

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JOHNATT ALLAN ROCHA DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS DAS FOLHAS DO  
MURUCIZEIRO (*BYRSONIMA CRASSIFOLIA*) POR  
VIA ENZIMÁTICA**

BELÉM

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**JOHNATT ALLAN ROCHA DE OLIVEIRA**

**EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS DAS FOLHAS DO  
MURUCIZEIRO (*BYRSONIMA CRASSIFOLIA*) POR  
VIA ENZIMÁTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**ORIENTADOR :**

Prof<sup>o</sup>. Dr. Rosinelson da Silva Pena (orientador)

Prof<sup>o</sup>. Dr. Hervé Rogez (co-orientador)

**BELÉM**

**2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CENTRO TECNOLÓGICO  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**JOHNATT ALLAN ROCHA DE OLIVEIRA**

**EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS DAS FOLHAS DO MURUCIZEIRO  
(*BYRSONIMA CRASSIFOLIA*) POR VIA ENZIMÁTICA**

**BANCA EXAMINADORA :**

---

**Prof.<sup>o</sup>. Dr. Rosinelson da Silva Pena**  
(UFPA – Orientador)

---

**Prof.<sup>o</sup>. Dr. Hervé Rogez**  
(UFPA – Co-orientador)

---

**Prof.<sup>o</sup>. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza**  
(UFPA – Membro)

---

**Dra. Laura Figueiredo Abreu**  
(Embrapa Amazônia Oriental – Membro)

**Dedico a minha mãe Maria Eliana, pai e avós.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus primeiramente sem o qual nada seria possível.

A minha mãe Eliana que sempre me motivou e com quem sempre poderei contar. À meu pai e avós que sempre me deram todo apoio.

A UFPA pelos conhecimentos adquiridos durante o mestrado.

Aos professores Rosinelson Penna e Hervé Rogez pela orientação deste trabalho e por toda a ajuda e conhecimento repassado, sem o qual não seria possível a realização desta dissertação.

A Sedect e Propespa pela concessão de bolsa durante o período de realização do trabalho.

À Embrapa onde foram realizadas as etapas de caracterização da matéria-prima utilizada neste trabalho e a todas as pessoas maravilhosas que lá trabalham.

Aos professores Alessandra Lopes e Evaldo Martins pela ajuda em vários momentos do trabalho.

Aos professores Laura Abreu e Jesus, primeiro por aceitarem participar da banca e segundo pelas grandes contribuições feitas ao trabalho.

A todos da usina de alimentos e a bolsista Taiana com quem foi um grande prazer trabalhar.

Aos amigos Luiza (gêmea), Renan, Caio, Priscylla (irmã), Heloísa, Thelma, Thaís e todos os amigos do mestrado que contribuíram muito para o meu aprendizado, além do grande companheirismo e apoio de cada um.

Meu grande obrigado a todos!

Lembre-se da minha ordem: “Seja forte e corajoso! Não fique desanimado nem tenha medo porque eu, o Eterno, o seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!”  
Josué 1:9

## RESUMO

A extração de antioxidantes a partir de fontes naturais tem se tornado essencial para a sua utilização na preparação de alimentos funcionais e como aditivos para produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios. A Amazônia apresenta grande biodiversidade e mostra-se como excelente fornecedora de matérias-primas ricas em substâncias com tais propriedades. Dentre as quais se tem a *Byrsonima crassifolia* (murucizeiro). Uma maneira de agregar valor a estas matérias-primas é desenvolver um processo de extração de seus compostos antioxidantes, que possa ser transferido para micro e pequenas empresas da região. O presente trabalho objetivou desenvolver e otimizar através da aplicação da metodologia de superfície de resposta a extração de compostos fenólicos, com o uso de enzimas hidrolíticas, através de um método novo, ambientalmente limpo, de custo acessível e com possibilidade de aplicação ao meio industrial. A caracterização físico-química das folhas foi realizada e os parâmetros cinéticos ( $V_{max}$  e  $K_m$ ) de cada enzima utilizada (celulase, xilanase, pectinase e protease) foram determinados. Após as hidrólises realizadas em diferentes parâmetros (Temperatura: 19 – 70°C, pH: 2,4 – 7,5 e tempo: 19 – 220 minutos) o conteúdo de compostos fenólicos foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu e os resultados comparados com a extração com solventes orgânicos e com a extração realizada sem enzimas e nas mesmas condições do método enzimático. A extração com solventes alcançou valores de 73,28 mg EAG/ g MS. As melhores condições de extrações para o método enzimático foram: pH 5,0 a 50°C durante aproximadamente 200 minutos. A temperatura foi o fator de maior influência nas extrações, sendo alcançados teores de 95,45 mg EAG/ g MS.

Palavras-chave: compostos fenólicos, extração enzimática

## ABSTRACT

Extraction of antioxidants from natural sources have become essential for the use of these substances in the functional foods preparation and as additives for pharmaceutical, cosmetics and nourishing products. The Amazon region is rich plants in antioxidants, traditionally used in the local medicine for example *Byrsonima crassifolia*. A way to add value to these plants would be to develop a process of extraction of these antioxidants that could be transferred to micro and small companies of the region. This work objectified to develop and to optimize with the application of the methodology of reply surface the phenolic compounds extraction, with the hydrolytic enzyme use, through a new, ambiently clean method, accessible cost and with possibility of application industrial. The Physicochemical characterization of the murucizeiro leaves were carried and the kinetic parameters ( $V_m$  and  $k_m$ ) of each enzyme (cellulase, xylanase, pectinase and protease) had been determined. After the hydrolysis carried through in different parameters (Temperature: 19 – 70°C, pH: 2,4 – 7,5 and time: 19 – 220 minutes) the phenolics compounds content were determined through the method of folin-Ciocalteu and comparative with the conventional method of extraction and the extraction carried through without enzymes and in the same conditions of the enzymatic method. The extraction with solvent showed values of 73,28 mg EAG/g MS, superiors the told one in literature. With the methodology of surface of answers they had been verified that the best conditions of extractions for the enzymatic method had been: pH 5,0, 50°C during approximately 200 minutes. Temperature had greater influence on the process of extractions and this methodology enzymatic showed extractions with 95,45 mg EAG/g MS.

Keywords: phenolics compounds; enzymatic extraction



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos e folhas do murucizeiro .....	15
Figura 2. Representação esquemática da estrutura molecular da parede celulósica.....	16
Figura 3. Estrutura química da celulose; a - Parte central da cadeia molecular; b - Grupos terminais redutores e não redutores.....	17
Figura 4. Estrutura química da lignina .....	20
Figura 5. Estrutura primária das substâncias pécnicas .....	22
Figura 6. Mecanismo de degradação da celulose .....	25
Figura 7. Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam .....	27
Figura 8. Reações catalisadas pelos diferentes tipos de enzima sobre a pectina ou o ácido pécnico. ....	29
Figura 9. Estrutura química dos principais representantes dos compostos fenólicos encontrados em matérias primas vegetais.....	34
Figura 10. Estrutura básica dos flavonóides .....	36
Figura 11. Esquema do método de determinação de fibras alimentares da AOAC (1997).....	45
Figura 12. Fluxograma da determinação dos parâmetros cinéticos da celulase.....	48
Figura 13. Esquema do procedimento de determinação dos parâmetros cinéticos da xilanase .....	49
Figura 14. Hidrólise em frascos âmbar (superior); determinação de DNS (inferior esquerda e direita) .....	50
Figura 15. Gráfico de Michaelis-Menten da celulase de <i>Aspergillus niger</i> .....	59
Figura 16. Gráfico da Linearização de Lineweaver-burk para a celulase de <i>Aspergillus niger</i> .....	59
Figura 17. Gráfico de Michaelis-Menten da xilanase de <i>Aspergillus niger</i> . ....	61
Figura 18. Gráfico da Linearização de Lineweaver-Burk para a xilanase de <i>Aspergillus niger</i> .....	62
Figura 19. Gráfico de Michaelis-Menten da pectinase de <i>A. niger</i> .....	64
Figura 20. Gráfico da Linearização de Lineweaver-burk para a pectinase de <i>A.</i> <i>niger</i> . ....	64

Figura 21. Gráfico de Michaelis-Menten da protease de <i>B. licheniformis</i> .....	66
Figura 22. Gráfico da Linearização de Lineweaver-burk para a protease <i>B. licheniformis</i> . .....	67
Figura 23. Gráfico de Pareto para a extração com enzimas. ....	74
Figura 24. (A) Gráfico do teor predito de compostos fenólicos totais extraídos com enzimas Versus valores observados (B) Gráfico dos resíduos versus teor de compostos fenólicos totais extraídos com enzimas.....	78
Figura 25. Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis tempo x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos com enzimas.....	78
Figura 26. Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis pH x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos com enzimas.....	80
Figura 27. Gráfico de Pareto para a extração sem enzimas .....	82
Figura 28. (A) Gráfico do teor predito de compostos fenólicos totais extraídos sem enzimas versus os valores observados. (B) Gráfico dos resíduos versus o teor de compostos fenólicos totais extraídos sem enzimas. ....	84
Figura 29. Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis Tempo x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos sem enzimas.....	84
Figura 30. Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis pH x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos sem enzimas.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação extensiva das enzimas pécticas .	30
Tabela 2. Condições de extração utilizadas nos teste preliminares.	52
Tabela 3. Níveis codificados e decodificados do planejamento.	55
Tabela 4. Planejamento composto central rotacional.	55
Tabela 5. Caracterização físico-química das folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i> em base úmida.	57
Tabela 6. Valores de $V_{max}$ e $K_m$ para a celulase.	60
Tabela 7. Valores de $V_{max}$ e $K_m$ para a xilanase.	62
Tabela 8. Valores de $V_{max}$ e $K_m$ para a pectinase.	65
Tabela 9. Valores de $V_{max}$ e $K_m$ para a protease.	67
Tabela 10. Testes preliminares de degradação	69
Tabela 11. Resultados preliminares da extração enzimática de compostos fenólicos a partir de folhas moídas de <i>B. crassifolia</i> e em função de distintas condições de tempo, temperatura e pH.	70
Tabela 12. Resultados das extrações enzimáticas de compostos fenólicos a partir de folhas moídas de <i>B. crassifolia</i> e em função de distintas condições de tempo, temperatura e pH realizadas para o planejamento experimental.	71
Tabela 13. Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para a extração com enzimas.	73
Tabela 14. Resultados da ANOVA para a extração com enzima.	77
Tabela 15. Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para a extração sem enzimas.	81
Tabela 16. Resultados da ANOVA para a extração sem enzima.	83

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 <i>BYRSONIMA CRASSIFOLIA</i> .....	15
2.2 PAREDE CELULAR E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES .....	16
<b>2.2.1 Celulose</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.2 Hemicelulose</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.3 Lignina</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.4 Substâncias pécicas</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.5 Outros constituintes</b> .....	<b>22</b>
2.3 ENZIMAS .....	22
<b>2.3.1 Considerações gerais</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3.2 Enzimas utilizadas na degradação da parede celular</b> .....	<b>24</b>
2.3.2.1 Celulases.....	24
2.3.2.2 Hemicelulases .....	26
2.3.2.3 Pectinases.....	27
2.3.2.4 Proteases .....	31
2.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES .....	31
<b>2.4.1 Compostos fenólicos</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4.2 Compostos fenólicos do tipo flavonóides</b> .....	<b>34</b>
<b>2.4.3 Compostos fenólicos do tipo não flavonóides</b> .....	<b>36</b>
<b>2.4.4 Taninos</b> .....	<b>37</b>
2.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	38
<b>2.5.1 Considerações gerais sobre extração</b> .....	<b>38</b>
<b>2.5.2 Métodos e principais variáveis da extração</b> .....	<b>39</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
3.1 MATÉRIA-PRIMA .....	43
3.2 MÉTODOS .....	43
<b>3.2.1 Caracterização das folhas</b> .....	<b>43</b>
3.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	46
<b>3.3.1 Extração com solventes</b> .....	<b>46</b>
<b>3.3.2 Extração enzimática</b> .....	<b>47</b>

3.3.2.1. Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas utilizadas .....	47
3.3.2.2 Extração enzimática .....	51
3.3.2.3 Testes preliminares de extração .....	52
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS .....	53
<b>3.4.1 Compostos fenólicos totais .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4.3 Delineamento experimental.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4.5. Análise estatística dos resultados.....</b>	<b>56</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	57
4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS .....	59
<b>4.2.1 Celulase de <i>Aspergillus niger</i> .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.2 Hemicelulase (xilanase) de <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.3 Pectinase (poligalacturonase) de <i>A. niger</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.4 Protease de <i>Bacillus licheniformis</i>.....</b>	<b>66</b>
4.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM SOLVENTE .....	68
4.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM ENZIMAS.....	68
<b>4.4.1 Testes preliminares de extração enzimática.....</b>	<b>68</b>
<b>4.4.2 Análise estatística das extrações .....</b>	<b>71</b>
4.4.2.1 Extração com enzimas .....	72
4.4.2.2 Extração sem enzimas .....	81
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de vegetais tem sido associado a uma dieta saudável. Além do seu potencial nutritivo, estes alimentos contêm diferentes fitoquímicos, muitos dos quais desempenham funções biológicas, com destaque para aqueles com ação antioxidante. Estudos têm demonstrado que além do  $\beta$ -caroteno, vitamina C e vitamina E, os compostos fenólicos também estão relacionados à capacidade antioxidante de vários vegetais, do qual podem ser retirados importantes compostos de grande potencial para a indústria alimentícia e farmacêutica (VELIOGLU et al., 1998; McDONALD et al., 2001).

*Byrsonima crassifolia* é conhecida no Brasil como murucizeiro, sendo seus produtos principais o fruto e as folhas; estas últimas apresentam uma elevada capacidade antioxidante (SILVA et al., 2007).

O processo de extração de antioxidantes naturais constitui um mecanismo complexo envolvendo diversas etapas. A extração por solvente pode ser eficiente em alguns casos, porém é muitas vezes agressiva ao ambiente e exige controle rigoroso de fatores como: a polaridade do solvente utilizado, o tempo e a temperatura de extração, os quais podem provocar perda dos compostos antioxidantes (ANDREO; JORGE, 2006).

A estrutura microscópica da maioria das células vegetais é formada por uma parede celular rígida, composta basicamente de celulose, disposta na forma de fibras, associada com outros polissacarídeos, principalmente hemiceluloses, compostos pécticos, lignina e minerais (SANTANA; CAVALI, 2006). Uma das maneiras de se provocar a ruptura desta parede celular é a sua hidrólise utilizando enzimas hidrolíticas como: celulase, protease, hemicelulase, pectineliase/pectinesterase, ligninase/lignase, as quais liberam os compostos presentes no interior da célula, tais como os compostos fenólicos.

Vários modelos teóricos e empíricos têm sido desenvolvidos para prever a hidrólise enzimática de biomassas (HOLTZAPPLE; CARAM; HUMPHREY, 1984; TARANTILI et al., 1996; MOVAGARNEJAD et al., 2000). Fatores intrínsecos determinantes nestes processos são: pH, temperatura, tempo e a relação enzima/matéria-prima. Baseados no modelo de Michaelis-Menten, importantes parâmetros como: velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) devem ser observados, para se obter uma eficiente cinética de atuação das

enzimas utilizadas na biodigestão enzimática (SAKAI et al., 1993; MOVAGARNEJAD et al., 2000).

Tendo em vista as restrições oferecidas pelos métodos convencionais de extração de antioxidantes, este trabalho visa desenvolver utilizando enzimas hidrolíticas, um novo protocolo de extração de compostos fenólicos a partir das folhas do murucizeiro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BYRSONIMA CRASSIFOLIA

*Byrsonima crassifolia* é uma das espécies mais típicas e abundantes das regiões de savanas, sejam estas setentrionais ou do Brasil Central (SANAIOTTI, 1996). Sua morfologia a assinala sob a forma de uma árvore pequena ou um arbusto perenifólio, sendo que sua copa pode ser tanto ampla e aberta, quanto irregular. O tronco apresenta ramos ascendentes, com freqüentes ramificações desde o solo. As flores situam-se em raquis ou panículas terminais, sendo estas actinomórficas, e os frutos situam-se em infrutescências pendulares, sendo estes uma drupa globosa contendo uma única semente (ZAMORA; GONZÁLEZ; POVEDA, 1999).

Pertence à família das Malpigiaceae amplamente distribuída na América Latina, podendo chegar até 6m de altura, com tronco tortuoso e ramos tocando o solo (CAVALCANTE, 1991).

Vários trabalhos relatam que as folhas desta espécie apresentam capacidade antioxidante similar a de alimentos mundialmente conhecidos como fontes de antioxidantes, tais como o chá preto e a ameixa (SOUZA et al, 2007). A Figura 1 mostra as folhas e o fruto do murucizeiro.



**Figura 1.** Frutos e folhas do murucizeiro (ZAMORA; GONZÁLEZ; POVEDA, 1999)

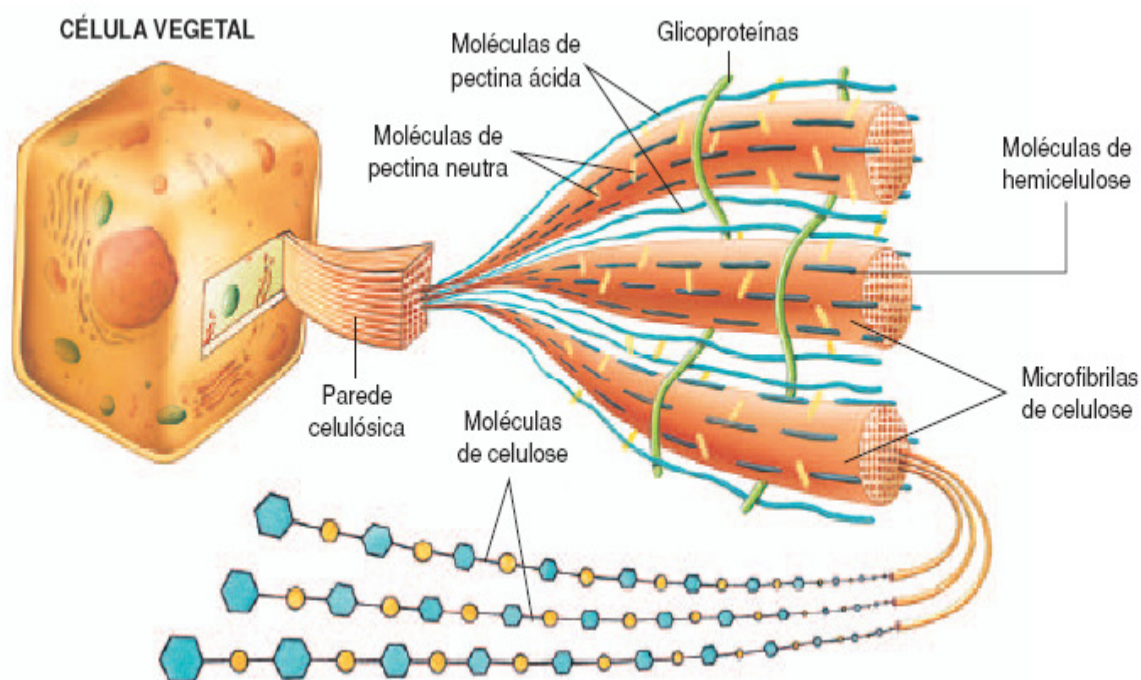


## 2.2 PAREDE CELULAR E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES

A parede celular é um componente próprio da célula vegetal, sendo constituída basicamente por compostos lignocelulósicos. A lignocelulose representa mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal, sendo composta pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, unidos fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes. Nas paredes celulares de tecidos vasculares de plantas terrestres superiores, as fibrilas de celulose estão localizadas em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose. A quantidade de cada um dos polímeros varia com a espécie e a idade da planta, bem como entre as partes da mesma. Em média, a lignocelulose é composta por 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina (GLAZER; NIKAIDO, 1995; FRANCO, 1997; BUCKERIDGE; TINÉ, 2001).

Os vegetais de tecido vascular possuem quantidades significativas de lignina no talo, tronco e folhas. Já nos vegetais de rápido crescimento, os tecidos jovens são ricos em hemicelulose e pectina (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

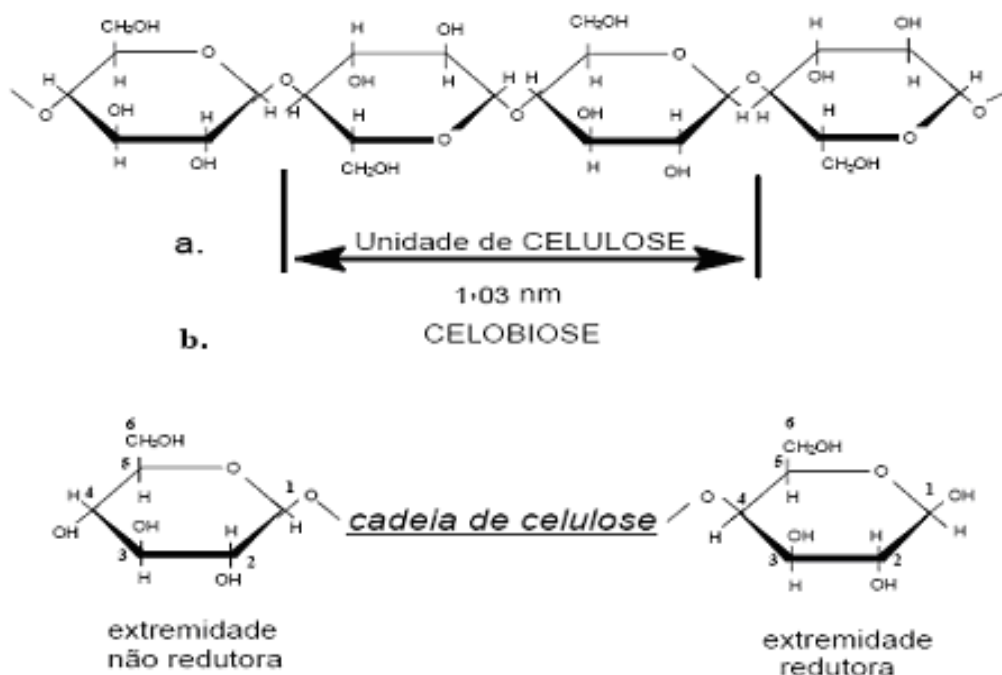
Na Figura 2 observa-se uma parede celular esquemática e alguns dos seus constituintes.



**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura molecular da parede celulósica (RAVEN; EVERT; ELCHHORN, 2001).

## 2.2.1 Celulose

A celulose é o mais abundante componente de biomassa em plantas, encontrado principalmente na parede celular, corresponde a 35-50% do peso da mesma. É formada por longas cadeias lineares de moléculas de glicose, que são ligadas na forma de unidades de D-anidroglicopiranosose, com pontes ésteres  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 e  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas (LYND et al., 2002). A resistência da celulose a processos de hidrólise é devido a sua estrutura cristalina. As pontes de hidrogênio conferem às cadeias de celulose uma estrutura altamente ordenada e rígida. Algumas regiões menos ordenadas (amorfas) são mais sensíveis à hidrólise, formando microcristais (LYND et al., 2002). Representações moleculares da celulose são apresentadas nas Figuras 3 e 4.



**Figura 3.** Estrutura química da celulose; a - Parte central da cadeia molecular e b - Grupos terminais redutores e não redutores.

Cada uma das fibrilas que compõe a estrutura da celulose é formada pela agregação de cerca de 250 microfibrilas, sendo que cada microfibrila é formada por um pequeno número de feixes de molécula de celulose (fibrilas elementares); onde cada molécula de celulose é formada por mais de mil unidades de glicose, as quais

se interligam por pontes de hidrogênio. Em alguns pontos das fibrilas elementares, as moléculas de celulose estão dispostas de maneira desordenada, em outras elas se dispõem ordenadamente, formando as micelas de estrutura cristalina. Entre as fibrilas, microfibrilas e fibrilas elementares, ocorrem outros componentes da parede celular como: hemicelulose, lignina, etc. (SAITO, 2005).

Os grupos hidroxilas (OH) são responsáveis pelo comportamento físico e químico da celulose, sendo capazes de assumir dois comportamentos, em função do seu posicionamento na unidade glicosídica. Dessa forma existem pontes de hidrogênio entre grupos OH de unidades glicosídicas adjacentes da mesma molécula de celulose, que são ligações intramoleculares, responsáveis pela rigidez das cadeias unitárias. Ocorre também ligações entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose, constituindo as chamadas ligações intermoleculares (FENGEL; WEGENER, 1989).

A biodegradação de celulose é um tópico relativamente bem elucidado do ponto de vista bioquímico. A degradação do polímero ocorre pela ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente. Estes grupos compreendem as endo-1,4- $\beta$ -glucanases, as exo-1,4- $\beta$ -glucanases e as 1,4- $\beta$ -glucosidases, investiga-se ainda a existência de uma quarta enzima conhecida como celobiase (BLANCHETTE et.,1997; ENOKI et al., 1999).

### **2.2.2 Hemicelulose**

As hemiceluloses são polissacarídeos de baixo peso molecular, não celulósicos e não amiláceos, associados com material lignocelulósico nas células das plantas. São macromoléculas, nas quais participam pelo menos dois tipos de unidades de açúcares, apresentando peso molecular muito menor do que o da celulose, com 100 a 200 moléculas de monômeros polimerizadas (SACHSLEHNER et al., 1997).

Compreendem um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, que se ligam firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa. Quimicamente, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos, formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. Estes açúcares estão ligados entre si, por

ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares (BIELY, 1985; DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

São classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas e galacto-arabino-glucurono-xilana são diferentes denominações das hemiceluloses em função da estrutura química que as compõem (BIELY, 1985; DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, e trata-se de um heteropolíssacarídeo composto de ligações  $\beta$ -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo do vegetal em que se encontra (WONG; TAN; SADDLER, 1988; HALTRICH et al., 1996; LARSSON et al., 1999).

A biodegradação das hemiceluloses ocorre de forma semelhante à da celulose e as enzimas envolvidas na biodegradação são hidrolases específicas que clivam determinados tipos de ligações existentes no polímero (BLANCHETTE et al., 1997; ENOKI et al., 1999; KAPICH; JENSEN; HAMMEL; 1999; GOODELL, 2003).

