



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

CAMILO BARROSO TEIXEIRA

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO PRÉ TRATAMENTO TÉRMICO OU
ENZIMÁTICO PARA EXTRAÇÃO AQUOSA E PROPRIEDADES DO ÓLEO DE
PALMA (*Elaeis guineensis*)

BELÉM/PA

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO PRÉ TRATAMENTO TÉRMICO OU
ENZIMÁTICO PARA EXTRAÇÃO AQUOSA E PROPRIEDADES DO ÓLEO DE
PALMA (*Elaeis guineensis*)

CAMILO BARROSO TEIXEIRA
(Engenheiro de Alimentos)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos
da Universidade Federal do Pará
como requisito parcial para
obtenção do título de mestre em
ciência e tecnologia de alimentos.

Prof. Dr. ANTONIO MANOEL DA CRUZ RODRIGUES (Orientador/UFPA)

Profa. Dra. GABRIELA ALVES MACEDO (Co-orientadora/UNICAMP)

BELÉM/PA 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Teixeira, Camilo Barroso

Estudo comparativo dos efeitos do pré tratamento térmico ou enzimático para extração aquosa e propriedades do óleo de palma (*Elaeis guineensis*) / Camilo Barroso Teixeira; orientador, Antonio Manoel da Cruz Rodrigues e Gabriela Alves Macedo .- Belém - 2011

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011

1. Óleo de palma- extração 2 . Enzimas 3 .Antioxidantes I.
Título

CDD 22.ed. 660.28424

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
(FEA / ITEC/ UFPA - Orientador)

Profa Dra. Gabriela Alves Macedo
(DCA / FEA / UNICAMP – Co-orientadora)

Prof. Dr. Sylvain Henri Darnet
(ICB / UFPA – Membro)

Dra. Juliana Alves Macedo
(Pos-doc Universidade São Francisco/USF)

Prof.Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo
(FEA/ITEC/UFPA)

O equilíbrio e o sinergismo sustentam a
Natureza e conseqüentemente a vida.

Camilo Barroso Teixeira

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela sensatez e maturidade na tomada de decisões e nos momentos de superação.

Aos meus pais pela confiança, apoio moral e amor incondicional.

À minha irmã por ser a melhor do mundo e ao meu sobrinho (Pedrinho) por existir na minha vida. Ao pai dele (João Élbio) pela amizade que virou família.

Ao prof. Antônio e à prof^a. Luiza pelo apoio, confiança, além da paciência comigo, experiência profissional e dedicação.

À prof^a Gabriela pela compreensão, confiança, paciência, dedicação e por me aguentar por tanto tempo.

À Juliana Macedo, ao prof. Sylvain, ao prof. Hamilton e ao prof. Jesus pelas correções e sugestões que ajudaram a melhorar o trabalho.

A todos do LAMEFI: Cecília, Daniele, Érica, Josilene, Júlio, Lidiane, Milena, Rafaela, Rafael, Rafaele e Rebeca.

A todos do laboratório de Bioquímica do DCA: Ana Luiza, Bia, Dani Branta, Evandro, Fabiano, Fran, Haroldo, Joelise, Ju Macedo, Marcela, Márcio, Paty Schons, Paulinha, Pri Becker, Pri Hoffman, Roberta, Ruann, Val, Vivi e Zé.

A todos da minha casa em Belém: Fernando, Fabrício, Graci, Diene, Jussara, Fernando (urso) e Manu.

A todos de onde morei em Campinas: Ademilde, Yvana, Ramon, Mariana e Paulo.

À Capes pela concessão de bolsa.

À AGROPALMA pela doação de matéria-prima e pela análise de AGL, cor e Rancimat.

Ao CNPQ pelo projeto de parceria entre as universidades.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação.

A todos que participaram de forma indireta ou direta na execução do projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do Triacilglicerol.....	20
Figura 2: Estrutura química dos ácidos oléico e linoleico.....	21
Figura 3: Alguns exemplos de carotenos e xantofilas	24
Figura 4: Estrutura de tocoferóis e tocotrienóis	25
Figura 5: Estruturas de ácidos fenólicos: 1) gálico 2) caféico 3) ferrúlico.....	27
Figura 6: Modelo da estrutura da parede celular vegetal de frutos	33
Figura 7: Representação estrutural da atividade de celulase	35
Figura 8: Formação de celotriose e celotetraose	36
Figura 9: Representação estrutural da hidrólise da pectina	36
Figura 10: Hidrólise do ácido tânico pela Tanase	38
Figura 11: Hidrólise da Epigallocatequina Galato por Tanase	39
Figura 12: Fluxograma dos experimentos dos processos de extração.....	41
Figura 13: Fluxograma da produção de Tanase por <i>Paecilomyces variotii</i>	44
Figura 14: Superfície de resposta e curva de contorno para tratamento térmico..	58
Figura 15: Relação entre valores experimentais e os preditos	59
Figura 16: Superfície de resposta para Diluição com concentração de Enzima .	66
Figura 17: Superfície de resposta para pH e concentração de enzima.....	67
Figura 18: Superfície de resposta para pH e Diluição no Rendimento de óleo.....	68
Figura 19: Relação entre pontos preditos e experimentais.....	68
Figura 20: Ajuste do modelo Log.....	72
Figura 21: Ajuste do modelo Pseudo-segunda ordem	72
Figura 22: Correlação entre Fenóis Totais e DPPH fração hidrofílica.....	81
Figura 23: Correlação entre Fenóis Totais e DPPH hidrofílico sem Tanase.....	82
Figura 24: Correlação entre carotenos totais e DPPH fração total óleo.....	83
Figura 25: Correlação entre carotenos totais e DPPH fração lipofílica.....	83
Figura 26: Correlação entre carotenos totais e DPPH da fração hidrofílica.....	84

Figura 27: Correlação entre Tocoferóis Totais e Estabilidade Oxidativa.....	87
Figura 28: Correlação entre carotenos totais e estabilidade oxidativa.....	88
Figura 29: Correlação entre ácidos graxos livres e relação oleico/linoleico.....	91
Figura 30: Correlação entre relação oleico/linoleico e DPPH fração lipofílica.....	91
Figura 31: Regressão múltipla entre Carotenóides e Tocoferóis	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura e ponto de fusão dos ácidos graxos.....	22
Tabela 2: Composição centesimal do fruto de palma.....	29
Tabela 3: Composição em Ácidos Graxos do Óleo de Palma.....	29
Tabela 4: Componentes insaponificáveis do óleo de palma.....	30
Tabela 5: Características Óleo de Palma.....	31
Tabela 6: Gordura sólida (%) para o óleo de palma refinado.....	32
Tabela 7: Níveis das variáveis do DCCR para tratamento térmico.....	43
Tabela 8: Níveis das variáveis do DCCR para tratamento enzimático.....	49
Tabela 9: Matriz Experimental para processo térmico do óleo de palma.....	56
Tabela 10: Coeficientes de regressão para o processo térmico.....	56
Tabela 11: Análise de variância para processo térmico.....	57
Tabela 12: Valores de média para extração de óleo em diferentes pH.....	61
Tabela 13: Atividade enzimática dos extrato bruto e comercial.....	62
Tabela 14: Matriz DCCR para tratamento enzimático.....	63
Tabela 15: Coeficientes de regressão para modelo do processo enzimático.....	64
Tabela 16: Análise de variância para pré-tratamento enzimático.....	65
Tabela 17: Validação experimental do modelo polinomial.....	69
Tabela 18: Efeito da Tanase no rendimento de extração de óleo de palma.....	70
Tabela 19: Parâmetros cinéticos dos ajustes dos modelos matemáticos.....	73
Tabela 20: Resultados para Fenóis Totais no óleo e efluentes dos processos....	75
Tabela 21: Teor de carotenos totais presente nas amostras de óleo.....	77
Tabela 22: Concentração de tocoferóis totais presentes no óleo das amostras...	78
Tabela 23: DPPH das frações hidrofílica, lipofílica e total das amostras de óleo..	80
Tabela 24: Análises de cor, ácidos graxos livres e estabilidade oxidativa.....	86
Tabela 25: Perfil de ácidos graxos das amostras de óleo de palma.....	89
Tabela 26: Relação das concentrações de ácido oleico e linoleico.....	90

Tabela 27: Valores dos coeficientes para Regressão Múltipla.....	93
Tabela 28: Análise de variância para regressão múltipla.....	94

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVO GERAL:.....	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA:.....	19
3.1 ÓLEOS VEGETAIS.....	19
3.2 CAROTENÓIDES.....	23
3.3 TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS.....	25
3.4 POLIFENÓIS.....	27
3.5 ÓLEO DE PALMA.....	28
3.6 COMPOSIÇÃO CELULAR VEGETAL.....	32
3.7 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	40
4.2 MÉTODOS.....	41
4.2.1 Processo de Extração Aquosa do Óleo de Palma.....	41
4.2.1.1 Esterilização.....	42
4.2.1.2 Trituração.....	42
4.2.2 Processo Térmico.....	42
4.2.2.1 Delineamento Composto Central Rotacional para Processo Térmico.....	42
4.2.3 Produção do Extrato Enzimático Bruto de Tanase por <i>Paecilomyces variotii</i>.....	44
4.2.3.1 Microrganismo.....	44
4.2.3.2 Pré-inóculo.....	45
4.2.3.3 Processo Fermentativo em Estado Sólido.....	45
4.2.3.4 Extração.....	45
4.2.3.5 Liofilização.....	46
4.2.4 Atividade Enzimática.....	46
4.2.4.1 Poligalacturonase (PG).....	47
4.2.4.2 Carboximetilcelulase.....	47
4.2.4.3 Tanase.....	47
4.2.5 Tratamento Enzimático.....	48
4.2.6 Extração com solvente.....	50
4.2.7 Caracterização.....	50
4.2.7.1 Umidade do óleo (Karl Fischer).....	50
4.2.7.2 Umidade da Polpa de Dendê.....	50

4.2.7.3	<i>Ácidos Graxos Livres Ca 5a-40</i>	51
4.2.7.4	<i>Perfil de ácidos graxos (Cromatografia Gasosa)</i>	51
4.2.7.5	<i>Estabilidade Oxidativa</i>	51
4.2.7.6	<i>Cor (Cc13e-92)</i>	52
4.2.8	Compostos Antioxidantes	52
4.2.8.1	<i>Carotenóides Totais</i>	52
4.2.8.2	<i>Tocoferóis</i>	52
4.2.8.3	<i>Extração de Fenóis</i>	53
4.2.8.4	<i>Fenóis Totais</i>	53
4.2.9	Capacidade Antioxidativa	54
4.2.9.1	<i>Método DPPH</i>	54
4.2.10	Análise estatística	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO	55
5.1.1	Influência do Potencial Hidrogeniônico no Tratamento Térmico	60
5.2	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO	61
5.2.1	Atividade enzimática	61
5.2.2	Planejamento Experimental	62
5.2.3	Validação Experimental do Modelo	69
5.2.4	Efeito da Tanase no Rendimento de Extração de Óleo	70
5.2.5	Cinética de Extração Enzimática	71
5.3	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	75
5.3.1	Fenóis Totais	75
5.3.2	Carotenóides	76
5.3.3	Tocoferóis	78
5.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)	79
5.4.1	Correlação entre Fenóis Totais e DPPH	81
5.4.2	Correlação entre Carotenóides Totais e DPPH	82
5.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	85
5.5.1	Cor, Acidez e Estabilidade oxidativa	85
5.5.2	Perfil de Ácidos Graxos	89
5.6	REGRESSÃO MÚLTIPLA	92
6	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

RESUMO

No presente estudo o processo aquoso de extração de óleo de palma (*Elaeis guineensis*) utilizando pré-tratamento térmico ou enzimático foi avaliado para rendimento de extração por centrifugação e propriedades antioxidantes do óleo. As enzimas empregadas para o pré-tratamento foram pectinase e celulase comerciais e tanase produzida por *Paecilomyces variotii* proveniente do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado para os dois processos sendo que para o térmico utilizadas duas variáveis independentes: tempo de centrifugação e relação água/amostra (Diluição), mantendo-se fixa a temperatura em 95°C durante 1 hora. Para processo enzimático utilizando Pectinase, Celulase e Tanase, as variáveis independentes foram pH, concentração enzimática (% UA/p) e relação solução enzimática:amostra (Diluição) mantendo fixa a temperatura em 50°C durante 1 hora. Para os dois processos a variável resposta foi rendimento de extração de óleo. O teor total de lipídeos da polpa de dendê foi determinado por extração com solvente com valor de 70,91% em base seca. Os resultados do DCCR para processo térmico indicaram a Diluição como variável mais significativa exercendo efeito negativo para rendimento de extração que resultou em cerca de 58% do teor total de lipídeos. Para processo enzimático, pH foi a variável mais significativa, de acordo com a atividade das enzimas Pectinase, Celulase e Tanase. Os rendimentos máximos alcançados foram entre 90 e 93% do teor total de lipídeos da polpa sendo alcançado nas condições de processo (4,7% Enzima, pH 4 e Diluição = 2x V/m) em 30 minutos de incubação. O fruto de dendê apresentou concentração de fenóis totais de 1222,87 ± 89,58 µg de equivalente ácido gálico (µgEAG/g) em polpa seca de dendê. O óleo da amostra extraído com o extrato de Tanase apresentou maior resultado de fenóis totais adsorvidos com valor de 26,43±0,58 (µgEAG/g óleo) e seu respectivo efluente (428,97±9,55 µgEAG/mL). A amostra extraída apenas com extrato de Tanase apresentou concentração de 346,76 ppm de Carotenóides Totais sendo 154% maior que a amostra Controle. Para fração total do óleo, a amostra extraída com pectinase, celulase e tanase apresentou maior atividade antioxidante (854,1±18 µmol Trolox/g óleo). No entanto, os resultados de atividade antioxidante e

estabilidade oxidativa não tiveram relação direta entre si. O tratamento enzimático foi significativo para atividade antioxidante mas não para estabilidade oxidativa

Palavras-chave: Óleo de Palma, Extração Enzimática de Óleo, Tanase, Polifenóis.

ABSTRACT

In the present study the aqueous extraction process of palm oil (*Elaeis guineensis*) using thermal or enzymatic treatment was evaluated for extraction yield by centrifugation and the antioxidant properties of the oil. The enzymes used for pretreatment were commercial pectinase and cellulase and tannase produced by *Paecilomyces variotii* from the Laboratory of Biochemistry, College of Food Engineering (FEA), State University of Campinas (UNICAMP). Central Composite Design (CCD) was applied for the two cases, in the thermal process two independent variables: centrifugation time and solution/sample ratio (Dilution) and keeping the temperature fixed at 95 °C for 1 hour. For enzymatic process using Pectinase, Cellulase and Tannase, independent variables were pH, enzyme concentration (% AU / p) and enzyme solution: sample ratio (Dilution) keeping the temperature fixed at 50 °C for 1 hour. In both processes the response variable was oil yield extraction. The total lipid content of palm oil pulp was determined by solvent extraction with a value of 70.91% on dry basis. The results of the CCD for thermal process indicated that the Dilution was the most significant variable and exerted negative effect on extraction yield which resulted in approximately 58% of the total content of lipids. For enzymatic process, pH was the most significant, according to enzymatic activity of Pectinase, Cellulase and Tannase. The maximum yields obtained were between 90 and 93% of the total lipid content of the pulp being achieved in the process conditions (4.7% enzyme, pH 4 and Dilution = 2x V / m) in 30 minutes of incubation. The palm oil fruit showed concentrations of total phenols 1222.87 + 89.58 µg of gallic acid equivalent (µg GAE / g) of dried palm oil pulp. The oil extracted from the sample with Tannase's extract showed higher total phenol adsorbed with 26.43 +0.58 µg GAE / g oil and its respective effluent (428.97 +9.55 µg GAE / mL). The sample extracted only with extract of tannase showed concentration of 346.76 ppm total carotenoids which was 154% higher than the control sample. For the total oil fraction, the extracted sample with pectinase, cellulase and tannase showed higher antioxidant activity (854.1 ± 18 µmol Trolox / g oil). However, the results of antioxidant activity and oxidative stability had no direct relationship between them. The enzyme treatment was significant for antioxidant activity but not for oxidative stability.

Keywords: Palm Oil, Enzymatic Extraction of oil Tannase, polyphenols.

1 INTRODUÇÃO

Óleos vegetais representam uma fonte importante de nutrientes como os ácidos graxos essenciais e compostos funcionais como fitoesteróis, vitaminas lipossolúveis, carotenóides e polifenóis. Além disso, atribuem características de sabor, aroma e textura aos alimentos e são as maiores fontes de energia entre as substâncias alimentares. Óleos vegetais podem também ser usados na indústria de alimentos para fabricação de óleos de fritura, óleos de salada, margarinas, manteigas, maioneses e cremes vegetais. Também são usados como matéria prima para obtenção de biocombustíveis, cosméticos, sabonetes, detergentes, medicamentos e lubrificantes.

Óleos e gorduras conferem consistência e características de fusão específicas aos produtos que os contêm, atuam como meio de transferência de calor durante o processo de fritura e como carreadores de vitaminas lipossolúveis e aromas (GOH, 1994). Além disso, os lipídios afetam a estrutura, a estabilidade, o sabor, o aroma, a qualidade de estocagem e as características sensoriais e visuais dos alimentos (O'BRIEN, 1998)

O fruto do dendê produz dois tipos de óleo: óleo de dendê ou de palma (*palm oil*, como é conhecido no mercado internacional), extraído da parte externa do fruto, o mesocarpo; e óleo de palmiste (*palm kernel oil*), extraído da semente, similar ao óleo de coco e de babaçu. (EMBRAPA, 2009).

Os processos de extração de óleos vegetais mais utilizados são: prensagem e extração por solvente ou a combinação dos dois. O método mais adequado depende da quantidade de óleo presente na semente, a quantidade de óleo que pode remanescer na torta, quantidade de proteína desnaturada permitida na torta, capital de investimento disponível e como as leis ambientais restringem a emissão de compostos orgânicos (O'BRIEN, 2004).

A Enzimologia industrial é um importante ramo da Biotecnologia. Processos enzimáticos permitem a transformação de produtos naturais em produtos acabados. As enzimas oferecem caminhos alternativos para se conseguir produtos previamente obtidos a partir de processos químicos convencionais (TURATTI, 1999). Esses

processos biotecnológicos são considerados como processos verdes (limpos) por causarem menor impacto ambiental, além disso, diminuem o consumo de energia e obtém produtos de melhor qualidade.

A utilização de tecnologia enzimática na extração de óleos se baseia no mecanismo de hidrólise da parede celular vegetal e de compostos de alto peso molecular como proteínas, polifenóis e polissacarídeos que envolvem o óleo com o objetivo de facilitar a dissolução e extração. O uso de enzimas na extração de óleos vegetais foi pesquisado intensamente nas últimas décadas e foi aplicado para oleaginosas de interesse comercial.

