: Fundação Zeri Brasil / L&PM, 1998.

PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, O. A.; GUERREIO, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**, v. 53, p. 421-424,1998.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; STRIGHETA, P. C.; BRANDÃO, S. C. C. Avaliação de carotenóides totais, α e β -caroteno em cenoura (*Daucus carota L.*) durante o processamento a nível doméstico, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

POOL-ZOBEL, B. L.; BUD, A.; MULLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, v. 18, n.91847-1850, 1997.

PORRINI, M.; RISO, P. Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. **Journal Nutri.**, v. 130, n.2, p.189-192, 2000.

REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R; CORRÊA, J.B.C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo, fosfotúngstico-fosfomolibdico. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.24, n.4, p.401-411, 1981.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 1ª edição, Instituto Mauá de Tecnologia, Editora: Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 155-157, 2004.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical Chemistry of Bioflavonoids, A Review. **The Analyst**, v.122 , 1997.

ROCK, C.; LOVALVO, H.; EMENTHISER, C. RUFFIN, M. T.; FLATT, S. W.; SCHWARTZ, S. J. Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. **Journal Micronutrition Ana.**, v.1, p. 191-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A in plant foods. **Journal Micronutrition Anal.**, v. 5, p. 191-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; AMAYA-FARFAN, J. Estado actual de los métodos analíticos para determinar pró-vitamina A. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 44, n. 1, p. 180-199, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.). **Shelf-life Studies of Foods and Beverages: Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 547-589, 1993.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. ILSI Press, Washington, p.37-51, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides – Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**, Ministério do Meio Ambiente, 2008.

ROSS, J. A., KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic effects, and Safety. **Annu. Rev. Nutr.**, v.22, p.19-34, 2002.

SCHROEDER, W.A.; JOHNSON, E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against oxygen damage. **Journal of Industrial Microbiology**, n. 14, p. 502-507, 1995.

SACKHEIM, G. I.; LEHMAN, D. **Química e bioquímica para ciências biomédicas**. Editora: Manole Ltda, 8ª edição, p. 553-554, 2001.

SAHU, S. C.; GRAY, G. C. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. **Cancer Letters**, v. 104, p. 193-196, 1996.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E.J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v.39, p.231-294, 1993.

SALGADO-ROMAN. M.; BOTELLO-ÁLVAREZ, E. RICO-MARTÍNEZ, RAMIRO; JIMÉNEZ-ISLAS, CÁRDENAS-MANRÍQUEZ, M.; NAVARRETE-BOLAÑOS, J. L. Enzymatic treatment to improve extraction of capsaicinoids and carotenoids from Chili fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.10012-10018, 2008.

SAUNDERS, C.; RAMALHO, A.; ACCIOLY, E.; PAIVA, F. Utilização de tabelas de composição de alimentos na avaliação do risco de hipovitaminose A. **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, Caracas, v.50, n.3, 2000.

SCHIEBER, A.; FÜGEL, R.; HENKE, M.; CARLE, R.; Determination of the fruit content of strawberry fruit preparations by gravimetric quantification of hemicelluloses. **Food Chemistry**, n.9, p. 365-371, 2005.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; WILLIAMS, R. J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p.861-880, 2002.

SENTANNI, M. A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de carotenóides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, Campinas, 2007.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHIRLEY, B. W. Flavonoids biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. **Trends in Plant Science**, v. 11, n.1, p.377-382, 1996.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, 2002.

SIMÕES, A. N.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; COSTA, F. B.; SOUZA, P. A. Caracterização química de pedúnculo de caju CCP-76 em diferentes estádios de desenvolvimento. **Revista Caatinga**, Mossoró – RN, v. 14, p. 75-78, 2001.

SOUZA FILHO, M. S. M.; MAIA, G. A.; HOLANDA, L. F. F.; ORÍÁ, H. F.; OLIVEIRA, G. S. F.; FIGUEIREDO, R. W. Clarificação enzimática do suco de caju. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 10, n. 26, p. 1647 – 1653, 1991.

SORESEN, J. F.; KRAG, K. M.; SIBBESEN, O.; DELCUR, J.; GOESART, H.; SVESEN, B.; TAHIR, T. A.; BRUFAU, J.; PEREZ-VENDREL, A. M.; BELLIMCAMP, D.; D'OVÍDIO, R.; CAMARDELLA, L.; GIOVANE, A.; BONNIN, E.; JUGE, N.; **Biochim. Biophys. Acta**, v. 275, p. 1696, 2004.