### **2.2.3 Lignina**

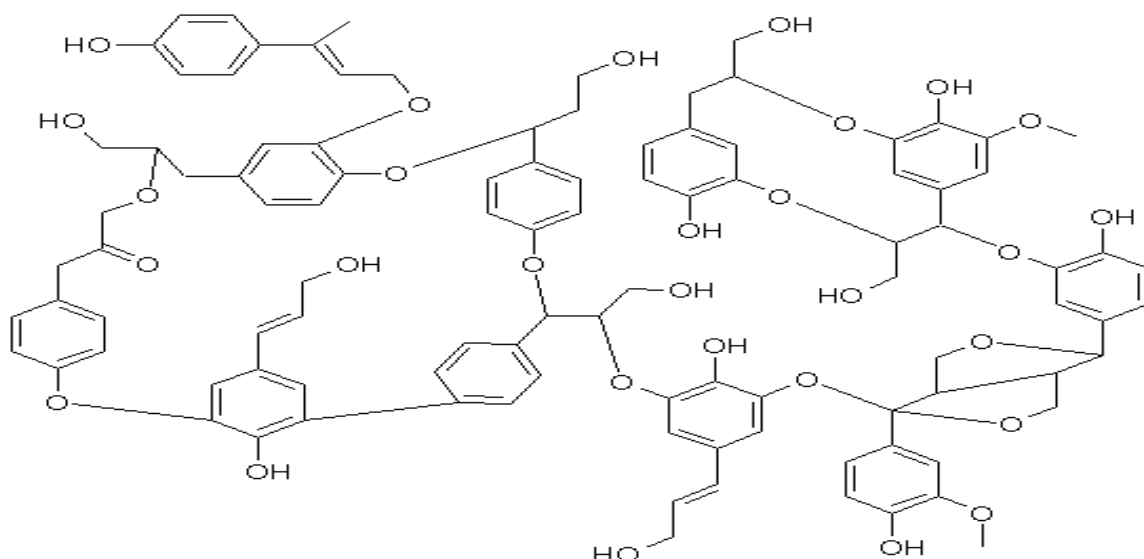
A lignina, juntamente com a celulose, é responsável pela estrutura e rigidez das plantas. É um polímero complexo que consiste de unidades de fenilpropano, interconectadas por uma variedade de ligações carbono-carbono e ligações éter. Na natureza está fisicamente incrustada à celulose e é resistente à degradação por muitos microrganismos (RAMACHANDRA; CRAWFORD; POMETTO, 1987).

A lignina possui uma estrutura aromática disposta em uma rede macromolecular tridimensional, sendo mais hidrofóbica que a celulose e a hemicelulose. É o mais abundante composto fenólico na natureza e serve como um ligante entre as fibras da madeira, dando rigidez e força à estrutura, não sendo digerido pelas enzimas dos mamíferos (VAN SOEST, 1994).

A estrutura da lignina é composta por polímeros formados pela união covalente de três tipos de monômeros: álcoois *p*-cumarílico, guaiacílico e sinapílico. A distribuição e proporção destes monômeros obedecem à origem filogenética de

cada vegetal. Estas ligações do tipo éter resistem a vários agentes hidrolíticos e diversos sistemas enzimáticos degradativos. A quantidade relativa de cada monômero difere significativamente, dependendo da origem da lignina (angiospermas, gimnospermas) (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2003; ZIEGLER et al., 2004).

De acordo com Ferraz (2004) um vasto grupo de enzimas está relacionado à biodegradação da lignina podendo ser divididas em pelo menos duas classes distintas: as fenoloxidasas e as enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. A figura 4 mostra a estrutura química da lignina.



**Figura 4.** Estrutura química da lignina (RAMACHANDRA; CRAWFORD; POMETTO, 1987).

As fenoloxidasas compreendem um grupo de enzimas característico por pertencerem as metaloproteínas. Entre as fenoloxidasas, ainda pode-se descrever dois subgrupos. As peroxidases que estão envolvidas na biodegradação da lignina são a lignina peroxidase e a peroxidase dependente de manganês. Ambas são comumente produzidas por fungos de decomposição branca; no entanto, existem espécies de fungos que são eficientes degradadores de lignina que produzem somente um ou outro subgrupo dessas enzimas. O outro subgrupo contém as lacases, cuproproteínas que não dependem de peróxido para atuarem (FERRAZ, 2004).

### 2.2.4 Substâncias pécticas

Substâncias pécticas 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 de células de vegetais superiores (ASPINALL, 1970; ALMEIDA et al., 2005). Quimicamente, é um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (VILARIÑO et al., 1993; DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; ALKORTA et al., 1998; GUMMADI; PANDA, 2003;) e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (VILARIÑO et al., 1993; ALKORTA, 1998; GUMMADI; PANDA, 2003).

Ao contrário das proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, e por serem polissacarídeos, as substâncias pécticas não possuem massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa (Kilodalton) (SAKAI et al., 1993).

A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécticas em: protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina, sendo os três últimos total ou parcialmente solúveis em água (VILARIÑO et al., 1993; ALKORTA, 1998).

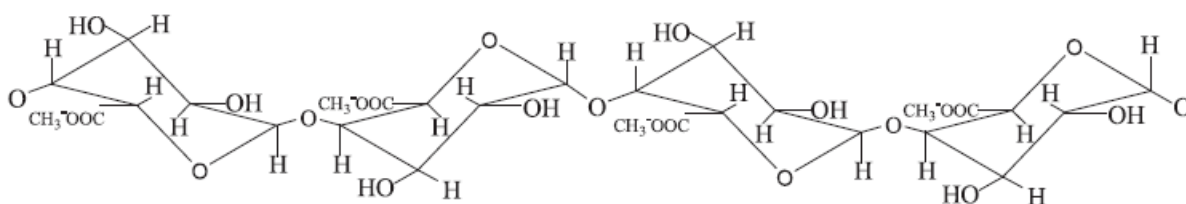
A protopectina é insolúvel em água e constitui a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais e, em condições de hidrólise restrita, produzem ácidos pectínicos ou pectina (TSUYUMU; ISHII; NAKAMURA, 1989; VILARIÑO et al., 1993; DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; ALKORTA et al., 1998; GUMMADI; PANDA, 2003). Ácido péctico é uma designação aplicada a substâncias pécticas compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil éster e seus sais são pectatos neutros ou ácidos ou em função do pH da matriz (SAKAI et al., 1993). Ácido pectínico é um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico coloidal com baixo grau de metoxilação (SAKAI et al., 1993; WHITAKER, 1994).

O termo geral pectina 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 (SAKAI et al., 1993). Consiste em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido  $\alpha$ -1,4-D-galacturônico e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose, como correntes laterais

(TSUYUMU; ISHII; NAKAMURA, 1989; DA SILVA; YIM; PARK, 1994; ALKORTA et al., 1998; GUMMADI; PANDA, 2003; SILVA et al., 2005).

Pectinas com alto teor de metoxilas (acima de 50%) são freqüentemente denominadas apenas de “pectinas” e têm poder de geleificação na presença de açúcares e ácidos, enquanto que a geleificação de pectinas com baixo teor de metoxilação é possível na ausência de açúcares e na presença de alguns íons metálicos (GUMMADI; PANDA, 2003; ALKORTA et al., 1998).

A cadeia primária das substâncias pécticas consiste em unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico com ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) com 2-4 % de unidades de ramnose com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) às unidades de ácido galacturônico (WHITAKER, 1990). A Figura 5 mostra a cadeia linear de ácido galacturônico ligado por associação  $\alpha$ (1,4), em uma cadeia polissacarídea.



**Figura 5.** Estrutura primária das substâncias pécticas (WHITAKER, 1990).

### 2.2.5 Outros constituintes

Muitas outras substâncias orgânicas e inorgânicas ocorrem nas paredes celulares, em quantidades variáveis, dependendo do tipo de célula. Entre as orgânicas destacam-se as de natureza protéica e as de natureza lipídica, como cutina, suberina e ceras. Estas últimas se encontram nos tecidos protetores superficiais da planta (FRANCO, 1997; BUCKERIDGE; TINÉ, 2001).

## 2.3 ENZIMAS

### 2.3.1 Considerações gerais

As enzimas são catalisadores biológicos, na sua maioria de natureza protéica. Possuem um centro ativo responsável pela atividade biológica, que é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica (apoenzima) e de

um grupo não-protéico (cofator). Os cofatores podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas de coenzimas (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de Van der Waals. A atividade catalítica, a estabilidade e a especificidade da enzima dependem da sua estrutura tridimensional. Por serem de natureza protéica o pH, a temperatura e a força iônica do meio, afetam a estrutura secundário ou terciária da enzima e, conseqüentemente suas propriedades (LIMA; PASTORE; LIMA, 2001).

As enzimas estão sujeitas às mesmas leis termodinâmicas e cinéticas dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação, porém não a posição final de equilíbrio entre substrato e o produto. Na primeira etapa da reação a concentração enzimática diminui drasticamente, pois a maior parte das enzimas se liga ao substrato em um equilíbrio dinâmico. A velocidade da reação depende da velocidade com que a enzima se liga ao substrato. Na segunda etapa é alcançada a atividade máxima. A elevada concentração de substrato permite que a enzima volte a formar o complexo enzima-substrato. Na terceira etapa, a concentração de substrato diminui, fazendo a velocidade da reação catalisada pela enzima decrescer (WISEMAN, 1991).

A nomenclatura científica das enzimas foi estabelecida em 1956, pela União Internacional de Bioquímica (IUB) que, através de uma comissão de especialistas (*Enzyme Commission* - EC), procurou sintetizar classes e nomes desses biocatalisadores (LIMA et al, 2001). Cada enzima recebe um número de quatro dígitos e um nome sistemático que identifica a reação catalisada. O primeiro dígito indica o nome da classe da enzima (de 1 a 6), o segundo indica a subclasse (tipo de ação ou grupo sobre o qual atua), o terceiro indica a sub-subclasse e o quarto se refere ao número de série da enzima dentro da sub-subclasse considerada (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais definidas. A concentração de produto formado aumenta linearmente com o tempo, num dado intervalo (velocidade de reação constante). No entanto, a partir de certo tempo, a velocidade decresce (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; LIMA; PASTORE; LIMA, 2001).



Segundo Lima; Pastore e Lima (2001) vários fatores podem contribuir para o decréscimo na velocidade de reação, tais como: diminuição da concentração de substrato, inativação parcial da enzima no decorrer da reação, inibição por produto e deslocamento do equilíbrio se a reação for irreversível. Para evitar a influência dos fatores mencionados, costuma-se associar a atividade à medida da velocidade de reação em condição inicial, ou seja, aquela que assegura velocidade constante (fase linear das curvas).

### **2.3.2 Enzimas utilizadas na degradação da parede celular**

As enzimas de maior interesse na atualidade para a degradação de materiais lignocelulósicos e constituintes da parede celular são celulases, hemicelulases,  $\beta$ -glucanase, xilanase e pectinases, que degradam alguns componentes dos cereais e fibras (GALANTE; DE CONTI; MONTEVERDI, 1998).

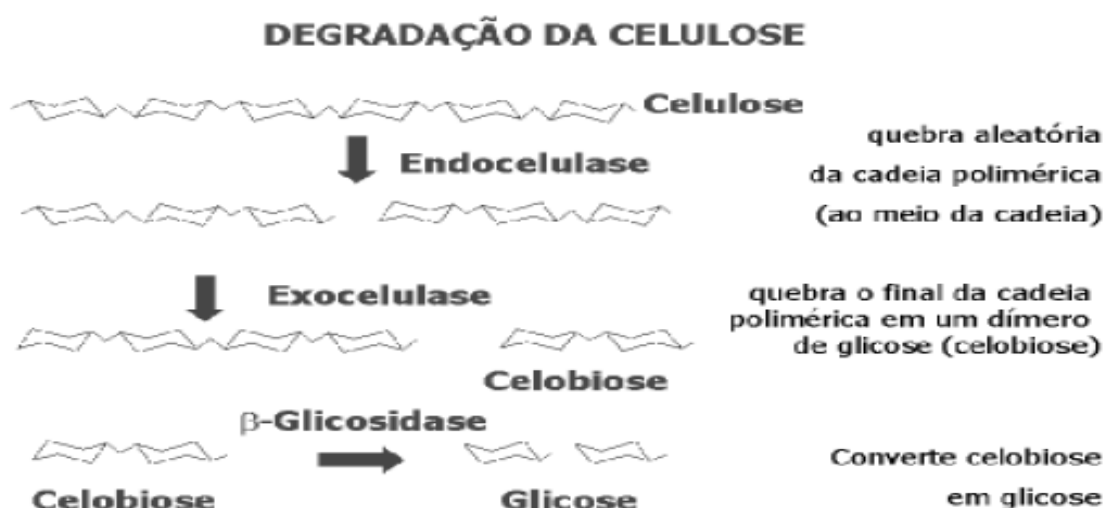
#### **2.3.2.1 Celulases**

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja, do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (ORBERG 1981; BLANCHETTE et al., 1997; ENOKI et al., 1999). As celulases comerciais, produzidas por cepas de *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger*, têm potencial na conversão de materiais lignocelulósicos em glicose (WARD et al., 1993).

A biodegradação da celulose é feita pela ação de três grupos de celulases que atuam sinergicamente: endo-glucanase, exo-glucanase e  $\beta$ -glucosidase. As endo-glucanases catalisam a hidrólise das moléculas de celulose internamente, ao acaso, produzindo fragmentos de celulose denominados de oligômeros, que servem de substrato para as exo-glucanases, que catalisam externamente a hidrólise dessas moléculas à celobiose. As  $\beta$ -glucosidases catalisam a hidrólise da celobiose à glicose (THIEMANN et al., 1980; ORBERG, 1981; WARD, 1989).

Uma quarta enzima, aparentemente pertencente ao complexo celulolítico, também tem sido descrita. A celobiose desidrogenase (CDH), anteriormente

denominada como celobiose oxidase, atua sobre celobiose, oligômeros de glicose e mesmo celulose, oxidando a extremidade terminal redutora. Essa enzima é capaz de utilizar quinonas como acceptor de elétrons e, dessa forma, aparentemente interliga os complexos celulolítico e ligninolítico (GOODELL, 2003). Uma outra enzima relacionada com a CDH tem sido descrita como celobiose-quinona oxidoreductase (CBQ) que, de fato, trata-se de um fragmento de CDH liberado pela ação de enzimas proteolíticas. Outra atividade interessante descrita para CDH é sua capacidade de reduzir os íons  $\text{Fe}^{3+}$  e dessa forma, na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerar radicais hidroxila que podem atuar na degradação de celulose (KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; GOODELL, 2003). Na Figura 6, é possível observar o esquema de degradação da celulose.



**Figura 6.** Mecanismo de degradação da celulose (SADDLER, 1986).

A atividade relativa de cada grupo de enzimas atuando de maneira isolada é baixa, enquanto que os três grupos em conjunto (sinergismo), permitem a hidrólise total da celulose com rendimento próximo a 100% (THIEMANN et al., 1980; ORBERG 1981; WARD, 1989).

A hidrólise da celulose pelas celulasas pode apresentar alguns problemas devido a sua dificuldade de penetração na matriz vegetal, haja vista que, por serem proteínas, não conseguem romper com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose

constitui o principal ponto crítico para desencadeamento desse processo de degradação (THIEMANN et al., 1980).

### 2.3.2.2 Hemicelulases

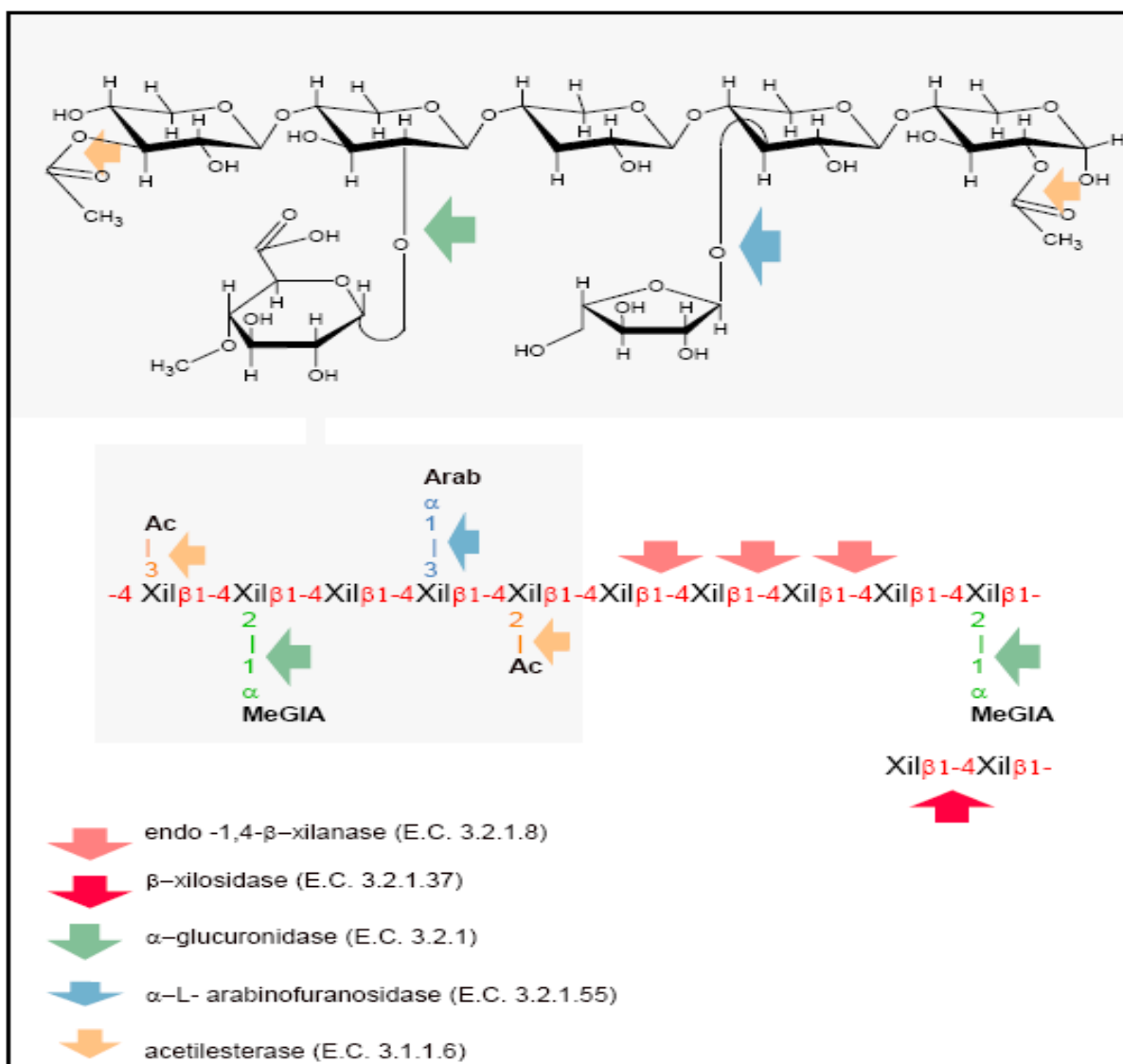
A biodegradação das polioses (hemicelulose) ocorre de maneira semelhante à da celulose sendo divididas nos seguintes grupos: endo-hemicelulases, que hidrolisam o polímero ao acaso e geram fragmentos de menor massa molecular e exo-hemicelulases que hidrolisam os fragmentos gerados pelas endo-hemicelulases. As xilosidases hidrolisam dímeros a açúcares monoméricos. Enquanto que as xilanases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas entre unidades monoméricas de xilose, as mananases atuam sobre ligações glicosídicas entre moléculas de manose e as glucuronidases sobre ligações de ácidos urônicos com moléculas de açúcares (BLANCHETTE et al., 1997; ENOKI et al., 1999; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; GOODELL, 2003).

O fato das hemiceluloses serem constituídas por vários polímeros, formados por diferentes resíduos de açúcares, exige que para a sua degradação completa, também sejam necessárias enzimas específicas (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

A xilana por ser a hemicelulase mais comumente encontrada, exige atenção especial, durante a biodigestão do tecido vegetal. A endo  $\beta$ -1,4 xilanase forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que degrada, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999). A degradação completa da cadeia principal de xilana ocorre por uma ação sinérgica de endo e exo-xilanases ( $\beta$ -xilosidases ou  $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolases), que hidrolisam os xilo-oligômeros de baixa massa molecular resultantes (HALTRICH et al., 1996).

De acordo com Biely (1985), para a hidrólise completa dos heteroxilo-oligômeros, são necessárias, ainda, enzimas que hidrolisem os grupos substituintes como  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetilesterase. Assim, de acordo com o autor, as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- $\beta$ -1,4 xilanase e  $\beta$ -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais ( $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e

acetilesterase). Na Figura 7 é possível observar as enzimas envolvidas na degradação da xilana.



**Figura 7.** Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam (BIELY, 1985).

### 2.3.2.3 Pectinases

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pecticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para

indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos (TSUYUMU; ISHII; NAKAMURA, 1989; DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; MAY, 1997; KASHYAP; VOHRA; SONI, 2001; LOOTENS et al., 2003).

A classificação das enzimas pécticas é baseada no ataque ao esqueleto galacturônico (ALKORTA et al., 1998), pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), por ação de transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liqüidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante) sendo classificadas em três grupos (SAKAI et al., 1993; BHAT, 2000; SILVA et al., 2005):

- Protopectinases – degradam a protopectina insolúvel dando origem a uma elevada quantidade de pectina solúvel.
- Esterases – catalisam a desesterificação, removendo o grupo metil do ácido esterificado;
- Despolimerases – que quebram as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das unidades de ácido poligalacturônico.

As despolimerases atuam nas substâncias pécticas por dois mecanismos (ALBERSHEIM; NEUKOM; DEUEL, 1960; CODNER, 2001):

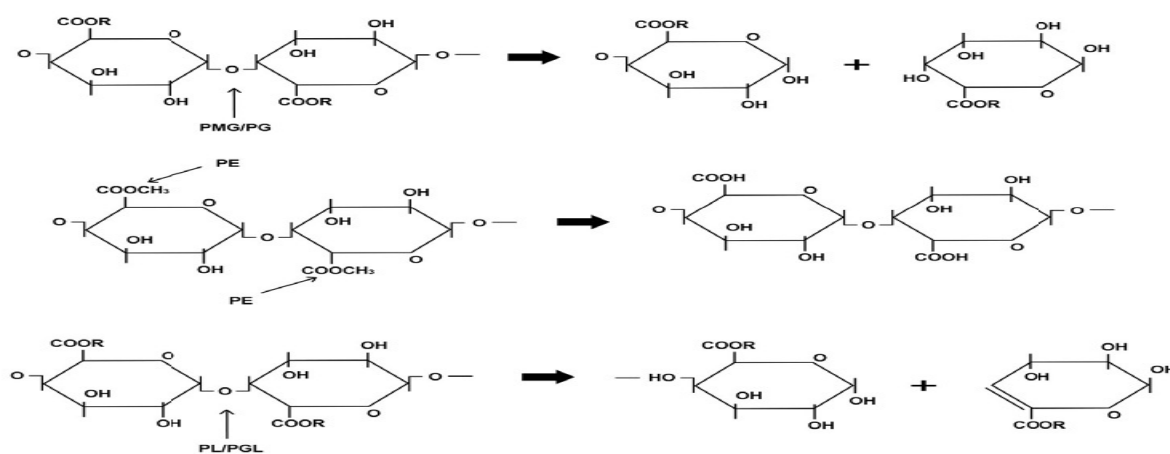
- Hidrólise – as enzimas catalisam o rompimento hidrolítico, com a introdução de água através de pontes de oxigênio.
- Transeliminção – em que as enzimas rompem a ligação sem a participação de nenhuma molécula de água.

As despolimerases podem ser, ainda, divididas em 4 categorias dependendo da preferência da enzima pelo substrato, do mecanismo de rompimento da ligação, e da intensidade da ligação glicosídica (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1976; SAKAI et al., 1993; BHAT, 2000; SILVA et al., 2005).

As poligalacturonases (PG) e polimetilgalacturonases (PMG) rompem o ácido péctico e a pectina por mecanismos de hidrólise. A pectatoliase (PGL) catalisa a clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido péctico de modo endo- ou exo- por transeliminção. Enquanto que a pectinaliase (PL) (polimetilgalacturnato liase - PMGL) catalisa a  $\beta$ - eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1976).

Outro tipo de pectinase inclui a pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) que catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol, e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado) (SHEN et al., 1999; GUMMADI; PANDA, 2003; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada, apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50°C. Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas (KAYSHAP et al., 2001). Pode estar envolvida em mudanças das substâncias pécicas durante amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais, além de facilitar a atuação das poligalacturonases uma vez que estas últimas são parcialmente inativadas na presença de grande quantidade de grupos metil.

Na figura 8 são apresentadas as reações catalisadas pelas principais enzimas que agem sobre o material pécico (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).



**Figura 8.** Reações catalisadas pelos diferentes tipos de enzima sobre a pectina ou o ácido pécico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Uma classificação mais recente e completa pode ser encontrada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação extensiva das enzimas pécnicas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

<b>Enzima</b>	<b>Nº E.C.</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Atuação</b>	<b>Substrato primário</b>	<b>Produtos</b>
<b>Estereases</b>					
Pectinesterase (PE)	3.1.1.11	Hidrólise	Aleatória	Pectina	Ácido pécnico, metanol
<b>Despolimerases - Hidrolases</b>					
Protopectinases	-	Hidrólise	Aleatória	Protopectina	Pectina
Endo - poligalacturonase (PG)	3.2.1.15	Hidrólise	Aleatória	Ácido pécnico	Oligogalacturonatos
Exo-poligalacturonase (PG)	3.2.1.67	Hidrólise	Terminal	Ácido pécnico	Monogalacturonatos
Endo-polimetilgalacturonase (PMG)	-	Hidrólise	Aleatória	Pectinas altamente esterificadas	Oligometilgalacturonatos
Exo-polimetilgalacturonase (PMG)	-	Hidrólise	Terminal	Pectinas altamente esterificadas	Oligogalacturonatos
<b>Despolimerases – Liases</b>					
Endo-pectatoliase (PGL)	4.2.2.2	Transeliminação	Aleatória	Ácido pécnico	Oligogalacturonatos insaturados
Exo-pectatoliase (PGL)	4.2.2.9	Transeliminação	Penúltima ligação	Ácido Pécnico	Digalacturonatos insaturados
Endo-pectinaliase (PL)	4.2.2.10	Transeliminação	Aleatória	Pectinas	Metiloligogalacturonatos insaturados
Exo-pectinaliase (PL)	-	Transeliminação	Terminal	Pectinas	Metilomonogalacturonatos insaturados

#### 2.3.2.4 Proteases

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas usados industrialmente. Elas catalisam reações de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, incluindo dois grupos. No primeiro as exopeptidases que catalisam as reações de hidrólise dos aminoácidos das extremidades das cadeias protéicas. No segundo grupo têm-se as endopeptidases, as quais catalisam as reações de hidrólise das ligações peptídicas internas às moléculas de proteínas (SINGH; VOHRA; SAHOO, 2003).

As proteases diferem na sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas. Como exemplos de proteases têm-se as aminopeptidases, dipeptidases, carboxipeptidases, serina, cisteína e metalo proteases (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995).

A aplicação de proteases é bastante ampla. São utilizadas na indústria de detergentes, no tratamento do couro, para a confecção de roupas, na recuperação da prata de filmes fotográficos e de filmes de raio X, na indústria farmacêutica, no tratamento de resíduos de indústrias de alimentos, na obtenção de peptídeos funcionais, entre outros (KUMAR; TAKAGI, 1999).

O uso de proteases como catalisador industrial tem aumentado. Essas enzimas apresentam alta capacidade catalítica, alto grau de especificidade de substrato e são economicamente viáveis (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995; JOO et al., 2002).