Ao favorecer a extração do óleo dos tecidos vegetais, compostos de interesse tais como polifenóis, tocoferóis e carotenóides podem ser adsorvidos e incorporados ao óleo com ganho de valor em função de propriedades funcionais e estabilidade oxidativa, tais como ocorrem no processo de extração do óleo de oliva por exemplo.

2 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a aplicação de enzimas de maceração comerciais (pectinase e celulase) e tanase microbiana não comercial no processo aquoso de extração por centrifugação do óleo de palma (*Elaeis guineensis*) para verificação de rendimento de extração de óleo e da incorporação de compostos bioativos como antioxidantes.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o processo aquoso de extração por centrifugação utilizando pré-tratamento térmico avaliando a relação soluto/solvente (Diluição), tempo de centrifugação e pH.
- Estudar o processo aquoso de extração por centrifugação utilizando pré-tratamento com Pectinase, Celulase e Tanase, avaliando os efeitos da concentração de enzima, pH e relação soluto/solvente.
- Quantificação de compostos antioxidantes, análise da capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa do óleo obtido nos dois processos.

3 REVISÃO DA LITERATURA:

3.1 ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais são compostos basicamente por ésteres de ácidos graxos unidos a uma molécula de glicerol (cujo nome oficial da IUPAC é 1, 2,3-propanotriol), que são denominados acilgliceróis (podendo ser mono- di- ou triacilgliceróis). Os óleos e gorduras são constituídos principalmente de triacilgliceróis (TG) que variam no comprimento da cadeia alquílica ou carbônica (a partir de 3 a 25 carbonos) e também na saturação da cadeia. As gorduras possuem a cadeia carbônica saturada, já os óleos possuem de 1 a 4 insaturações (duplas ligações) na cadeia carbônica. Os ácidos graxos mais abundantes na natureza têm 16 ou 18 átomos de carbono. Estão incluídos entre eles os ácidos palmítico, esteárico, linoléico e oléico (WADA, 2007).

Em sua maioria, os óleos vegetais brutos apresentam uma faixa de 1 a 3% de ácidos graxos livres. Entretanto, sua concentração no óleo bruto varia fortemente, dependendo da fonte e das técnicas de extração, sendo considerada uma boa medida da qualidade tanto do óleo bruto quanto do refinado. Alguns óleos de melhor qualidade apresentam acidez de 0,5 % ou menos, enquanto alguns outros (como o óleo de arroz) podem apresentar teores próximos a 5 %. Ácidos graxos livres de cadeia longa geralmente não prejudicam as características sensoriais, ao passo que os de cadeia curta impelem ao óleo odor e sabor de ranço (DRESCHER et al., 1999).

A parte não glicerídica afeta a estabilidade do produto final em termos de cor, sabor e odor e podem gerar problemas durante o processamento, como a formação de espuma e fumaça, quando não retiradas. Os fosfatídeos, por exemplo, são responsáveis pelo escurecimento do óleo quando submetido a elevadas temperaturas. Tanto a etapa de degomagem como o refino são responsáveis por diminuir o teor destes compostos.

Deve-se ressaltar, porém, que nem todos os compostos não glicerídicos são indesejáveis e, muitas vezes, é interessante mantê-los no óleo refinado. Os esteróis

são os principais constituintes da matéria insaponificável dos óleos vegetais, que também possui hidrocarbonetos, como o esqualeno. Os esteróis são compostos sem cor, termicamente estáveis e relativamente inertes (PRYDE, 1995). As altas temperaturas da desacidificação por via física e da desodorização são capazes de removê-los de forma efetiva, concentrando-os no destilado (O'BRIEN, 2004). Os esteróis são utilizados na indústria farmacêutica, na produção de hormônios e corticóides (WOERFEL, 1995). Os fitoesteróis são os micronutrientes funcionais mais estudados na atualidade. Têm mostrado competição com colesterol na absorção pelo intestino (LAW, 2000) e oferecer proteção contra a oxidação de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL).

Quase a totalidade dos óleos vegetais brutos passa por algum tipo de processamento antes de ser destinado ao consumo humano. Os objetivos do processamento são diversos: remoção de odor e acidez, alterações no sabor e na cor do óleo, modificações em sua estrutura molecular e de suas propriedades termodinâmicas (O'BRIEN, 2004). A remoção de ácidos graxos livres (desacidificação) é a etapa mais importante do processo de purificação de óleos, principalmente porque o rendimento do óleo neutro nesta operação tem um efeito significativo no custo do refino (BALCHEN et al., 1999).

Como já foi salientado, a variabilidade na composição dos óleos vegetais é alta, tanto nos esteres de ácidos graxos ligados ao glicerol, quanto na porção não glicéridica. Este fator gera diferenças no processamento a ser seguido nas refinarias.

Ácidos graxos são formados por uma cadeia de carbonos e possui propriedade lipossolúvel. As Figuras 1 e 2 apresentam respectivamente um exemplo de estrutura química dos triacilgliceróis e a estrutura dos ácidos oleico e linoleico.

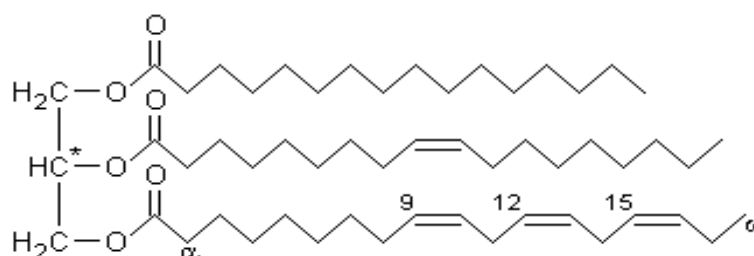


Figura 1: Estrutura química do Triacilglicerol

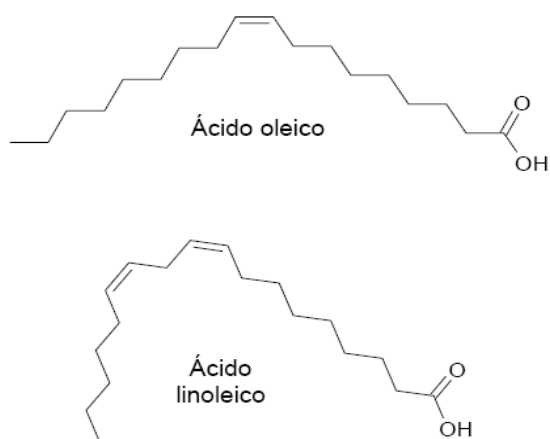


Figura 2: Estrutura química dos ácidos oléico e linoleico

Os triacilgliceróis apresentam a propriedade de polimorfismo, isto é, se cristalizam em mais de uma forma, tem a mesma composição química, porém diferem em propriedades físicas e algumas químicas.

O conhecimento das características químicas dos hidrocarbonetos ajuda a esclarecer o comportamento de lipídios cujas propriedades dependerão em grande parte da cadeia alquílica. Quanto maior a cadeia, maior o ponto de fusão, portanto poderá ser sólido à temperatura ambiente (gorduras). Quanto menor a cadeia e quanto mais insaturada, menor será o ponto de fusão, portanto, líquido à temperatura ambiente (óleos). Na natureza a maioria dos ácidos graxos insaturados possui configuração “cis”, o que provoca ainda mais, a diminuição do ponto de fusão (menor empacotamento) (WADA, 2007). A Tabela 1 mostra a nomenclatura e ponto de fusão dos ácidos graxos.

Tabela 1: Nomenclatura e ponto de fusão dos ácidos graxos.

Ácido Graxo	Símbolo	Ponto de Fusão (°C)
Butírico (butanóico)	C4:0	-8
Capríco (hexanóico)	C6:0	-3,4
Caprílico (octanóico)	C8:0	16,7
Cáprico (decanóico)	C10:0	31,6
Láurico (dodecanóico)	C12:0	44,2
Mirístico (tetradecanóico)	C14:0	54,4
Palmítico (hexadecanóico)	C16:0	62,9
Palmitoléico	C16:1 cis	45
Esteárico (octadecanóico)	C18:0	69,6
Oléico (9-octadecenoico),(w-9)	C18:1 cis	16
Elaídico	C18:1 trans	43,7
Linoléico (9,12-octadecadienoico, (w-6)	C18:2 cis	-7
Linolênico (9,12,15-octadecatrienoico, (w-3)	C18:3 cis	-13
Araquídico (eicosanóico)	C20:0	75,3
Behênico (docosanóico)	C22:0	79,9
Erúcico	C22:1 cis	33,5
Lignocérico (tetracoisanoico)	C24:0	84,2

Fonte: O'BRIEN,2004

De acordo com TURATTI e PASTORE (1999), as principais funções de óleos e gorduras na alimentação humana são: fornecer matéria prima (ácidos graxos) para produção de energia, através da β -oxidação em nível celular, necessária à realização de todos os processos de biosíntese pelo corpo humano, pois um grama de gordura fornece de 9,1 a 9,3 kcal, sendo que carboidratos e proteínas fornecem cerca de 4 kcal/g; fornecer ao organismo compostos orgânicos como os ácidos graxos essenciais (linoléico e araquidônico), vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), hormônios (esteróis), entre outros.

Os ácidos graxos poliinsaturados podem ser classificados em ômega-9 (ω -9), ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3), de acordo com a localização da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metil terminal da molécula. Os ácidos graxos poliinsaturados ácido linoléico (ω -6) e o ácido α -linolênico (ω -3), quando metabolizados formam outros poliinsaturados como ácido araquidônico e ácido eicosapentaenoico, respectivamente (CALDER, 2003). Vários estudos têm demonstrado efeitos benéficos dos ω -3 à saúde: no metabolismo lipídico; provocando uma diminuição nos níveis plasmáticos dos triacilgliceróis e um aumento

da HDL (NESTEL, 2000); possuem também uma ação antiinflamatória, provocada pela diminuição da síntese de potentes mediadores químicos da inflamação, derivados do ácido araquidônico: prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrieno B4 (LTB4) (KREMER, 2000).

3.2 CAROTENÓIDES

Os carotenóides são um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, com mais de 600 estruturas caracterizadas (SU et al., 2002; WINTERHALTER & ROUSEFF, 2002; FRASER & BRAMLEY, 2004), com uma produção estimada em 100 milhões de toneladas por ano (ZORN et al., 2003c; FRASER & BRAMLEY, 2004), identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais (SU et al., 2002; MALDONADO-ROBLEDO et al., 2003; FRASER & BRAMLEY, 2004; HORNERO-MÉNDEZ & MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2007). Somente microrganismos e plantas podem sintetizar carotenóides. Nos animais, estes compostos são originários dessas duas fontes e podem ser modificados durante o metabolismo e se acumular nos tecidos (DELGADO-VARGAS et al., 2000; UENOJO, 2008).

Quimicamente os carotenóides podem ser classificados em dois grandes grupos: aqueles que contêm apenas átomos de carbono e hidrogênio designados carotenos e aqueles que contêm pelo menos um átomo de oxigênio, compondo grupos ceto-hidroxi ou epóxicarotenóides, que recebem o nome de xantofilas (VAN DEN BERG, 2000). Parte dos carotenóides são acíclicos, como o licopeno, porém a grande maioria contém um ou dois anéis na molécula, como o β -caroteno. (MATOS, 2006). Na Figura 3 são apresentados alguns exemplos de carotenóides.

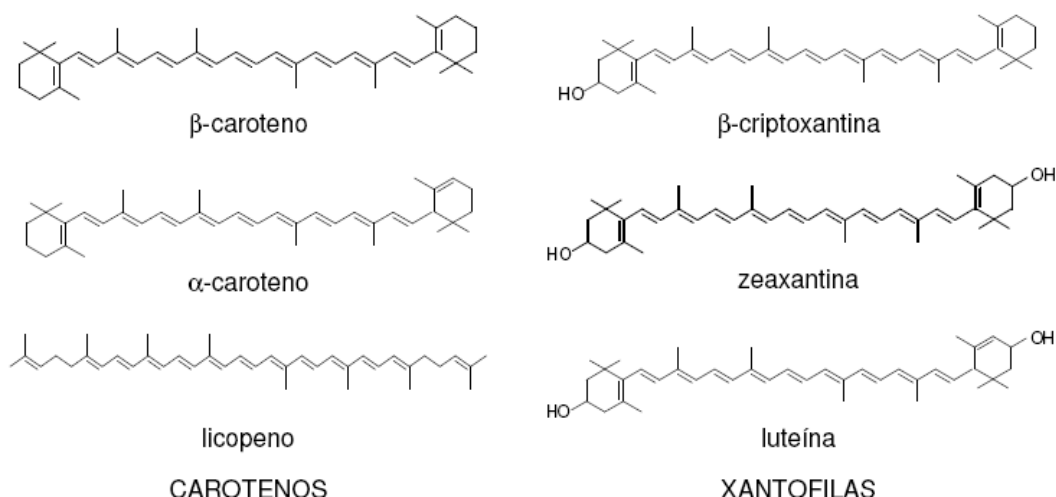


Figura 3: Alguns exemplos de carotenos e xantofilas (Rodrigues-Amaya, 1999).

A estrutura química dos carotenóides é o elemento responsável pelo seu potencial antioxidante, o qual está relacionado à presença de duplas ligações conjugadas, as quais tornam possível a captação de radicais livres. Além disso, os tipos de grupamentos terminais (cíclicos ou acíclicos) e a natureza dos substituintes em carotenóides de cadeias cíclicas, influenciam na ação supressora de radicais livres destes compostos (HIRAYAMA et al., 1994, KIOKIAS, 2004; SOUZA, 2008).

Também podem ser classificados como *primários* ou *secundários*. Carotenóides primários são necessários na fotossíntese dos vegetais (β -caroteno, violaxantina, neoxantina) e os carotenóides secundários estão presentes em frutas e flores (α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, capsantina) (DELGADO-VARGAS et al., 2000; UENOJO, 2008).

Carotenóides são lipofílicos, solúveis em lipídeos ou em solventes orgânicos não polares. A coloração é devida ao sistema de duplas ligações conjugadas, principalmente na configuração *trans*, sua forma natural. Possuem baixa energia no estado excitado, portanto, a energia de transição está localizada na região do visível (400 a 500 nm). A cadeia carbônica é altamente reativa e susceptível ao ataque de reagentes eletrofílicos responsáveis pela instabilidade dos carotenóides à oxidação (RODRIGUES-AMAYA, 1999; DELGADO-VARGAS et al., 2000; UENOJO, 2008).

3.3 TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

Os tocoferóis são antioxidantes naturais e têm ação sobre os radicais livres. Sua presença no óleo é altamente desejável (O'BRIEN, 2004), mas, em alguns casos, o processo de desodorização é delineado de forma a recuperá-lo no destilado (AHRENS, 1998). Dependendo de quão drástico for o tratamento térmico sofrido pelo óleo durante a desodorização, a concentração final de tocoferóis no destilado pode chegar a 14% (WALSH et al., 1998). Possuem atividade de vitamina E e são divididos em dois grupos : Tocoferóis e Tocotrienóis. A Figura 4 ilustra a estrutura química de Tocoferóis e Tocotrienóis.

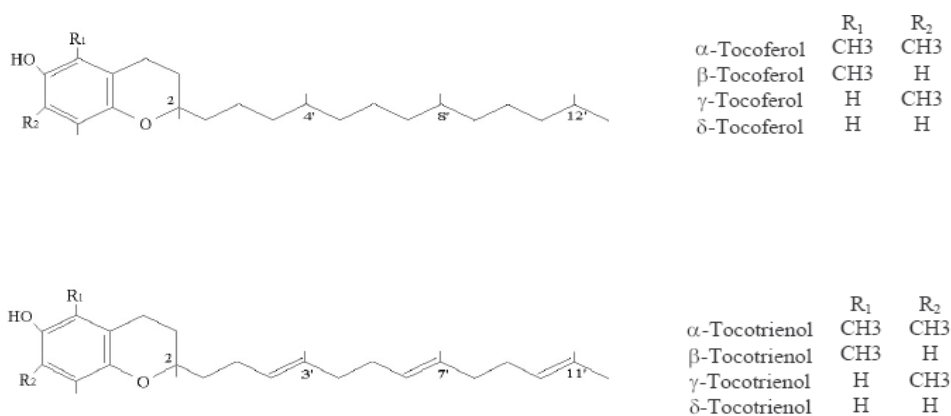


Figura 4: Estrutura de tocoferóis e tocotrienóis (PEIXOTO, 2004).

A atividade biológica dos isômeros de tocoferol anteriormente era dada pelo teste de reabsorção fetal em ratos, entretanto com o reconhecimento da seletividade dos isômeros através da ação da proteína de transferência do α-Tocoferol (α-TTP), atualmente determina-se o requerimento para humanos usando o isômero α-Tocoferol. Assim, a atividade biológica *in vivo* é diferenciada para cada isômero, sendo α-T>β-T>γ-T>δ-T, podendo variar sua atividade e proporção nas diferentes matrizes biológicas (EITENMILLER & LEE, 2004).

Estudos indicam que o aumento de tocoferóis na alimentação diminui o risco do aparecimento de doenças no coração (FRANKEL, 1996; AHMED et al., 2005). O α-tocoferol exerce função importante como inibir a oxidação dos radicais livres, reagindo com o oxigênio e impossibilitando a transformação dos ácidos graxos

insaturados em aldeídos (FRANKEL, 1996, RODRIGO et al., 2002, AU YEUNG et al., 2005).

Os compostos da família da vitamina E oferecem benefícios à saúde humana, tendo como função essencial o transporte de elétrons para dentro das mitocôndrias no sistema fisiológico (ABIDI, 2000). Atuam como antioxidantes lipossolúveis, protegendo as membranas celulares de radicais e espécies mutagênicas. Os radicais livres são responsáveis por vários processos patológicos, como câncer, arteriosclerose e perda celular causando o envelhecimento. É importante o consumo de alimentos que contenham antioxidantes para a proteção contra processos degenerativos (FRANKEL, 1996; PELLEGRINI et al., 2001)

Em estudos recentes, a vitamina E tem sido considerada como “gene protetor” devido a sua atuação na proteína do RNA. Esta vitamina atua também como imunoprotetor, anticoagulante, redutora da oxidação LDL (low density lipoprotein) e antitrombose (FRANKEL, 1996; ABIDI, 2000).