STAHL, W.; ALE-AGHA, N.; POLIDORI, M. C. Non-antioxidant properties of carotenoids. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 553-558, 2002.

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 428 p., 1967.

SUDHEESH, S.; SANDHYA, C.; SARAH, K. A.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. **Phytother Res.**, v.13, p.393-396, 1999.

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, 2005.

TARGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, p. 411, 1999.

TRUSCOTT, T. G. β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. **J. Photochem Photobiol B.**, v. 35, p. 233-235, 1996.

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

VAN POPPEL, G.; GOLDBOHN, R. A. Epidemiologic evidence for β -carotene and cancer prevention. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1393S-1402S, 1995.

VILLELA, G. G; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogon S. A., 2° edição, p.785-790, 1966.

VILLELA, G. G. **Pigmentos animais: Zocromos**. Editora: Academia Brasileira de Ciências, p. 5-31, 1976.

ZECHMEISTER, L. **Cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes**. Vienna: Springer Verlag, 1962.

ZEIGLER, R. G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 251S-259S, 1991.

WERNZEL, U.; KUNTZ, S.; BRENDDEL, M. D.; DANIEL, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**,v.60, p.3823-3831, 2000.

WEIL, J. H. **Bioquímica geral**. Fundação Cauloste Gulbenkian. 2° edição, Lisboa, p. 316, 2000.

WEST, C.E.; CASTENMILLER, J.J.M. Quantification of "SLAMENGI" factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. **Int. Journal Resvit. Nutr.**,v. 68, n.6, p.371-377, 1998.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker Inc., 1972. 636p.

WILEY, J.; SONS, I. **Experimental Biochemistry a Laboratory Manual**. New York, p. 127-133, 1960.

WILLIAMS, R. J; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? In: Rice-Evans C, editor. Serial Review: Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absortion, Metabolism, and Bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, n. 7, p.838-849, 2004.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p.484-493 2001.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Bioohysics**, v. 385, n. 1, p- 20-27, 2001.

ANEXO A - Equação de compressão da mola do tipo Expeller

A força aplicada na mola apresentou um comportamento linear em função da distância até a compressão de 80 mm, o que pode ser observado na figura 17 e tabela 08, a partir daí o comportamento passou a ser não linear. Neste trabalho utilizou-se 21,7 mm de deformação a mola, resultando em 804,61 N de força aplicada.

Tabela 09: Correlação entre a distância de compressão da mola utilizada com da força exercida sobre o sistema da prensa expeller.

CARACTERÍSTICA	VALORES									
Compressão (mm)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Força (N)	361	739	1123	1512	1902	2298	2695	3159	3824	4608

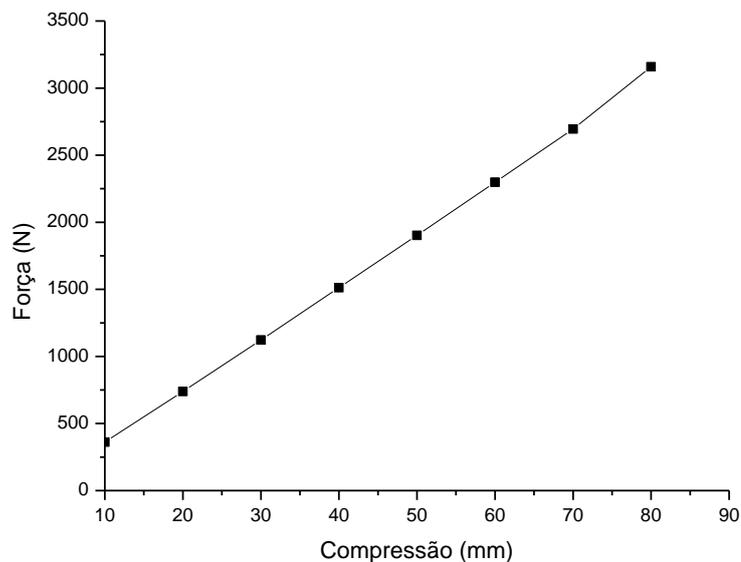


Figura 27 - Gráfico da compressão da mola (mm) em prensa do tipo Expeller versus força (N).

A regressão linear resultou na equação 1, que apresentou um R^2 de 0,9836, indicando uma forte correlação linear entre os dados de compressão da mola (mm) e a força resultante em Newtons.

$$\text{Força} = (44,811 * \text{Distância}) - 242,45 \quad (2)$$

Equação 02- Relação entre a distância em mm e a compressão em N em prensa do tipo Expeller.