Na indústria de alimentos, as proteases podem ser usadas para a produção de hidrolisados protéicos, a partir de proteínas vegetais ou animais, para o melhoramento da digestibilidade, biodisponibilidade e funcionalidade destes produtos. As proteases microbianas, para uso comercial ou industrial, são obtidas principalmente de bactérias e fungos. Os microrganismos do gênero *Bacillus* são os mais estudados como produtores dessas proteases e suas enzimas têm sido extensivamente exploradas comercialmente (SINGH; VOHRA; SAHOO, 2003).

#### 2.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de



oxidação, em cadeia (ANTUNES; CANHOS, 1984; SIMÃO, 1985; FENNEMA, 1993; BRENNNA; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001).

Grande parte desses compostos são quimicamente constituídos por anéis benzênicos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), muito utilizados na indústria de alimentos, ou naturais, como os flavonóides e os terpenóides, porém tais compostos podem apresentar uma variedade de estruturas químicas (KITTS, 1994).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS e doenças do coração podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas, denominadas de “substâncias reativas oxigenadas” ou simplesmente ROS. Estas substâncias estão também ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (BRENNNA; PAGLIARINI, 2001; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002).

Os mecanismos endógenos de defesa ou mediadores de redox, tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas, podem ser auxiliados favoravelmente com a introdução de antioxidantes por meio da dieta (BRENNNA; PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI; KARA, 2002).

As ROS's são, na verdade, as várias formas de oxigênio ativado (singlete), entre as quais se incluem os denominados radicais livres. Nos organismos vivos as várias formas de ROS's podem se constituir de diversas maneiras. Por exemplo, nas fontes exógenas produtoras de radicais livres inclui-se a fumaça do tabaco, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas (YILDRIM; MAVI; KARA, 2002).

Desde o início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pelos possíveis efeitos maléficos ao organismo como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (SIMÃO, 1985; ZHENG; WANG, 2001; MELO; GUERRA, 2002; YILDRIM, MAVI; KARA, 2002).

Numerosos compostos demonstram possuir propriedades antioxidantes, porém seus usos em alimentos são limitados por várias razões, e somente um número restrito de substâncias é aceito (MIKOVÁ, 2001). Entre estes, os compostos fenólicos, sintéticos ou naturais têm sido extensivamente analisados (ZHENG; WANG, 2001; MIKOVÁ, 2001; MELO; GUERRA, 2002; YILDRIM, MAVI; KARA, 2002; NENADIS; ZAFIROPOULOU; TSIMIDOU, 2003).

#### **2.4.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Constituem, provavelmente, o maior grupo de metabólitos secundários das plantas (BRUNETON, 1993). Englobam diversas substâncias com características estruturais químicas heterogêneas (POLENTA, 1996), apresentando como característica em comum a existência de anel (éis) aromático(s) com um ou mais grupos hidroxilas (OH); podendo estes apresentarem substituições por grupamentos metil ou glu(i)cosil (GOODWIN; MERCER, 1983). Estes compostos podem ser divididos em grupos, de acordo com o número de átomos de carbono constituintes (DREOSTI; WARGOVICH; YANG, 1977; GOODWIN; MERCER, 1983; TIJBURG et al., 1997; MAZUR et al., 1998; CASTELLARI et al., 2002; CHAMKHA et al., 2003; GOLDBERG; YAN; SOLEAS, 2003).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio tripleto e singleto ou decompondo peróxidos (ANTUNES; CANHOS, 1984; SIMÃO, 1985; FENNEMA, 1993; BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001, MONAGAS; BARTOLOMÉ; GOMEZ-CORDOVÉZ, 2005).

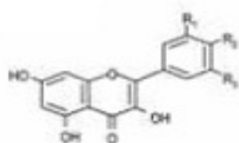
Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides; ambos são metabólitos secundários presentes em vegetais. Os denominados de flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C6-C3-C6; já os denominados de não flavonóides são classificados como (BURNS et al., 2001; MELO; GUERRA, 2002; ZHENG; WANG, 2001; MONAGAS; BARTOLOMÉ; GOMEZ-CORDOVÉZ, 2005):

- Ácidos fenólicos simples ou hidroxibenzóicos, derivados das estruturas químicas C6-C1 específicas dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico;

- Ácidos cinâmicos, derivados das estruturas químicas C6-C3 específicas dos ácidos caféico e *p*-coumárico hidroxi-cinamatos;
- Estilbenos, derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do trans resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glicosídeo.

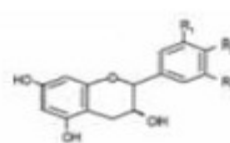
Na Figura 9 é possível observar detalhes da estrutura química dos principais representantes dos compostos fenólicos encontrados em matérias primas vegetais.

#### FLAVONÓIS



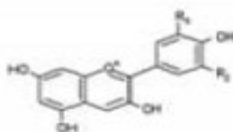
$R_2 = \text{OH}$ ,  $R_1, R_3 = \text{H}$ : Kaempferol  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$ : Quercetina  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$ : Miricetina

#### FLAVANÓIS



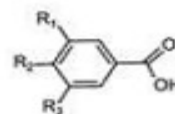
$R_1 = R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$ : Catequina  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$ : Galocatequina

#### ANTOCIANINAS



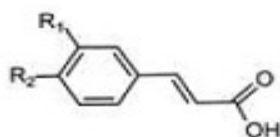
$R_1 = R_2 = \text{H}$ : Pelargonidina  
 $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ : Cianidina  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$ : Delfinidina  
 $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ : Petunidina  
 $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ : Malvidina

#### ÁCIDO HIDROXIBENZÓICO



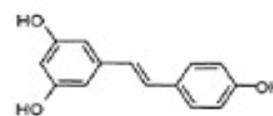
$R = R_2 = R_3 = \text{OH}$ : Ácido gálico

#### ÁCIDO HIDROXICINÂMICO



$R_1 = \text{OH}$ : Ácido coumarico  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$ : Ácido caféico  
 $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ : Ácido ferrúlico

#### STILBENO ou ESTILBENOS



Resveratrol

**Figura 9.** Estrutura química dos principais representantes dos compostos fenólicos encontrados em matérias primas vegetais.

### 2.4.2 Compostos fenólicos do tipo flavonóides

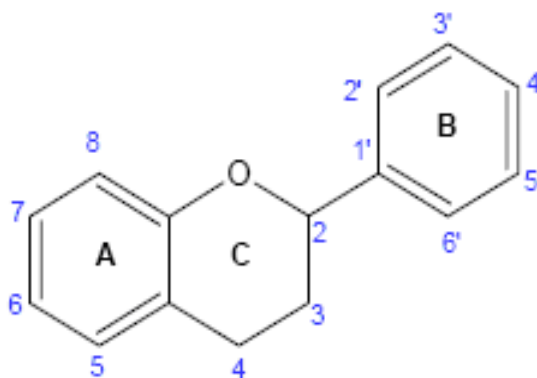
Os flavonóides representam o maior grupo de polifenóis encontrados em alimentos (SCALBERT; WILLIANSO 2000), além de serem considerados os mais

potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; SOOBRAATTEE et al., 2005).

A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os flavonóides são formados pela combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioleta B, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz. Conseqüentemente, plantas cultivadas em estufas, onde os raios ultravioleta são bloqueados tem o conteúdo de flavonóides reduzido. Vegetais que crescem na Espanha ou na África do Sul são apontados como contendo de 4 a 5 vezes mais flavonóides que os que crescem no Reino Unido (BOBBIO; BOBBIO, 1989; FENNEMA, 1993; BURNS et al., 2001; AHERNE; O'BRIEN, 2002; SELLAPPAN; AKOH; KREWER, 2002).

Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor freqüência, as auronas, chalconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula. O grupo dos flavonóides é também conhecido como polifenólicos e geralmente ocorrem em plantas na forma de glucosídios, sendo uma das substâncias responsáveis pela atribuição do perfil sensorial de frutas, atribuindo-lhes o corpo característico. Mais de 6.000 diferentes estruturas já foram identificadas e este número continua a aumentar (BOBBIO; BOBBIO, 1989; FENNEMA, 1993; SLUIS et al., 2001; AHERNE; O'BRIEN, 2002; CORDENUNSI et al., 2002; ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

A estrutura dos flavonóides está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel que na posição 2 carrega um anel de fenil-benzeno como substituinte. O terceiro anel, denominado de núcleo flavan pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou proantocianinas ou catequinas) e as antocianidinas. No caso do terceiro anel apresentar como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide. (AHERNE; O'BRIEN, 2002; ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Na Figura 10 é possível observar a estrutura química base dos flavonóides.



**Figura 10.** Estrutura básica dos flavonóides

Exceto o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonóides ocorrem em plantas frequentemente na forma glicosilada recebendo a denominação de glicoflavonóide. Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (SLUIS et al., 2001; AHERNE; O'BRIEN, 2002).

### 2.4.3 Compostos fenólicos do tipo não flavonóides

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: os derivados do ácido hidroxicinâmico e os derivados do ácido hidroxibenzóico. Os primeiros são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por 3 carbonos ligada ao anel (BELITZ ;GROSCH, 1988; DURÁN; PADILLA, 1993).

Os ácidos *p*-coumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido caféico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres. Isômeros do ácido clorogênico e do ácido caféico são descritos com antioxidantes (HARBORNE, 1973; BELITZ GROSCH, 1988; DURÁN; PADILLA, 1993; AHERNE; O'BRIEN, 2002).

No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Esses dois grupos de ácidos fenólicos têm apresentado propriedades antioxidantes (HARBORNE, 1973). Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos

fenólicos e seus ésteres, esta é geralmente determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula (RAJALAKSMI; NARASIMHAN, 1995).

A hidroxila do ácido ferrúlico existente na posição *orto* com o grupo metoxila, doador de elétrons, é um fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxil e a eficiência antioxidante do composto (CUVELIER; RICHARD; BERSET, 1992). A presença de uma segunda hidroxila na posição *orto* ou *para*, também aumenta a atividade antioxidante. O ácido caféico, que apresenta essa característica, possui uma atividade antioxidante maior do que o ácido ferrúlico (CHEN; HO, 1997). O efeito seqüestrante do radical hidroxil parece estar diretamente relacionado com os grupos hidroxil localizados na posição *para* no anel aromático (CUVELIER; RICHARD; BERSET, 1992).

Os ácidos sináptico, ferrúlico e p-coumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido procatecuíco, siríngico e vanílico. Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico (-HC=CHCOOH), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa possibilidade (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994; SOOBRAATTEE et al., 2005).

#### **2.4.4 Taninos**

No caso dos taninos, os mesmos são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham molécula polihidroxifenóis ou seus derivados. Os primeiros são denominados taninos hidrolisáveis, que incluem os galitaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico, desta forma estão inclusos no grupo dos compostos fenólicos não-flavonoides. Este grupo de taninos é comumente utilizado para a curtição de couros (FENNEMA, 1993; NASCIMENTO; MORAIS, 1996; GARROGALVEZ; RIEDL; CONNER, 1997; MELO; GUERRA, 2002).

Os outros são denominados de taninos condensados. São encontrados em maior quantidade e são de maior importância em alimentos. Apresentam uma estrutura semelhante aos flavonóides, com coloração variando do vermelho ao marrom. A presença de pequenas quantidades de taninos em frutos confere-lhes características sensoriais desejáveis, ditas como “o corpo da fruta” (GARRO-

GALVEZ; RIEDL; CONNER, 1997). No entanto, quantidades elevadas conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes (MELO; GUERRA, 2002). A sensação de adstringência é gerada devido à propriedade que os taninos apresentam de precipitar proteínas. Quando em contato com as proteínas da saliva, forma um complexo insolúvel que popularmente se caracteriza pela sensação “amarrando a língua” (BOBBIO; BOBBIO, 1989; FENNEMA, 1993; GARRO-GALVEZ; RIEDL; CONNER, 1997; MELO; GUERRA, 2002).

## 2.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

### 2.5.1 Considerações gerais sobre extração

A extração consiste na operação de separação, por diferença de potencial de um ou mais constituintes de uma mistura através do contato com uma outra fase (GEANKOPLIS, 1983; BINBENET; DUQUENOY; TRYSTAM, 2002). A extração mais utilizada na retirada de compostos fenólicos de suas matrizes constitui o processo de extração sólido-líquido, o qual se baseia na retirada de determinado composto a partir de uma matriz sólida, pelo contato com um líquido (solvente). Este processo também recebe a denominação de lixiviação. Durante o tempo de contato, há transferência de massa dos solutos da matriz sólida para o solvente (GEANKOPLIS, 1983; BINBENET; DUQUENOY; TRYSTAM, 2002; ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA, 2003).

Algumas etapas preliminares devem ser realizadas para facilitar o processo de extração e conservar os compostos antioxidantes, que são sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor (VEKIARI et al., 1993; AZIZAH; RUSLAWATTI; TEE, 1999). Os vegetais normalmente são desidratados, liofilizados ou congelados, e ainda peneirados ou moídos antes do processo de extração. Assim, os substratos atingem maior superfície de contato com o solvente de extração e as enzimas como a lipoxigenase tornam-se inativas. Tais enzimas, naturalmente presentes em vegetais, são responsáveis pela rancidez oxidativa enzimática (GÁMEZ-MEZA, 1999; JUNTACHOTE; BERGHOFER, 2005).

A liofilização das amostras antes da extração não afeta significativamente as substâncias fenólicas, além de ajudar a mantê-las conservadas por um longo tempo. O congelamento também é recomendável, uma vez que lesiona o tecido vegetal

favorecendo a saída dos componentes das células (ESCRIBANO-BAILÓM; SANTOS-BUELGA, 2003).

A eficiência da extração de constituintes antioxidantes está diretamente relacionada às características químicas das moléculas e aos procedimentos de extração utilizados (WATERMAN; MOLE, 1994).

### **2.5.2 Métodos e principais variáveis da extração**

Dentre os métodos de extração mais utilizados está aquele realizado com solventes orgânicos, freqüentemente utilizados para o isolamento dos compostos bioativos. O rendimento da extração e a determinação da atividade antioxidante dos extratos dependem do tipo de solvente, devido às diferenças nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos (JULKUNEM-TIITO, 1985; MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997).

As pesquisas relacionadas com a extração de compostos fenólicos têm como objetivo comparar seus resultados e encontrar a melhor alternativa para sua aplicação em alimentos (VEKIARI et al., 1993). Keinänen (1993) evidenciou que solventes alcoólicos (MeOH 80% e EtOH 80%) são mais eficazes na extração de compostos fenólicos.

Kalt; McDonald e Donner (2000) verificaram que teores mais elevados de compostos fenólicos são obtidos a partir de produtos processados de blueberry quando extraídos durante 60 minutos em água a 60°C. Com o tempo de 20 minutos na mesma temperatura de 60°C para cada extração, Maillard et al. (1996) obtiveram um teor quatro vezes maior de fenólicos totais para malte de cevada. Por outro lado, um dos métodos de extração testado por Kähkönen et al. (1999) que foi considerado eficiente, consistiu de três extrações de 20, 40 e 45 minutos na mesma temperatura dos dois trabalhos anteriores. Dessa forma foi evidenciado que fatores como: tempo de extração, temperatura e características da matriz podem estar diretamente relacionado com os conteúdos finais do componente de interesse (AZIZAH, RUSLAWATTI e TEE, 1998; VEKIARI, et al. 1993).

Nessa et al. (2004) ao realizarem pesquisa com folhas de *Blumea balsamífera*, mediante extração seqüencial com éter, clorofórmio e metanol e determinaram a atividade antioxidante seqüestradora de radical livre e identificaram 11 tipos de flavonóides na fração unificada. No mesmo experimento o extrato de



metanol foi o que apresentou a maior atividade antioxidante, seguida pelo extrato de clorofórmio e do extrato etéreo. Já Azizah, Ruslawatti e Tee (1999) utilizaram metanol, misturas de clorofórmio, éter e dicloroetano ou clorofórmio, metanol e dicloroetano para a extração de compostos fenólicos a partir de subprodutos de cacau (pó, grãos e cascas), e obtiveram resultados variados quanto aos teores finais de compostos fenólicos.

Segundo Moure et al. (2001) etanol e água são os solventes mais empregados para a extração de antioxidantes por razões de higiene e de abundância. De acordo com os estudos comparativos para a seleção do solvente ótimo são necessários, pois a atividade dessas substâncias depende dos compostos polifenólicos, uma vez que a atividade antioxidante máxima é exigida para cada substrato.

Segundo Tsuda et al. (1994) solventes com menor polaridade, como o acetato de etila, normalmente extraem compostos com maior atividade antioxidante que a mistura com etanol ou metanol ou somente metanol, para sementes de tamarindo.

A água pura extrai com baixa eficiência os compostos fenólicos com atividade antioxidante devido à sua alta polaridade. Em estudo realizado com cogumelos “Ling Chih” (*Ganoderma tsugae*), o extrato metanólico apresentou maior atividade antioxidante, porém baixa concentração de compostos fenólicos (24,0 a 35,5 mg/g) (MAU et al., 2005a). Já no extrato aquoso, a concentração de compostos fenólicos obtida foi de 40,86 a 42,34 mg/g (MAU et al., 2005b).

Dentro dos métodos de obtenção dos compostos antioxidantes verifica-se como fator determinante o tempo (JULKUNEM-TIITO, 1985; MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997). O tempo de extração também afeta consideravelmente a recuperação dos polifenóis. O tempo de extração pode variar de 1 minuto e 24 horas. No entanto, longos períodos de extração aumentam a possibilidade de oxidação dos compostos fenólicos exigindo que agentes redutores sejam adicionados ao sistema (SHAIDI; NACZK, 1995).

A decomposição térmica tem sido apontada como a maior causa da redução do conteúdo de polifenóis em matrizes vegetais (MOURE et al., 2001). Segundo Conde et al. (1998) a temperatura tem influência significativa na extração de compostos fenólicos, promovendo aumento na retirada destes a partir de suas matrizes. Entretanto segundo o mesmo autor a estabilidade dos compostos fenólicos é afetada por degradações químicas e enzimáticas, e pela volatilização dos

compostos, o que acaba reduzindo os teores destes, pela excessiva exposição das matrizes à temperaturas muito elevadas, em geral acima de 60°C.

Na decomposição térmica, compostos fenólicos podem reagir com outros componentes e impedir sua extração (MOURE et al., 2001). De acordo com Herrero; Cifuentes e Ibanez (2006) altas temperaturas de extração apresentaram grande influência em todos os resultados, alterando os compostos com propriedades antioxidantes.

A extração sob temperaturas brandas é desejável nos casos em que alguns compostos podem ser degradados como, por exemplo, o ácido carnósico presente nos extratos de alecrim. Para minimizar tais efeitos Hui (1996) sugere a utilização da extração com fluido supercrítico que preserva a ação antioxidante dos extratos.

A extração com solventes constitui método de separação conveniente, mas deve-se levar em consideração os efeitos tóxicos causados pelos resíduos. Dessa forma novos métodos vem sendo desenvolvidos, tais como a extração com fluido supercrítico, considerada desejável, pois não libera resíduos tóxicos de solventes no ambiente. Este tipo de extração está incluída nas técnicas de extração denominadas não-convencionais (por microondas, CO<sub>2</sub> supercrítico e a alta pressão), que vem sendo utilizadas com o intuito de obter altos rendimentos com tempos de extração reduzidos (HUI, 1996; HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006).

As indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas têm interesse pela extração supercrítica em substituição aos processos de extração convencionais (extração com solventes orgânicos e hidrodestilação) para obtenção de óleos essenciais e oleorresinas. A extração supercrítica produz extratos livres de resíduos e pode ser conduzida em baixas temperaturas, preservando a qualidade de compostos termo-sensíveis (ZANCAN et al., 2002).

A obtenção de compostos antioxidantes mediante extração com gases, como o dióxido de carbono, sob condições críticas de pressão e temperatura constitui método moderno e eficiente (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006). Para polifenóis a extração supercrítica é possível desde que se adicione um co-solvente mais polar, ou se for reduzida a polaridade dos polifenóis, pois o CO<sub>2</sub> supercrítico é apolar. Tais procedimentos promovem aumento do rendimento e da seletividade dos extratos (POKORNY; KORCZAK, 2001). Outras vantagens como, por exemplo, a alta pureza dos extratos e a grande eficiência do processo podem torná-la viável

para aplicação em alimentos (POKORNY; KORCZAK, 2001; HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006).

O grande inconveniente da extração supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação que requer equipamentos excessivamente caros, elevando o custo final do produto (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006).

A extração por microndas combina a extração tradicional por solvente com as microndas. Neste tipo de extração solventes com altas constantes dielétricas (polares) absorvem mais a energia das microndas, elevando a temperatura do meio e facilitando a extração, por esse motivo, a princípio são mais indicados (ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA, 2003). Entretanto há resultados opostos a esse, usando solventes com constantes dielétricas mais baixas, como a cetona que extrai mais do que a água, o metanol ou o etanol. A explicação para esse fato seria que o solvente não absorve a energia, permitindo que a água do material sólido a absorva, rompendo assim as paredes das células e liberando os polifenóis para o solvente (MAGNO e SILVA, 2004).

O estudo de compostos com atividade antioxidante, tais como os compostos fenólicos necessita de modificações e melhoramentos uma vez que a indústria para este tipo de compostos cresce em escala industrial cada vez mais rápida necessitando de novas tecnologias para que este crescimento seja acompanhado (FENNEMA, 1993; SIMÃO, 1985; BRENNA; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizadas neste estudo folhas de *Byrsonima crassifolia* coletadas no Campus do Guamá da Universidade Federal do Pará (Belém-PA). A identificação da espécie foi realizada no Museu Emílio Goeldi (Belém-PA) com o registro Nº 130939 para a exsicata analisada.

As folhas de *Byrsonima crassifolia* foram coletadas e embaladas em sacos de papel até a chegada ao laboratório, onde foram secas em estufa com circulação de ar à 50°C, trituradas em moinho (tipo Willye modelo TE-650 – Tecnal -Brasil) e peneiradas. O pó utilizado foi aquele que passou na peneira de 20-mesh (0.84 mm), e ficou retido na peneira de 28 mesh (0.6 mm), sendo o mesmo armazenado em freezer à -20°C até o momento das análises.

As enzimas utilizadas no experimentos foram: celulase de *Aspergillus niger* (1 unit/mg - Fluka, Suíça), hemicelulase de *Aspergillus niger* (0.3-3.0 unit/mg - Sigma, EUA), protease de *Bacillus licheniformis* (12 units/mg - Fluka, Suíça ) e Pectinase de *Aspergillus niger* (Sigma, EUA).

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Caracterização das folhas

As análises utilizadas na caracterização físico-química das folhas de *Byrsonima crassifolia*, foram realizadas no laboratório de Agroindústria da EMBRAPA Amazônia Oriental e todas as análises citadas nos itens a seguir foram realizadas em triplicata.

- Umidade

Foi determinada por secagem direta em estufa à vácuo da marca QUIMIS® modelo Q819V2, a 70°C até peso constante, segundo método nº 920.151 da AOAC (1997).

- Resíduo mineral fixo (cinzas)

O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico através da calcinação da amostra a 550 °C, em mufla da marca FORNITEC– Ind. e Com. LTDA, modelo 2017, de acordo com o método nº 940.26 da AOAC (1997).

- Teor de Proteína

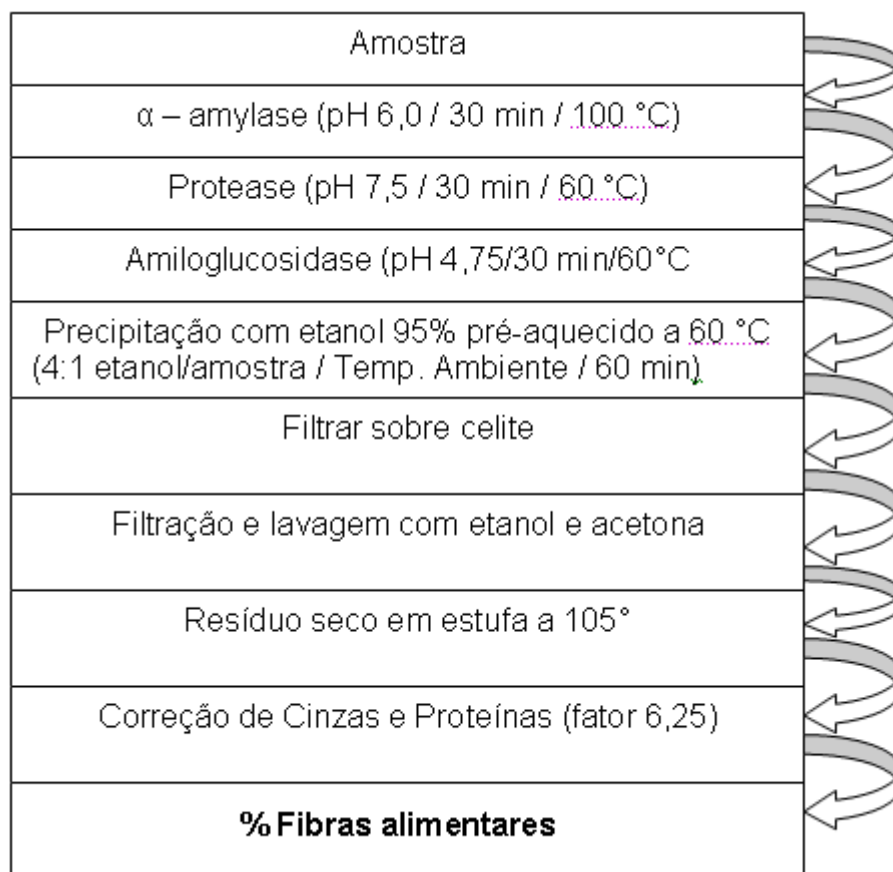
Foi determinado pela técnica micro-Kjeldahl, utilizando bloco digestor da marca TECNAL modelo TE 040/25, controlador de temperatura da TECNAL modelo TE 007A e destilador de nitrogênio da TECNAL modelo TE-036/1. Para conversão da porcentagem de nitrogênio em proteínas, utilizou-se o fator 6,25, de acordo com o método nº 920.152 da AOAC (1997).

- Teor de lipídios

Obtido por extração em *Soxhlet* acoplado ao banho-maria da ADVANTEC modelo LB-160, utilizando como solvente o éter de petróleo e refluxo durante 4 horas, de acordo com o método nº 968.20 da AOAC (1997).

- Fibra alimentar total

Na quantificação das fibras alimentares totais (FAT) foi utilizado o método 985.29 enzimático-gravimétrico, oficialmente adotado pela AOAC (1997), cujo esquema é apresentado na Figura 11. A determinação das fibras alimentares totais baseia-se no princípio de que amido e proteínas são removidos da amostra enzimaticamente e o resíduo resultante, o qual é insolúvel em etanol à 95%, é determinado gravimetricamente. Correções são aplicadas pela dedução das frações de proteínas residuais e componentes inorgânicos (cinzas).