Na natureza, os tocoferóis ocorrem em óleos de cereais e sementes, frutos, vegetais e grãos em geral. Nos alimentos são encontrados nas margarinas e derivados, molhos, sobremesas e acompanhamentos. Já nos tecidos animais, as principais reservas de vitamina E são nos adipócitos e na derme (MACHLIN, 1984). Na dieta de humanos e animais, todas as formas de vitamina E estão presentes, destacando-se o α -tocoferol, que é o principal isômero na dieta e o γ -tocoferol, que atualmente tem apresentado potente efeito antioxidante (ESKIN & SNAIT, 2006). A contribuição de tocoferóis por óleos e gorduras na dieta humana é altamente significativa, pois além de serem consumidos diretamente na alimentação, são utilizados como insumo para a produção de alimentos. Portanto, além de atuar como vitamina e antioxidante em seres vivos, os tocoferóis são importantes aditivos antioxidantes na indústria de alimentos, auxiliando a estabilidade durante o armazenamento e processamento destes (LAMPI et al., 2002).

Tocotrienóis contam com mais de 50% do total de vitamina E do endosperma de sementes de monocotiledôneas, enquanto tocoferóis ocorrem mais amplamente em folhas e sementes de dicotiledôneas (CAHOON et al., 2003).

3.4 POLIFENÓIS

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem em uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas), eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos, e suscetíveis à ação de enzimas (KING & YOUNG, 1999).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias

Os compostos fenólicos mais encontrados nas sementes oleoginosas são os ácidos fenólicos, coumarina, flavonóides, taninos e lignina (RIBEREAU-GAYON, 1972).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para a prevenção do câncer, doenças cardiovasculares (KERRY & ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON & HARRIS, 1999). Na figura 5 são apresentadas as estruturas de alguns ácidos fenólicos.

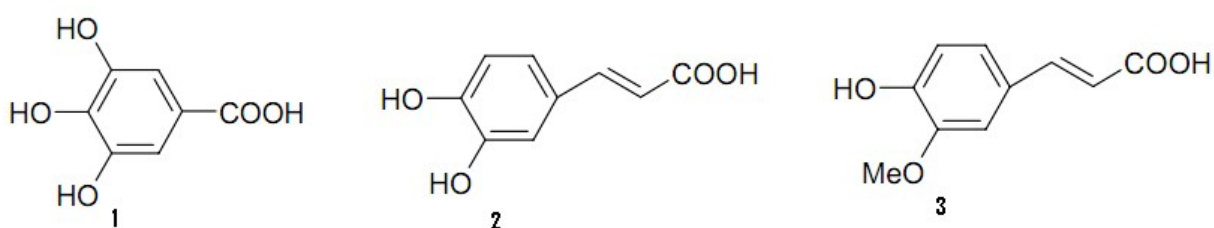


Figura 5: Estruturas de ácidos fenólicos: 1) gálico 2) caféico 3) ferrúlico

Medindo a eficiência de alguns ácidos fenólicos como antioxidantes em sistema lipídico, através do Rancimat, verificou-se que os ácidos protocatequínico, caféico, ferúlico, gálico e sinápico possuem uma boa atividade (DZIEDZIC & HUDSON, 1984), embora estes compostos, assim como os demais ácidos fenólicos, possuam baixa solubilidade neste sistema, limitando em parte, sua utilização e seu potencial antioxidante (PRATT, 1992). Contudo, estas substâncias podem ser modificadas para se tornarem lipossolúveis através de alquilação ou esterificação com ácidos graxos de cadeia longa ou álcoois. Ademais, em avaliação do potencial dos ácidos caféico, protocatequínico, *p*-hidroxibenzóico, ferúlico e *p*-cumárico em sistema lipídico, alguns deles, como o caféico e o protocatequínico, apresentaram atividade antioxidante maior que o α -tocoferol e o BHT (VON GADOW *et al.*, 1997; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante da fração polar contida em óleo de oliva refinado foi testada nele mesmo através do método de Shall (estufa a 60°C, na ausência de luz), determinando-se o índice de peróxidos como indicador do processo oxidativo (PAPADOPOULOS & BOSKOU, 1991). O extrato contendo a fração polar é constituído praticamente por compostos fenólicos, em particular por ácidos fenólicos. Os resultados mostraram uma certa ação por parte da fração polar do óleo de oliva, mas esta foi inferior a do BHT. Foi testada também a atividade antioxidante de cada ácido fenólico contido na fração polar, individualmente, utilizando a mesma metodologia. O ácido caféico mostrou uma atuação maior que a do BHT, enquanto os ácidos protocatequínico e siríngico, apesar de terem apresentado atividade, foram inferiores a do BHT. Por outro lado, os ácidos *o*-cumárico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzóico e vanílico demonstraram pouca ou nenhuma propriedade antioxidante (SOARES, 2002).

3.5 ÓLEO DE PALMA

O óleo de palma bruto é caracterizado por uma intensa cor alaranjada devido ao elevado teor de carotenos (0,03 a 0,15%). Sua porção glicerídica é formada basicamente por triacilgliceróis, dos quais 7,9% são trisaturados. Difere dos demais

óleos devido ao seu alto teor de ácido palmítico, carotenóides (500 a 700 mg/kg), tocoferóis (600 a 1000 mg/kg), esteróis, fosfatídeos, peróxidos e produtos de oxidação formam a porção não-glicerídica (O'BRIEN, 2004).

A polpa do fruto de palma é caracterizada por alto teor de lipídeos de acordo com a Tabela 2 abaixo:

Tabela 2: Composição centesimal do fruto de palma.

Componentes (% p/p)	Polpa	Semente
Umidade	4,0±0,3	4,4±0,7
Lipídeos	73,2±1,9	32,6±0,8
Proteínas	3,4±0,4	10,9±0,1
Cinzas	1,9±0,1	1,7±0,1
Fibras	4,3±0,6	15,6±1,9
Carboidratos exceto fibras (por diferença)	13,3	35,1

Fonte: Bora *et al.*,(2003)

Na Tabela 3 é representada a composição de ácidos graxos do óleo de palma.

Tabela 3: Composição em Ácidos Graxos do Óleo de Palma

Composição de Ácidos Graxos	(%)
Ácido Láurico (C 12:0)	< 0,4
Ácido Mirístico (C 14:0)	0,5 - 2
Ácido Palmítico (C 16:0)	35 - 47
Ácido Palmitoleico (C 16:1)	< 0,6
Ácido Esteárico (C 18:0)	3,5 - 6,5
Ácido Oléico (C 18:1)	36 - 47
Ácido Linoléico (C 18:2)	6,5 - 15
Ácido Linolênico (C 18:3)	< 0,5
Ácido Araquidônico (C 20:0)	< 1
Ácidos Trans	

Fonte: (AGROPALMA, 2009); AOCS

Na Tabela 4 são representados os compostos insaponificáveis do óleo de palma.

Tabela 4: Componentes insaponificáveis do óleo de palma.

Componentes	mg.kg⁻¹
Carotenóides	500-700
Tocoferóis e tocotrienóis	600-1000
Esteróis	326-527
Fosfolipídios	5-130
Alcool triterpeno	40-80
Metil esteróis	40-80
Esqualeno	200-500
Alcoois alifáticos	100-200
Hidrocarbonetos alifáticos	50

Fonte: CHOO, 1994; PEIXOTO, 2004.

A extração do óleo de palma é feita por prensagem. O refino físico é o método de purificação mais empregado na indústria de óleo de palma e compreende as etapas de degomagem, branqueamento e desodorização/desacidificação que utiliza altas temperaturas (240 a 260 °C) e pressões entre 1 e 3 mmHg (ROSSI et al., 2001). Sob estas condições de operação, os carotenóides são decompostos termicamente. (BASIRON, 1996).

O óleo de palma apresenta propriedades físicas necessárias para múltiplos usos em alimentos pela característica semi-sólida. A consistência deste óleo favorece seu emprego na formulação de produtos gordurosos sólidos. O óleo de palma, a oleína e a estearina são amplamente utilizados na fabricação de margarinas, e também na indústria de frituras em todo o mundo (RITTNER, 1996; WADA, 2007).

Na Tabela 5 são apresentadas as características físico-químicas do óleo de palma.

Tabela 5: Características Óleo de Palma.

Características	Limites
Acidez (% Palmítico)	Menor igual 0,05
Índice de Peróxidos (mEq/kg)	Menor igual 1,0
Cor Lovibond Red 5 ¼	Menor igual 4,0
Ponto de Fusão (°C)	34 - 38
Índice de Iodo (Wijjs)	51 - 55
Fósforo (ppm)	Menor igual 3,0
Rancimat 130 °C, 20 L/h	Maior ou igual 6
Sabor / Odor	Neutro

Fonte: AGROPALMA (2009); (AOCS)

Em virtude de sua composição peculiar, rica em ácido palmítico, destaca-se o comportamento do óleo nas transições e coexistência de fases sólidas e líquidas, que lhe confere uma consistência semi-sólida, permitindo flexibilidade para produzir uma grande variedade de produtos alimentícios (RITTNER, 1996; SAMBANTHAMURTHI et al., 2000; WADA, 2007).

O conteúdo de gordura sólida (SFC) expressa qual a quantidade de triacilgliceróis sólidos presentes em uma determinada temperatura; desde que a gordura é uma mistura de triacilgliceróis com diferentes pontos de fusão e com solubilidade mútua, a cada temperatura a presença de sólidos e líquidos poderá ser diferente. Valores típicos de SFC para o óleo de palma apresentam-se na Tabela 6.

Tabela 6: Gordura sólida (%) para o óleo de palma refinado.

Temperatura							Referências Bibliográficas
10°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	
50	21	12,5	8	5	2,5	0	Agropalma, 2009
48,9	22,9	14,2	7,5	4,3	-	-	D' Agostini, 2001
50,3	23,2	15,5	9,1	5,7	2	1,1	Rittner, 1996
47-56	20-27	-	6-11	-	1-6	-	O' Brien, 1998

Fonte: WADA, 2007.

3.6 COMPOSIÇÃO CELULAR VEGETAL

As paredes celulares não são uniformes. Sua composição, forma e tamanho dependem da função da célula dentro da planta. Elas são estruturas complexas constituídas de multicomponentes formando um emaranhado de polissacarídeos unidos por ligações intermoleculares. Apesar da estrutura química dos componentes já ser bem elucidada, a proporção relativa de cada um deles parece ser pouco conhecida. Pode-se dizer que a parede celular contém quatro principais componentes: celulose, polissacarídeos não celulósicos, proteínas e polifenóis (CONN e STUMPF, 1975; TURATTI, 1999). A chave da atividade enzimática necessária para abrir as paredes de forma a liberar o óleo para uma fase oleosa, baseia-se na degradação de vários polissacarídeos complexos encontrados nas paredes celulares de materiais de plantas (TURATTI, 1999).

CARPITA e GIBEAULT (1993) descreveram um modelo primário de parede celular, composto de celulose e hemicelulose generalizado para plantas que florescem (angiospermas). As fibras estão imersas numa matriz de polissacarídeos pécticos, ácido poligalacturônico e alguns desses grupos são ligados ainda a proteínas estruturais (TURATTI, 1999).

Geralmente, a estrutura da parede celular é subdividida em parede primária, parede secundária e parede terciária. As distribuições da celulose, da hemicelulose e da lignina variam consideravelmente entre as camadas. A Figura 6 ilustra a estrutura de uma parede celular vegetal.

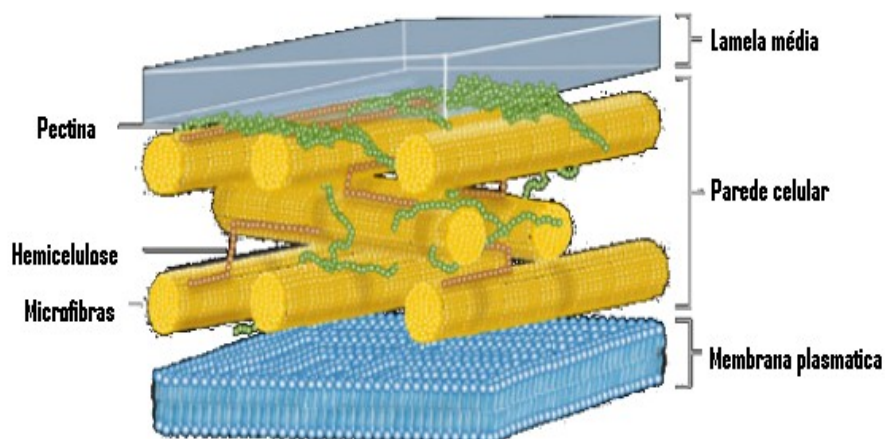


Figura 6: Modelo da estrutura da parede celular vegetal de frutos (SIGMA-ALDRICH, 2010).

Lipídeos associados às proteínas formam um complexo macromolecular na parte interna de células vegetais e animais. Estão presentes nos tecidos de armazenamento de sementes e frutas. Um exemplo é a oleosina que é ligada aos lipídeos acumulados nos tecidos de plantas, tanto no citosol como nos plastídeos (MURPHY, 2005).

Essas estruturas estão ligadas tanto às membranas quanto aos lipídeos armazenados nas células vegetais. Por exemplo, a família caleosina inclui algumas isoformas que são os maiores componentes dos óleos armazenados em sementes enquanto outra isoforma similar está ligada à membrana em que é responsável pela resistência mecânica ao estresse, à secagem e à salinidade (MURPHY, 2005).

Oleosinas são uma classe de proteínas alcalinas de baixo peso molecular que se acumula na superfície dos lipídeos de sementes tolerantes à dessecação (MURPHY, 2005).

3.7 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS

Os processos industriais normais utilizados na produção de óleo consistem de prensagem contínua ou hidráulica e/ou extração por solventes. Esses processos têm certos inconvenientes: equipamentos muito caros para instalar e manter, alto nível de perigo devido às grandes quantidades de solvente empregadas e indesejáveis efeitos colaterais na qualidade dos produtos acabados, principalmente devido às altas temperaturas alcançadas em algumas etapas (TURATTI, 1999).

A extração enzimática de óleos vegetais, principalmente para aumentar o rendimento de obtenção de óleo, fornece resultados promissores quando aplicada simultaneamente com processos puramente mecânicos. Entretanto, a aplicação desta tecnologia em escala comercial está restrita à obtenção apenas do óleo de oliva.

Trabalhos de utilização de enzimas na extração de óleos vegetais têm sido publicados (PASSOS et al., 2009, NAJAFIAN et al., 2009, NASCIMENTO et al., 2008; DE FAVERI., 2008, SOTO et al., 2006; SANTOS e FERRARI, 2005; GOMES et al., 2002; ROSENTHAL et al., 2001; SHANKAR et al., 1997). A partir das observações feitas sobre a acumulação do óleo nos espaços intracelulares em células vegetais, os pesquisadores têm estudado substâncias capazes de afetar a estrutura das células com objetivo de melhorar a extração de óleo, mas a aplicação de um tratamento enzimático requer uma estratégia específica para cada caso.

Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulasas e hemicelulasas começaram a ser utilizadas para extração de óleo de oliva, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração (BHAT, 2000; KAYSHAP, 2001; UENOJO, 2003). A aplicação desta tecnologia em escala comercial está restrita à obtenção apenas do óleo de oliva devido ao alto valor agregado gerado pela qualidade do produto que é relacionada à alta concentração de compostos bioativos como polifenóis presente no óleo extraído por processo enzimático.

Vários autores reportaram que a adição de preparações enzimáticas comerciais durante a maceração pode reduzir a complexação de fenóis hidrofílicos

com polissacarídeos, aumentando a concentração de fenóis livres na massa de oliva e sua consequente dissolução no óleo e efluente líquido durante o processamento (RANALLI & MATTIA, 1997 ; VIERHUIS et al., 2001; DE FAVERI et al., 2008a; DE FAVERI et al., 2008b).

O uso de enzimas de maceração aumenta a extração de agentes antioxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extra virgem, reduz a indução ao ranço, aumenta a extração, melhora o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade (BHAT, 2000; UENOJO, 2003).

Os processos enzimáticos utilizam temperaturas baixas evitando a degradação de compostos termosensíveis como pigmentos e antioxidantes.

As enzimas mais utilizadas para extração de óleos vegetais são: celulases, pectinases, hemicelulases e proteases.

A Celulase (EC 3.2.1.4) ou β -1,4-D-glucanohidrolase, cataliza a endohidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas na celulose e cereais β -D-glucanos. Nas Figuras 7, 8 e 9 são apresentadas as atividades estruturais de celulase.

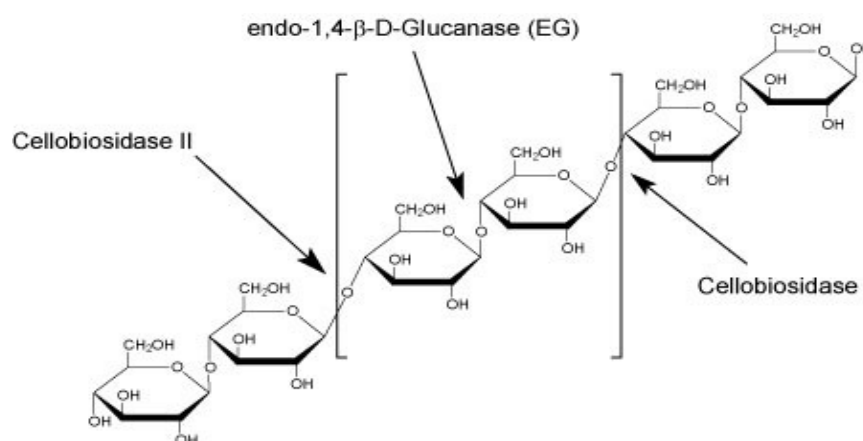


Figura 7: Representação estrutural da atividade de celulase (SIGMA-ALDRICH, 2010)

As endo-1,4- β -D-glucanases (EGs) clivam a celulose em suas regiões internas não terminais aumentando o rendimento de oligosacarídeos.

As duas formas de celobiohidrolase (CBH) são consideradas exo-1,4- β -D-glucanases, liberando dissacarídeos de celbiose da extremidade redutora da cadeia da celulose (CBHI) e da extremidade não redutora (CBHII). A β -glucosidase é uma exo-hidrolase que aumenta a liberação de glicose de oligossacarídeos solúveis como a celbiose.

Outras atividades são encontradas em preparações comerciais de celulase como xilanase, hemicelulase e laminarinase (SIGMA-ALDRICH, 2010).

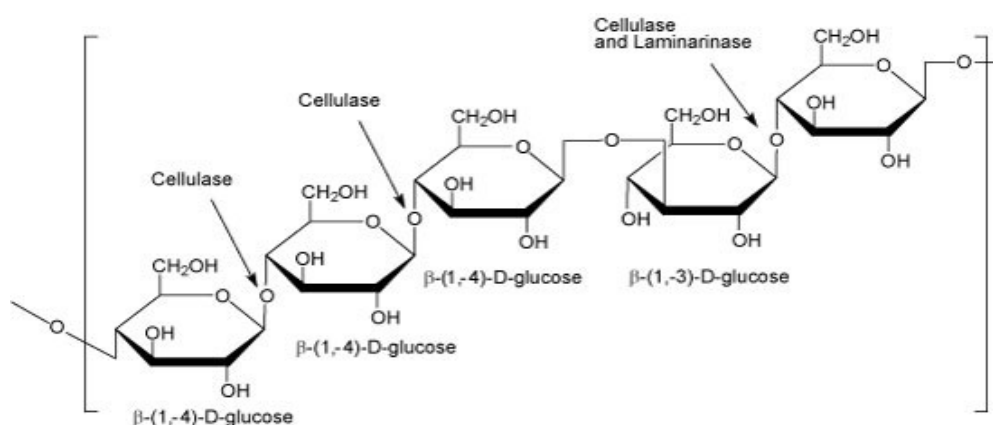


Figura 8: Formação de celotriose e celotetraose separadas por unidades de β -(1,3)-D-glicopiranosose (SIGMA-ALDRICH, 2010).

A Pectinase (EC 3.2.1.15) ou poligalacturonase cataliza hidrólise aleatória das ligações α -1,4-D-galacturônicas na pectina e outros galacturônicos (SIGMA-ALDRICH, 2010).

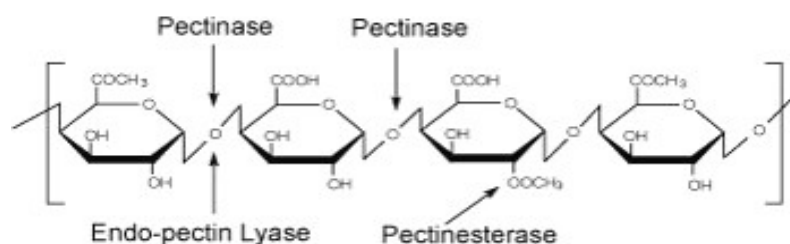


Figura 9: Representação estrutural da hidrólise da pectina (SIGMA-ALDRICH, 2010).

As substâncias pécnicas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos, leveduras e bactérias (SAKAI et al., 1993; GAINVORS et al., 1994), muito

utilizadas nas indústrias de sucos de frutas, vegetais e vinhos, para melhorar a extração de óleos e no tratamento e degomagem de fibras da indústria têxtil (TARAGANO e PILOSOFF, 1999; BLANDINO et al., 2001; LIMA et al., 2002). A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, é usada na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais para aumentar o rendimento e melhorar o processamento sem o aumento de custos. São empregadas em duas etapas: (1) após corte, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta para aumentar o rendimento, diminuir o tempo de processamento e melhorar a extração dos componentes da fruta e (2) após a extração, pectinases são aplicadas para clarificação, diminuir a viscosidade para posterior concentração e filtração e estabilidade do produto final (BHAT, 2000; BRAVO et al., 2000).

A degradação da parede celular por enzimas pectinolíticas permite seu uso para extração de óleo vegetal em processo aquoso, pela liquefação dos componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contêm óleo (KAYSHAP, 2001).

As proteases são enzimas cuja função catalítica é hidrolisar ligações peptídicas de proteínas. São também chamadas de enzimas proteolíticas. As proteases diferem na sua capacidade de hidrolisar várias ligações peptídicas em que cada tipo de protease quebra uma ligação peptídica específica. Como exemplos de proteases têm-se as aminopeptidases, dipeptidases, carboxipeptidases, serina, cisteína e metalo proteases.

SANTOS e FERRARI (2005) estudaram diferentes enzimas na extração de óleo de soja e obtiveram rendimento maior quando utilizaram proteases.

A hidrólise de proteínas pode ser realizada com enzimas, ácidos ou álcalis, mas a hidrólise enzimática é mais indicada que métodos químicos rigorosos para a produção de hidrolisados com aplicações nutricionais. Adicionar enzimas em vez de reagentes químicos oferece muitas vantagens porque permite o controle da hidrólise, melhorando as propriedades do produto final. Além disso, o processo de hidrólise enzimática é mais simples, eficiente e envolve condições alcalinas moderadas que não destroem as proteínas recuperadas por racemização e outras reações químicas (FONKWE e SINGH, 2005).

Neste trabalho propõe-se além da aplicação de enzimas já conhecidas como enzimas de maceração que trazem benefício ao processo e ao produto final, a aplicação de uma enzima que até o momento não foi empregada na extração de óleos vegetais.

A Tanase (EC 3.1.1.20) ou tanino-acil-hidrolase (TAH) catalisa a hidrólise de ligações ésteres de ácido gálico nas moléculas de taninos hidrolisáveis (KUMAR, 2007; TREVIÑO-CUETO, 2007). Esta enzima é produzida por alguns fungos filamentosos, principalmente das espécies: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, mas também pode ser produzida por bactérias do gênero *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Streptococcus* e *Selenomonas*. A tanase também é produzida por vegetais para acelerar o processo de amadurecimento de frutas (DESCHAMPS, 1983; AGUILAR e GUITIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001b; BELMARES, 2004; AISSAM, 2005; BATRA, 2005; VAN DE LAGEMAAT, 2005; PUROHIT, 2006; RODRIGUES, 2007; HAMDY, 2008; RODRÍGUEZ, 2008; MADEIRA JUNIOR, 2010). A Figura 10 ilustra a hidrólise de uma molécula de ácido tânico realizada por tanase.

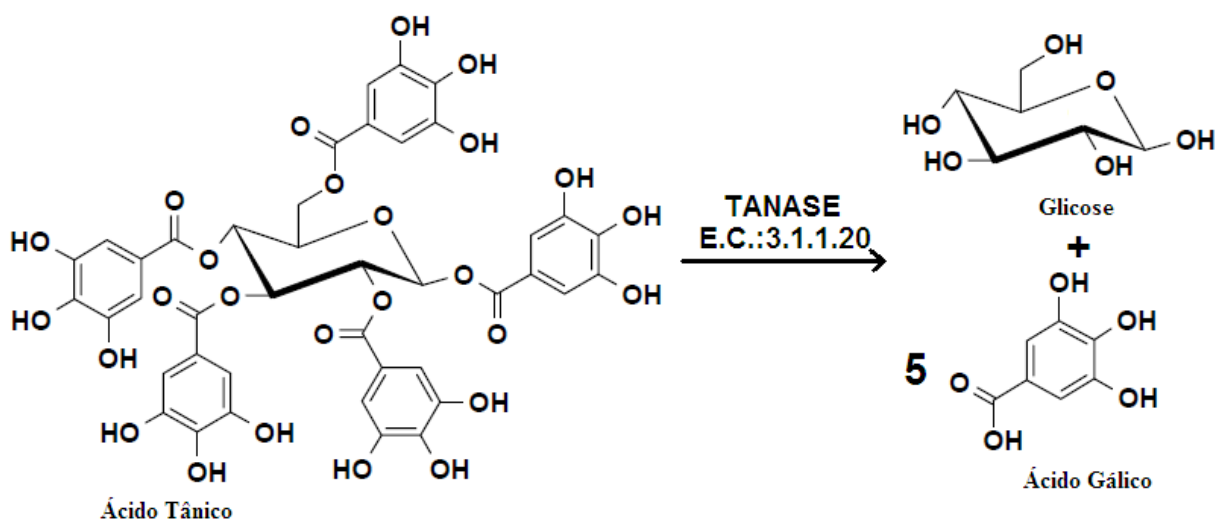


Figura 10: Hidrólise do ácido tânico pela Tanase (BATTESTIN, 2004).

As Tanases são capazes de hidrolisar as ligações éster e depsídica de substratos como ácido tânico, epicatequina galato, epigalocatequina galato, ácido clorogênico, etc (GARCIA-CONESA et al., 2001; BATTESTIN et al., 2008) .

BATTESTIN et al., 2008 estudaram o potencial das propriedades antioxidantes de epigalocatequina galato (EPGC) antes e depois da reação enzimática utilizando a tanase produzida por *Paecilomyces variotii* (BATTESTIN, PASTORE & MACEDO, 2005). A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas (CG/MS). Foi verificado que após a reação enzimática, as concentrações de epigalocatequina galato reduziram enquanto as de ácido gálico aumentaram. Além disso, a atividade antioxidante por DPPH foi medida antes e depois da reação, obtendo um aumento de atividade após a reação enzimática. A Figura 11 apresenta a reação de hidrólise da epigalocatequina galato pela Tanase.

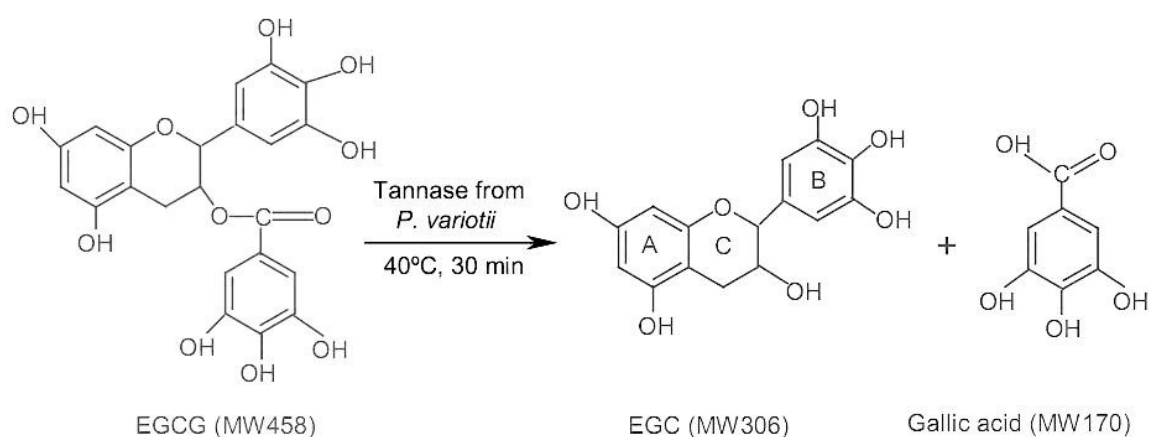


Figura 11: Hidrólise da Epigalocatequina Galato por Tanase de *Paecilomyces variotii* (BATTESTIN, 2007b).

Um dos tópicos mais estudados sobre TAH refere-se às propriedades químicas desta enzima mas o mecanismo de ação e regulação ainda não é totalmente compreendido. A tanase é um glicoproteína formada por um mistura de esterase e depsidade. O conteúdo de carboidratos pode variar de 25,4 a 66,2% do peso total da enzima O papel exato desses elevados conteúdos de carboidratos não é conhecido, suspeita-se que seja a maneira de proteger o núcleo protéico da ação desnaturante dos taninos hidrolisáveis e de direcionar o substrato ao centro ativo da enzima para possibilitar a quebra desse em seus respectivos componentes, glicose e ácido gálico (AGUILAR e GUITIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001). A enzima TAH fúngica tem pH de

estabilidade na faixa de 3,5 e 8,0; pH ótimo de 5,5 e 6,0; temperatura de estabilidade na faixa de 30 e 60°C; temperatura ótima entre 30 e 40°C; ponto isoelétrico de 4,0 e 4,5 e massa molecular entre 186 e 300 kDa. Essas propriedades variam de acordo com o tipo de microrganismo e condições de cultivo da linhagem usada. A TAH é inibida por Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Mg^{+2} , sendo inativada por EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfato de magnésio e de cálcio e o-fenantrolina (AGUILAR, 2001a; AGUILAR, 2007; BATTESTIN, 2007a; BELMARES, 2004; MAHOPATRA, 2005; SHARMA, 2007; SHARMA, 2008; MADEIRA JUNIOR, 2010).

Na extração de óleos vegetais não há relatos na literatura da utilização de tanase e o objetivo principal de testar esta enzima é verificar a possível incorporação de polifenóis ao óleo, o que poderia trazer benefícios ao produto tanto funcionais quanto tecnológicos, como estabilidade oxidativa, aumentando o valor agregado do produto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência de Alimentos (DCA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) situada em Campinas-SP; no Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI) e no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará (FEA/UFPa) localizada na cidade de Belém-PA. A matéria-prima (frutos de dendê) foi doada pela empresa AGROPALMA situada no município de Tailândia-PA.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Processo de Extração Aquosa do Óleo de Palma

O trabalho foi realizado de acordo com processo de extração apresentado no fluxograma da Figura 12:



Figura 12: Fluxograma dos experimentos dos processos de extração de óleo de palma

Todos os experimentos realizados no presente trabalho utilizaram o mesmo lote de frutos doado pela empresa AGROPALMA. Esses frutos foram esterilizados, debulhados e congelados no Laboratório de Medidas Físicas da FEA/UFPA em Belém-PA e transportados para cidade de Campinas-SP para a realização dos experimentos no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA/UNICAMP. A partir dessa etapa, dois processos foram feitos e comparados entre si com relação ao rendimento de extração de óleo, de polifenóis e quanto à qualidade final do óleo bruto obtido: a) Extração por solvente orgânico (BLIGH & DYER, 1959) utilizada

como referência para teor total de óleo; b) Tratamento térmico; c) Tratamento enzimático.

4.2.1.1 Esterilização

Após a recepção dos cachos, os mesmos foram acondicionados em embalagens flexíveis e autoclaváveis para posteriormente serem submetidos à etapa de esterilização, em temperatura de 125°C por 5 minutos em autoclave. Os objetivos dessa etapa foram: facilitar a debulha manual dos frutos; eliminar as enzimas lipases, peroxidases, polifenoloxidasas e lipoxigenases responsáveis pela hidrólise dos triacilgliceróis, oxidação de polifenóis e carotenos dos frutos frescos. Além disso, o calor aplicado auxilia no rompimento da parede celular vegetal da polpa que facilita a extração do óleo.

4.2.1.2 Trituração

Os frutos foram descongelados em temperatura ambiente, retiradas as sementes manualmente e reduzido o tamanho das partículas em processador de alimentos WALLITA Master R17633 (Brasil) até a formação de massa uniforme, com o objetivo de aumento na relação área superficial por volume de polpa de dendê. Após isso, a massa foi acondicionada em embalagens flexíveis em temperatura de refrigeração (5°C) até o momento dos experimentos.

4.2.2 Processo Térmico

4.2.2.1 Delineamento Composto Central Rotacional para Processo Térmico

A Digestão ou Tratamento Térmico, no presente trabalho, foi avaliada por Delineamento Experimental Composto Central Rotacional (DCCR) utilizando um Planejamento experimental fatorial completo 2² com 3 repetições no ponto central.

As variáveis independentes foram tempo de centrifugação (Tempo) e relação de água/massa de fruto (Diluição) mantendo-se fixa a temperatura a 95°C durante 1 hora de operação. A variável resposta foi rendimento de extração de óleo em porcentagem calculado de acordo com a Equação 1:

$$Rendimento_{\text{oleo}} = \frac{\text{massa óleo (g)} / \text{massa polpa (g)}}{\text{Teor total de óleo (g/g)}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, o teor total de óleo (%) é a relação entre massa de óleo (g) extraído pelo método Bligh&Dyer e massa de polpa de dendê (g).

Os níveis das variáveis são apresentados na Tabela 7:

Tabela 7: Níveis das variáveis do DCCR para tratamento térmico.

Níveis/variáveis	X1 (Tempo)	X2 (v/m)
-1,41	8	2,6
-1	10	3
0	15	4
1	20	5
1,41	22	5,4

• X1 – Tempo de centrifugação (minutos); X2 – Relação Volume solução (mL)/(g) massa de fruto (Diluição)

O processo térmico foi realizado utilizando erlenmeyer de 125 mL como reator em banho termostático com agitação magnética. A solução aquosa de água destilada, com volume determinado para cada ensaio experimental, foi colocada em banho durante 5 minutos até o equilíbrio de temperatura, depois 10g de polpa de dendê triturada foram incubadas no erlenmeyer e agitado por 1 hora a 95±5 °C. Após o final do processo, a solução foi distribuída em tubos e submetidos à centrifugação (Centrífuga Fanem Excelsior Modelo 206BL – Brasil) a 2012 x g. A massa de óleo foi determinada gravimetricamente e armazenada a -18 °C.

4.2.3 Produção do Extrato Enzimático Bruto de Tanase por *Paecilomyces variotii*

O extrato enzimático de Tanase foi produzido de acordo com a metodologia de SCHONS (2009), conforme (BATTETSTIN e MACEDO, 2007a), através de fermentação em meio sólido, utilizando o fungo *Paecilomyces variotii*, previamente selecionado por MACEDO et al., (2005). A linhagem pertence ao Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de engenharia de Alimentos da UNICAMP. O processo de produção foi executado de acordo com o fluxograma na Figura 13:



Figura 13: Fluxograma da produção de extrato de Tanase por *Paecilomyces variotii*.

4.2.3.1 Microrganismo

O microrganismo *Paecilomyces variotii* foi selecionado dentre 400 linhagens fúngicas pertencentes ao laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Este fungo apresentou melhor capacidade de síntese de tanase conforme descrito por MACEDO et al., (2005). O microrganismo foi mantido em meio Potato Dextrose Agar (PDA – OXOID - CM0139) em tubos de ensaio com suplemento de 0,2% de ácido tânico (Tanal B – Prozyn - BioSolutions) e incubados em estufa a 30°C (Estufa de Cultura Modelo 002 CB - FANEM-LTDA) durante 72 horas.

4.2.3.2 Pré-inóculo

Inicialmente o meio de cultura ágar batata (PDA) em pó foi diluído e aquecido sob agitação até formação de gel. Foram adicionados 10mL de PDA em tubos de ensaio e colocados em inclinação de aproximadamente 30° durante 5 horas. Após isso, o microrganismo mantido em placa de petri sob refrigeração (5°C) foi inoculado com alça de níquel nos tubos de ensaios, na superfície do PDA, depois incubados em estufa a 30 °C por 72 horas.

4.2.3.3 Processo Fermentativo em Estado Sólido

Em Erlenmeyer de 500mL foi adicionado 20g de farelo de trigo, 20mL de água destilada, 10% de ácido tânico (Tanal B - Prozyn) e 1,2% de nitrato de amônio. O meio de cultivo foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente, foi inoculado suspensão de esporos (pré-inóculo) de $1,6 \times 10^7$ esporos/mL (os esporos foram removidos adicionando-se 2,5 mL de água e raspados com auxílio de uma alça de inoculação). A contagem dos esporos foi feita em Câmara de Neubauer. Os Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30°C por 120 horas.