**Figura 11.** Esquema do método de determinação de fibras alimentares da AOAC (1997).

- Fibras alimentares solúveis e insolúveis

A determinação do teor de fibra alimentar insolúvel (FAI), das amostras de *Byrsonima crassifolia* foi realizada de acordo com o método enzimático-gravimétrico oficial da AOAC (1997) nº 985.29, utilizando kit de determinação de fibra (Sigma Chemical Co.), solução-tampão ácido 2-(N-Morfolino) etanolamina Tris(hidroximetil)aminometano (MES-TRIS) 0,05M, pH 8,2 e celite como auxiliar de filtração. A fibra alimentar solúvel (FAS) foi obtida por diferença entre FAT e FAI.

- Teor de celulose, lignina e hemicelulose

As estimativas dos componentes da parede celular foram obtidas pela análise de fibra em detergente neutro (FDN = celulose + lignina + hemicelulose), fibra em

detergente ácido (FDA = lignina + celulose) e lignina bruta conforme metodologias descritas por Van Soeste e Wine (1963).

#### *Determinação de lignina*

A determinação da lignina foi feita pelo método do permanganato de potássio (SILVA; QUEIROZ, 2002).

#### *Determinação da celulose*

Após a determinação da lignina, foi aproveitado o material para determinar a celulose, incinerando-se os cadinhos durante 2 horas a 500°C, esfriando-os em dessecador e pesando-os. A porcentagem de celulose foi calculada pela diferença nas pesagens, antes e depois da incineração (SILVA; QUEIROZ, 2002).

#### *Determinação de hemicelulose*

Por diferença das frações calculadas a partir das análises de FDN e FDA foi possível estimar a fração de hemicelulose conforme metodologia descrita por Van Soeste e Wine (1963).

- Teor de pectina

As pectinas totais (PT) foram extraídas de acordo com o procedimento de McCready e McComb (1952) e determinadas colorimetricamente pela reação do carbazol, seguindo a técnica de Bitter e Muir (1962).

### 3.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

#### **3.3.1 Extração com solventes**

A extração com solventes foi realizada em procedimento seqüencial de acordo com literaturas específicas (SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007; ROESLER, 2007) em balões âmbar de 30mL, usando uma razão sólido-líquido de

1:20 (m:v) (1g de amostra : 20 mL da 1ª solução extratora) com três diferentes soluções extratoras. As soluções extratoras utilizadas foram: 1ª extração - acetona: metanol (70:30, v:v); 2ª extração - metanol:água (70:30, v:v); e a 3ª extração - metanol:água:ácido acético (50:40:10, v:v:v).

Em um balão âmbar foram depositadas as folhas em pó e em seguida adicionados o volume da 1ª solução extratora. O balão ficou em repouso por 45 minutos a 58°C. Em seguida a solução foi filtrada em kitassato de 100mL com auxílio de uma bomba de vácuo. O material retido no papel de filtro foi coletado e transferido para outro balão âmbar, tomando-se cuidado para que o papel filtro fosse lavado com a 2ª solução extratora (20 mL), repetindo-se os procedimentos para a 3ª solução extratora como já mencionados para as duas primeiras. O extrato resultante das três lavagens foi coletado no kitassato e em seguida misturado e analisado.

### **3.3.2 Extração enzimática**

#### **3.3.2.1. Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas utilizadas**

- Celulase

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  da celulase foram medidos pela velocidade inicial da produção de açúcares redutores, liberados em tampão acetato de sódio 0,05M pH 4,8 sob condições controladas.

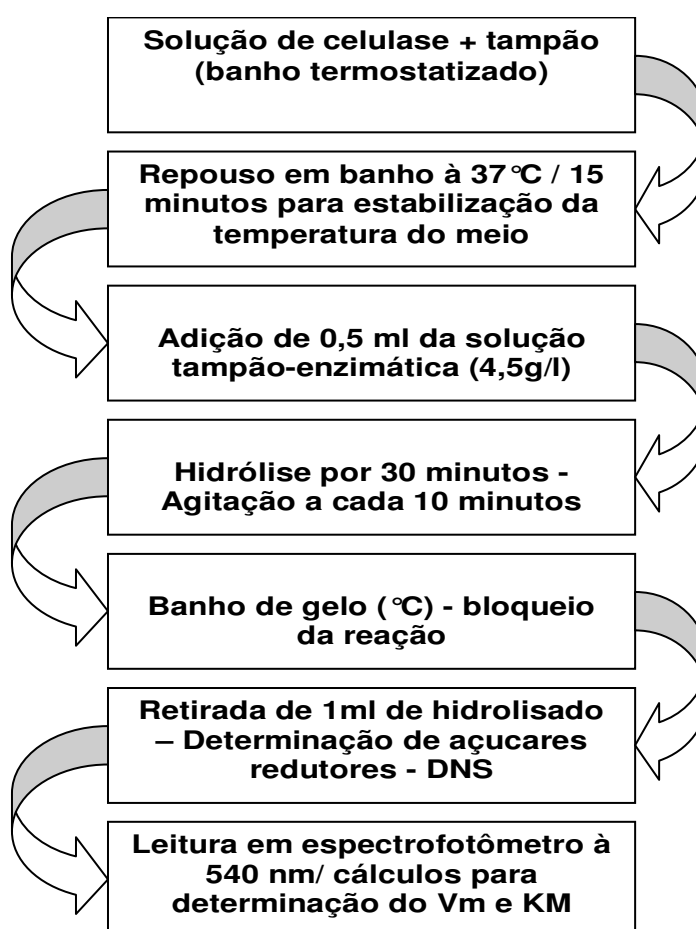
O método consistiu na utilização de frascos âmbar incubados em banho termostático a 37°C (temperatura ótima para a celulase) durante 30 minutos, com agitação recíproca (em forma de 8) realizada a cada 10 minutos, sendo utilizados nos ensaios frascos de 30 mL aos quais eram adicionadas as diferentes concentrações de solução padrão de celulose a 2%, que variaram de 0,25 a 7 g/L. Em seguida eram adicionados da solução tampão (volume calculado para um volume final de 10ml) e deixados sob aquecimento por 15 minutos até que atingissem a temperatura ótima da enzima; somente então eram adicionados os 0,5 mL de solução enzimática (4,5 g/L) preparada em tampão.

Durante a hidrólise os frascos âmbar eram colocados no banho termostático a 37°C, pelo período já citado. Após o término do tempo os frascos eram imediatamente depositados sobre um banho de gelo para cessar a hidrólise.



Em seguida alíquotas de 1 mL dos produtos da hidrólise, foram retirados para a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do DNS (MILLER, 1959) sendo as absorbâncias medidas a 540 nm. O branco consistiu numa solução que continha o tampão e o reagente DNS.

Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinados pela linearização de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934). Na Figura 12 é possível observar as etapas realizadas no procedimento de hidrólise para determinação do  $V_{max}$  e  $K_m$  da celulase.

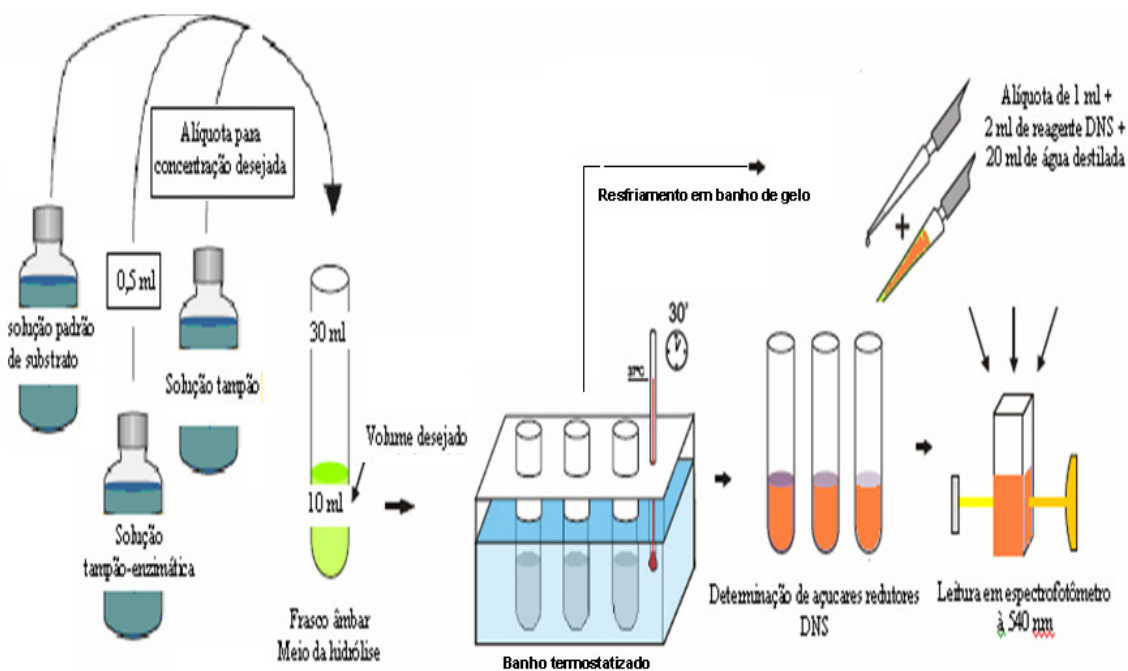


**Figura 12.** Fluxograma da determinação dos parâmetros cinéticos da celulase

- Hemicelulase (xilanase)

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  da xilanase foi realizada de maneira semelhante àquela observada para a celulase, sendo alteradas as concentrações de xilose (substrato para xilanase), obtidas a partir de uma solução padrão de xilana a 1%. Estas concentrações variaram de 0,5 a 9,5 g/L. O

experimento foi todo realizado em tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,5, sob condições controladas. A hidrólise ocorreu em banho termostatizado a 50 °C, por um período de 30 minutos. Após o término da hidrólise a atividade da xilanase foi determinada medindo-se a liberação de açúcares redutores usando o método do DNS (MILLER, 1959), seguindo as etapas já mencionadas para a celulase. Na Figura 13 é possível observar de maneira esquemática as etapas do experimento.



**Figura 13.** Esquema do procedimento de determinação dos parâmetros cinéticos da xilanase

- Pectinase

Os parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_m$  da pectinase foram determinados medindo-se a liberação de ácido D-galacturônico, liberado pela hidrólise de pectina cítrica de baixa metoxilação (Sigma, St Louis, MO, USA). No experimento uma solução mãe de pectina de baixa metoxilação a 1% foi preparada em tampão acetato 0,05M, pH 5,5, da qual foram retiradas alíquotas a fim de obter concentrações desejadas as quais variaram de 0,1 a 9,5 mg/mL. Em seguida as diferentes concentrações foram colocadas em tubo âmbar, o volume era completado com tampão e deixados sobre aquecimento por 15 minutos até que atingissem a temperatura ótima da enzima, sendo então somente adicionados os 0,5 mL de solução tampão enzimática, completando um volume final de 10mL.

Os tubos foram colocados novamente em banho termostatzado e ao final de 30 minutos a atividade da pectinase foi medida pelo método do DNS, proposto por Miller (1959).

Na figura 14 são apresentadas algumas das etapas da determinação do  $V_{max}$  e  $K_m$  da pectinase.



**Figura 14.** Hidrólise em frascos âmbar (superior); determinação de DNS (inferior esquerda e direita)

- Protease

A constante de Michaelis-Mentem e a velocidade máxima da protease foi determinada utilizando como substrato isolado protéico (Integral médica, São Paulo, Brasil) na faixa de concentração de 0,5 a 9,5g/L em solução tampão fosfato 0,05 M, pH 5,0 a 50 °C, obtidas a partir de uma solução mãe de isolado protéico a 2% (ROWLEY; BULL, 1977).

As diferentes concentrações de substrato foram colocadas em frascos âmbar de 30mL juntamente com o tampão (volume previamente calculado). A mistura foi aquecida até 55°C e 0,5mL de solução tampão-enzimática foi adicionada, sendo novamente aquecida por 1 hora. Os frascos eram agitados de maneira recíproca a cada 15minutos.

Ao final do tempo a reação foi paralisada com banho de gelo e pela adição de 3 mL de solução 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA). A absorbância do produto da hidrólise foi medida a 280 nm, utilizando como branco o tampão utilizado como meio da hidrólise.

### 3.3.2.2 Extração enzimática

Para a determinação da quantidade de cada enzima a ser utilizada na solução extratora, foram determinados os valores do  $V_{max}$  e  $K_m$  de cada enzima. A partir do qual foi feita uma relação entre a soma dos  $K_m$  obtido para as enzimas estudadas com os percentuais de cada fibra encontrados na matriz vegetal caracterizada.

De maneira detalhada na determinação dos valores do  $K_m$  e  $V_{max}$  foram utilizados 4,5 g de enzima para 1g de folha. Estes valores foram relacionados com a massa de 0,2g de folha utilizada na extração dos compostos fenólicos. Após isso o valor obtido foi de 0,9 g de enzima, utilizando-se 1g final de enzima, do qual foram retiradas as proporções de cada enzima a serem utilizadas, com base nos percentuais das frações de cada fibra anteriormente determinados.

Para as extrações foram utilizadas amostras de folhas secas moídas de *Byrsonima crassifolia* obtidas do mesmo modo como na extração por solvente. Para a realização das hidrólises enzimáticas foram utilizadas as seguintes enzimas: Celulase em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,8 à 35°C); Hemicelulase em solução tampão de acetato de sódio (0,05 M, pH 5,5 à 37°C); Protease em solução tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 5,0 à 55°C) e Pectinase em solução tampão de fosfato de sódio (0,05 M, pH 5.5 à 55°C). Quando necessário foram realizados ajustes de temperatura e pH com ácido acético e/ou acetato de sódio.

A extração foi realizada em tubos de 30 mL do tipo âmbar usando uma relação sólido-líquido de 1:20 (m:v) (0,2g de amostra : 4 mL de tampão enzimático).

Após a pesagem das folhas em pó em cada frasco foram adicionados 1,8 mL de água a 80°C, e o conjunto mantido nessas condições por 10 segundos, para inativação da polifenoloxidase, uma vez que essa poderia promover interferências nos resultados. Após os 10 segundos foram adicionados 1,8 mL de água a 0°C e a mistura levada à estufa na temperatura de estudo. Ao atingir a temperatura desejada, 0,4 mL de solução tampão enzimática foi adicionada aos tubos nos tempos pré-definidos. Em seguida os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes retirados para as análises necessárias.

### 3.3.2.3 Testes preliminares de extração

Com o objetivo de verificar os melhores pontos de atuação das enzimas e facilitar a elaboração do planejamento experimental a ser aplicado no trabalho. Foi realizado um estudo preliminar das condições de extração.

Temperatura, pH e tempo de processo foram estabelecidos como fatores de maior influência, cuja faixa de interesse foi definida com base em dados da literatura (HURST et al., 1976; KUMAR; TAKAGI, 1999; GUMMADI; PANDA, 2003; SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007)B: Temperatura: 30 a 70°C; Tempo: 30 a 180 minutos e pH: 3 a 7. Na tabela 2 são mostradas as condições dos ensaios realizados.

**Tabela 2.** Condições de extração utilizadas nos teste preliminares.

Tempo	Temperatura	pH
30	50	5,0
60	50	5,0
90	50	5,0
120	50	5,0
120	30	5,0
120	40	5,0
120	50	5,0
120	60	5,0
120	70	5,0
120	50	3,0
120	50	4,0
120	50	5,0
120	50	6,0
120	50	7,0
180	50	5,0

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

#### 3.4.1 Compostos fenólicos totais

A concentração dos polifenóis foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocateu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) adaptado por Silva et al. (2007) para uso em microplacas.

A partir de cada extrato seco, foram preparadas em triplicata soluções estoque pelos seguintes procedimentos: 5mg de extrato foram solubilizados com 1mL de metanol, sonificados por 3 minutos em banho ultrasônico, sendo em seguida centrifugados por 5 minutos a 3500rpm e 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos do tipo eppendorf de 2mL, envoltos por papel alumínio e saturados com N<sub>2</sub>. Estas soluções eram armazenadas a 4°C, por até dois dias.

Em seguida teve início a mistura reacional realizada com 250 µL de extrato, 125 µL de solução de Folin-Ciocateu 1N e 625 µL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 75g/L. Após o período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente (25°C), 200 µL da mistura reacional foram transferidos para os poços da microplaca (transparentes) e a absorbância lida em espectrofotômetro (Ultospec 2000, UV visível - Pharmacia Biotech, EUA) a 765 nm.

O teor de compostos fenólicos totais foi calculado a partir da curva de calibração do ácido gálico e expresso como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (mgEAG/gES). Todas as leituras foram feitas em triplicatas sendo refeitas aquelas que apresentarem um erro relativo maior ou igual a 12%.

#### 3.4.3 Delineamento experimental

Para avaliar os efeitos combinados das variáveis independentes (pH, Tempo e temperatura) sobre as variáveis dependentes ou respostas (Teor de compostos fenólicos totais) aplicou-se um delineamento experimental baseado na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) do tipo central composto rotacional de 2ª ordem (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2003).

O planejamento utilizado foi o fatorial completo 2<sup>3</sup> com 20 ensaios, sendo 8 ensaios fatoriais (combinações entre os níveis -1 e +1); 5 axiais (uma variável no

nível  $+\alpha$  e duas em 0; e uma no nível  $-\alpha$  e duas em 0); e 6 centrais (as três variáveis independentes no nível 0) com mais 5 pontos adicionais .

Na determinação dos valores máximos e mínimos de cada variável independente (Tabela 2) foram considerados os resultados dos testes preliminares obtidos anteriormente.

Os parâmetros do processo, identificados como variáveis independentes, foram avaliados em 5 níveis codificados ( $-\alpha$ ;  $-1$ ;  $0$ ;  $+1$ ;  $+\alpha$ ), e foram calculados segundo a Equação 1.

$$X_i = (x_i - Z) / \Delta X_i \quad (1)$$

Onde:

$X_i$  = valor codificado da variável  $X_i$ ;

$x_i$  = valor real da variável;

$Z$  = valor real da variável no ponto central;

$\Delta X_i$  = valor do intervalo de variação de  $X_i$ .

O delineamento central composto rotacional de 2ª ordem apresenta também dois níveis axiais para as variáveis independentes, que são codificados como  $+a$  e  $-a$ . O valor depende do número fatorial ( $F$ ) do delineamento e da quantidade de variáveis independentes ( $K$ ), sendo o valor definido pela Equação 2.

$$\alpha = (F)^{1/4} \quad (2)$$

Sendo  $F = 2^k$  e  $K = 3$ , tem-se que:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} = 1,682$$

O valor fornecido pela Equação 2 representa o valor em módulo. Os valores codificados utilizados para os pontos axiais no projeto foram de  $+1,682$  e de  $-1,682$  para  $+\alpha$  e  $-\alpha$ , respectivamente.

Na Tabela 3, encontram-se os níveis das variáveis independentes e na Tabela 4, os ensaios realizados.

**Tabela 3.** Níveis codificados e decodificados do planejamento.

Variável independente	Variável codificada	Nível de variação				
		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
pH	X1	2,4	3,5	5,0	6,5	7,5
Tempo (minutos)	X2	19	60	120	180	220
Temperatura	X3	19	30	45	60	70

**Tabela 4.** Planejamento composto central rotacional.

Ensaio	pH (X1)	Tempo (minutos) (X2)	Temperatura (°C) (X3)
1	3,5 (-1,00)	60 (-1,00)	30 (-1,00)
2	6,5 (1,00)	60 (-1,00)	30 (-1,00)
3	3,5 (-1,00)	180 (1,00)	30 (-1,00)
4	6,5 (1,00)	180 (1,00)	30 (-1,00)
5	3,5 (-1,00)	60 (-1,00)	60 (1,00)
6	6,5 (1,00)	60 (-1,00)	60 (1,00)
7	3,5 (-1,00)	180 (1,00)	60 (1,00)
8	6,5 (1,00)	180 (1,00)	60 (1,00)
9	2,4 (-1,68)	120 (0,00)	45 (0,00)
10	7,5 (1,68)	120 (0,00)	45 (0,00)
11	5,0 (0,00)	220 (1,68)	45 (0,00)
12	5,0 (0,00)	120 (0,00)	19 (-1,68)
13	5,0 (0,00)	120 (0,00)	70 (1,68)
14	5,0 (0,00)	120 (0,00)	45 (0,00)
15	5,0 (0,00)	120 (0,00)	45 (0,00)
16	5,0 (0,00)	120 (0,00)	45 (0,00)
17	5,0 (0,00)	120 (0,00)	45 (0,00)
18	5,0 (0,00)	120 (0,00)	45 (0,00)
19	5,0 (0,00)	120 (0,00)	45 (0,00)
20	3,5 (-1,00)	180 (1,00)	45 (0,00)
21	2,4 (-1,68)	180 (1,00)	60 (1,00)
22	2,4 (-1,68)	120 (0,00)	60 (1,00)
23	2,4 (-1,68)	180 (1,00)	70 (1,68)
24	3,5 (-1,00)	220 (1,68)	70 (1,68)
25	2,4 (-1,68)	220 (1,68)	70 (1,68)



### 3.4.5. Análise estatística dos resultados

Para a análise dos resultados experimentais, a Metodologia de Superfície de Resposta descreve o comportamento de um sistema no qual estão combinadas as variáveis independentes ( $X_k$ ) e a variável dependente ou resposta ( $Y_i$ ). A resposta é uma função dos níveis nos quais estes fatores foram combinados e definidos (BOX, DRAPER, 1987) (Equação 3) :

$$Y_i = F (X_1, X_2, \dots, X_k) \quad (3)$$

Dentro das faixas de variação propostas, ou seja, dentro da região caracterizada por esses níveis, o comportamento de cada resposta avaliada pode ser predito de forma generalizada (Equação 4).

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (4)$$

Onde:

$Y_1$  = Variável dependente ou função resposta;

$X_1, X_2, X_3$  = Valores das variáveis independentes;

$\beta_0$  = Coeficiente relativo à interceptação do plano com o eixo de resposta;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$  = Coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$  = Coeficientes das variáveis quadráticas;

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$  = Coeficientes de interação entre as variáveis independentes;

$\varepsilon$  = Erro experimental.

Foram ainda avaliados os resultados das análises físicas e físico-químicas das matérias-primas e dos extratos através do teste de comparação de médias de Tukey, com o auxílio programa Statistica® versão 5.0 (StatSoft, Tulsa, 2006). Os resultados do planejamento experimental do processo de extração foram avaliados utilizando programa estatístico, avaliando-se:

- Efeitos significativos ( $p \leq 0,1$  ou valores próximos) das variáveis;
- A significância estatística dos parâmetros do modelo;
- A estimação dos pontos ótimos

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização das folhas foi realizada com o objetivo de verificar, principalmente, os percentuais de fibras encontradas nas folhas e ainda fornecer dados necessários para a determinação da concentração de cada enzima a ser utilizada nas extrações dos compostos fenólicos. Na Tabela 5 são apresentados os valores das determinações realizadas para as folhas de *Byrsonima crassifolia*.

**Tabela 5.** Caracterização físico-química das folhas de *Byrsonima crassifolia* em base úmida.

<b>Determinação*</b>	<b>Resultados</b>
Umidade (%)	23,79± 0,05
Proteína (%)	7,57± 0,50
Lipídios (%)	2,36± 0,37
Cinzas (%)	1,09± 0,01
Fibras alimentares totais (%)	65,18± 0,39
Fibras alimentares insolúveis (%)	59,37± 0,17
Fibras alimentares solúveis (%)	5,81± 0,15
Celulose (%)	35,05± 0,02
Hemicelulose (%)	20,03± 0,25
Lignina (%)	4,29± 0,63
Pectina (%)	3,90± 0,32

(\*) Análises realizadas em triplicata;

Os valores de celulose, hemicelulose e lignina foram de 35,05%, 20,03%, 4,29%, respectivamente, valores compatíveis com aqueles encontrados por Carvalho et al. (2006) que obtiveram, para o bagaço de cana-de-açúcar adquirido em usinas produtoras de cachaça, teores de 30,30% de celulose, 20,68% de hemicelulose e 7,34% de lignina. Em uma base de 100% de fibras as folhas do murucizeiro apresentaram valores de 53,97 % para o teor de celulose, 30,73% para hemicelulose, 6,58% para lignina e 5,98% para pectina. De acordo com Glaizer e Nikaido (1995) a parede celular é constituída em média por 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina variando de acordo com o tipo de tecido vegetal o que explicaria os baixos teores de lignina quando comparados com a literatura.

Andrade et al. (2002) avaliaram 60 cultivares de cana-de-açúcar com vistas à alimentação animal e observaram para os teores de celulose valores menores que aqueles observados nas folhas de *B. crassifolia*; o mesmo ocorreu para o teor de hemicelulose, com valores que variaram de 17,94 a 29,01% de celulose e de 11,15 a 23,87% de hemicelulose. Entretanto o teor de lignina citado pelo mesmo autor foi compatível com o observado para a *Byrssonima*, uma vez que o intervalo citado foi de 2,71 a 6,78%.

Foi possível observar que o teor de celulose na matriz vegetal estudada foi cerca de 8 vezes maior que o teor de lignina, indicando uma possível facilidade de hidrólise enzimática desse material, uma vez que a lignina é o maior inconveniente para a hidrólise de biomassas vegetais. Segundo Van Soest (1994) esta maior quantidade de celulose em relação à lignina é característica de folhagens, diferentemente de outras partes vegetais como caules que necessitam ao fornecer sustentação ao vegetal como um todo, maiores teores de lignina, haja vista que esse componente é o principal responsável pelo fornecimento de rigidez ao tecido vegetal.

A celulose é o mais abundante componente de biomassa em plantas, correspondendo a aproximadamente 35-50% do peso, valores estes semelhantes aos encontrados para as folhas do murucizeiro (LYND et al., 2002). Os teores de hemicelulose podem variar de 20 a 25%, intervalo este que englobaria o resultado encontrado na caracterização das folhas de *B. crassifolia* (WAKABAYASHI, 2000). Segundo Larsson et al. (1999) cerca de 40% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se à hemicelulose, que depois da celulose é o carboidrato mais abundante na natureza sendo as xilanas as formas mais comuns de hemiceluloses.