4.2.3.4 Extração

A extração das enzimas foi feita após fermentação adicionando 160mL de tampão acetato 0,02 M - pH 5,0 em cada frasco Erlenmeyer. Em seguida agitou-se a 200rpm em agitador orbital (EDISON) durante 1 hora. O extrato foi filtrado em gase e centrifugado a 9630x g por 30 minutos a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se sulfato de amônio á concentração final de 80% de saturação (561g/L). O extrato foi mantido sob refrigeração por 12 horas, cetrifugado novamente a 9630g por 30 minutos a 4°C.

4.2.3.5 Liofilização

Após congelamento, o extrato foi submetido à liofilização durante 48 horas em liofilizador (LioTop Liobrás L101 Ltda). O produto final com características de pó foi armazenado em congelador a -18°C.

4.2.4 Atividade Enzimática

O extrato enzimático bruto de *Paecilomyces variotii*, Pectinase e Celulase comerciais foram caracterizados com relação à atividade de Tanase, Poligalacturonase (PG) e Carboximetilcelulase (CMCase). As análises feitas utilizaram técnicas colorimétricas com espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 640, EUA) calibrado com solução feita pelos reagentes usados na determinação menos a solução enzimática (controle) que foi substituída por água destilada na mesma proporção. No tubo controle foi feita a reação com extrato enzimático submetido a tratamento térmico (10 minutos em ebulição). A absorbância final foi obtida pela Equação 4:

$$\Delta \text{Abs} = \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{controle}}$$

$$U / \text{mL} = \frac{\Delta \text{Abs} \cdot d}{c \cdot v \cdot \text{mol} \cdot t} \cdot 10^6 \quad U / \text{mL} = \mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mL} \quad (2)$$

Onde:

c = Coeficiente angular da curva de calibração do substrato (Abs.mL/mg)

v = Volume de extrato enzimático adicionado à reação (mL)

d = Diluição do extrato enzimático

t = Tempo de reação de hidrólise (minutos)

mol = massa molar do substrato (g/mol)

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade em μmol do substrato (específico para cada enzima) hidrolisado durante 1 minuto de reação ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

4.2.4.1 Poligalacturonase (PG)

Incubou-se 0,5ml de extrato enzimático e 0,5ml de solução de pectina cítrica 0,1% em solução tampão citrato fosfato 0,1M; pH 5,5 a 40°C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela inativação enzimática por banho em ebulição por 10 minutos (Rizzato, 1999). A quantificação foi feita utilizando curva de calibração com glicose (SYNTH) através do método de SOMOGYI-NELSON (1945) determinando a concentração de açúcares redutores.

4.2.4.2 Carboximetilcelulase

Os procedimentos empregados na determinação de atividade de Carboximetilcelulase (CMCase) foram efetuados de acordo com a metodologia descrita por MACEDO *et al.*, (2005a). Pipetou-se 4mL da solução de substrato (0,5% de carboximetilcelulose em tampão citrato-fosfato 0,05M – pH 5,0) em tubos de ensaio. Estes foram incubados em banho-maria a 40°C por 10 minutos para homogeneizar a temperatura; adicionou-se 1mL de solução enzimática, seguiu-se a incubação por mais 20 minutos. Para paralisar a reação, os tubos foram imersos em banho de gelo. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método de Somogyi-Nelson (1945). A atividade foi calculada empregando-se curva padrão de glicose (SYNTH).

4.2.4.3 Tanase

A medida da atividade de enzima foi feita de acordo com Mondal *et al.*, (2001) com modificações (SCHONS, 2009). Adicionou-se 150 µL de substrato (solução de ácido tânico 0,2% p/v em tampão acetato pH 5,5 ; 0,2M); foi adicionado também 250µL de solução enzimática e a solução foi incubada a 60°C por 30 minutos. Foi paralisada a reação pela adição de 1,5 mL de solução de albumina de soro bovino (Biográs) na concentração de 1 mg/mL (solução preparada em tampão acetato 0,2M – pH 5,0 contendo 0,17 M de NaCl), em seguida foi centrifugada a 7100 x g por 15 minutos a 4°C em Centrífuga Beckman Coulter. O precipitado contendo ácido tânico

que a enzima não hidrolisou foi ressuspenso em 1,5 mL de solução dodecil sulfato de sódio (SDS)-trietanolamina (SDS 1% p/v adicionado de 5% v/v de trietanolamina) acrescida de 0,5 mL de solução de FeCl_3 (0,01 M de FeCl_3 em 0,01 M de HCl). Após 15 minutos de repouso procedeu-se à medida de absorbância a 530 nm em espectrofotômetro . A atividade enzimática foi calculada através de uma curva de calibração de ácido tânico (MERCK). O FeCl_3 reage com os compostos fenólicos do tanino por atração nucleofílica e forma uma coloração marrom, dependendo da intensidade da coloração formada é necessário fazer diluição em água.

4.2.5 Tratamento Enzimático

As enzimas mais recomendadas para extração do óleo de palma são pectinases e celulases. No presente estudo, além dessas enzimas recomendadas, optou-se também pela aplicação de tanase. O objetivo da aplicação está na possível hidrólise de polifenóis do fruto de dendê que possam ser extraídos no óleo. Para avaliação do processo de extração enzimática foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR) combinado com a metodologia de superfície de resposta (MSR).

As variáveis independentes do processo foram concentração em porcentagem de enzima em relação à massa de fruto (Enzima), diluição da solução aquosa em relação à massa de amostra do fruto (Diluição) e pH da solução (pH). A temperatura do meio foi fixada de acordo com condições ótimas de atividade média das enzimas ($T=50^\circ\text{C}$). O pH foi modificado utilizando tampão citrato-fosfato 0,1 M. Na Tabela 8 são apresentados os valores dos níveis das variáveis para o DCCR do tratamento enzimático:

Tabela 8: Níveis das variáveis do DCCR para tratamento enzimático.

Níveis/variáveis	X1 (%)	X2 (v/m)	X3 (pH)
-1,68	1,3	2,3	4
-1	2	3	4,7
0	3	4	5,5
1	4	5	6,3
1,68	4,7	5,7	7

- X1 – Concentração de enzima; X2 – Relação solução tampão (mL)/(g) polpa de dendê

Os experimentos foram executados utilizando mesmo sistema que o pré-tratamento térmico: erlenmeyer de 125 mL em banho com agitação magnética e controle de temperatura (50°C). A solução do extrato enzimático foi preparada de acordo com cada ensaio do planejamento experimental, variando a concentração total de enzima em relação ao substrato (polpa de dendê). A concentração foi determinada por atividade de enzima em relação ao peso de substrato em que 1% de concentração de enzima apresenta 58,9U de Poligaractunose(PG), 67,2U de Carboximetilcelulase (CMCase) e 3,18U de Tanase para 10g de polpa de dendê (mesocarpo) previamente triturado e mantido em refrigeração (5°C). A solução enzimática foi preparada adicionando as enzimas à solução tamponante de citrato-fosfato 0,1M com pH específico para cada ensaio experimental. A solução foi homogeneizada em erlenmeyer de 125 mL, no banho a 50°C sob agitação magnética por 5 minutos. Após isso, foi adicionado 10 g de polpa de dendê, homogeneizado na solução e a incubação com duração de 1 hora sob agitação, na temperatura de 50±2 °C. Após isso, a solução enzimática era inativada aquecendo a 90°C por 5 minutos, centrifugando (centrífuga Fanem Excelsior®) durante 15 minutos. O óleo foi determinado gravimetricamente e as amostras foram armazenadas a -18°C.

Foi utilizada celulase de origem comercial do fabricante NOVOZYMES. Celluclast® 1,5L é um preparado líquido de celulase produzido por fermentação submersa de cepas selecionadas do fungo *Trichoderma reeseri*. (NOVOZYMES, 2001; SANTOS E FERRARI, 2005).

Pectinase FE Multiefect (Genencor International, INC- Dinamarca) contém atividades de pectinase, celulase e hemicelulase.

4.2.6 Extração com solvente

A extração com solvente foi utilizada como controle do teor total de lipídeos no fruto. Foi utilizada a metodologia de BLIGH & DYER (1959) utilizando solvente clorofórmio/metanol na proporção de 10/2 em relação à massa de polpa seca adicionada em temperatura ambiente, sob agitação por 30 minutos, evaporação do solvente seguido de determinação gravimétrica do óleo.

4.2.7 Caracterização

4.2.7.1 Umidade do óleo (Karl Fischer)

Metodologia que se baseia na oxidação de SO₂ pelo I₂, que constituem o reagente de Karl Fischer, na presença de água, conforme ilustrado na equação química a seguir:



Esta metodologia foi realizada por titulação volumétrica através do aparelho de Karl Fischer KF-1000 (Analyser). Este aparelho fornece diretamente a porcentagem de água da amostra, sendo necessário fornecer a massa de amostra adicionada no frasco de titulação.

4.2.7.2 Umidade da Polpa de Dendê

Metodologia oficial AOAC 931.04 (AOAC, 1997) por determinação em estufa a 100°C até peso constante.

4.2.7.3 Ácidos Graxos Livres Ca 5a-40

Porcentagem em peso de um ácido graxo específico (ácido palmítico), determinada por titulação ácido-base de KOH para neutralizar os ácidos livres presentes em 1g de óleo ou gordura (AOCS, 2002).

4.2.7.4 Perfil de ácidos graxos (Cromatografia Gasosa)

A obtenção de metil-esteres foi realizada via saponificação e esterificação segundo metodologia descrita por RODRIGUES et al., (2010).

A separação dos esteres metílicos foi realizada em um cromatógrafo a gás VARIAN Modelo CP-3380, equipado com detector de ionização de chama (FID); injetor split e coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 (60 m x 0,25 mm, VARIAN, EUA). Os parâmetros de análise foram: Temperatura injetor (245°C), Temperatura detector (280°C), Temperatura de coluna (175°C) por 26 minutos, aumentando na taxa de 30°C/minuto até 205°C, permanecendo nessa temperatura por 20 minutos. Foi utilizado Hélio como gás de arraste a 1mL/minuto. Injeção no modo split, na razão de 1:50, realizadas em duplicata. Volume de amostra injetado (1 µL). A identificação dos ácidos graxos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção de esteres metílicos de ácidos graxos de uma amostra padrão (NU-CHECK, EUA). A quantificação foi calculada através do Software STAR W.S ver 6.0 (VARIAN, EUA).

4.2.7.5 Estabilidade Oxidativa

Este método considerado como Índice de Estabilidade Oxidativa (OSI), consiste em submeter uma amostra de óleo às condições aceleradas de oxidação determinando o tempo (em horas) para que uma amostra de óleo ou gordura atinja um nível de oxidação (rancificação) sob as condições do teste, tal que os produtos de oxidação formados alterem a condutividade elétrica. A análise foi executada nas seguintes condições: 3 g de amostra, T = 130 °C e vazão de ar (20 L/h) utilizando aparelho RANCIMAT e método Cd 12b-92 (AOCS, 2002).

4.2.7.6 Cor (Cc13e-92)

Método que utiliza o equipamento LOVIBOND PFX880 tintometer mensurando as variáveis de cor primárias R (Vermelho), Y (Amarelo) e B (Azul) com o resultado expresso em unidades de Vermelho e Amarelo. (AOCS 2002).

4.2.8 Compostos Antioxidantes

4.2.8.1 Carotenóides Totais

Análise de acordo com GUEDES (2006) utilizando método espectrofotométrico, solubilizando 50mg de óleo em 10 mL de hexano P.A, com leitura da absorbância em comprimento de onda de 453 nm. Os resultados foram expressos como micrograma equivalente de β -caroteno por grama de óleo ($\mu\text{g/g}$) utilizando curva de calibração com β -caroteno.

4.2.8.2 Tocoferóis

Metodologia de acordo com LINS (2006): Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando aparelho Thermo Scientific Finningan Surveyour (EUA), nas seguintes condições: detector de fluorescência com excitação a 290 nm e emissão a 230 nm e detector UV em 284 nm, fluxo 1mL/min, fase metanol:água (95/5 v/v), coluna Gemini C18 fase reversa (250 x 4,60 nm 5 μm) utilizando padrões para construção da curva de calibração. O preparo da amostra foi realizado de acordo com SAN ANDRÉS et al., (2010).

4.2.8.3 Extração de Fenóis

Foi utilizada extração por solvente para determinar a concentração de fenóis totais nos óleos, nos resíduos e na polpa (mesocarpo) de dendê.

As amostras de óleo foram diluídas em metanol 80% na diluição de 1/10 (g/mL) em erlenmeyer de 125 mL e colocado sob agitação a temperatura de 50°C durante 60 minutos. Para amostras de polpa foi seguido o mesmo procedimento. Para água residual do processo aquoso de extração, foi utilizado 1mL de amostra, filtrado em papel filtro e diluído em metanol 1:2. Todas as amostras foram centrifugadas a 2012 x g (Centrífuga Fanem Excelsa-Modelo 206BL) por 5 minutos e recolhido o sobrenadante. A fração metanólica recolhida foi lavada com 10 mL de hexano para remoção de interferentes lipídicos.

4.2.8.4 Fenóis Totais

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por SINGLETON & ROSSI, 1965. O método colorimétrico baseia-se na capacidade de redução do ácido fosfomolibdico e fosfotúngstico pelas hidroxilas dos fenóis produzindo uma coloração azul.

300 µL de extrato metanólico foram adicionados ao tubo teste junto com 8,2 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu. Depois de 5 minutos, foi adicionado 1 mL de Na₂CO₃ a 10 % (mg/mL), o tubo agitado e deixado em repouso por 60 minutos em ausência de luz. A curva de calibração foi feita utilizando ácido gálico como padrão (Sigma-aldrich) dissolvido em metanol e o branco feito com todos os reagentes substituindo a amostra por água destilada. Os resultados foram expressos como µg de equivalente ácido gálico/ g de amostra (µgEAG/g).

4.2.9 Capacidade Antioxidativa

4.2.9.1 Método DPPH

A análise espectrofotométrica com DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi utilizada de acordo com TUBEROSO et al., (2007). Esse método se baseia na capacidade do antioxidante em reduzir o radical cátion DPPH. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) utilizando uma curva padrão de Trolox. A atividade antioxidante *in vitro* dos óleos (Fração Total) e das Frações Hidrofílica e Lipofílica foram determinadas. A separação das duas frações foi realizada da seguinte maneira: 1g de óleo dissolvido em 2mL de metanol (80%), agitado durante 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugado a 700xg por 10 minutos; separada a fase metanólica (fração Hidrofílica) e adicionado acetato de etila no restante (fração Lipofílica). A Fração Total é a diluição do óleo em acetato de etila sem o fracionamento. Duas curvas de calibração foram determinadas utilizando Trolox em solvente metanol e outra em acetato de etila. Foi aplicado 500 µL de amostra com 1,5 mL de solução de DPPH 0,2mM e monitorado o decaimento da absorbância durante 1 hora de incubação, em ausência de luz e temperatura ambiente, no espectrofotômetro HITACHI, a 517nm, utilizando cubeta de quartzo. Os resultados expressos em µmol Trolox / g óleo.

4.2.10 Análise estatística

Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizando Planejamento fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central para o tratamento enzimático e planejamento fatorial completo 2^2 com 3 repetições no ponto central para tratamento térmico. A comparação entre médias será feito por análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey. A análise de correlação utilizando coeficiente de Pearson (r). Todos os cálculos foram efetuados utilizando software STATISTICA 7.0® (STATSOFT INC, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO

O processo de pré-tratamento térmico foi estudado utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) através do planejamento fatorial completo 2³ com 3 repetições no ponto central.

A Tabela 9 apresenta a matriz experimental do planejamento para as variáveis independentes do tratamento térmico (T = 95°C) com os valores reais e codificados: volume de água/massa de fruto (X1) e tempo de centrifugação (X2) e rendimento médio de extração de óleo (massa óleo por massa total de óleo)x100 como variável resposta (Y):

A análise do teor total do óleo presente na polpa de dendê realizada pelo método BLIGH & DYER (1959) de extração por solvente a frio apresentou o resultado de 59,32% com desvio padrão de 2,43% de massa de óleo por massa de polpa fresca.

Considerando que a umidade determinada em estufa foi de 16,35% com desvio padrão de 1,72%, o teor total de lipídeos na polpa é de 70,91% b.s. Portanto, os valores de rendimento de extração foram calculados com base neste valor, considerando que 100% de extração seria a extração de 71% aproximadamente de massa de óleo por massa de polpa seca.

Todos os resultados de rendimento de extração de óleo foram expressos em relação ao teor total de lipídeos da polpa de acordo com a equação 3 do item 4.2.2.1.

$$Rendimento_{oleo} = \frac{massa\ óleo(g) / massa\ polpa(g)}{Teor\ total\ de\ óleo(g/g)} \times 100 \quad (3)$$

O Teor total de óleo foi definido como a porcentagem de massa de óleo extraída pelo método de BLIGH & DYER, 1959 em determinada massa de polpa de dendê.

Tabela 9: Matriz Experimental para processo térmico do óleo de palma.

Ensaio	Tempo ^a	Diluição ^b	R% ^e	R% ^p
1	10 (-1)	3 (-1)	34,20	31,75
2	20 (1)	3 (-1)	44,00	41,33
3	10 (-1)	5 (1)	22,17	17,18
4	20 (1)	5 (1)	10,62	5,46
5	22 (1,41)	4 (0)	14,41	18,37
6	8 (-1,41)	4 (0)	16,18	19,88
7	15 (0)	5,4 (1,41)	5,39	11
8	15 (0)	2,6 (-1,41)	44,50	46,55
9	15 (0)	4 (0)	26,97	27,44
10	15 (0)	4 (0)	28,15	27,44
11	15 (0)	4 (0)	27,31	27,44

^A Tempo de centrifugação em minutos, ^b Volume (mL)/ massa (g); R%^e Rendimento experimental; R%^p Rendimento previsto pelo modelo

De acordo com a Tabela 9, o ensaio 8 obteve maior rendimento de extração de óleo com 46,55% do teor total de óleo presente na polpa utilizando Diluição (V/m) de 2,6 em temperatura de 95°C durante 1 hora com Tempo de Centrifugação de 15 minutos a 2012x g. O ensaio 4 obteve menor rendimento com 5,46% do teor total de óleo nas condições: Diluição (V/m) 5 por 20 minutos de centrifugação (2012x g) após tratamento a 95°C durante 1 hora.

Tabela 10: Coeficientes de regressão para o processo térmico.

Fator	Coeficientes de Regressão	Erro Puro	p	Limite confiança 95%	Limite confiança -95%
Média*	27,44	0,35	0,0002	25,93	28,96
(1)Tempo (L)	-0,53	0,43	0,1300	-2,92	0,79
(1)Tempo (Q)*	-4,18	0,51	0,0038	-10,58	-6,15
(2)Diluição(L)*	-12,61	0,43	0,0000	-27,07	-23,36
(2)Diluição(Q)	0,67	0,51	0,1203	-0,87	3,56
1 com 2*	-5,33	0,6	0,0032	-13,27	-8,04

*Efeitos significativos a 5% de confiabilidade. (L) Linear, (Q) Quadrático.

Na Tabela 10 são apresentados os valores de coeficientes de regressão que revelam que os efeitos Tempo de centrifugação (Q), Diluição (L) e a combinação dos dois efeitos foram significativos, em nível de 5% de confiabilidade para Teste t de *student* para o processo aquoso de extração de óleo de palma utilizando pré-tratamento térmico. Todos esses efeitos tiveram sentido negativo indicando uma relação de inversa proporcionalidade com o rendimento de extração de óleo. O efeito Diluição (L) teve maior efeito sobre o processo exercendo uma relação linear com a variável resposta. Enquanto o Tempo de centrifugação (Q) apresentou um comportamento exponencial em relação à resposta rendimento de óleo.

Para verificar a adequação dos dados experimentais ao modelo predito é necessária a confirmação com parâmetros estatísticos como a Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 11.

Tabela 11: Análise de variância para processo térmico.

Fonte	SQ	gL	QM	Fcal	Ftab	p
Regressão	1503,82	5	300,76	11,53	5,05	0,0089
Resíduos	130,38	5	26,08			
Falta de ajuste	129,64	3	43,21	116,79	19,16	0,0085
Erro Puro	0,74	2	0,37			
Soma dos Quadrados	1634,2	10				

$R^2 = 92,02\%$; R^2 ajustado = $84,04\%$. Fcal – Valor do F calculado; Ftab – Valor do F tabelado

O coeficiente de determinação (R^2) apresenta uma proporção de variância explicada pelo modelo de 92,02% dos resultados obtidos nos ensaios ($p < 0,05$), indicando que o rendimento da extração aquosa de óleo com pré-tratamento térmico tem correlação com as variáveis independentes.

Pela análise de variância é possível observar que tanto a regressão quanto a falta de ajuste foram significativas para o processo, considerando o valor de p menor que 0,05 e o valor de F calculado maior que o tabelado. A falta de ajuste ocorreu

devido ao desvio dos pontos em que a Diluição teve maiores valores, indicando que o modelo não explica tão bem o mecanismo do processo em altos valores de Diluição. No entanto, os valores máximos de rendimento de extração de óleo são obtidos quando são usados menores valores de Diluição. Assim como o coeficiente de determinação tem um valor aceitável e o F calculado da Regressão ser maior que o tabelado, foi decidido que é possível gerar o modelo preditivo (Equação 4) e a superfície de resposta e curva de contorno (Figura 14):

Equação polinomial de segunda ordem para processo térmico utilizando apenas os efeitos significativos para os coeficientes:

$$Y = -4,18.(X_1)^2 - 12,61.X_2 - 5,33.X_1.X_2 + 27,44 \quad (4)$$

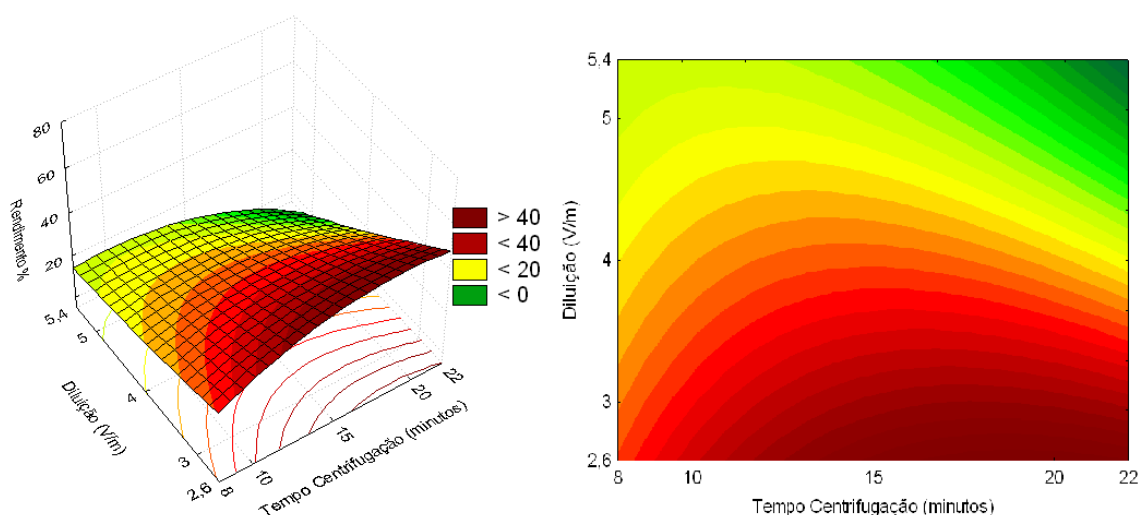


Figura 14: Superfície de resposta e curva de contorno para tratamento térmico.

Observando a superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 14) é possível verificar um maior rendimento de extração de óleo quando são utilizados baixas diluições combinadas em um tempo de centrifugação entre 15 e 20 minutos.

Rendimentos de extração de até 50% aproximadamente do teor total de óleo da polpa de dendê podem ser preditos pelo modelo considerando as condições de contorno utilizadas para o processo.

HANMOUNGJAI et al., (2000) avaliaram a extração aquosa do óleo de farelo de arroz e verificaram que a variação da relação solução/amostra (Diluição) não teve efeito para o rendimento de extração.

A determinação da umidade do óleo em estufa apresentou valor de $0,82 \pm 0,35\%$ p/p para as amostras extraídas com pré-tratamento térmico.

A Figura 15 apresenta a relação entre os pontos experimentais e os preditos pelo modelo polinomial. Os pontos com valores mais baixos apresentam maiores desvios em relação aos pontos preditos. Essa diferença pode ser devido ao mecanismo global do processo não ser explicado pelo modelo em valores altos de diluição.

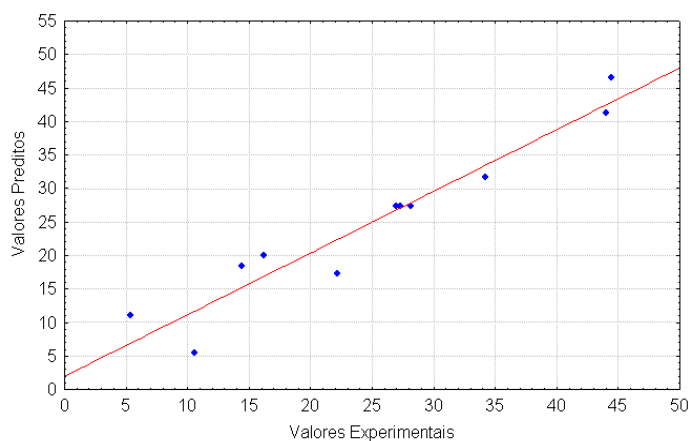


Figura 15: Relação entre valores experimentais e os preditos pelo modelo polinomial.

O mecanismo do processo aquoso de extração de óleo não é explicado pelo de extração por solvente que se baseia na capacidade do óleo em se dissolver e ser extraído pelo solvente. No processo aquoso, o óleo não tem afinidade química pelo solvente e por isso não tem potencial químico para ser dissolvido.

ROSENTHAL et al. (1996), explica que no mecanismo de extração por solvente durante a dissolução espontânea, o sistema fica carregado com uma energia de Gibbs negativa. A energia térmica é consumida para separar as moléculas do soluto e dissociar as moléculas de solvente; essa energia é liberada quando as moléculas de soluto dispersas interagem com as moléculas de solvente:

A variação total de entalpia será mais negativa (exotérmica), se a energia consumida durante as interações soluto-soluto e solvente-solvente forem menores do que a energia liberada em interações soluto-solvente. No entanto, se as moléculas de soluto estão fortemente vinculadas umas às outras como na água, o soluto se dissolve bem somente se a dissolução resultar em forte interação soluto-solvente. Este não é o caso da água em óleo onde as interações são fracas e não conseguem compensar a grande quantidade de energia necessária para romper as ligações de hidrogênio na água. Por outro lado, a solubilidade do óleo em hexano é alto porque as fortes interações soluto-solvente compensam a energia perdida.

Para processo aquoso de extração de óleo, a energia térmica é utilizada para separar o óleo dos outros componentes presentes que devido às características polares são dissolvidos na água e assim separados do óleo por centrifugação. Portanto, o mecanismo do processo se baseia na insolubilidade do óleo na água permitindo a dissolução dos componentes sólidos na fase aquosa.

Na teoria, o rendimento de extração pode ser maior com aumento da fase aquosa, facilitando a dissolução de componentes polares solúveis em meio aquoso. No entanto, foi verificado o contrário pelo processo no presente trabalho em que a diminuição da fase aquosa aumenta o rendimento de extração de óleo. Por isso, é necessário uma investigação mais detalhada sobre o processo para identificação e resolução que explique tal fenômeno.

5.1.1 Influência do Potencial Hidrogeniônico no Tratamento Térmico

Para estudar a influência do pH da solução na extração aquosa, um experimento univariável foi executado em triplicata para diferentes níveis de acidez (pH entre 4 e 7) e uma amostra controle utilizando apenas água destilada.

O processo foi aplicado utilizando uma relação de 2:1 (volume de solução:massa de fruto), temperatura de 95°C durante 1 hora e tempo de centrifugação de 15 minutos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de média para extração de óleo em diferentes pH.

Controle	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
55,63 ^a ± 3,54	57,54 ^a ± 2,79	57,30 ^a ± 3,95	55,30 ^a ± 1,15	54,36 ^a ± 3,40

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com Teste de Tukey a 5% de confiabilidade. Resultados expressos como % óleo extraído em relação ao teor total da polpa.

De acordo com a Tabela 12, a variação de pH de 4 a 7 para a solução do tratamento térmico não apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de confiabilidade. Portanto, foi decidido utilizar apenas água destilada como solução para o tratamento.

Para algumas oleaginosas, a mudança de pH pode favorecer o aumento do rendimento de extração do óleo em processo aquoso. Essa mudança de acidez pode facilitar a hidrólise de componentes presentes na matriz e aumentar a dissolução dos componentes aquosos na solução. Isso pode ocorrer principalmente em matrizes com alto teor protéico como a soja, o que contribui na liberação do óleo devido à desnaturação da emulsão lipoprotéica.

HANMOUNGJAI et al., (2000) avaliaram o efeito do pH na extração aquosa de óleo de farelo de arroz e verificaram aumento no rendimento de extração utilizando pH alcalino enquanto que em baixos valores de pH não houve diferença.

5.2 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO

5.2.1 Atividade enzimática

O extrato enzimático bruto obtido da fermentação sólida de farelo de trigo pelo fungo *Paecilomyces variotii* e as enzimas comerciais de pectinase e celulase foram caracterizadas com relação à atividade enzimática de Poligalacturonase (PG) , Carboximetilcelulase (CMCase) e Tanase (TAH) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Atividade enzimática dos extrato bruto e comercial.

Enzimas	Tanase (U/mL)	CMCase (U/mL)	PG (U/mL)
Extrato Tanase	106,03±2,34	71,24±1,16	43,3±0,87
Pectinase comercial	-	367,65±21,34	1338,65±12,65
Celulase Comercial	-	1800,46±37,45	581,23±12,34

U = μ mol substrato/min

O extrato enzimático bruto obtido por *Paecilomyces variotii* apresenta atividades de CMCase e PG necessárias para lise da parede celular da polpa de dendê. No entanto, não são suficientes para que ocorra a liberação total do óleo. Por esse motivo foi necessária a introdução de enzimas pectinase e celulase comerciais no presente estudo. O extrato bruto será considerado a paritr de então, somente como fonte de tanase e assim analisado seu efeito na adição ao processo junto com as enzimas de maceração comerciais.

GOMES et al., (2002) utilizaram extrato enzimático com atividade Poligalacturonase (PG), Carboximetilcelulase (CMCase), celulase em papel de filtro (FPase), protease e α -amilase produzido pela linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8 por fermentação sólida de farelo de trigo para processo de extração aquosa de óleo de pupunha obtendo maior rendimento que as enzimas comerciais.

5.2.2 Planejamento Experimental

Para a análise do processo de tratamento enzimático para a extração do óleo de palma foi realizado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O Delineamento consiste no planejamento fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central combinado com a metodologia de superfície de resposta para melhor visualização do comportamento do processo nas condições estudadas. Na Tabela 14 é apresentada a matriz com os pontos experimentais e os pontos preditos pelo modelo:

Tabela 14: Matriz DCCR para tratamento enzimático.

Ensaio	X1 (%Enzima)	X2 (Diluição)	X3 (pH)	Rendimento (%)^a	Rendimento (%)^b
1	-1 (2)	-1 (3)	-1 (4,7)	62,12	61,24
2	1 (4)	-1 (3)	-1 (4,7)	81,15	82,35
3	-1 (2)	1 (5)	-1 (4,7)	40,66	44,36
4	1 (4)	1 (5)	-1 (4,7)	75,39	70,61
5	-1 (2)	-1 (3)	1 (6,3)	44,67	48,04
6	1 (4)	-1 (3)	1 (6,3)	58,63	53,52
7	-1 (2)	1 (5)	1 (6,3)	13,26	10,65
8	1 (4)	1 (5)	1 (6,3)	21,81	21,27
9	-1,68 (1,3)	0 (4)	0 (5,5)	35,6	32,79
10	1,68 (4,6)	0 (4)	0 (5,5)	54,62	59,44
11	0 (3)	-1,68 (2,3)	0 (5,5)	76,09	76,26
12	0 (3)	1,68 (5,6)	0 (5,5)	33,15	34,99
13	0 (3)	0 (4)	-1,68 (4)	71,9	71,68
14	0 (3)	0 (4)	1,68 (7)	16,92	19,15
15	0 (3)	0 (4)	0 (5,5)	50,43	49,73
16	0 (3)	0 (4)	0 (5,5)	50,61	49,73
17	0 (3)	0 (4)	0 (5,5)	48,51	49,73

*Valores entre parênteses representam os valores reais das variáveis. ^aExperimental; ^bPredito. (%)Porcentagem de óleo extraído em relação ao teor total de óleo da polpa.

Foi observado na matriz de experimentos (Tabela 14) que o ensaio 2 obteve maior rendimento de extração de óleo com 82,35% do teor total de óleo na polpa a partir das condições operacionais: concentração de enzima (%Enzima) a 4%, Diluição 3.(V/m) e pH 4,7. O menor valor de extração foi obtido no ensaio 7 com valor de 10,65% do teor total de óleo na polpa a partir das condições operacionais: concentração de enzima (%Enzima) 2%, Diluição 5.(V/m) e pH 6,3. Na Tabela 15 são apresentados os efeitos para tratamento enzimático:

Tabela 15: Coeficientes de regressão para modelo do processo enzimático.

Coeficientes de			
Fator	Regressão	Erro Puro	p
Média*	49,73	0,67	0,0002
(1) % Enzima (L)*	7,93	0,63	0,0015
% Enzima (Q)	-1,28	0,69	0,0478
(2) Diluição (L)*	-12,28	0,63	0,0007
Diluição (Q)*	2,09	0,69	0,0266
(3) pH (L)*	-15,63	0,63	0,0004
pH (Q)*	-1,53	0,69	0,0470
1 com 2	1,29	0,82	0,0889
1 com 3*	-3,91	0,82	0,0109
2 com 3 *	-5,13	0,82	0,0016

*Efeitos significativos a 5% de confiabilidade. (L) – Linear; (Q) – Quadrático.

Os efeitos significativos de acordo com teste t de *student* são % Enzima(L), Diluição(L), Diluição(Q), pH(L), pH(Q), %Enzima com pH e Diluição com pH. O efeito mais significativo para o processo de extração aquosa do óleo de palma utilizando pré-tratamento enzimático foi o pH. Assim como a Diluição teve um valor alto de significância sendo as duas variáveis com sentido negativo, indicando uma relação de inversa proporcionalidade com o rendimento de extração de óleo como observado no tratamento térmico. No entanto, a variável %Enzima teve efeito com sentido positivo indicando relação diretamente proporcional com o rendimento de extração de óleo indicando que as enzimas apresentam atividade na matriz e auxiliam no processo de extração como foi observado por ROSENTHAL et al. 2001, NAJAFIAN et al., 2009; DE FAVERI., 2008, SOTO et al, 2006; SANTOS e FERRARI, 2005.

Para avaliação da adequação do modelo da regressão aos pontos experimentais obtidos utiliza-se a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 16:

Tabela 16: Análise de variância para pré-tratamento enzimático.

ANOVA	SQ	gL	QM	Fcal	Ftab	p
Regressão*	6728,54	9	747,61	41,66	3,67	0,00003
Resíduo	125,61	7	17,94			
Falta de ajuste	122,91	5	24,58	18,14	19,29	0,0531
Erro puro	2,71	2	1,35			
Total	6854,15	16				

*Efeitos significativos a 5% de confiabilidade. SQ- Soma dos quadrados, gL- Graus de liberdade, QM-Quadrado Médio. $R^2 = 98,16\%$ R^2 ajustado = 95, 81%

Os resultados de análise de variância para a Regressão e para Falta de ajuste revelam que a Regressão foi significativa enquanto a Falta de ajuste não. O valor de F calculado para Regressão foi maior que o de F tabelado, assim como o valor de p foi menor que 0,05. Isso demonstra que o modelo definido pela regressão é adequado para representar o mecanismo do processo aquoso enzimático de extração de óleo de palma nas presentes condições. A Falta de ajuste não significativa demonstra que os pontos experimentais tiveram um baixo desvio em relação aos pontos preditos pelo modelo polinomial. A partir desses parâmetros, foi gerado o modelo matemático (Equação 5) utilizando apenas os efeitos significativos como coeficientes:

$$Y = 7,93.X_1 - 12,28.X_2 + 2,09.(X_2)^2 - 15,63.X_3 - 1,53.(X_3)^2 - 3,91.X_1.X_3 - 5,13.X_2.X_3 + 49,73$$

(5)

As superfícies de resposta e curvas de contorno estão representadas nas Figuras 16, 17 e 18.