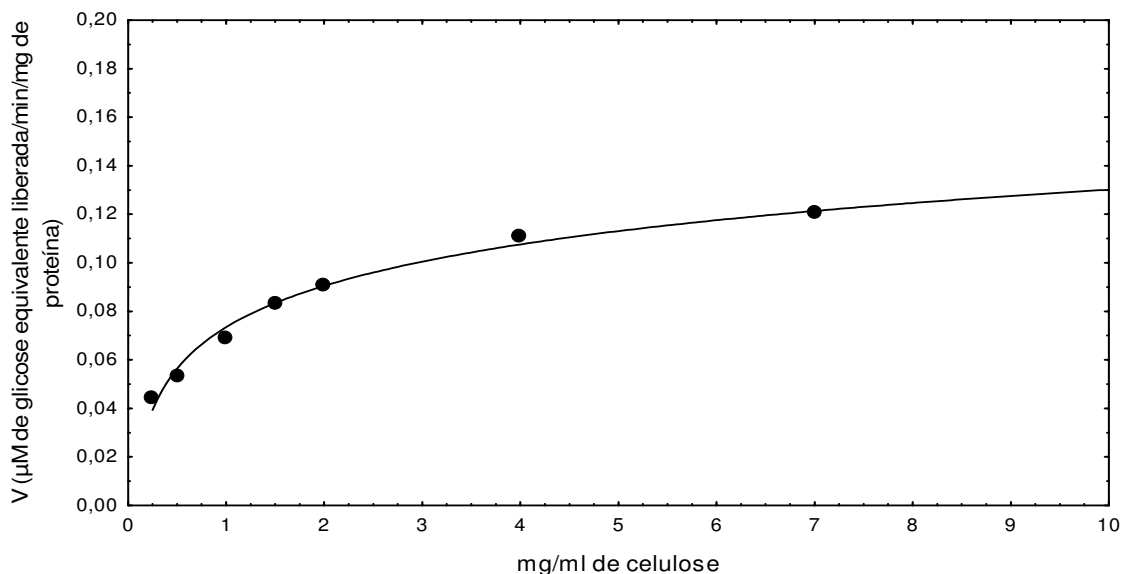
Esmelindro et al. (2002) caracterizando folhas de erva mate encontrou para os teores de proteína valores variando de 8,30% a 13,45% e relativamente semelhante ao encontrado neste trabalho que foi de 7,57%. Encontrou ainda valores de 5,07% a 6,60% para cinzas bem acima dos encontrados para as folhas de *B. crassifolia* que apresentou teor de 1,07%.

O teor de fibras totais encontrado para as folhas de *B. crassifolia* foi de 65,19%, valor este acima daqueles encontrados por Câmara e Madruga (2001) e Ortega-Flores (1998) para folhas de mandioca moídas e secas em estufa a 50°C que foram de 11,2% e 52,1% respectivamente.

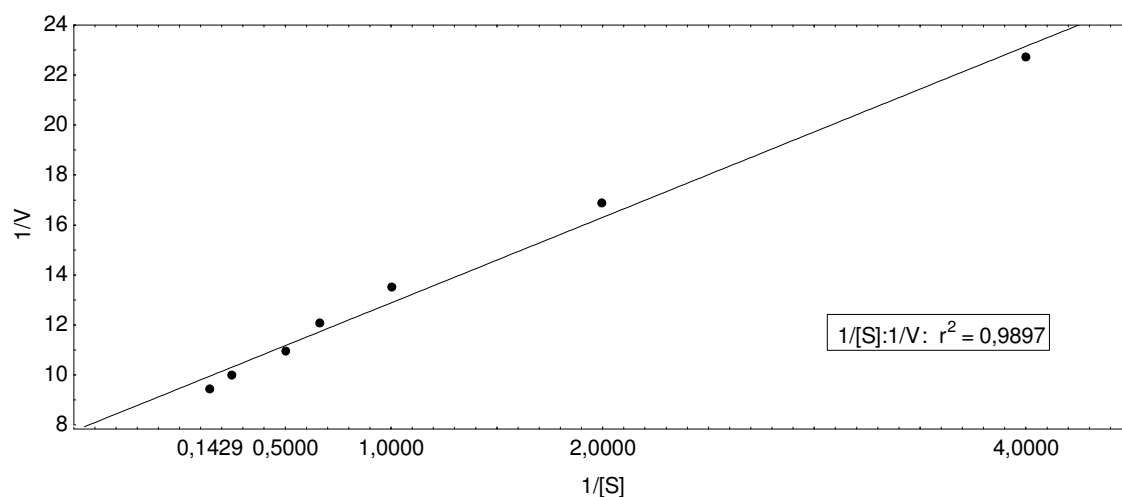
## 4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS

### 4.2.1 Celulase de *Aspergillus niger*

Nas Figuras 15 e 16 estão apresentados os gráficos de Michaelis-Menten e da linearização de Lineweaver-Burk respectivamente obtidos para a celulase de *Aspergillus niger*.



**Figura 15.** Gráfico de Michaelis-Menten da celulase de *Aspergillus niger*



**Figura 16.** Gráfico da Linearização de Lineweaver-burk para a celulase de *Aspergillus niger*

Observa-se na Figura 15 a evolução da atividade enzimática em função da concentração de celulose padrão. Na Tabela 6 são apresentados os valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  estimados para a celulase a partir da linearização de Lineweaver-Burk

mostrada na Figura 16. Os valores encontrados para o Vmax e o Km foram de 238,10  $\mu\text{M}$  de glicose equivalente liberada/min/mg de proteína e 3,24 mg/mL respectivamente. Na Tabela 6 são apresentados os valores de Vmax e Km encontrados para a celulase após a sua caracterização e valores citados na literatura para a mesma.

**Tabela 6.** Valores de Vmax e Km para a celulase

<b>Celulases</b>	<b>Vmax *</b>	<b>Km **</b>	<b>Fonte</b>
<i>A. niger</i>	238,10	3,24	2009
<i>A. niger</i>	10,8 a 207	1,3 a 80	Hurst et al. (1976)
<i>A. niger</i>	2,96 a 10,7	1,3 a 80	Imai, Ikari e Suzuki (2004)
<i>Trichoderma reesei</i>	—	0,05 a 0,10	Nidetzky et al. (1994)
<i>A. niger</i>	556	110	Oikawa, Tsukagawa e Soda (1998)

\*( $\mu\text{M}$  de glicose equivalente liberada/min/mg de proteína); \*\* (mg de celulose/mL)

Hurst et al. (1976) purificaram e caracterizaram as celulases de *A. niger* e encontraram valores para o Vmax que variaram de 10,8 a 207  $\mu\text{M}$  de glicose equivalente liberada/min/mg de proteína e de 1,3 a 80 mg de carboximetilcelulose/mL para o Km, em intervalos de pH de 2,5 a 6,0 como apresentado na Tabela 6.

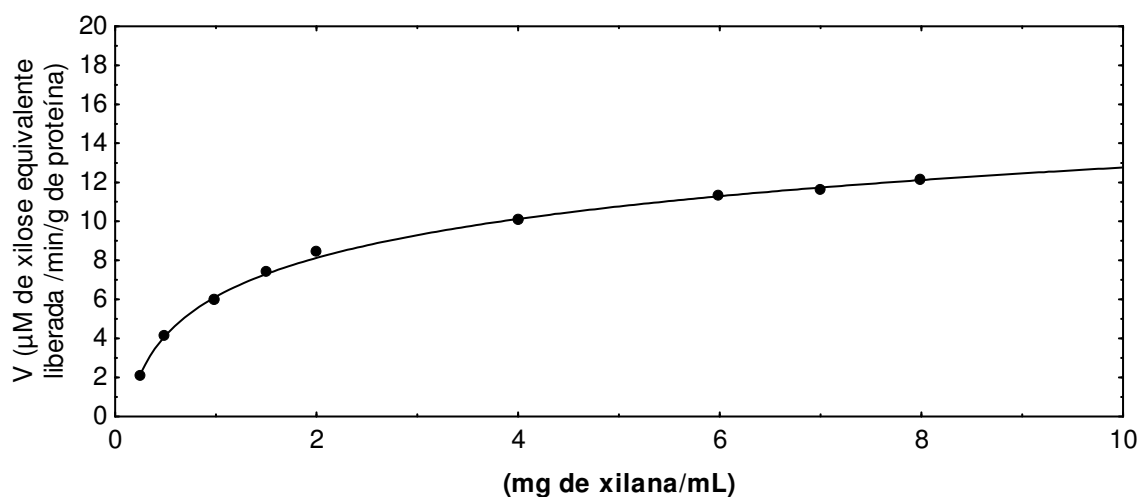
Bakare et al. (2005) também variaram as concentrações de carboximetilcelulose e encontraram valores de 3,1, 3,6 e 5,3 mg/mL para o Km da celulase de *Pseudomonas fluorescens*. Estes valores são bem semelhantes ao encontrado neste trabalho, porém em sua maioria superiores, indicando menor afinidade dessas enzimas em relação a que foi utilizada neste trabalho. Waskman (1991) encontrou para endoglucanase de *Sclerotinia sclerotiorum* Km de 8,7 mg/mL. Halliwell (1965) obteve Km de 0,5mg/mL para a celulase de *Myrothecium verrucari*. Imai, Ikari e Suzuki (2004) avaliaram a hidrólise da celulose por misturas de celulases e obtiveram valores que variaram de 2,96 a 10,7  $\mu\text{M}$  de glicose equivalente liberada/min/mg de proteína para valores de Vmax e 1,3 a 80 mg de carboximetilcelulose/mL para Km de celulases de *Aspergillus niger*.

Nidetzky et al. (1994) avaliando a hidrólise de celulose por celulasas de *Trichoderma reesei* obtiveram valores de Km variando de 0,05 a 0,10 mg/mL para as endocelulasas obtidas do microrganismo. Oikawa, Tsukagawa e Soda (1998) encontraram valores de 556  $\mu$ M de glicose equivalente liberada/min/mg e 110mg/mL de carboximetilcelulose para os valores de Vmax e Km respectivamente.

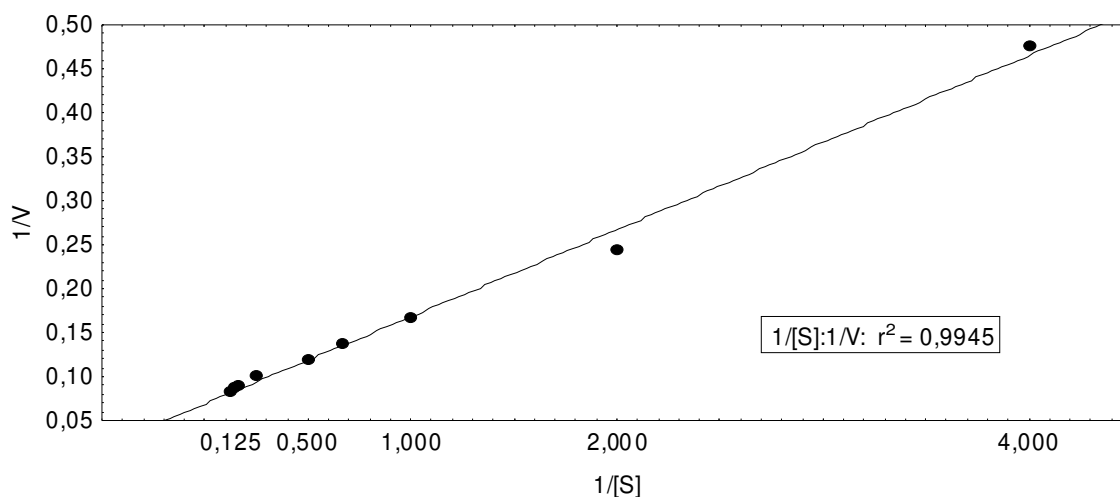
Segundo Tong, Cole e Shepherd (1980) e Bakare et al. (2004) não é uma tarefa fácil definir o Km de substratos insolúveis tais como a celulose.

#### 4.2.2 Hemicelulase (xilanase) de *Aspergillus niger*

Nas Figura 17 e 18 são apresentados os gráficos de Michaelis-Menten e a linearização de Lineweaver-Burk obtidos respectivamente para a xilanase de *A. niger*.



**Figura 17.** Gráfico de Michaelis-Menten da xilanase de *Aspergillus niger*.



**Figura 18.** Gráfico da Linearização de Lineweaver-Burk para a xilanase de *Aspergillus niger*

Na Tabela 7 são apresentados os valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  encontrados por outros autores para a xilanase.

**Tabela 7.** Valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  para a xilanase

Xilanase	$V_{max}$ *	$K_m$ **	Fonte
<i>Aspergillus niger</i>	14,49	1,43	2009
<i>Aeromonas caviae</i>	182	2	Kubata et al. (1993)
<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	2,5	6,66	Tuncer (1999)
<i>Acrophialophora nainiana</i>	-	16,1	Salles et al. (1999)
<i>Aspergillus nidulans</i>	1,09	0,97	Fernandez-Espinar et al. (2004)
<i>Burkholderia</i> SP	12,75	165	Mohana et al. (2008)

\* $\mu\text{M}$  de xilose equivalente liberada/min/g de proteína; \*\* mg de xilana/mL

Os valores encontrados para o  $V_{max}$  e  $K_m$  da xilanase de *A. niger* foram de 14,49  $\mu\text{M}$  de xilose equivalente liberada/min/g de proteína e 1,43 mg de xilana /mL (Tabela 7). O baixo valor encontrado para o  $K_m$  mostra uma elevada afinidade da enzima. Esse valor de  $K_m$  é compatível com o encontrado por Fernandez-Espinar et

al. (2004) para xilanases de *Aspergillus nidulans* em pH 6,0 a 56°C que foi de 0,97 mg de xilana/mL. Os autores obtiveram para o mesmo microrganismo o Vmax de 1,09 µM de xilose equivalente liberada/min/g de proteína em condições semelhantes às adotadas neste trabalho.

Tais valores são menores que aqueles encontrados por Kubata et al. (1993) que foram de 182 µM de xilose equivalente liberada/min/g de proteína para o Vmax e 2 mg/mL para o Km de xilanases obtidas a partir de culturas de *Aeromonas caviae*.

Tuncer (1999) caracterizou endoxylanases de *Thermomonospora fusca* BD25 e encontrou Km com valor maior (6,66mg/mL), porém o Vmax encontrado pelo mesmo foi de 2,5 µM de xilose equivalente liberada/min/g de proteína sendo menor que o obtido para a xilanase de *A. niger*.

Salles et al. (1999) caracterizaram um novo tipo de xilanase obtida de *Acrophialophora nainiana* em pH 6,0 a 55°C e obtiveram o valor de 16,1 mg de xilana/ mL. Xilanases obtidas a partir de cadeias de *Burkholderia* SP mostraram valores de Km e Vmax de 12,75 mg/ml de xilana e 165 µM de xilose equivalente liberada/min/g de proteína em pH 8,6 e 50°C (MOHANA et al., 2008).

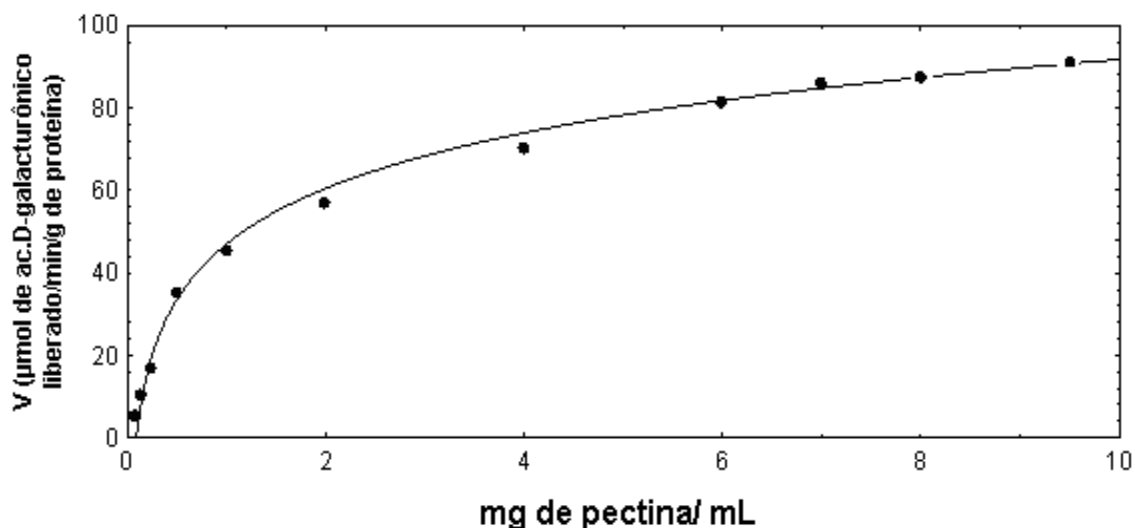
Vieira et al. (2007) estudaram um complexo enzimático com ênfase na atividade de xilanase e observaram valores de 1,54 mg de xilana /mL e 1,4 µM de xilose equivalente liberada/min/g de proteína para o Km e o Vmax respectivamente para xilana insolúvel. Os mesmos autores ao utilizarem como substrato xilana solúvel obtiveram valores de 11,53 mg/mL de xilana e 11,38 µM de xilose equivalente liberada/min/g de proteína.

O valor do Km para a xilana solúvel foi muito maior que para a xilana insolúvel. Isso ocorreu devido a presença de grupos com cadeias lado a lado na xilana solúvel gerando a chamada tensão ou impedimento estérico, no qual a aproximação espacial entre moléculas ou partes da mesma molécula é sugerido como um possível mecanismo catalítico ligado à desestabilização do substrato, dificultando assim a associação enzima-substrato (JENCKS, 1987).

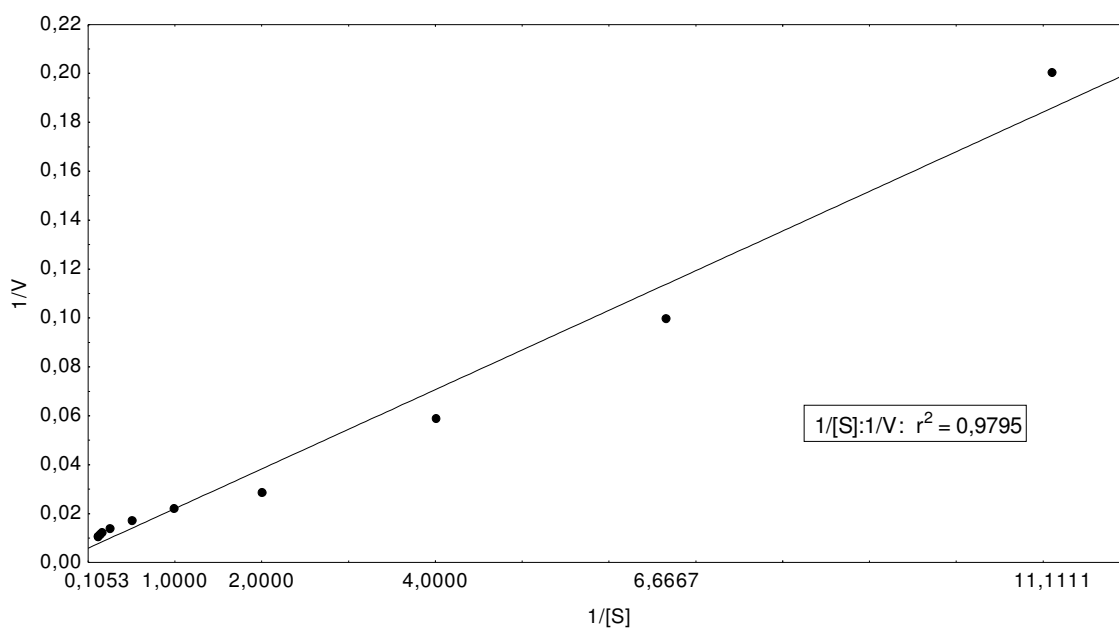


#### 4.2.3 Pectinase (poligalacturonase) de *A. niger*

Nas Figuras 19 e 20 são mostrados os gráficos de Michaelis-Menten e a linearização de Lineweaver-Burk respectivamente obtidos para a pectinase de *A. niger*.



**Figura 19.** Gráfico de Michaelis-Menten da pectinase de *A. niger*



**Figura 20.** Gráfico da Linearização de Lineweaver-burk para a pectinase de *A. niger*.

Na Tabela 8 são apresentados os valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  encontrados por outros autores para pectinases.

**Tabela 8.** Valores de Vmax e Km para a pectinase.

<b>Pectinase (poligalacturonase)</b>	<b>Vmax *</b>	<b>Km **</b>	<b>Fonte</b>
<i>A. niger</i>	172,41	2,79	2009
<i>Neurospora crassa</i>	-	5,0	Polizeli et al. (1991)
Bacillus	30,3 a 58,8	0,63 a 1,3	Kobayashy et al. (2000)
<i>Acrophialophora nainiana</i>	0,13 a 0,17	13,33 a 19,24	Celestino e Filho (2005)
<i>Thermotoga maritima</i>	1170	0,06	Kluskens et al. (2005)
<i>Trichoderma harzianum</i>	3,4	1,28	Mohamed et al. (2006)
<i>A. niger</i>	1,9	4,5	Keller; Jen; Brunner (2006)

\* $\mu\text{M}$  de ac. D-galacturônico liberado/min/g de proteína; \*\*mg de pectina /mL

Para a pectinase, obteve-se Vmax e Km de 172,41  $\mu\text{M}$  de ac. D-galacturônico liberado/min/g de proteína e 2,79 mg/mL de pectina. Este valor de Km mostra uma afinidade de 2 (duas) a 4 (quatro) vezes menor que aquela encontrada por Kobayashy et al. (2000) que purificaram exopoligalacturonases obtidas de culturas de Bacillus em pH 7,0 a 30°C e obtiveram valores para o Vmax e Km de 30,3 a 58,8  $\mu\text{mol}$  de ácido D-galacturônico liberado/min/g de proteína e 0,63 a 1,3 mg de pectina /mL, respectivamente.

Keller; Jen e Brunner (2006) caracterizaram pectinases comerciais de *A. niger* e observaram valores otimizados para pH 4,4 e 50°C. Como é mostrado na Tabela 8, estes valores foram maiores para o Km (4,5 mg de pectina /mL) e menor para o Vmax, que foi de 1,9  $\mu\text{M}$  de ac. D-galacturônico liberado/min/g de proteína.

Mohamed et al. (2006) obtiveram para poligalacturonases produzidas por *Trichoderma harzianum* em pH 5,0 a 40°C resultados menores tanto para o Km que foi de 3,4mg de pectina/mL, quanto para o Vmax de 1,28  $\mu\text{M}$  de ac. D-galacturônico liberado/min/g de proteína. Polizeli et al. (1991) obtiveram um Km para uma poligalacturonase de *neurospora crassa* de 5,0 mg/mL, semelhante aquele encontrado para o *Aspergillus niger*.

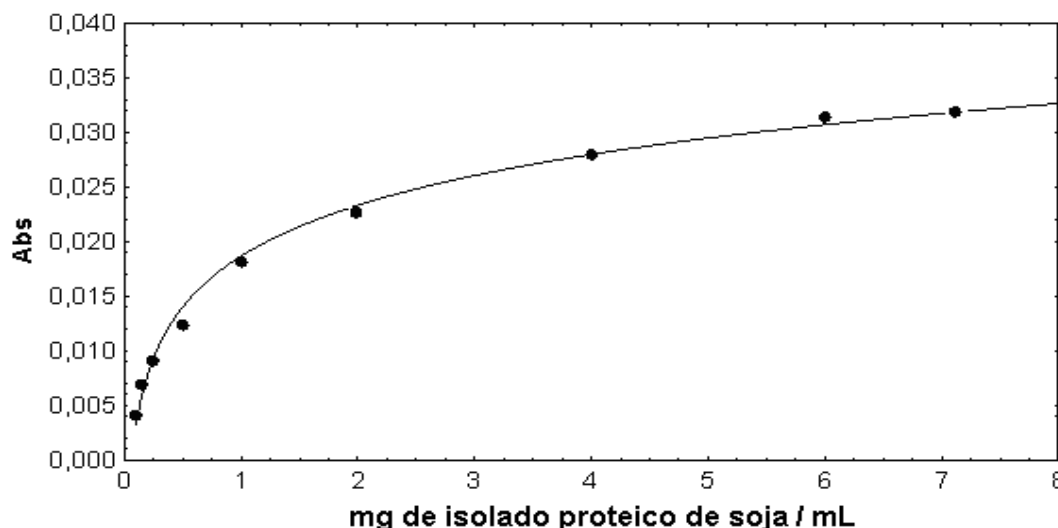
Kluskens et al. (2005) observaram para uma exopoligalacturonase da bactéria *Thermotoga marítima*, Km de 0,06 mg de pectina/mL, valor este 97% menor que o observado neste trabalho, indicando uma afinidade muito maior que aquela

encontrada para o *A.niger*. O  $V_{max}$  observado para o mesmo microrganismo também foi maior, sendo de 1170  $\mu\text{M}$  de ac.D-galacturônico liberado/min/g de proteína.

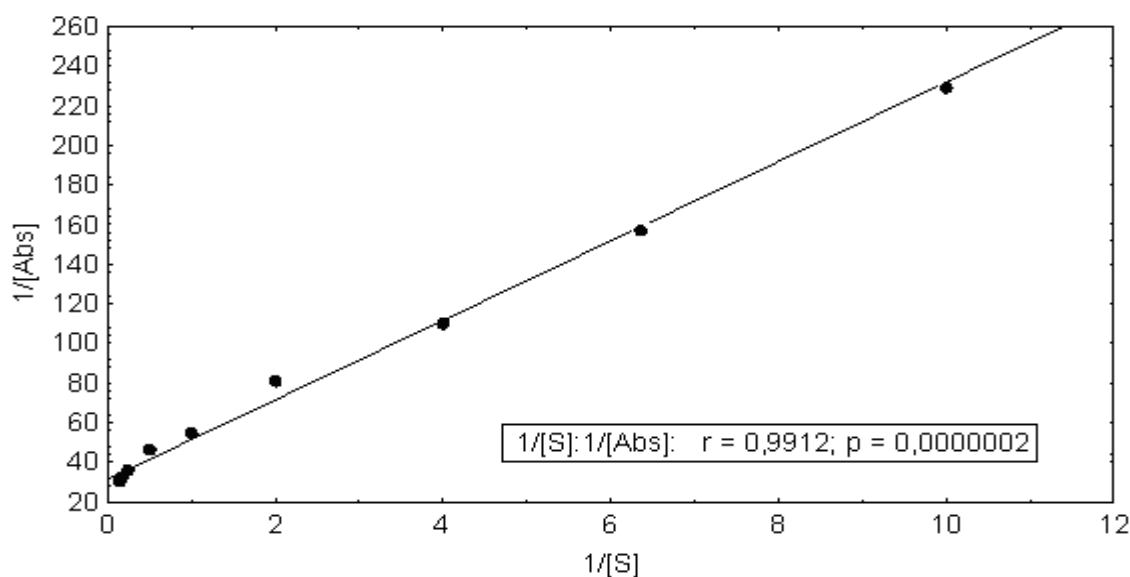
Diferenças de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram relatados no trabalho de Celestino e Filho (2005) que caracterizaram pectinases de *Acrophialophora nainiana* em condições otimizadas de pH 7,0 e 60°C e obtiveram valores de  $K_m$  que variaram de 13,33 a 19,24 mg de pectina/ml e  $V_{max}$  de 0,13 a 0,17  $\mu\text{M}$  de ac.D-galacturônico liberado/min/g de proteína. Pectinases de *A.niger* mostraram atividade ótima no intervalo de pH 6,5 a 7,0 (GUMMADI; PANDA, 2003), enquanto que atividades máximas foram obtidas para pectinases de *B. macerans* em pH 9,0 (MYAZAKI, 1991). Portanto é possível perceber grande variabilidade de  $K_m$  e  $V_{max}$  gerados por pectinases, não havendo valores padrões característicos para esta classe de enzimas.

#### 4.2.4 Protease de *Bacillus licheniformis*

Nas Figuras 21 e 22 são apresentados os gráficos de Michaelis-Menten e a linearização de Lineweaver-Burk respectivamente obtidos para a protease de *B.licheniformis*.



**Figura 21.** Gráfico de Michaelis-Menten da protease de *B. licheniformis*



**Figura 22.** Gráfico da Linearização de Lineweaver-burk para a protease *B. licheniformis*.

Na Tabela 9 são apresentados os valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  encontrados por outros autores para proteases.

**Tabela 9.** Valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  para a protease

Protease	$V_{max}$ *	$K_m$ **	Fonte
<i>B. licheniformis</i>	0,03	0,64	2009
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	6,25	0,027	Santos (2004)
<i>B. subtilis</i> NCIM 2713	-	2,5	Mane e Bapat (2001)
<i>Arthrobacter luteus</i>	-	0,84	Kitamura (1982)
<i>S. aureus</i>	-	0,19 a 0,59	Arvidson (1973)

\*U/mg ; \*mg de isolado protéico de soja /mL.

Como mostrado na Tabela 9 a protease apresentou valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de 0,64 mg de isolado protéico de soja/mL e 0,03 U/mg respectivamente. Esta protease apresentou menor afinidade pelo substrato que a protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 que apresentou valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de 0,027 mg de isolado protéico de soja/mL e 6,25 U/mg respectivamente (SANTOS, 2004). Porém apresentou maior afinidade pelo substrato quando comparada com a

protease de *Zymolyase* do complexo enzimático produzido pelo microrganismo lítico *Arthrobacter luteus*, que apresentou valor de Km de 0,84 mg de isolado protéico de soja/mL (KITAMURA, 1982).

Mane e Bapat (2001) estudando protease purificada de *B. subtilis* NCIM 2713 observaram valores de Km de 2,5 mg de isolado protéico de soja/mL. Arvidson (1973) observou para três tipos de proteases de *S. aureus* valores de Km de 0,59, 0,19 e 0,29 mg de isolado protéico de soja/mL, os quais foram próximos aos observados neste trabalho. Enquanto que Wretlind e Wadstrom (1977) observaram para protease de *Pseudomonas aeruginosa* um Km de 0,15 mg de isolado protéico de soja/mL. Os valores de Km e Vmax podem variar principalmente em função do microrganismo de origem da enzima e das condições do meio de estudo.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM SOLVENTE

O extrato obtido na extração com solventes apresentou uma concentração de compostos fenólicos de 73,28 mg EAG/ g MS, superior ao encontrado por Souza et al., (2007), de 58,15 mg EAG/ g MS para a extração das folhas de *B. crassifolia*, utilizando como solvente uma solução de metanol e água (80:20; v/v).

Silva et al. (2007) determinaram a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico de espécies de plantas amazônicas e encontraram um valor de polifenóis totais de  $45,5 \pm 1,9$  mg EAG/ g MS para as folhas de *B. crassifolia*.

A extração seqüencial, realizada no presente trabalho, na temperatura de 55°C, obteve teores elevados de extração para os compostos fenólicos, confirmando dados citados por Silva, Rogez e Larondelle (2007) que otimizaram a extração de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* e observaram que temperaturas entre 40 e 65°C apresentavam os maiores valores de extração para determinada matriz.

#### 4.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM ENZIMAS

##### 4.4.1 Testes preliminares de extração enzimática

Nos ensaios preliminares foi observado o efeito da aplicação da mistura enzimática nas folhas de *B. crassifolia*, nesse processo mediu-se a degradação da parede celular com base na liberação dos açúcares redutores liberados após a extração enzimática. Foi avaliado também o efeito da inativação térmica

(Branqueamento) das folhas no teor de compostos fenólicos. As diferentes condições de estudo encontram-se descritas na Tabela 10.

**Tabela 10.** Testes preliminares de degradação

**Resultados dos testes preliminares (120 min/pH 5/ a 45 °C)**

	Polifenóis totais (mg/GMS)	Açúcares redutores mg/g de MS
<b>S/E S/I</b>	63,50± 0,25 <sup>a</sup>	4,02± 0,05 <sup>a</sup>
<b>S/E C/I</b>	61,74± 0,08 <sup>a</sup>	3,38± 0,05 <sup>a</sup>
<b>C/E S/I *</b>	74,74± 0,15 <sup>b</sup>	6,43± 0,05 <sup>b</sup>
<b>C/E C/I *</b>	76,71± 0,25 <sup>b</sup>	6,55± 0,05 <sup>b</sup>

S/E - Sem enzima; S/I - Sem inativação; C/I - Com inativação; C/I - Com inativação;

(\* ) - com enzima;

Médias com letras iguais, em uma mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Após a medição dos compostos fenólicos realizada para as extrações enzimáticas nas condições descritas (120 min/ pH 5,0 a 45°C) a liberação de açúcares redutores foi medida pelo método DNS, semelhante a análise realizada para a determinação do Vm e Km das enzimas. Os resultados encontrados mostram que para os maiores valores de compostos fenólicos foram encontrados maiores valores de açúcares redutores indicando a real degradação da parede celular e comprovando a atuação das enzimas hidrolíticas utilizadas no estudo. É possível observar também que não houve diferença significativa a nível de 5% de significância entre as extrações com enzima e inativação e com enzima e sem inativação. Na tabela 10 observa-se a diferença estatística apenas entre as extrações realizadas com enzima (com e sem inativação) e sem enzimas ( com e sem inativação).

Na Tabela 11 são mostrados os resultados dos testes preliminares obtidos para a extração enzimática em diferentes condições.

**Tabela 11.** Resultados preliminares da extração enzimática de compostos fenólicos a partir de folhas moídas de *B. crassifolia* e em função de distintas condições de tempo, temperatura e pH.

Tempo	Temperatura	pH	Compostos fenólicos totais (mg EAG/ g MS)*	
			Com enzima	Sem enzima
30	50	5,0	38,73	33,50
60	50	5,0	49,31	45,48
90	50	5,0	53,24	51,98
120	50	5,0	57,28	54,50
120	30	5,0	37,06	35,50
120	40	5,0	39,31	36,14
120	60	5,0	56,28	53,16
120	70	5,0	55,72	54,85
120	50	3,0	59,55	56,83
120	50	4,0	58,42	55,68
120	50	6,0	50,58	41,33
120	50	7,0	42,92	40,58
180	50	5,0	60,06	55,18

\*(polifenóis totais em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca)

O estudo preliminar possibilitou a determinação de pontos nos quais seriam possíveis melhores visualizações estatísticas através da definição de um planejamento experimental. Assim foram estudadas condições nas quais se tornasse possível determinar os melhores pontos a serem estudados com o objetivo de se elaborar um modelo que representasse o modelo do processo de extração enzimático.

Foram estudados tempos de extração que variaram de 30 a 180 minutos; temperaturas de 30 a 70°C e intervalo de pH de 3,0 a 7,0, conforme a Tabela 11. O ponto que proporcionou maior extração foi aquele no qual o pH utilizado foi de 5,0 a 50°C por 180 minutos.

As extrações em pH 3,0 também mostraram valores elevados de extração e serão mais discutidos no decorrer do trabalho. As extrações preliminares focaram-se na utilização do pH 5,0 uma vez que foi para esse pH que foram observadas as maiores diferenças de extração, quando da utilização ou não de enzimas, mostrando desta forma o intervalo ótimo de atuação hidrolítica das enzimas utilizadas.

#### 4.4.2 Análise estatística das extrações

Utilizando a ferramenta do planejamento experimental e a análise de superfície de resposta é possível investigar a influência das variáveis em um processo e a forma de interação entre estas variáveis, bem como obter o valor das variáveis que otimizem o processo. Os resultados das extrações obtidos para o planejamento estudado são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Resultados das extrações enzimáticas de compostos fenólicos a partir de folhas moídas de *B. crassifolia* e em função de distintas condições de tempo, temperatura e pH realizadas para o planejamento experimental.

Ensaio	pH (X1)	Tempo (min) (X2)	Temperatura (°C) (X3)	PT com enzimas (Y1)*	PT sem enzimas (Y2)*
1	3,5	60	30	55,03	54,58
2	6,5	60	30	50,89	48,74
3	3,5	180	30	68,01	71,01
4	6,5	180	30	52,97	50,80
5	3,5	60	60	89,47	87,71
6	6,5	60	60	69,06	68,80
7	3,5	180	60	95,45	95,01
8	6,5	180	60	86,25	80,05
9	2,4	120	45	90,98	90,03
10	7,5	120	45	55,08	56,06
11	5,0	220	45	85,98	75,12
12	5,0	120	19	35,57	24,12
13	5,0	120	70	80,71	72,78
14	5,0	120	45	76,43	73,12
15	5,0	120	45	70,23	61,09
16	5,0	120	45	70,24	61,01
17	5,0	120	45	75,11	67,96
18	5,0	120	45	70,01	63,99
19	5,0	120	45	77,02	65,09
20	3,5	180	45	89,97	96,16
21	2,4	180	60	85,10	83,07
22	2,4	120	60	90,23	88,01
23	2,4	180	70	88,12	85,17
24	3,5	220	70	84,36	80,36
25	2,4	220	70	82,02	80,21

\*(polifenóis totais em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca)

Com base na Tabela 12 é possível visualizar que o ponto de estudo para o qual foi obtido maior valor em teor de compostos fenólicos totais foi aquele que



utilizou as condições de: pH 3,5 durante 180 minutos à 60°C, obtendo uma concentração de 95,45 mg EAG/ g MS para a extração com enzima e 95,01 mg EAG/ g MS sem enzima. Todavia quando houve a associação do pH 3,5 com temperatura de 70°C em uma extração com duração de 220 minutos foi possível observar uma redução nos teores de extração para ambos os tratamentos ( com e sem enzima). De maneira geral nas condições extremas tais como aquelas que empregaram pH 2,4 e 3,5 em temperaturas de 70°C e extrações por 220 minutos ocorreram reduções nos teores finais dos compostos extraídos.

Um ponto importante a ser discutido diz respeito aos resultados obtidos para o pH 5,0 uma vez que nesse pH foi possível observar de fato o efeito das enzimas hidrolíticas na extração dos compostos de interesse. Na comparação entre os teores de compostos fenólicos extraídos com enzimas, com os resultados da extração sem enzima ambas em pH 5,0, ocorreram diferenças de rendimentos que variaram de 3,31% a 11,45%.

#### 4.4.2.1 Extração com enzimas

A partir dos resultados da Tabela 12, foi feita uma análise usando a metodologia de superfície de resposta por meio de software STATISTICA 7.0, possibilitando observar os efeitos e a significância de cada variável sobre os compostos fenólicos totais extraídos com ou sem enzima. Foram considerados na análise efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes pH, tempo e temperatura.

Os resultados da análise estatística aplicada aos dados experimentais para a extração com enzimas são mostrados na Tabela 13, considerando o erro puro.

**Tabela 13.** Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para a extração com enzimas.

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	t(5)	Significância estatística (p)
<i>Efeitos principais</i>				
(X1) pH (L)	<b>-13,58</b>	<b>3,39</b>	<b>-3,99</b>	<b>0,0103</b>
(X1) pH (Q)	<b>-15,73</b>	<b>3,07</b>	<b>-6,21</b>	<b>0,0867</b>
(X2) log do Tempo (L)	<b>11,13</b>	<b>5,23</b>	<b>2,12</b>	<b>0,0868</b>
(X3) Temperatura (L)	<b>25,53</b>	<b>3,51</b>	<b>7,25</b>	<b>0,0007</b>
(X3) Temperatura (Q)	<b>-14,01</b>	<b>3,21</b>	<b>-4,36</b>	<b>0,0072</b>
<i>Efeitos de interação</i>				
X1 X3	1,03	3,88	0,26	0,8015
X2 X3	<b>-19,78</b>	<b>1,89</b>	<b>-6,59</b>	<b>0,0970</b>

Linear (L); quadrático (Q); os parâmetros em negrito são significativos para  $p < 0,1$

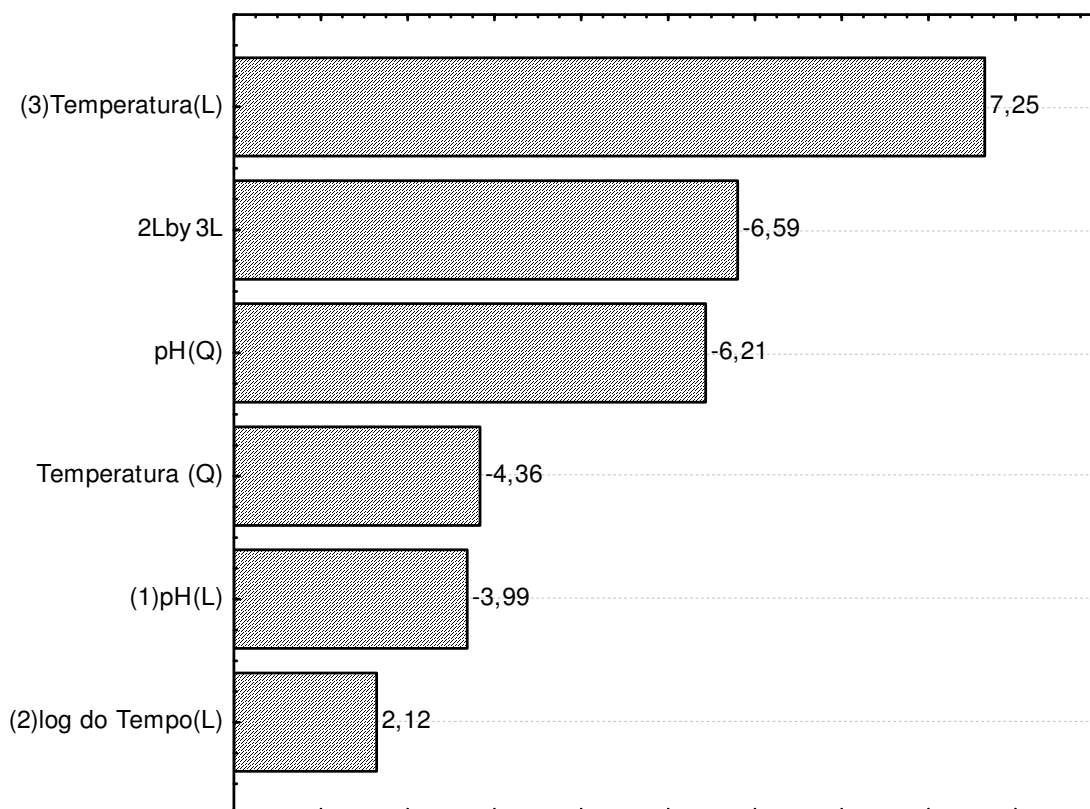
Como pode ser observado na Tabela 13, as variáveis com efeitos significativos dentro do intervalo de confiança estatístico próximos a 90% de confiança foram: pH (L), pH (Q), log do tempo (L), Temperatura (L), temperatura (Q) e a interação tempo x temperatura (X2,X3).

O efeito estimado indica o quanto cada fator influi na resposta estudada, pois quanto maior o seu valor, maior é a sua influência. Para os parâmetros linear e quadrático, um efeito positivo indica que o aumento da variável provoca um aumento na resposta. O efeito negativo, para o parâmetro linear, mostra que com um aumento da variável ocorre a diminuição na resposta. Para o parâmetro quadrático, os efeitos positivo e negativo denotam a existência de uma região de mínimo ou máximo respectivamente, ou seja, quando o efeito quadrático for negativo a superfície de resposta terá concavidade voltada para baixo (máximo), e quando for positivo terá concavidade voltada para cima (mínimo).

O valor t expressa o quão grande é a variável em relação ao seu desvio, desta forma, quanto maior o t, maior é a probabilidade da variável ser estatisticamente significativa.

O valor do coeficiente  $p$  é o nível da significância da variável independente sobre a resposta estudada.

Na Figura 23 é mostrado o gráfico de Pareto, no qual é possível observar como cada variável do processo contribuiu para as respostas finais de extração com enzimas em um nível de significância de 90% ( $p=0,1$ ).



**Figura 23.** Gráfico de Pareto para a extração com enzimas.

Observa-se na Figura 23, que a temperatura (L) foi o parâmetro de maior influência no teor final de compostos fenólicos extraídos com enzimas, tendo um efeito positivo, ou seja, quanto mais elevada a temperatura de extração, maior será o teor final de compostos fenólicos obtidos durante a extração. A tendência obtida de aumento da quantidade de compostos extraídos na medida em que há aumento na temperatura do banho é coerente com os dados encontrados na literatura científica, na qual a difusividade aumenta com a temperatura (ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA, 2003).

Todavia o efeito da temperatura (Q) também foi significativo e alto, porém negativo. Tal fato indica a presença de um ponto máximo de extração.

Cada aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões produtivas. Dessa forma aumentos na temperatura promovem aumentos de rendimento, os quais foram observados nas extrações enzimáticas. Por outro lado a diminuição na temperatura e conseqüentemente na entalpia do sistema levam a uma menor ação enzimática sobre a parede celular, e dessa forma menores rendimentos de extração.

Todavia valores demasiadamente elevados de temperatura provocam o rompimento de ligações fracas da mesma, conduzindo a uma alteração da conformação da enzima e, conseqüentemente, a uma alteração do centro ativo da enzima levando ao fenômeno conhecido como desnaturação protéica. Este processo promove a perda da atividade biológica da enzima, impossibilitando a mesma de continuar realizando a reação de interesse, neste caso a hidrólise da parede celular e conseqüentemente a liberação dos compostos de interesse é reduzida.

O pH (L) (Tabelas 13 e figura 23), apresentou coeficiente negativo, indicando que quando houve um aumento nessa variável houve uma diminuição na resposta. Tal fato indica que a extração em valores de pH reduzido favorecem a extração dos compostos de interesse.

Segundo Escribano-Bailón e Santos-Buelga (2003) a adição de ácidos às soluções extratoras pode produzir diferentes efeitos, como: aumentar a estabilidade e favorecer a dissolução dos compostos fenólicos, que são inicialmente parte de polímeros ou parte de componentes ligados a parede celular, havendo, através da hidrólise, a liberação dos mesmos. Pode ainda melhorar a desintegração das divisões celulares, facilitando a solubilização e a difusão de compostos fenólicos da planta (CHIRINOS et al., 2007).

Por sua vez o pH quadrático mostrou efeito negativo e com maior influência que o pH (L) o que leva a análise de que há no experimento a presença de um ponto máximo de extração. Tal fato pode ser explicado pelo efeito que esta variável apresenta sobre as enzimas. O pH interfere na atividade enzimática uma vez que altera a distribuição das cargas elétricas da enzima influenciando na conformação do centro ativo e, conseqüentemente, na sua interação com o substrato (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; GONZÁLEZ-TELLO et al., 2000). As enzimas possuem um pH ótimo acima ou abaixo do qual a atividade enzimática diminui e acaba por cessar, levando a uma redução de extração nessas faixas.

Em outra análise foi possível observar que os elevados valores de extração em baixos valores de pH, resultaram muito mais do baixo pH, do que da presença de enzimas hidrolíticas no meio, visto que as enzimas estudadas, não apresentavam atividade biológica nessas faixas de pH. Tal fato foi comprovado após a comparação com as extrações sem enzimas realizadas como parte do mesmo estudo. Este último fato já era esperado, uma vez que o pH ótimo de atuação das enzimas que

hidrolisam a parede celular possuíam um pH ótimo na faixa de 4,5 a 5,5, de acordo com os protocolos de utilização das mesmas

Antes de serem avaliados estatisticamente os valores de tempo apresentados em minutos foram previamente logaritimizadas para que dessa forma ocorresse uma linearização dos valores ao serem tratados pelo programa utilizado, dessa forma era de se esperar que o parâmetro tempo (L) se apresentasse como significativo. De acordo com a Figura 23 o fator apresentou efeito negativo, o que mostra uma relação diretamente proporcional, a partir do qual um acréscimo no tempo proporciona um aumento da resposta.

Para Escribano-Bailón e Santos-Buelga (2003) durante a extração, o tempo de permanência deve ser suficiente para o solvente dissolver a maior quantidade de soluto possível, até o sistema alcançar o equilíbrio (saturação). Para Shaidi e Naczki (1995) o tempo de extração afeta consideravelmente a recuperação dos polifenóis. Para o mesmo autor o período de extração pode variar entre 1 minuto e 24 horas. Porém longos períodos de extração aumentam a possibilidade de oxidação dos compostos fenólicos e períodos relativamente curtos se mostram insuficientes para que ocorra uma transferência de massa significativa.

É possível que haja um comportamento a partir do qual ocorra um decréscimo na extração, o que não foi possível observar no experimento em questão, uma vez que no experimento com extrações enzimáticas não foram estudados tempos muito longos de extração.

O único aspecto de interação encontrado como significativo para a extração de compostos fenólicos com enzimas foi a relação Tempo x Temperatura (X2X3), para o qual foi observado um valor negativo indicando que aumentos na temperatura e tempo ao mesmo tempo proporcionam redução na resposta estudada.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, que foram: pH x Tempo (X1 X2) e pH x Temperatura (X1 X3), foi realizada a análise de variância (ANOVA) e verificada a significância da regressão e da falta de ajuste com nível de significância menor que 10% ( $p < 0,1$ ), utilizando o teste F.

Na Tabela 14 são observados os resultados obtidos para a ANOVA na extração realizada com enzimas.

**Tabela 14.** Resultados da ANOVA para a extração com enzima.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	R <sup>2</sup>
Regressão	4980,35	4	1245,08	32,62	2,87	0,90
Resíduo	763,21	20	38,16			
Falta de ajuste	546,62	15	36,44	0,84	4,62	
Erro puro	216,59	5	43,31			
Total	5743,56	24				

SQ: soma quadrática GL: graus de liberdade MQ: média quadrática

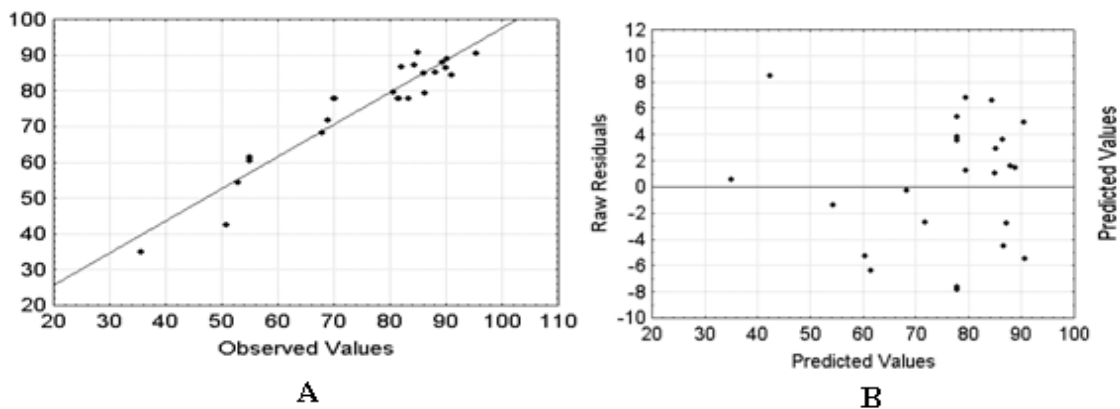
A 5ª e a 6ª coluna da Tabela 14 apresentam os testes F, sendo que o primeiro (Fcalculado/Ftabelado) indica que o modelo é significativo, ou seja, os dados preditos se aproximam dos experimentais. Já o segundo (Ftabelado/Fcalculado) indica que os dados estão ajustados e descrevem bem a superfície de resposta. Para que o primeiro teste seja válido, é necessário que o valor do Fcalculado seja no mínimo quatro vezes maior que o Ftabelado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995; KHURI; CORNELL, 1996) condição esta que se aproxima da encontrada (FCalculado/ Ftabelado  $\cong$  11,4), mostrando que o modelo foi significativo e preditivo.

No caso do segundo teste, a condição de validade é inversa, ou seja, o Fcalculado tem que ser no mínimo 4 (quatro) vezes menor que o Ftabelado (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995; KHURI; CORNELL, 1996). Assim é possível perceber que o valor encontrado (Fcalculado/ Ftabelado = 5,50) satisfaz a condição para que o modelo descreva bem a superfície de resposta. Outro ponto importante na análise dos resultados diz respeito ao fato de que a falta de ajuste não foi significativa, o que mostra que o modelo ajustou-se aos dados experimentais obtidos.

De acordo com a Tabela 14 o modelo apresentou regressão significativa no nível de 90% de confiança (Fcalculado superior ao Ftabelado) com R<sup>2</sup> igual a 0,9027, evidenciando que o modelo explicou 90,27% da variação dos dados experimentais.

Uma indicação gráfica da qualidade do modelo pode ser visualizada na Figura 24 (A), no qual é mostrada a relação linear entre os valores calculados através do modelo de regressão e os valores observados experimentalmente do teor de compostos fenólicos totais extraídos com enzima, com coeficiente de determinação, R<sup>2</sup>, de 0,90. O gráfico dos resíduos versus valores observados experimentalmente

de teor de fenólicos totais extraídos com enzimas (Figura B) mostra que as considerações de normalidade, independência e aleatoriedade dos resíduos foram satisfeitas.



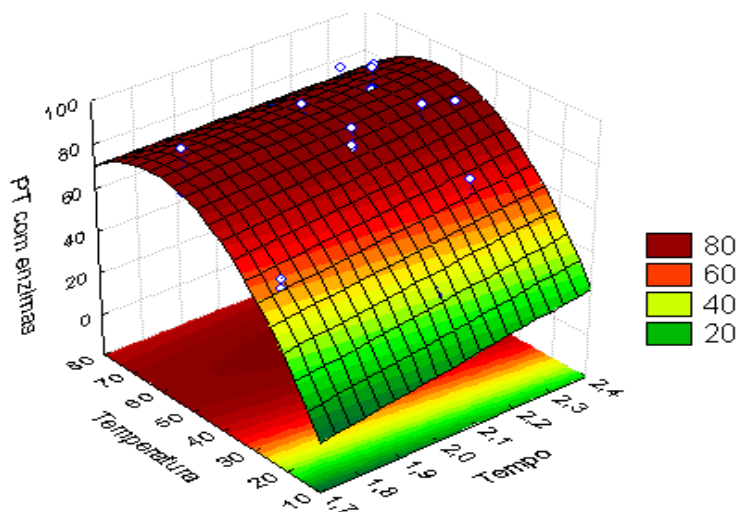
**Figura 24.** (A) Gráfico do teor predito de compostos fenólicos totais extraídos com enzimas Versus valores observados (B) Gráfico dos resíduos versus teor de compostos fenólicos totais extraídos com enzimas

A Equação 5, apresenta o modelo empírico obtido pela regressão dos dados experimentais de PT (polifenóis totais) extraídos com enzimas :

$$\text{Polifenóis totais} = 77,84 - 7,38 \times (\text{pH} - 5,0) - 1,87 \times (\text{pH} - 5,0)^2 + 3,91 \times \log (t - 120) + 13,12 \times (T - 45) - 7,00 \times (T - 45)^2 + 0,51 \times (\text{pH} - 5,0) \times (T - 45) - 1,04 \times \log (t - 120) \times (T - 45)$$

(Equação 5)

A superfície gerada pelo modelo (Equação 5) é mostrada na Figura 25, para as variáveis tempo x Temperatura de extração.