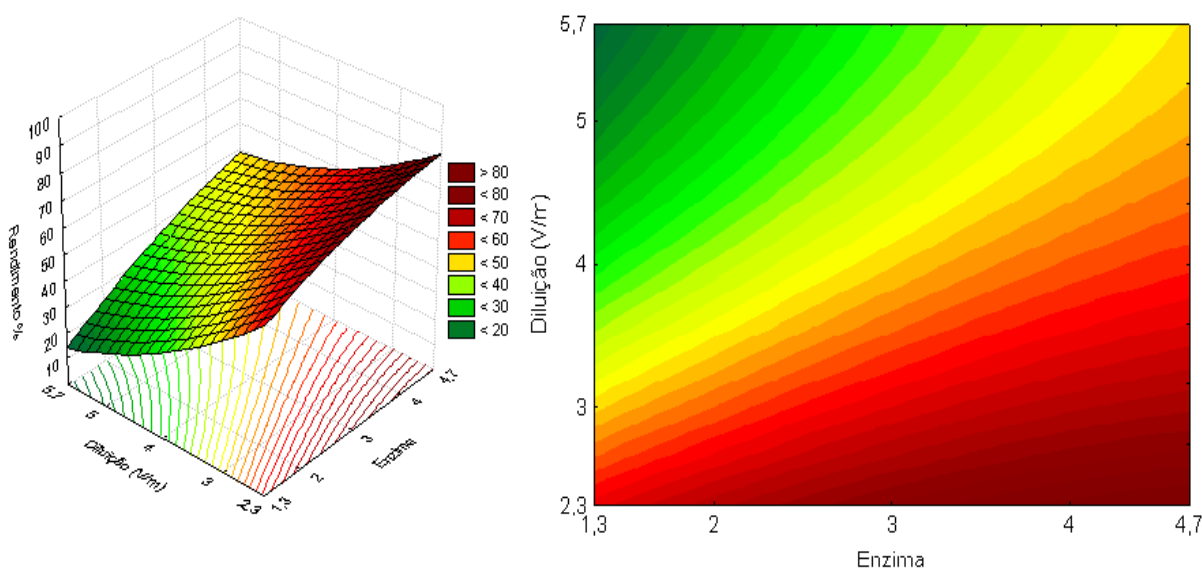


Figura 16: Superfície de resposta e curva de contorno para efeito da Diluição com concentração de Enzima para Rendimento de extração de óleo.

Analisando a curva de contorno (Figura 16) é possível verificar que o maior rendimento de extração de óleo é obtido quando o sistema é operado nas diluições menores que 3(V/m) e a concentração de enzima maior que 3% alcançando rendimento de extração de óleo acima de 80%.

NAJAFIAN et al. (2009), utilizaram enzima Pectinex Ultra SP-L (Novo nordisk) para extração de óleo de oliva e verificaram que a concentração de enzima foi significativa, aumentando a extração de óleo e polifenóis.

O rendimento de extração é diretamente proporcional à concentração enzimática em relação à massa de polpa de dendê utilizada. Entretanto, em valores altos de Diluição (acima de 4), a concentração enzimática tem pouco efeito sobre o rendimento de óleo. Aumentando a concentração de enzima e diminuindo a relação solução/amostra (Diluição) é favorecida a acessibilidade da enzima às paredes celulares sendo mais efetivas em baixos valores de Diluição.

SANTOS e FERRARI, (2005) investigando o processo enzimático de extração aquosa de óleo de soja e verificaram que a Diluição foi a variável mais significativa tendo relação direta com o rendimento de óleo obtendo a relação de 1:20 amostra:solução como valor ótimo.

ROSENTHAL et al., (2001) avaliaram os efeitos das variáveis concentração enzimática (p/p), taxa líquido/sólido (Diluição), granulometria do material (μm) e tempo de hidrólise para rendimento de extração de óleo e hidrolisado protéico; verificando que a variável Diluição apresentava efeito significativo positivo apresentando relação direta com o rendimento de óleo.

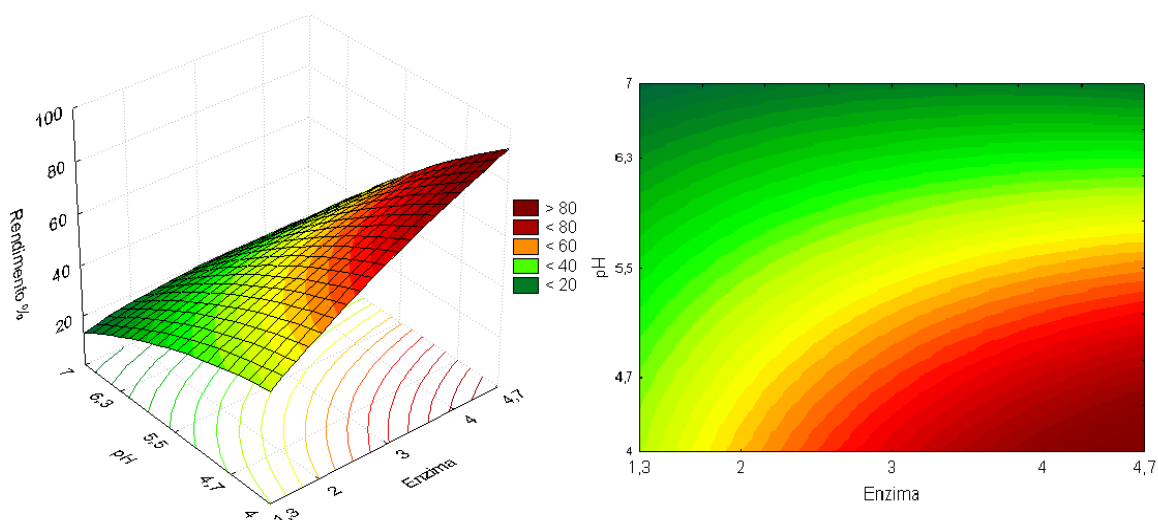


Figura 17: Superfície de resposta e curva de contorno para efeito do pH e concentração de enzima para rendimento de extração de óleo.

Observando a superfície e curva (Figura 17) é possível afirmar que os maiores resultados foram obtidos na faixa de pH entre 4 e 5,5. As enzimas comerciais Pectinase e Celulase apresentam atividade ótima nessa faixa de pH, o que provavelmente determinou melhor rendimento de extração de óleo. Além disso, em pH 7 a concentração de enzima não teve efeito para o rendimento de extração de óleo. PASSOS et al. (2009) utilizaram pré-tratamento enzimático para extração de óleo de semente de uva aplicando celulases, pectinases, xilanases e proteases e verificaram que o maior rendimento de extração do óleo foi utilizando pH 3 e 4. Além disso, não obtiveram aumento significativo de extração de óleo de semente de uva quando aumentaram as concentrações de pectinase, celulase, protease e xilanase em pH 7 devido à baixa atividade dessas enzimas em pH neutro.

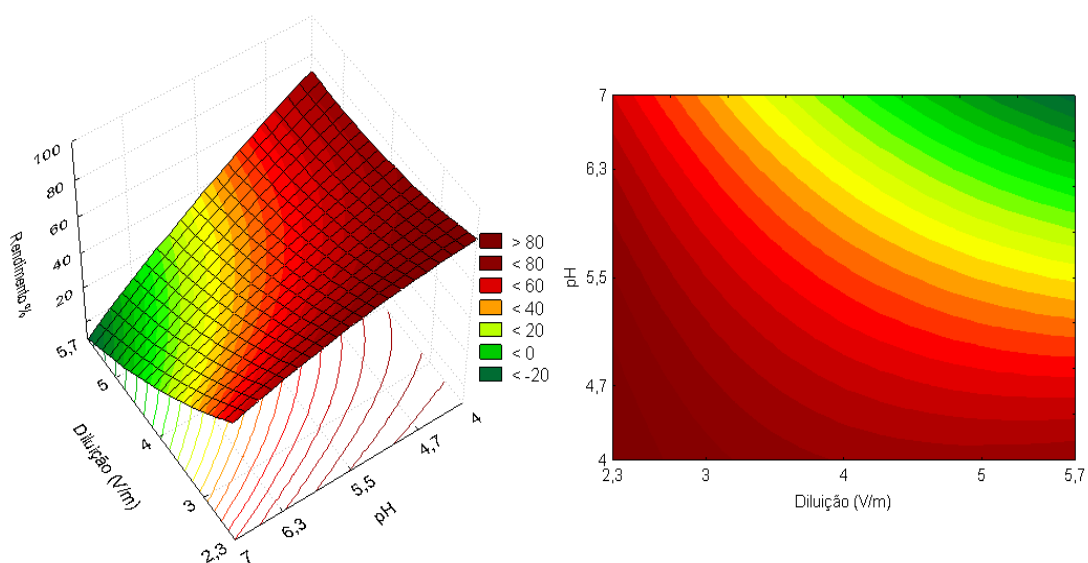


Figura 18: Superfície de resposta e curva de contorno para os efeitos de pH e Diluição no Rendimento de óleo.

Pela Figura 18 é possível identificar que a variável pH teve maior influência em relação ao Rendimento de extração. Para processo em pH 4, a diluição não apresenta efeito para o rendimento de extração de óleo. No entanto, em valores altos de pH é observado uma diminuição no rendimento de extração quando os valores de Diluição são altos. Acima de pH 5,5 o mecanismo do processo perde a característica enzimática devido à baixa atividade das enzimas nessa faixa de acidez.

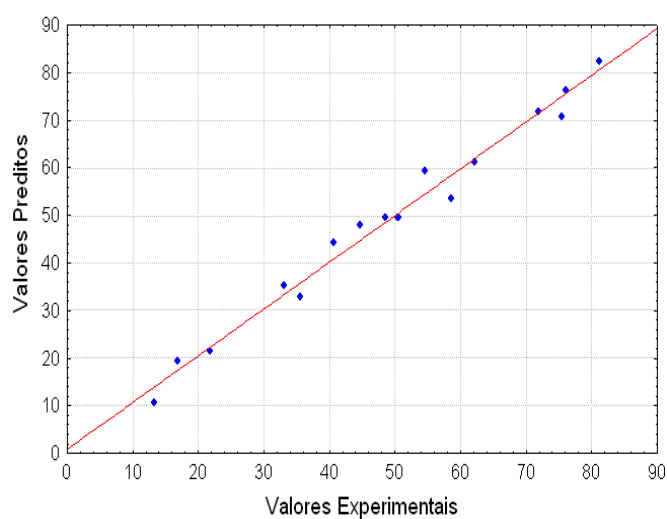


Figura 19: Relação entre pontos preditos e experimentais para processo enzimático.

Na Figura 19 é ilustrada a relação entre os dados experimentais e os do modelo obtido pela regressão. Os pontos experimentais possuem boa correlação com os do modelo polinomial preditivo confirmando a boa adequação dos dados, além da capacidade da equação para reproduzir o mecanismo do processo nas condições estudadas.

5.2.3 Validação Experimental do Modelo

Para validação do modelo, alguns experimentos foram realizados de forma aleatória e seus resultados comparados com os valores preditos pelo modelo. Os resultados encontrados demonstram que os pontos experimentais podem ser explicados pelo modelo.

Utilizando a concentração máxima de enzima (4,6%) e o menor valor de Diluição (2,3) e pH (4) obteve-se resultado de maior rendimento de extração do óleo presente na polpa do fruto. Os resultados dos ensaios estão apresentados na Tabela 17:

Tabela 17: Validação experimental do modelo polinomial.

Enzima (%)	Diluição (v/m)	pH	Experimental*	Predito*	-95,00%	95,00%
4,7	2,3	4	90,02	97,39	86,17	107
4,7	2,3	7	49,56	55,18	43,55	66,82
2	2,3	4	67,54	70,12	61,11	79,12
2	5	4	49,34	53,03	46,58	59,47

* % óleo extraído em relação ao teor total presente na polpa do fruto de dendê.

Apesar de haver desvio entre os valores experimentais e preditos pelo modelo, o resultado ainda se encontra dentro do limite de tolerância de 5% para variação do sistema.

5.2.4 Efeito da Tanase no Rendimento de Extração de Óleo

Para determinar a influência da enzima Tanase no rendimento de extração de óleo, alguns experimentos foram realizados utilizando as enzimas separadamente e uma amostra controle. A amostra que utilizou apenas extrato bruto de Tanase teve concentração de 42,4 U de Tanase (TAH); 28,5U de Carboximetilcelulase (CMCase) e 17,3 de Poligalacturonase (PG) para 10g de polpa. A amostra que usou apenas Pectinase e Celulase teve 727,8U de CMCase e 383,9U de PG. A amostra com a mistura das três enzimas teve 13,8U de TAH; 291,2 de CMCase e 255,2U de PG e uma amostra controle utilizando apenas solução tampão. O processo foi conduzido sob as seguintes condições operacionais: relação volume:massa (diluição) 3:1 e pH 4. Temperatura do sistema fixa em 50°C durante 1 hora e centrifugação por 20 minutos a 3000 rpm. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 18:

Tabela 18: Efeito da Tanase no rendimento de extração de óleo de palma.

Controle	Tanase	Pec+Cel	Pec+Cel+Tan
26,18 ±0,75	41,52 ±0,35	78,73 ^c ±0,80	79,56 ^c ±0,30

Resultados expressos como porcentagem de rendimento de óleo extraído em relação ao teor total de óleo na polpa. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente de acordo com Teste de Tukey a 5% de confiabilidade. Pec+Cel – Pectinase e Celulase; Pec+Cel+Tan- Pectinase, Celulase e Tanase.

De acordo com os resultados obtidos pelo Teste de Tukey é possível verificar que apesar da capacidade de extrair óleo, o extrato bruto de Tanase teve efeito menor sobre o rendimento de extração comparado às amostras extraídas na presença de pectinase e celulase comerciais. O extrato de Tanase foi aproximadamente 58% maior que amostra Controle, enquanto que as amostras extraídas na presença de pectinase e celulase comerciais foram aproximadamente 200% maior que a Controle. No entanto, cabe ressaltar que o objetivo da utilização da da tanase no presente estudo estaria relacionado com a capacidade de hidrolisar compostos fenólicos e auxiliar ou propiciar a dissolução dos mesmos no óleo, migrando da matriz vegetal. Além disso, todas publicações sobre aplicação de

tanase são direcionadas à hidrólise de taninos hidrolisáveis (ácido tânico), taninos condensados (epigallocatequina galato) e síntese de propil galato (BANERJEE et al., 2001; BATTESTIN et al., 2004).

O presente estudo considera o fato da enzima tanase ser uma esterase e por isso, necessário investigar o grau de especificidade de substratos para tal enzima, verificando se esta apresenta atividade em outros compostos fenólicos, além daqueles já descritos na literatura, como também na sua capacidade de facilitar a extração de óleo e de compostos bioativos que estejam em interação com os taninos em uma matriz complexa como a polpa de dendê.

5.2.5 Cinética de Extração Enzimática

Para estudo do perfil do processo enzimático em relação ao tempo, foi realizada uma cinética de extração nas seguintes condições: concentração enzimática de 13,8U de TAH; 291,2U de CMCase e 255,2U de PG , Diluição= 2. (V/m) e pH 4 a 50°C. Os experimentos foram realizados em duplicata de acordo com os tempos de operação: 5, 10, 20, 30, 45, 60 e 80 minutos de incubação; 5 minutos de aquecimento a 95°C e centrifugação a 2012 x g.

A partir dos dados obtidos foi realizada uma regressão não linear da cinética de extração do óleo ajustando a dois modelos matemáticos: (Equação 6) modelo Log proposto inicialmente por DUGGAL (1987) e modificado por KASHYAP et al., (2007) para descrever as taxas de reação de extração de óleo de grãos de soja hidrolisados enzimaticamente e (Equação 7) modelo pseudo-segunda ordem de Lagragren utilizado para descrever mecanismo de transferência de massa e de reação química simultaneamente.

$$R = \exp(-k_1.t^n) \quad (6)$$

$$R = \frac{R_\infty^2 . k_2 . t}{1+(R_0.k_2.t)} \quad (7)$$

Em que R é o rendimento de extração em relação ao teor total de óleo (%); R_{∞} é o rendimento de extração no tempo infinito ($t = \infty$). K_1 é a constante de velocidade do modelo Log e n é a ordem da reação. K_2 é a constante do modelo de pseudo-segunda ordem. Nas Figuras 20 e 21 são apresentados os ajustes do modelo de cinética de reação e do modelo de pseudo-segunda ordem respectivamente.

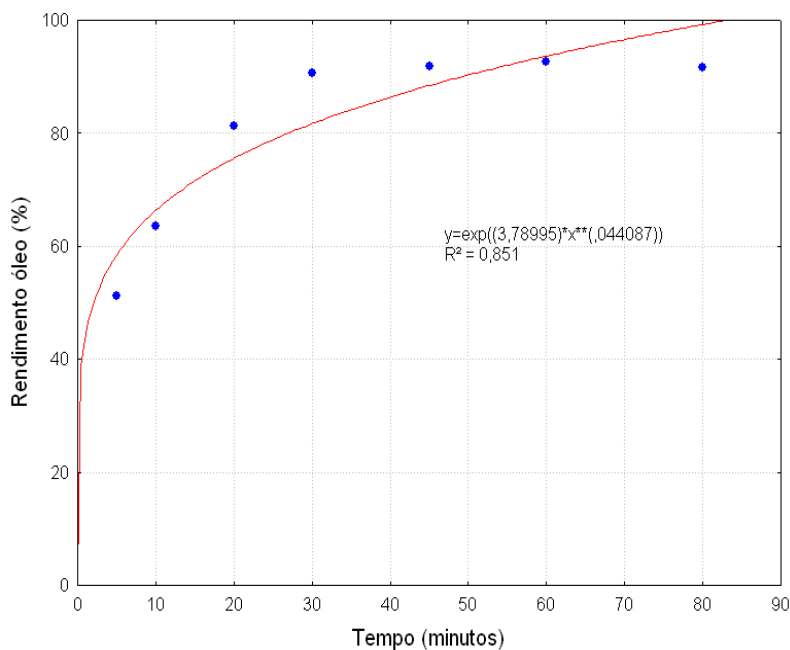


Figura 20: Ajuste do modelo Log.

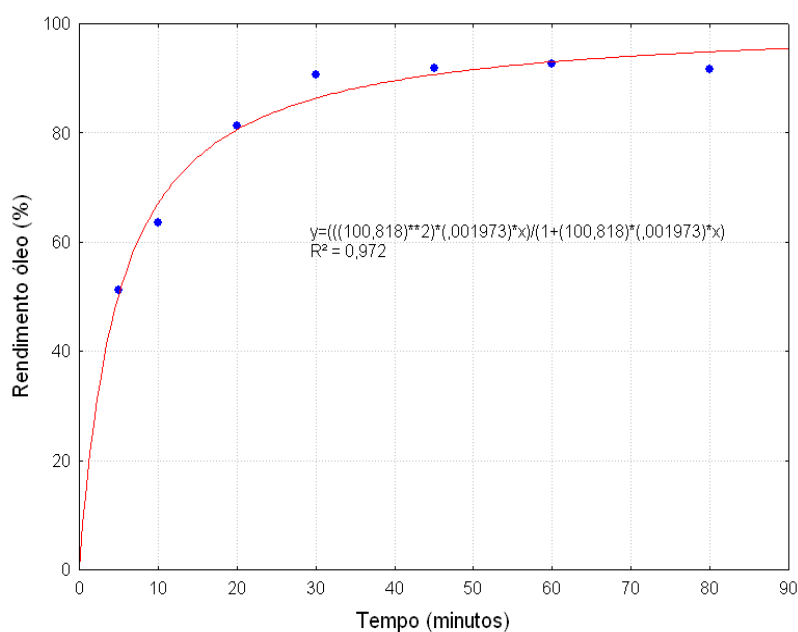


Figura 21: Ajuste do modelo Pseudo-segunda ordem

Na Tabela 19 são apresentados os parâmetros cinéticos do ajuste dos modelos matemáticos de cinética de reação e pseudo-segunda ordem.