**Figura 25.** Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis tempo x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos com enzimas

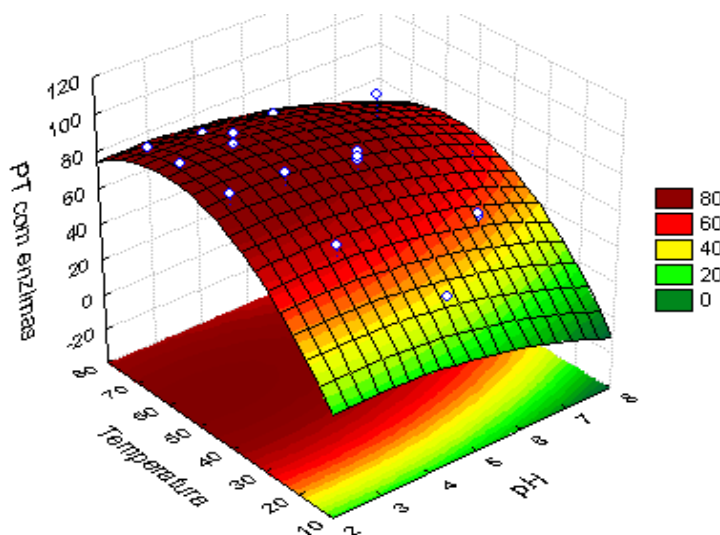
Pelo fato da interação temperatura x tempo ter se mostrada significativa é interessante avaliá-la a partir do gráfico gerado pelo efeito que estas demonstram sobre as extrações enzimáticas.

Dessa forma pela superfície de resposta pode-se observar que valores elevados de temperatura e de tempo contribuíram para a elevação na extração dos compostos fenólicos. A faixa de temperatura de 48 a 68 °C foi aquela que obteve melhores resultados nos teores de compostos fenólicos extraídos com enzimas, para uma ampla faixa de tempo, com ênfase para o intervalo de 2,33 (213 minutos) a 2,40 (251 minutos) nos quais foram possíveis visualizar as melhores condições de extração. Isso demonstra a grande influência da temperatura, que apresenta efeito linear significativo a  $p \leq 0,1$  na extração de compostos fenólicos totais extraídos com enzima.

Entretanto percebe-se que em condições excessivas de temperatura começa a ocorrer um decréscimo na extração, principalmente para a faixa de temperatura compreendida entre 71 a 80°C, onde se observa uma tendência a redução nos teores dos compostos de interesse extraídos com a utilização das enzimas hidrolíticas. Assim associações excessivas de tempo e temperatura promovem perdas de rendimentos para a extração de compostos fenólicos. Há entretanto a possibilidade de que temperaturas reduzidas possam ser utilizadas uma vez que sejam atendidas as condições de pH ótimo para tais enzimas por volta de 5,0, o que contribuiria para a utilização de temperaturas mais amenas, significando menos gastos energéticos para a indústria.

Na Figura 26 é observada a segunda superfície gerada pelo modelo, em que são relacionados pH x Temperatura, uma vez que tal parâmetro foi considerado para o mesmo.





**Figura 26.** Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis pH x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos com enzimas

Com base nas superfícies é possível observar que para a variável temperatura houve uma ampla faixa de possível aplicação do processo. Estando o resultado de acordo com a literatura (CACACE; MAZZA, 2003; PINELO et al, 2005; LIYANA-PATHIRANA, 2005) onde o rendimento de compostos fenólicos aumenta com a temperatura. A melhor faixa de temperatura é compreendida entre 44,52°C e 71,35. Entretanto se o interesse for mesmo a utilização de enzimas deve-se priorizar por faixas de temperatura menores pois o consumo de energia se tornará menor, com conseqüente economia de energia para a indústria.

Assim como para a Temperatura o pH apresentou uma boa faixa de otimalidade sendo o melhor intervalo encontrado entre 2,0 a 5,4.

A utilização das enzimas permite temperaturas mais amenas de processo, e meios menos ácidos, uma vez que extrações ácidas promoveriam prejuízos ao maquinário industrial, e temperaturas muito elevadas produziram alto consumo energético para a indústria. Considerando ainda que algumas famílias da flavonóides são termos-sensíveis (principalmente antocianina e derivados de flavan-3-ol) (ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA, 2003), deve-se manter a temperatura de extração abaixo do limite de degradação dos mesmos. Com base nas Figuras 25 e 26 sugere-se um processo realizado em pH 5,0 a 50°C por um período de 213 minutos.

#### 4.4.2.2 Extração sem enzimas

Para efeito de comparação foram avaliadas as extrações sem enzimas, apenas com a utilização dos tampões. Essas extrações foram realizadas simultaneamente no momento das extrações com enzimas, de forma que para cada triplicata de extrações com enzimas eram realizadas as mesmas triplicas, porém sem enzimas. Os resultados encontram-se na Tabela 12, a partir dos quais foram avaliados novamente os efeitos estatísticos (tabela 15).

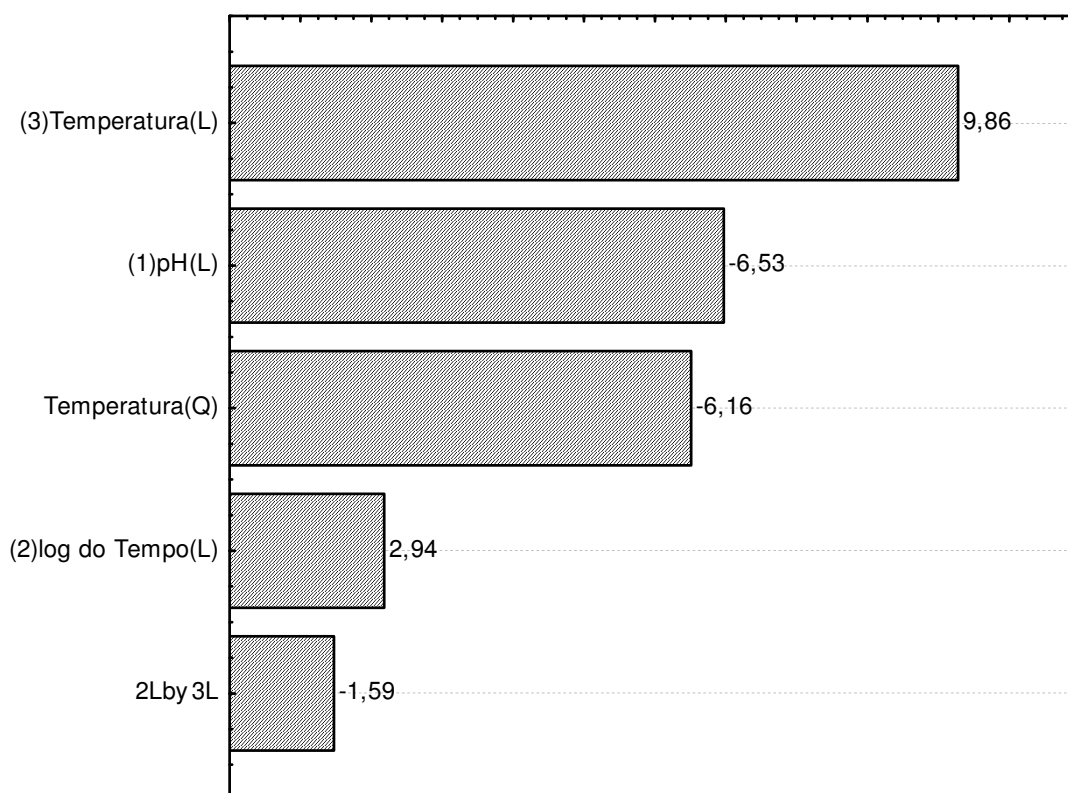
**Tabela 15.** Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para a extração sem enzimas.

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	t(15)	Significância estatística (p)
<i>Efeitos principais</i>				
(X1) pH (L)	<b>-15,64</b>	<b>2,39</b>	<b>-6,53</b>	<b>0,0012</b>
(X1) pH (Q)	2,38	2,20	1,08	0,3277
(X2) log do Tempo (L)	<b>10,64</b>	<b>3,61</b>	<b>2,94</b>	<b>0,0321</b>
(X3) Temperatura (L)	<b>24,30</b>	<b>2,46</b>	<b>9,86</b>	<b>0,0001</b>
(X3) Temperatura (Q)	<b>-14,17</b>	<b>2,30</b>	<b>-6,16</b>	<b>0,0016</b>
<i>Efeitos de interação</i>				
X1 X3	4,69	2,82	1,66	0,1828
X2 X3	<b>-5,68</b>	<b>3,57</b>	<b>-1,59</b>	<b>0,0872</b>

Linear (L); quadrático (Q); os parâmetros em negrito são significativos para  $p < 0,1$

Com base na tabela 15 constata-se que as variáveis pH (L), Temperatura (L), Temperatura (Q), log do tempo (L) e a variável de interação entre tempo e Temperatura (X2X3) foram as que se mostraram significativas a 90% de confiança ( $p \leq 0,1$ ), quando avaliadas pelo erro puro.

A Figura 27 ilustra o gráfico de Pareto construído a partir dos resultados obtidos e utilizado para determinar a influência dos fatores e suas interações nas respostas finais de extração sem enzimas, com 90% de confiança ( $p = 0,1$ ).



**Figura 27.** Gráfico de Pareto para a extração sem enzimas

Com base na Figura 27 é possível perceber novamente o grande e positivo efeito obtido pela temperatura (L) na resposta de PT (polifenóis totais) extraídos sem enzimas. Este efeito da temperatura indica que um aumento na variável proporciona um aumento na extração realizada sem enzimas.

A temperatura (Q) também obteve valor significativo, porém negativo, indicando a presença de um ponto máximo de extração. O pH (L) obteve o segundo maior efeito sobre o processo de extração, apresentando efeito negativo assim como aquele que foi observado para a extração com enzimas, mostrando mais uma vez que a diminuição no pH utilizado possibilita aumento nas extrações dos compostos fenólicos obtidos a partir da degradação da parede celular.

O tempo linear foi significativo como era de se esperar, devido a linearização prévia dos valores antes da análise estatística. Para a interação tempo e temperatura, assim como para a extração com enzimas também foi observado efeito negativo da associação das duas variáveis na resposta do processo de extração. Entretanto na extração sem enzima tal variável apresentou bem menos significância que para aquela extração realizada com enzimas.

Para efeito de comparação com a extração com enzimas a ANOVA foi avaliada eliminando-se os mesmos parâmetros eliminados para a extração com enzimas. Dessa forma após a eliminação dos parâmetros considerados não significativos, que foram: Tempo (Q) e pH x Tempo (X1 X2), foi realizada a análise de variância (ANOVA) e verificada a significância da regressão e da falta de ajuste com nível de significância menor que 10% ( $p < 0,1$ ), utilizando o teste F.

Na Tabela 16 são observados os resultados obtidos para a ANOVA na extração realizada sem enzimas.

**Tabela 16.** Resultados da ANOVA para a extração sem enzima.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	R <sup>2</sup>
Regressão	5554,82	4	1388,70	26,53	2,87	0,8753
Resíduo	1046,88	20	52,34			
Falta de ajuste	930,586	15	62,039	2,66	4,62	
Erro puro	116,30	5	23,260			
Total	6601,70	24				

De acordo com Box e Wetz (1973), uma regra prática que pode ser empregada é considerar a regressão como útil para fins preditivos caso o valor  $MQ_{regressão}/MQ_{resíduo}$  seja, pelo menos, quatro a cinco vezes maior que o  $F_{tabelado}$  (BOX E WETZ, 1973) como ocorreu para os resultados da extração sem enzima onde  $F_{calculado}$  foi 9,24 vezes maior que o  $F_{tabelado}$ . Analisando-se a Tabela 15 pode-se verificar que a regressão foi significativa ( $p \leq 0,1$ ), pois o valor de  $F_{calculado}$  foi maior que o tabelado, sendo também foi preditiva, pois o valor obtido foi superior a quatro vezes o valor de F calculado.

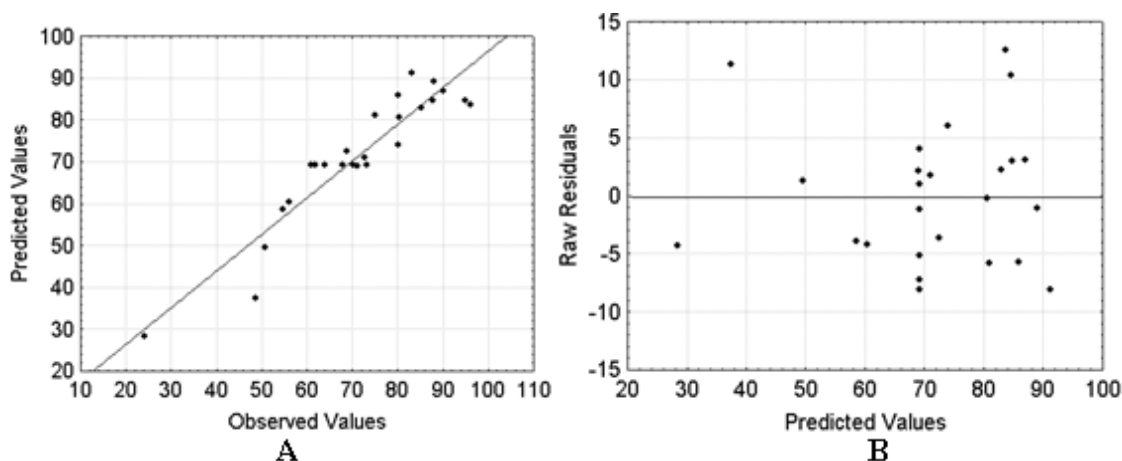
A Equação 6, apresenta o modelo empírico obtido pela regressão dos dados experimentais de PT (polifenóis totais) extraídos sem enzimas:

$$\text{Polifenóis totais} = 69,13 - 7,92 (\text{pH} - 5,0) + 1,59 (\text{pH} - 5,0)^2 + 2,99 \times \log (t - 120) + 12,66 (T - 45) - 6,86 (T - 45)^2 + 2,20 (\text{pH} - 5,0) \times \log (t - 120) - 2,61 (T - 45) \times \log (t - 120)$$

(Equação 6)

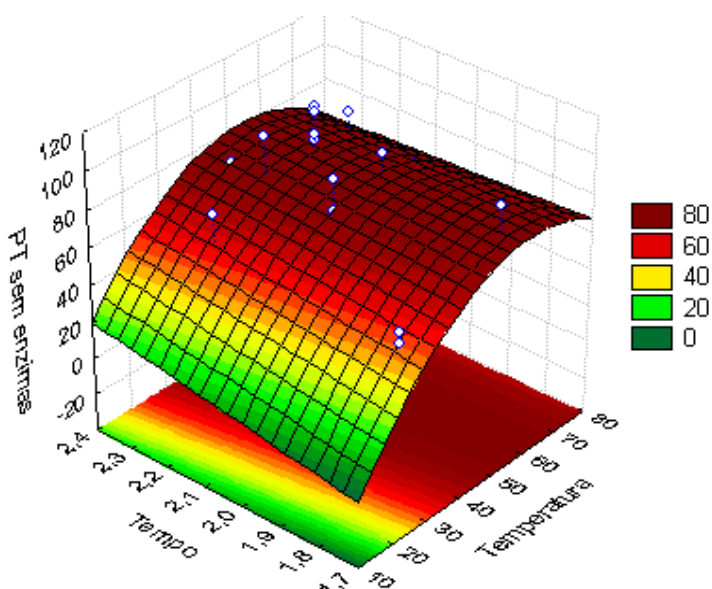
A Figura 28 (A) mostra o gráfico dos valores previstos pela equação 5 contra os resultados experimentais correspondentes. Os pontos são distribuídos ao acaso próximos da linha, demonstrando excelente concordância e que o modelo não tem

falta de ajuste significativo. O gráfico dos resíduos versus valores observados experimentalmente de teor de fenólicos totais extraídos sem enzimas (Figura 28 B) mostra que as considerações de normalidade, independência e aleatoriedade dos resíduos foram satisfeitas.



**Figura 28.** (A) Gráfico do teor predito de compostos fenólicos totais extraídos sem enzimas versus os valores observados. (B) Gráfico dos resíduos versus o teor de compostos fenólicos totais extraídos sem enzimas.

A superfície gerada pelo modelo (Equação 6) é mostrada na Figura 29, para as variáveis tempo x Temperatura de extração sem enzima.

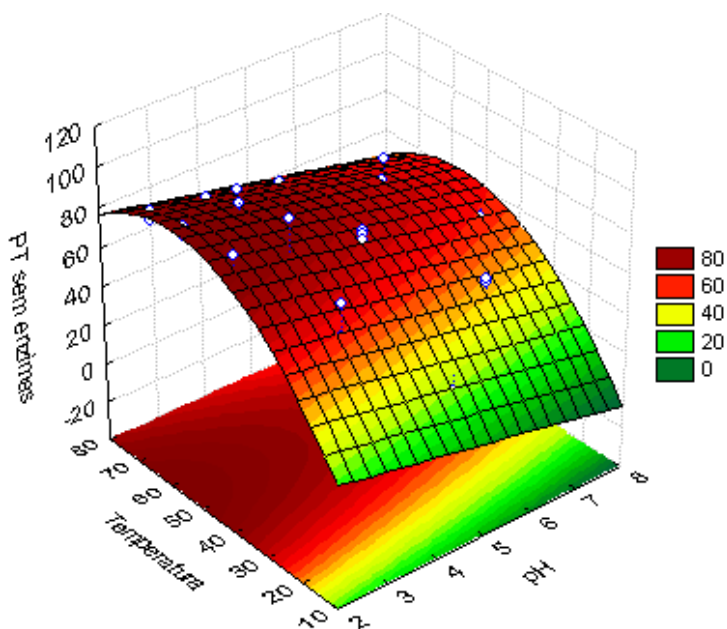


**Figura 29.** Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis Tempo x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos sem enzimas

Pela superfície de resposta obtida a partir das extrações realizadas sem a utilização de enzimas pode-se observar que assim como nas extrações enzimáticas, os valores elevados de temperatura e de tempo contribuíram para a elevação na extração dos compostos fenólicos. A faixa de temperatura de 50°C a 65°C foi aquela que fornece melhores resultados de extração. Tais extrações foram boas para uma ampla faixa de tempo, com ênfase para o intervalo de 2,2 (158 minutos) a 2,40 (251 minutos) nos quais foram possíveis visualizar as melhores condições de extração. Isso demonstra a grande influência da temperatura, que apresenta novamente efeito linear significativo a  $p \leq 0,1$ , na extração de compostos fenólicos totais extraídos sem enzima.

Foi possível constatar que a combinação de temperaturas elevadas com longos períodos de extração mais uma vez promoveu a redução nas extrações de compostos fenólicos, semelhantes às degradações observadas na extração enzimática.

Na Figura 30 é possível visualizar as superfícies de respostas para as extrações realizadas sem enzimas, relacionando-se pH x Temperatura.



**Figura 30.** Superfície de resposta e contorno mostrando o efeito das variáveis pH x Temperatura sobre o teor final de compostos fenólicos extraídos sem enzimas

Com base na Figura 30 observa-se que ocorrem boas extrações, no processo, porém estas ocorrem principalmente em pH muito ácido, principalmente

entre pH 2,0 e 2,8, intervalos bastante ácidos para aplicação industrial. Para a Temperatura foram encontrados intervalos semelhantes aos observados para a extração enzimática, variando de 40 a 65°C.

## 5 CONCLUSÃO

As determinações dos parâmetros  $V_m$  e  $K_m$  possibilitaram um melhor estudo das concentrações ótimas de enzimas a serem utilizadas no processo de extração.

A metodologia de superfície de resposta foi aplicada com sucesso para o processo de otimização da extração enzimática de compostos fenólicos da *Byrsonima crassifolia*.

Na comparação entre as extrações que foram realizadas com solventes no trabalho e também com aquelas relatadas na literatura trabalho. As extrações enzimáticas mostraram valores de polifenóis relativamente mais elevados.

Dentro de uma comparação entre os processos de extração, com enzima e sem enzima foi observado que valores de pH relativamente baixos tiveram influência positiva em ambos os processos, não havendo grandes diferenças de extração dentro desta faixa de pH. Em intervalo próximo ao pH ótimo das enzimas, foi possível observar maior extração.

Foi verificado aumento significativo na extração com aumentos de temperatura, ocorrendo o mesmo fenômeno para o fator tempo, constatado pelos coeficientes positivos observados no gráfico de pareto para as extrações enzimáticas.

De acordo com o estudo o melhor ponto de extração para a aplicação da metodologia de extração enzimática encontra-se em pH 5,0 a 50°C durante aproximadamente 200 minutos.

A extração enzimática pode apresentar-se como uma alternativa em substituição à extração com solventes orgânicos, uma vez que demonstrou bons rendimentos de extração, com potencial de aplicação industrial, uma vez que possibilita a utilização de meios de extração relativamente neutros.

Por se tratar de um estudo inovador há poucas comparações possíveis dentro da literatura. Entretanto faz-se de extrema importância uma continuidade no estudo da metodologia, com fins de aperfeiçoamento do processo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. **Dietary flavonols**: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**. v. 18. n.10. p.75-81. New York, 2002.

ALBERSHEIM, P; NEUKOM, H. E; DEUEL, H. Splitting of pectin chain molecules in neutral solution. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.90. n.15. p. 46–51. London. 1960.

ALKORTA. L, GARBISU, C, LLAMA, M.J. SERRA, J.L. Industrial application of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**. v.33. n.20. p 21-28. London, 1998.

ALMEIDA, C; BRÁNYIK, T; MORADAS-FERREIRA, P. E; TEIXEIRA, J. Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain. **Process Biochemistry**. v.40. n.22. p. 1937-1942. London, 2005.

ANDRADE, J. B. de; FERRARI JÚNIOR, E; POSSENTI, R. A; OTSUK, I. P; ZIMBACK, L; LANDEL, M. G. de A. L Produção e composição de cultivares de cana-de-açúcar. **In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 39, Recife, 2002. Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Recife, 2002. 1CD-ROM.

ANDERSEN, O; M; MARKHAM, K.R. **Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and applications**. CRC PRESS, Taylor & Francis group, New York, 2006.

ANDREO. D; JORGE. N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim da CEPPA**. v. 24. n. 2. p. 319-336. Curitiba, 2006

ANTUNES, A. J; CANHOS, V. **Aditivos em Alimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1984.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists: **Official Methods of Analysis**. Washington (USA), 1997.

ARVIDSON, S. Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. II. Isolation and characterization of an EDTA-sensitive protease. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.302. n.4. p.149-157.London, 1973.

ASPINALL, G. O. **Polyssacharides**. Oxford: Pergamon Press. 228p, 1970.

AZIZAH, A.H.; RUSLAWATTI, N.M.; TEE, T.S. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chemistry**. v. 64. n. 7. p. 199-202, London 1999.

BAKARE, M.K; ADEWALE, I.O; AJAYI, A; SHONUKAN, O;O. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**. v.12. n. 4. p. 898-904, London, 2004.

BARROS NETO, B; SCARMINIO, I. S; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, 2. edição. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

BELITZ, H.D; GROSCH, W. Química de los alimentos.: **Acribia**. Pg. 645-656. Zaragoza, 1988.

BHAT, M. K., Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology and Advances**. v.18. n.3. p. 355–383. London, 2000.

BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology**. v.3. n.5. p. 286-95, London, 1985.

BIMBENET, J.J; DUQUENOY, A; TRYSTAM, G. **Génie des procédés alimentaires: des bases aux applications**. v. 58. n.3. p.554. Paris, 2002.

BITTER, T; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Chemistry**. v.4. n.5. p. 330-334, New York, 1962.

BLANCHETTE, R.A; KRUEGER, E.W; HAIGHT, J.E; AKHTAR, M; AKIN, D.E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53. n.3. p. 203-213, Chicago, 1997.

BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. Introdução à química de alimentos. 2.ed. São Paulo: **Varela**, 1989.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function**. University of Wisconsin Technical Report, 9, 1973.

BOX, G. E .P.; DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surface**. New York: John Wiley & Sons, 1987. 669 p.

BRENNA, O.V; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49. v.3. p.4841-4844, Chicago, 2001.

BRUNETON, J. Composés Phenóliques. **In: Pharmacognosie**. Lavoiser. Pg.200-291. New York, 1993.

BUCKERIDGE, M. S; TINÉ M. A. S. Composição polissacarídica: estrutura da parede celular e fibra alimentar. **In: Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Cood. Franco Maria Lajolo. **Livraria Varela**. Pg.43-60. São Paulo, 2001.

BURNS, J; GARDNER, P.T; MATTHEWS, D; DUTHIE, G.G; LEAN, M.E.J; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49. n.8. p. 5797-5808, Chicago, 2001.

CACACE, J.E; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries, **Journal of Food Engineering**. v.59. n.14. p. 379–389. Chicago, 2003.

CAMARA, F.S; MADRUGA, M.S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflatoxin contents of a brazilian (Natal) multimistura preparation. **Revista de nutrição**. v.14.n.6. p.33-36, Curitiba.2001.

CARVALHO, G. G. P. de; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; MAGALHÃES, A. F.; FREIRE, M. A. L.; SILVA, F. F. da; SILVA, R. R.; CARVALHO, B. M. A. de. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 125-132. Brasília, 2006.

CASTELLARI, M; SARTINI, E; FABIANI, A; ARFELLI, G; AMATI, A. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. **Journal of Chromatography**. v.973. n.14. p.221-227. London, 2002.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas amazônicas da Amazônia**. 5.ed. Belém: Edições CEJUP, 1991.

CELESTINO, S.M; FILHO, E. X. F. Characterization of pectinases from *Acrophialophora nainiana* and *Trichoderma harzianum* strain T6. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas de Salvador**. v. 4. n. 2.p. 97-104. Salvador 2005

CHAMKHA, M; CATHALA, B; CHEYNIER, V; DOUILLARD, R. Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot noir vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.31. n.2. p. 3179-3184. Chicago, 2003.

CHEN, H. M., MURAMOTO, K., YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 43. n. 3. p. 574-578. Chicago, 1995.

CHEN, J.H.; HO, C.T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45. n.3. p. 2374-2378. Chicago, 1997.

CHIRINOS, R; CAMPOS, D; ARBIZU, C; REES, J.-F; ROGEZ, H; LARONDELLE, Y; NORATTO, G; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Effect of genotype, maturity stage and postharvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity of Andean Mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz&Pav´on). **Journal of Science and Food Agriculture**. v. 43. v.10. p. 574-578. London, 2007.

CHIRINOS, R; ROGEZ, H; CAMPOSA, D; PEDRESCHI, R; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav´on) tubers. **Separation and Purification Technology**. v.55. v.5. p.217–225. London, 2006.

CODNER, R. C. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 84. n.11. p. 47–60. New York, 2001.

CONDE, E; CADAHÍA, E; GARCIA-VALLEJO, M. C; SIMÓN, B. F. Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different Spanish provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46. n.12. p. 3166-3171. Easton, 1998.

CORDENUNSI, B.R. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**: V.50. n.11. p. 2581-2586. Chicago, 2002.

CUVELIER, M.E; RICHARD, H; BERSET, C. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 56. n.15. p. 324-235. Tokyo, 1992.

DA SILVA, R; FRANCO, C.M.L; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 31. n. 2. p. 249 – 260, Campinas, 1997.

DA SILVA, R; YIM, D.K; PARK, Y.K. Purification and Characterization of Thermostable Xylanases from Thermophilic *Humicola* sp. and their Application in Pulp Improvement. **Revista de Microbiologia**. v.25. n. 2. p. 112-118. São Paulo, 1994.

DREOSTI, I.E; WARGOVICH, M.J; YANG, C.S. Inhibition of carcinogenesis by tea: The evidence from experimental studies. **Critical Review in Food Science and Nutrition**. v. 37. n. 4. p. 761-770, London, 1977.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**. v. 44. n.5. p. 101-106, Sevilla, 1993.

ENOKI M, WATANABE T, NAKAGAME S, KOLLER K, MESSNER K, HONDA Y, KUWAHARA M. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Fems microbiology letters**. v.180. n.15. p. 205-211. Oxford, 1999.

ERTAGNOLLI, Silvana Maria Michelin et al. **Influência da maceração carbônica e da irradiação ultravioleta nos níveis de *trans*-resveratrol em vinhos de uva *cabernet sauvignon***. Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.43, n.1, p. 71-77. Santa Maria, 2007.

ESCRIBANO-BAILÓN, M.T; SANTOS-BUELGA, C. Polyphenol extraction from foods, in: C. Santos-Buelga, G. Williamson (Eds.), *Methods in Polyphenol Analysis*, The Royal Society of Chemistry, United Kingdom, 2003.

ESMELINDRO, M.C; TONIAZZO, G; WAGZUK, A; DARIVA, C; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento

industrial. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 22. n. 2. p. 52-60 Campinas. 2002.

FENGEL, D; WEGENER, G. **Wood - chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter. Pg. 613. Berlin, 1989.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Acribia, Zaragoza, 1993.

FERNÁNDEZ-ESPINAR. M; PIÑAGA. F; DE GRAAFF. L; VISSER. J; RAMÓN. D; VALLÉS. S. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volume 42, Number 4 / December, Berlin, 2004.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. **In: ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. (Org.). Biologia de Fungos**. Pg. 215-242. Caxias do Sul, 2004.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 9ed. Editora: **Atheneu**. Madri, 1997.

FUKUSHIMA, S. R.; HATFIELD, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 38. n.8. p.505-511, Brasília, 2003.

GALANTE, Y; DE CONTI, A; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry. **In: HARMAN, G. AND KUBICEK, C. (eds.) Trichoderma and Gliocladium, Enzymes, biological control and commercial applications**. v. 2. n. 1. p.311-326. Routledge, 1998.

GÁMEZ-MEZA, N. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, Chicago, 1999.

GARRO-GALVEZ, J. M.; RIEDL, B.; CONNER, A. H. **Analytical studies on Tara tannins**. v. 51, n. 3. p. 235-243, *Holzforschung*, 1997.

GEANKOPOLIS, C.J. Transport process and unit operations. 2.ed. Boston: Editora: **Allyn and Bacon**. 862pg. 1983.

GLAZER, A. N; NIKAIDO, H. Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology. Editora: **W.H. Freeman and Company**. Chapter 10. p.335-357, New York, 1995.

GOLDBERG, D.A; YAN, J; SOLEAS, G.J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clinical Biochemistry**. v.36, n.1. p.79-87, New. York, 2003.

GONZÁLEZ-TELLO, P; CAMACHO, F; JURADO, E.; PAÉZ, M. P; GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. **Biotechnology and Bioengineering**. V.44, n.4, p.529-532, London, 1994.

GOODELL B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. **In:** GOODELL B, NICHOLAS DD, SCHULTZ TP (eds) Wood deterioration and preservation. ACS Symposium series. Pg. 97–118. Washington, 2003.

GOODWIN, T.W; MERCER, E.I. Introduction to plant biochemistry.: Editora: **Pergamon**. 677pg. Oxford, 1983.

GUMMADI, S.N; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochem**. v.38, n.3. p.987-996. Barking, 2003.

HALLIWELL, G. Hydrolysis of fibrous cotton and reprecipitated cellulose by cellulolytic enzymes from soil microorganisms. **Journal of Food Biochemistry**. v.101. n.3. p.30-52. London, 1965.

HALTRICH, D; NIDETZKY, B; KULBE, K.D; STEINER, W; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**. v.58. n.2. p. 137-161, London, 1996.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**. Chapman and Hall, 295p. London, 1973.

HERRERO, M; CIFUENTES, A; IBANEZ, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. **Food Chemistry**. v. 98, n. 1.p. 136-148, London, 2006.

HOLTZAPPLE, M; CARAM, H; HUMPHREY, A. The HCH-1 model of enzymatic cellulose hydrolysis. **Process Biochemistry**. v.26. n.2. p.775–780, New York, 1984.

HUI, Y. H. Bailey's industrial oil & fat products. Editora.: **John Willey & Sons**. v. 3. n. 1. p. 696, New York , 1996.

HURST, P.L; NELSON, J; SULLIVAN, P.A; SHEPHERD, M.G. Purification and Properties of a Cellulase from *Aspergillus niger*. Biochem. J. Gr. Br. 165: 33-41. **Journal of Food Biochemistry**. v.165. n. 20. p.33-41. London, 1976.

IMAI, M; IKARI, K; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonification pretreatment. **Biochemical engineering**. V.17. n.10. p.79-83. London ,2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz, métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3º edição. v.1. São Paulo,1985.

JAYANI, R. S; SAXENA, S; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**. v.160. n. 21. p. 31-40. London, 2005.

JENCKS, W. P. "Catalysis in Chemistry and Enzymology" **Dover Publication**, Inc. p.312-313, New York, 1987.

JOO, H. S; KUMAR, C. G; PARK, G. C; KIM, K. T; PAIK, S. R; CHANG, C. S. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**. v. 38. n.2. p. 155-159, London, 2002.

JULKUNEM-TIITO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows, methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.33, n. 2. p.213-217. Chicago, 1985.

JUNTACHOTE, T; BERGHOFER, E. Antioxidant properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**. v. 92. n. 2. p. 193-202, London, 2005.

KÄHKÖNEN, M.P; HOPIA, A.I; VOURELA, H.J; RAUHA, J.P; PIHLAJA, K; KUJALA, T.S; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolics compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.47. n. 13. p.3954-62. Chicago, 1999.

KALT, W; MCDONALD, J. E; DONNER, H. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.65. n. 11. p. 390-3. London, 2000.

KAPICH, A.N; JENSEN, K.A; HAMMEL, K.E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **Febs letters**. v. 461. n. 25. p. 115-119. New York, 1999.

KASHYAP, D.R; VOHRA, P; SONI, S.K. Degumming of bael (*Grewia optiva*) bast fibers by pectinolytic enzyme from *Bacillus sp.* DT7. **Bioresource Technology**. v.23. n. 4. p. 1297-1301. London, 2001.

KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**. v.77. n. 3. p. 215-227. London, 2001

KEINÄNEN M. Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.41. n. 2. p. 1986-90. Chicago, 1993.

KELLER. S. E; JEN. J. J; BRUNNER. J. R. Purification of Commercial Pectinase by Hydrophobic Chromatography. **Journal of Food Science**. v. 461. n. 25. p. 115-119. New York. 2006

KITAMURA, K. A protease that participates in yeast cell wall lysis during zymolyase digestion. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 46. n. 8. p. 2093-2099, Osaka, 1982.

KITTS, D.D. Bioactive substance in food: identification and potencial use. **Canadian Journal of the Physiology and Pharmacology**, v.72. n. 3. p. 423-434, Ottawa, 1994.

KLUSKENS, L.D.; ALEBEEK, G.J.W.M.; WALTHER, J.; VORAGEN, A.G.J.; VOS, W.M.; OOST, J. Characterization and mode of action of an exopolygalacturonase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime*. **FEBS Journal**. v.272. n. 23. p.5464–5473. Chicago, 2005.

KOBAYASHI, T; HIGAKI, N; YAJIMA, N; SUZUMATSU, A; HAGIHARA, H; KAWAI, S; ITO, S. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Bioscience, Biotechnology and biochemistry**. v.65. n. 19. p. 842-847. Osaka, 2000.

KUBATA, B.K; SUZUKI, T; HORITSU, H; KAWAI, K; TAKAMIZAWA, K. Purification and Characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 Xylanase V, Which Produces Exclusively Xylobiose from Xylan. **Applied and Environmental Microbiology**. v.36. n. 5. p. 531-535. Tokyo. 1993.

KUMAR, C. G; TAKAGI, H. Microbial alkaline protease: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**. v. 17. n. 3. p. 561-594. Osaka, 1999.

KULKARNI, N; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**. v. 23. n. 2. p. 411 – 456. Chicago, 1999.

KHURI, A. I; CORNELL, J. A. **Response surface: design and analyses**. 2 edition. New York: Marcel Dekker Inc., 1996.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**. v. 71. n. 2. p. 214-222. London, 2005.

LARSSON, S; PALMQVIST, E; HAHN-HÄGERDAL, B; TENGBORG, C; STENBERG, K; ZACCHI, G; NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 24. n.3. p.151-159, London, 1999.

LEHNIGER, A; NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2° ed., São Paulo: Editora Savier, 1995.

LIMA, E.D.P.A; PASTORE, G.M; LIMA, C.A. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. **Revista de Ciência e tecnologia de alimentos**. v.21. n.2. p. 98 – 104. Campinas, 2001.

LINEWEAVER, H, BURK, D. The determination of enzyme dissociating constants, **Journal of the American Chemical Society**. v. 56. v. 3. p. 658-666, Chicago, 1934.

LIYANA-PATHIRANA, C. SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology, **Food Chemistry**. v.93. n. 11. p. 47–56. London, 2005.



LOOTENS, D; CAPEL, F; DURAND, D; NICOLAI, T; BOULENGUER, P; LANGENDORFF, V. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**. v.17, n.3. p.237-244, Oxford, 2003.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 25. n.3. p. 506–577, New York, 2002.

MAGNO E SILVA, K.J. Estudo preliminar da extração de antioxidantes hidrossolúveis de plantas amazônicas. 2004. 98f. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal do Pará**. Belém, 2004.

MAILLARD, M.N; SOUM, M.H; BOIVIN, P; BERSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v.29, n.3. p. 238-44. Berlin, 1996.

MANE, R. R., BAPAT, M. A study of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM 2713. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 39. n. 2. p. 578-583. New York, 2001.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. **Food Chemistry**. v. 58. n. 3. p. 245- 248, London, 1997.

MAU, J. L.; TSAI, S. Y.; TSENG, Y. H.; HUANG, S. J. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**. v. 93, n. 4. p. 641-649, London, 2005a.

MAU, J. L.; TSAI, S. Y.; TSENG, Y. H.; HUANG, S. J. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. **LWT. Food Science and Technology**. v. 38. n. 6. p. 589-597, London 2005b.

MAY, C. D. Pectins. In: IMENSON, A. Thickening and gelling agents for food. Cap. 11. 2 ed. **Blackie Academic & Professional**. v.25, n.2. p. 230-260. London:1997.

MAZUR, W.M; DUKE, J.A; WÄHÄLÄ, K; RASKU, S; ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. **Nutritional Biochemistry**. v.9. n. 5. p. 193-200. London, 1998.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim do SBCTA**. v.36. n. 1. p. 1-11. Campinas, 2002.

McCREADY, R. M; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruit. **Analytical Chemistry**. v.24. n.12. p. 586-1588, Washington, 1952.

MCDONALD S, PRENZLER PD, ANTOLOVICH M, ROBARDS K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**. v.73. n.6. p. 73-84. Chicago, 2001.

MIKOVÁ, K. The regulation of antioxidants in food. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. Antioxidants in foods. **Cambridge: Woodhead Publishing**. v.12. n. 2. p. 267-284, London, 2001.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31. n. 5. p. 426–428. New York, 1959.

MOHANA, S; SHAH, A; DIVECHA, J; MADAMWAR, D. Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. **Bioresource Technology**. v. 99. n.16. p. 145-151, London, 2008.

MOHAMED, S.A; FARID, N.M; HOSSINY, E.N; BASSUINY, R.I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Biotechnology**. v.127. n. 21. p. 54-64, Osaka, 2006

MONAGAS, M; BARTOLOMÉ, B; GOMEZ-CORDOVÉZ, C. Evolution of polyphenols. In red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle II. Nonanthocyanin phenolic compounds. **European Food Research and Technology**. v.220. n. 26. p. 331-340, London, 2005.

MOURE, A; FRANCO, D; DOMINGUES, J.M; SINEIRO, J; DOMINGUES, H., NÚÑEZ, M.J; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**. v.72. n. 11. p. 145-171, Chicago, 2001.

MOVAGARNEJAD, K; SOHRABI, M; KAGHAZCHI, T; VAHABZADEH, F. A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems. **Biochemical Engineering Journal**. v.4. n. 1. p. 197-206. London, 2000.

MYAZAKI, Y. Purification and characterization of an endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. **Agricultural and biological chemistry**. v.55. n. 7. p. 25-30, Tokio.1991

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Polifenóis da madeira de *Eucalyptus grandis*. Parte 1: análise por espectroscopia e cromatografia líquida. **Ciência & Engenharia**. v. 5, n. 2. p. 13-18, São Paulo, 1996.

NATSUME, M; OSAKABE, N; YAMAGISHI, M; TAKIZAWA, T; NAKAMURA, T; MIYATAKE, H; HATANO, T; YOSHIDA, T. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reverse-phase HPLC. **Biochemical Engineering Journal**. v.64. n.12. p. 2581-2587, Osaka, 2000.

NENADIS, N; ZAFIROPOULOU, I; TSIMIDOU, M. Commonly used food antioxidants: a comparative study in dispersed systems. **Food Chemistry**. v. 82. n. 12. p. 403-407. Chicago, 2003.

NESSA, F; ISMAIL, Z; MOHAMED; N; HARIS, M.R.H.M. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. **Food Chemistry**. v. 88. n. 2. p. 243-252, London, 2004.

NIDETZKY, B; STEINER,W; HAYNT,M; CLAEYSSSENST, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. **Journal of the Biochemistry**. v. 298. n. 50. p. 705-71. London, 1994.

OIKAWA, T; TSUKAGAWA, Y; SODA, K. Endo- $\beta$ -glucanase secreted by a Psychrotrophic yeast: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.62. v. 11. p. 1751-1756. Osaka, 1998.

ORBERG, P.K. Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei*. **Dissertação de mestrado**, Oregon State University, Oregon. 1981.

ORTEGA-FLORES, C.I. Avaliação nutricional da folha de mandioca. São Paulo 1998. 165p. **Tese doutorado**. Universidade de São Paulo (USP).

PINELO, M; RUBILAR, M; JEREZ M; SINEIRO, J; NUNEZ M.J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. v.53. n. 6. p. 2111–2117. Chicago, 2005.

POKORNY, J; KORCZAK, J. Preparation of Natural antioxidants. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**.: CRC Press. v.23. n.5. p. 311-330. New York, 2001.

POLIZELI, M.L.T.M; JORGE, J.A; TERENCEI, H.F. Pectinase production by *Neurospora crassa*. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase activity. **Biochemical Engineering Journal**. v.137. n. 13. p. 1815-1823, Osaka, 1991.

POLENTA, G.A. Evolução dos compostos fenólicos durante a fermentação de mostos provenientes de três regiões do Rio Grande do Sul, submetidos a diferentes tratamentos. **Dissertação de Mestrado**, Santa Maria/RS, 153p. 1996.

PRIOR, R. L; WU, X; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. v. 53, n. 10. p. 4290-4302, Columbus, 2005.

RAJALAKSMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. Food Antioxidants – technological, toxicological and health perspectives.: Marcel Dekker. V.14. n. 2. p. 65-157, New York, 1995

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D. L.; POMETTO, I.A. L. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp: A comparative study of wild type and genetically manipulated strains. **Applied and environmental microbiology**. v. 12. n. 3. p. 2754-2760, London, 1987.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; ELCHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, ed. 6, Editora. Koogan .928p. London, 2001.

REXOVA-BENKOVA, L; MARKOVIC, O. Pectic enzymes. In: Tipson RS, Horton D (eds) **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. Academic Press, 323–385p. New York, 1976.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography**. V.123. Pg.657-691, London, 2003

ROESLER, R; MALTA, L. G; CARRASCO, L. C; HOLANDA, R.B; SOUSA, C.A.S; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência tecnologia de alimentos**. v.27, n.1.p.53-60. Campinas-Brasil. 2007.

SACHSLEHNER, A; NIDETZKY, B; DULBE, K.D; HALTRICH, D. Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in *Aclerotium rolfsii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.12. n. 2. p. 594-600, London, 1997.

SADDLER, J.N. Factors limiting the efficiency of cellulase enzymes. **Microbiological sciences**. v.3, n.3. p. 84-87, Oxford, 1986.

SAITO, I.M. Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico. **Tese de doutorado**. Unesp. 2005.

SAKAI, T; SAKAMOTO,T; HALLAERT,J; VANDAMME,E.J. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**. v.39. n. 8. p. 213-294, Osaka, 1993.

SAKAKIBARA, H; HONDA, Y; NAKAGAWA, S; ASHIDA, H; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51. n.3. p. 571-581, 2003.

SALLES, B.C; CUNHA, R.B; FONTES, W; SOUSA, M.V; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal of Biotechnology**. v.81. n. 3. p. 140-145, Dubai. 1999.

SANAIOTTI,T. **The woody flora and soils of seven Brazilian dry savanna areas**. **Tese de Doutorado**. University of Stirling, Reino Unido. 145p. 1996.

SANTANA, M.C.A., CAVALI. J. Fundamentos e Avaliação Comparativa de Métodos para Análise de Lignina em Forragens (Foundations and Comparative Evaluation of Methods for Analysis of Lignin in Forages). **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**. v.7. n.11. p. 14-19. Curitiba, 2006.

SANTOS, L. F. Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). 97 p. Campinas, 2004

SCALBERT, A; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130. n. 12. p. 2073-2085. London, 2000.

SELLAPPAN, S; AKOH, C.C; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. v.50, n. 8. p. 2432-2438, Chicago, 2002.

SHAHIDI, F; JANITHA, P.K; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v.32. n.1. p. 67-103, Chicago, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic. 331 p. New York, 1995.

SHEN, Z.C; MANNING, G; REESE, J.C; REECK, G.R. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.29. n. 5. p. 209-214. London, 1999.

SILVA, D.J; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3ª edição**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa (MG): Editora UFV, 2002.

SILVA, E. G., BORGES, M. F., MEDINA, C., PICCOLI, R. H. E SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**. v.12. n. 2. p. 859-865. Chicago, 2005.

SILVA, E.M; SOUZA, J.N.S; ROGEZ, H; REES, J-F; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian Region. **Food Chemistry**. v.101. n. 19. p. 1012-1018, Chicago, 2007.

SILVA, E. M; ROGEZ, H; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**. v.55. n. 14. p. 381-387. London, 2007.

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. Editora Nobel, São Paulo, 1985.

SINGH, J; BATRA, N; SOBTI, R. C. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**. v. 36. n.3. p. 781-785, Osaka, 2001.

SINGH, J; VOHRA, R. M; SAHOO. D. K. Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. **Process Biochemistry**. v. 30. n. 4. p. 1-9, Osaka, 2003

SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R; LAMUELA-RAVENTOS, A. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin-cioucateu Reagent. **Methods in Enzimology**. v.299. n. 24. p. 152-178, New York, 1999.

SINGLETON, V. L; ROSSI. J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.26. n.2. p. 62- 69, Chicago, 1965.

SLUIS, A. A; DEKKER, M; SKREDE, G; JONGEN, W. M. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49. n. 9. p. 3606-3613, Chicago, 2001.

SOBRATTEE, M. A; NEERGHEEN, V. S; LUXIMON-RAMMA, A; ARUOMA, O. I; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.579. n.1. p. 200-213. Chicago, 2005.

SOUZA, J.N.S. Etude des propriétés antioxydantes in vivo d'extraits de feuilles de *Byrsonima crassifolia* et *Ingá edulis* et caractérisation partielle des composés phénoliques. **PhD Thesis**, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium, 2007.

SOUZA, J.N.S; SILVA, E.M; LOIR, A; REES, J.F; ROGEZ, H; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**. v.612. n. 1. p.199-206. Chicago, 2007.

STATISTICA for Windows 7.0. Computer program manual. Tulsa: StatSoft, Inc., 2006.

TARANTILI, P; KOULLAS, D; CHRISTAKOPOULOS, P; KEKOS, D.; KOUKIOS, E; MACRIS, B. Cross-synergism in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses: mathematical correlations according to a hyperbolic model. **Biomass Bioenergy**. v.10. v. 1. p. 213–219, Osaka, 1996.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.37. n.1. p. 47-73, London, 1997.

THIEMANN, J.E; XAVIER, M.S.S.P., COLEN, G; GUIA, M.M. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. In *Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo*. Sociedade Brasileira de Microbiologia. v. 14. n. 3. p. 168-185. , São Paulo, 1980.

TIJBURG, L.B.M; MATTERN, T; FOLTS, J.D; WEISGERBER, U.M; KATAN, M.B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.37. n. 5. p. 771-785, Turin, 1997.

TONG, C.C; COLE, A.L; SHEPHERD, M.G. Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus, *Thermomonas auriantiacus*. **Biochemical Journal**. v.191. n. 12. p. 83-94. London,1980.

TSAO, R; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. v.1118. n 20. p. 29-40, London, 2003.

TSAO, R; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals, **Journal of Chromatography**. v. 812. n. 52. p. 85–99. London, 2004.

TSUDA, T; WATANABE, M; OHSHIMA, K; NORINOBU, S; CHOL, S. W; KAWAKISHI S; OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D-glucoside and cyanidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.42. n. 7. p.2407-2410, Chicago, 1994.

TSUYUMU S, ISHII S, NAKAMURA M. Plate assay for differentiation of different pectinases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53. n.9. p. 2509-2511. Chicago, 1989

TUNCER, M. Characterization of Endoxylanase Activity From. *Thermomonospora Fusca* BD25. **Turkish Journal of Biology**. v.50. n.2. p. 250-256. Çiftlikköy, 1999.

UPDEGRAFF, D. M. Semi-micro determination of cellulose in biological materials. **Analytical Biochemistry**. v.32. n. 14. p. 420-424, New York, 1969.

VAN SOEST, P.J; WINE, R.H. Use of detergents in the analyses of fibrous feeds - A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal Association Official Analytical Chemistry**. v.46. n.1. p. 829-835, Arlington, 1963.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2. ed. 476 p. Ithaca: Cornell University Press, Ithaca, 1994.

VEKIARI, S. A; OREOPOULOU, V; TZIA, C; THOMOPOULOS, C. D. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 70. n. 5. p. 483-487. Chicago 1993.

VELIOGLU, Y.S, MAZZA, G; GAO, L; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J Agricultural Food Chemistry** .v.46. n.10. p. 41-47. Chicago, 1998.

VIEIRA, W. B; MOREIRA, L. R. S; MONTEIRO, N, A; FERREIRA, F, E. X. Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity. **Brazilian journal of microbiology**. v.38. n. 2. p. 237-242, São Paulo, 2007.

VILARIÑO, C; DEL GIORGIO, J.F; HOURS, R.A; CASCONI, O. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. **Food Science and Technology**. v, 26. n. 3. p. 107-114. New York, 1993.

WANASUNDARA, U; AMAROWICZ, R; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. v. 42. n. 6. p. 1285-1290. Chicago, 1994.

WAKABAYASHI, K. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. **Journal Plant Research**. V.113. n. 12. p. 231–237. London, 2000.

- WARD, O. P. **Biotecnología de la fermentación**. Zaragoza: Acribia, 1989.
- WARD, M; WU, S; DAUBERMAN, J; WEISS, G; LARENAS, E; BOWER, B; REY, M; CLARKSON, K; BOTT, R. Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small high pI endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*. **In:** P. Suominen and T. Reinikainen (eds.) Proceedings of the Second Tricel Symposium on *Trichoderma* cellulases and other hydrolases, Espoo, Vol. 8. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Pg. 153-158. Helsinki, 1993.
- WATERMAN P.G; MOLE S. **Analysis of phenolic plant metabolites.**: Blackwell Scientific Publications; 238p. Oxford 1994.
- WAKSMAN, G. Purification and characterization of two endo-beta-1,4-D-glucanases from *Sclerotinia sclerotiorum*, pp. **Biochimica et Biophysica Acta**. v 1073. n. 145. p.49-55, New York, 1991.
- WRETLIND, B; WADSTRÖM, T. Purification and properties of a protease with elastase activity from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of General Microbiology**. v.103. n. 2. p. 319–327. London, 1977
- WHITAKER, J. R. **Microbial Enzyme and Biotechnology**. 2<sup>o</sup> edition. Elsevier, 363 p. New York, 1990.
- WHITAKER, J. R.; **Principles of Enzimology for the Food Sciences**, 2nd ed. DEKKER M, Inc. Pg. 425 – 436. New York, 1994.
- WISEMAN, A. Manual de biotecnología de los alimentos. Zaragoza: **Editorial Acribia**, 444p. 1991.
- WONG, K.K.Y; TAN, L.U.L; SADDLER, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 Xylanase in Microorganisms: **Functions and Applications**. **Microbiological Reviews**. v. 52. n. 3. p. 305 – 317, Osaka, 1988.
- WOODWARD, J. Xylanases: Functions, Properties and Applications. **In:** Introduction to Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, Cap. 29 – 30, London, 1984.
- WU, L.C; HANG, Y.D. Acid protease production from *Neosartorya fischeri* Lebensm - **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.69. n. 12. p. 4083-4089. London, 2000.
- YILDIRIM, A; MAVI, A; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.49. n. 17. p. 40-48, Chicago, 2002.
- ZAMORA, N; GONZÁLEZ J ;POVEDA, L. J. Arboles y Arbustos del Bosque Seco de Costa Rica. **Editora: Instituto Nacional de Biodiversidad**. Costa Rica, 1999.
- ZANCAN, K. C; MARQUES, M. O. M; PETENATE, A. J; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents:



a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 24. n. 1. p. 57-76, New York, 2002.

ZHENG, W; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 11. p. 5165-5170, Easton, 2001.

ZHENG, Z; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**. v.35. n. 3. p. 825 – 830, London, 2000.

ZIEGLER, I. M; HOLMGREN, A; FORSLING, W; LINDBERG, M; RANHEIMER, M. Mechanism of the adsorption process of pinosylvic acid and some polyhydroxybenzenes onto the structure of lignin. **Vibrational Spectroscopy**. v. 36. n. 5. p. 65-72. Chicago, 2004.