Tabela 19: Parâmetros cinéticos dos ajustes dos modelos matemáticos.

Modelos	k	R[∞]	n	R²
Cinética de Reação	3,789	-	0,044	0,851
Pseudo-segunda ordem	0,019	100,81	-	0,972

K Constante de velocidade; R[∞] Rendimento de óleo no tempo infinito; n Ordem da reação; R² Proporção de variância explicada.

De acordo com a Tabela 19, o modelo de Pseudo-segunda ordem apresentou melhor proporção de variância explicada, apresentando menor desvio em relação aos pontos experimentais, representando melhor o mecanismo de extração aquosa enzimática de óleo de palma em diferentes tempos de incubação.

KASHYAP et al., (2007) avaliaram a hidrólise enzimática de soja (*Glycine max* L.) para aumento de rendimento de extração do óleo (hexano) em relação ao tempo de incubação enzimática e verificaram que o modelo Log modificado apresentava coeficiente de correlação maior que $r = 0,9$.

HANDAYANI et al., (2007) avaliaram a extração de astaxantina de resíduos de camarão (*Panaeus monodon*) utilizando óleo de palma e determinaram a cinética de extração comparando dois modelos matemáticos: modelo de transferência de massa e modelo de transferência de massa e de reação química simultaneamente (Pseudo-segunda ordem). Os ajustes dos dois modelos foram considerados satisfatórios, no entanto o modelo Pseudo-segunda ordem apresentou maior valor de R² indicando que a reação entre os grupos hidroxilas na astaxantina com os ácidos graxos do óleo também ocorreu durante o processo de extração, além da transferência de massa.

De acordo com o melhor ajuste do modelo Pseudo-segunda ordem para representar os pontos experimentais de extração aquosa enzimática de óleo de palma, é possível verificar que o mecanismo do processo pode ser explicado simultaneamente pela reação enzimática e pela transferência de massa para fase aquosa do processo. A atividade enzimática favorece a hidrólise de polissacarídeos permitindo maior dissolução destes em meio aquoso facilitando a separação e extração de óleo.

Foi observado que a partir de 50 minutos de reação o máximo de extração foi atingido. O tempo ótimo de operação para pré-tratamento enzimático da polpa de dendê foi de 30 minutos alcançando cerca de 90% do teor total de óleo presente na polpa de dendê.

O valor máximo de óleo extraído no processo aquoso enzimático de óleo de palma foi de 93% do teor total de óleo presente na polpa de dendê.

JIANG et al., (2009) investigaram a extração aquosa simultânea de óleo e hidrolisado protéico de amendoin e verificaram que as condições ótimas de operação foram: Temperatura (65°C), pH (9,5), concentração enzimática 1,5% (p/p), e tempo de hidrólise de 5 horas obtendo 79,32% do teor total de óleo e 71,38% de hidrolisado protéico.

ALIAKBARIAN et al., (2008) otimizaram a extração enzimática de óleo de oliva utilizando pectinase, celulase e hemicelulase comerciais e obtiveram rendimento de 15 g de óleo para 100 de fruto nas condições: tempo de 91,64 minutos e concentração enzimática de 25 mL/kg de polpa de fruto.

KIM, (1989) avaliou a extração enzimática de óleo de palmíste e obteve em 30 minutos de operação um rendimento de extração de 84% do teor total de óleo utilizando pH 7, relação volume: amostra de 4:1 e temperatura de 45°C. (ROSENTHAL et al., 1995).

5.3 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

5.3.1 Fenóis Totais

As análises de fenóis totais utilizando reagente Folin-ciocalteu para as amostras de óleo extraído com enzimas, pelo processo térmico e seus respectivos efluentes aquosos estão representadas na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados para Fenóis Totais no óleo e efluentes dos processos.

Amostras	Controle	Tanase	P+C	Térmico	P+C+T
Efluentes ¹	160±13,56	428,97±9,55	333,77±11,38 ^a	213,64±15,98	376±39,58 ^a
Óleo ²	21,43±0,58 ^a	26,43±0,58 ^b	17,43±1,53 ^{ca}	22,53±3,06 ^{ba}	14,76±1,00 ^c

¹ µgEAG/mL ² µgEAG/g. P+C – Pectinase+Celulase; P+C+T – Pectinase+Celulase+Tanase. *Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de confiabilidade.

A concentração de polifenóis totais para o fruto foram de 1222.87 ± 89.58 micrograma de equivalente ácido gálico (µg EAG / g) por grama de polpa seca. Os efluentes aquosos do processo (solução + sólidos) revelam que a enzima Tanase apresentou atividade na matriz lipídica (polpa de dendê). O aumento da concentração de fenóis totais da amostra Controle para da Tanase sugere que a enzima tenha hidrolisado alguns polifenóis de maior cadeia e solubilizando na água do processo. Houve aumento de cerca de 167% em relação ao Controle. No entanto, todas as amostras tiveram valores mais altos que o Controle, sugerindo extração de fenóis pela pectinase, celulase e tratamento térmico.

Os resultados de fenóis totais para o óleo revelam que foram detectados baixos valores de fenóis adsorvidos no óleo bruto de palma. As médias apresentaram valores aproximados com poucas diferenças significativas entre si, com as amostras extraídas com Tanase apresentando maior valor de $26,43 \pm 0,58$ µgEAG/g mas não estatisticamente diferente do Térmico $22,43 \pm 3,06$ µgEAG/g. As duas amostras apresentaram aumento em relação à amostra controle de 23,3% (Tanase) e 5,1% (Térmico). As amostras extraídas com Pectinase e Celulase tiveram valores abaixo do Controle, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

DE FAVERI et al., (2008) analisaram a influência das enzimas pectinase, celulase e hemicelulase separadamente e verificaram que a mistura das três apresentava maior eficiência de extração de polifenóis totais, indicando um efeito sinérgico entre as atividades de cada enzima. Após isso, ALIAKBARIAN et al., (2008) otimizaram o pré-tratamento enzimático para extração de azeite de oliva utilizando planejamento fatorial completo 3^2 e aplicando uma solução de pectinase, celulase e hemicelulase comerciais; analisando os efeitos das variáveis independentes tempo de maceração e concentração enzimática sobre as respostas polifenóis totais (TP), o-difenóis (OD) e capacidade antioxidante (DPPH) e obtiveram TP = 844.30 microgramas de equivalente de ácido cafeico por grama de óleo ($\mu\text{gCAE/g}$ óleo); OD = 120,80 $\mu\text{gCAE /g}$ óleo e atividade antioxidante de 24.93 $\mu\text{gDPPH}/\mu\text{L}$ de extrato como aumento de fenóis totais.

NAJAFIAN et al., (2009) utilizaram Pectinex Ultra SP-L (Novo nordisk biochem north america, inc) and Pectinase 1.6021 (Merk company, Darmstadt, Germany) para extração aquosa de óleo de oliva e verificaram que o efeito da concentração era significativamente positivo para rendimento de óleo, cor e polifenóis totais. Mas não significativo para acidez, índice de peróxidos e índice de iodo. O teor de polifenóis apresentou aumento de 13.9 – 72.6% em relação ao controle.

LATIF e ANWAR , (2009) avaliaram os efeitos do tratamento com várias preparações enzimáticas para extração aquosa de óleo de girassol e analisaram os polifenóis totais para as amostras que apresentaram de 13-15 mg EAG/100 g de óleo e 9 mg EAG/100 g para a amostra controle.

NEO et al., (2010) identificaram oito tipos de ácidos fenólicos presentes na polpa de dendê (*E. guineensis*) sendo que o ferrúlico, p-hidroxibenzóico e p-cumárico foram os ácidos fenólicos majoritários na polpa variando de 55 a 376 $\mu\text{g/g}$ b.s.

5.3.2 Carotenóides

A determinação de carotenos totais pelo método espectrofotométrico realizada em triplicata nas amostras extraídas com tratamento enzimático por Pectinase e

Celulase; Pectinase, Celulase e Tanase; apenas Tanase; pelo tratamento térmico (Térmico) e controle enzimático (Controle) estão apresentadas na Tabela 21:

Tabela 21: Teor de carotenos totais presente nas amostras de óleo.

Pec+Cel	Pec+Cel+Ta	Tanase	Térmico	Controle
219,9+11,03 ^{ac}	269,67+67,5 ^{cb}	346,74+19,86 ^b	152,60+1,42 ^{ad}	136,48+17,52 ^{ad}

Resultados expressos como $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g}$ de óleo.*Médias seguidas de mesma letra não são diferentes estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de confiabilidade. Pec+Cel – Pectinase e Celulase; Pec+Cel+Ta – Pectinase, Celulase e Tanase.

Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento térmico e enzimático apresentaram aumento no rendimento de extração de carotenos totais para o óleo de palma. No entanto, apenas as amostras tratadas com tanase (Tanase e Pec+Cel+Ta) foram diferentes estatisticamente das amostras Controle e Térmico. O óleo da amostra Tanase apresentou aumento de cerca de 154% do teor de carotenos totais do óleo em relação ao óleo da amostra Controle (mesmos parâmetros do tratamento enzimático, no entanto sem enzima). Enquanto que a amostra Pectinase, Celulase e Tanase teve aumento de 97% em relação ao Controle. As duas amostras com a presença de tanase não foram estatisticamente diferentes entre si. A média da triplicata para óleo da amostra Tanase, com maior teor, foi de 346,74 μg de $\beta\text{-caroteno/g}$ de óleo, enquanto da amostra Controle (menor teor) foi de 136,48 μg de $\beta\text{-caroteno/g}$ de óleo. As amostras extraídas com Pectinase e Celulase não tiveram diferença significativa da amostra Pectinase, Celulase, Tanase; Térmico e da Controle. Apesar de apresentar cerca de 61% de aumento de concentração em relação à amostra Controle.

As concentrações de carotenos totais obtidas no processo aquoso de extração de óleo de palma tiveram valor abaixo do óleo obtido por processo convencional de prensagem (500-700 ppm) de acordo com CHOO, 1994; PEIXOTO, 2004.

CHOUDHARI e ANANTHANARAYAN (2007) utilizaram pectinase e celulase para extração de licopeno dos tecidos de tomate e obtiveram aumento no

rendimento de extração de 198% em relação ao controle (132 µg/g) para amostras tratadas com celulase e 224%(108 µg/g) para amostras tratadas com pectinase.

MORTENSEN , (2005) analisou um extrato de carotenos obtido do fruto de dendê (*Elaeis guineensis*) por HPLC empregando uma coluna C₃₀ e verificaram que α- e β-carotenos são os majoritários correspondendo a 95% dos carotenos presentes no extrato. Além disso, 60% de α- e β-carotenos estão na forma isômero *trans*.

O presente estudo indica uma possível atividade da tanase na liberação de carotenóides na extração aquosa do óleo de palma. Nenhum estudo avaliando o efeito dessa enzima para extração de carotenóides foi publicado ainda.

5.3.3 Tocoferóis

A análise de tocoferóis totais realizada em HPLC tem seu resultado apresentado na Tabela 22:

Tabela 22: Concentração de tocoferóis totais presentes no óleo das amostras.

Pec+Cel	Pec+Cel+Ta	Tanase	Térmico	Controle
79,61	805	828,72	944,55	1029,96

Resultados expressos como µg de Tocoferóis totais / g de óleo (µg TT / g). Pec+Cel – Pectinase+Celulase; Pec+Cel+Ta - Pectinase+Celulase+Tanase

De acordo com a Tabela 21 é possível observar que o tratamento enzimático não teve influência sobre a concentração de tocoferóis considerando o valor da amostra Controle como maior concentração entre as amostras (1029,96 µg TT / g óleo). No entanto, não é possível afirmar com precisão devido à falta de repetições de amostras para determinar uma relação estatística significativa entre as médias e desvios das amostras.

A amostra extraída com pectinase e celulase apresentou menor valor de concentração de tocoferóis com valor de 79,61 ppm ou $\mu\text{g TT} / \text{g óleo}$. A amostra extraída com pectinase, celulase e tanase teve valor aproximado da amostra extraída apenas com Tanase indicando um possível valor médio sem diferença (805 e 828,72 $\mu\text{g TT} / \text{g óleo}$ respectivamente). A amostra extraída com tratamento térmico apresentou valor maior que as amostras extraídas com tratamento enzimático (944,55 $\mu\text{g TT} / \text{g óleo}$).

As concentrações de tocoferóis totais obtidas no tratamento com pectinase, celulase e tanase e apenas tanase tiveram valor aproximado com as concentrações obtidas por processo convencional de prensagem (600-1000 ppm) de acordo com (CHOO, 1994; PEIXOTO, 2004, O'BRIEN, 2004). No entanto, a amostra controle apresentou concentração maior.

WEI PUAH et al., (2007) estudaram as concentrações de tocoferóis no óleo de palma após refino físico e observaram o valor médio de 1273 ± 18 ppm no óleo bruto de palma, 1134 ± 20 ppm após a degomagem, 1095 ± 18 ppm após branqueamento e 1029 ± 18 ppm após a desodorização.

LATIF e ANWAR . (2009) utilizaram tratamento enzimático com várias preparações comerciais para extração aquosa de óleo de girassol e observaram que as amostras apresentavam concentrações de tocoferóis totais maior que a amostra controle, indicando efeito significativo das enzimas no aumento de rendimento de extração de tocoferóis variando de 799-849 mg TT / kg de óleo (ppm) para asmostras enquanto que a controle com 778 ppm.

5.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)

As análises de DPPH foram realizadas nas frações hidrofílicas (metanólica), lipofílicas e totais das amostras de óleo de palma. Os resultados são apresentados na Tabela 23 abaixo:

Tabela 23: DPPH das frações hidrofílica, lipofílica e total das amostras de óleo.

Amostras	Hidrofílico	Lipofílico	Total
P+C	377,8+66 ^a	584,10+51 ^a	728,5+20 ^a
P+C+T	456,1+54 ^a	991,8+217 ^b	854,1+18 ^b
Tanase	754,5+18	791,8+73 ^{ab}	820,7+10 ^b
Térmico	116,1+33 ^b	535,7+67 ^a	542,9+13
Controle	266,1+28 ^{ab}	644,6+47 ^a	756,8+13 ^a

• Resultados expressos como $\mu\text{molET/g}$ óleo *Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); P+C – Pectinase + Celulase; P+C+T- Pectinase + Celulase + Tanase

Os resultados demonstram que a amostra de óleo extraída com Pectinase, Celulase e Tanase teve maior valor de potencial antioxidante da fração lipofílica ($991,8 \pm 217 \mu\text{mol Trolox/g}$ óleo) e total ($854,1 \pm 18 \mu\text{mol Trolox/g}$ óleo). No entanto, não diferiram estatisticamente das amostras Tanase pelo Teste de Tukey para as duas frações. O que indica que a presença da enzima tanase foi significativa para aumento da atividade antioxidante. Para fração hidrofílica, o óleo extraído apenas com Tanase teve maior valor de capacidade antioxidante ($754,5 \pm 186 \mu\text{molET/g}$ óleo) sendo diferente estatisticamente das outras amostras e do Controle.

Somente os valores para fração total e lipofílica devem ser comparados, desde que estes são quantificados utilizando acetato de etila, no caso da fração metanólica, o solvente pode interferir na análise de DPPH (PEREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2006). Deve ser notado que apesar do óleo restante após a extração metanólica não possuir compostos polares, a fração hidrofílica contém tanto compostos polares como compostos de polaridade intermediária (PEREZ-JIMENEZ et al. , 2008).

5.4.1 Correlação entre Fenóis Totais e DPPH

As Figuras 22 e 23 representam a correlação entre Fenóis Totais e DPPH da fração hidrofílica com e sem os valores da amostra Tanase respectivamente.

Quando são correlacionados os valores de todas as amostras, o valor de $r = 0,21$ com $p = 0,43$ sendo não estatisticamente significativo. No entanto, quando são correlacionadas às amostras sem a presença dos valores da amostra Tanase o valor de $r = -0,86$ com $p = 0,0003$ sendo estatisticamente significativa a correlação. Com sentido negativo indicando uma relação linear inversa entre Fenóis Totais e a atividade antioxidante (DPPH).

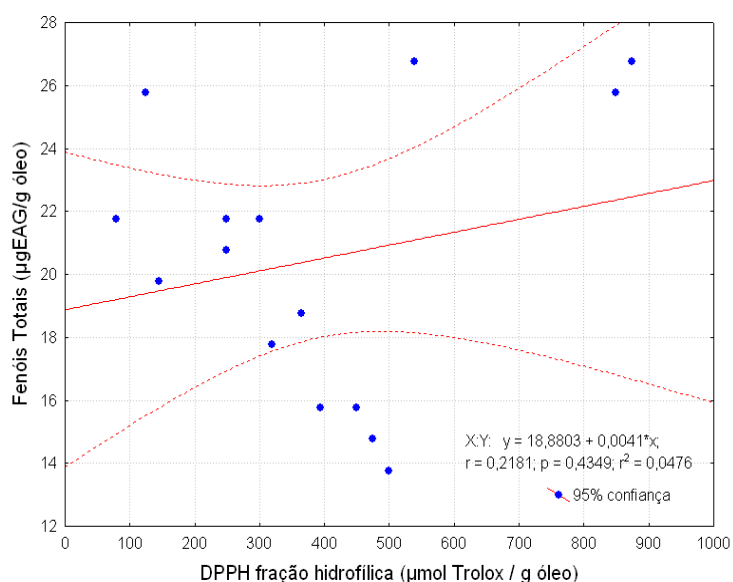


Figura 22: Correlação entre Fenóis Totais e DPPH fração hidrofílica.

Sem a presença dos valores da amostra Tanase a correlação tem valor negativo, indicando efeito contrário do aumento de fenóis totais para o atividade antioxidante da fração hidrofílica.

A análise de polifenóis totais pelo método de Folin ciocalteu é considerada como um método quantitativo de compostos que apresentam fenol na cadeia não identificando os compostos específicos. Porém, alguns compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante diferente entre si, podendo apresentar atividades diferentes em uma mesma concentração de polifenóis totais.

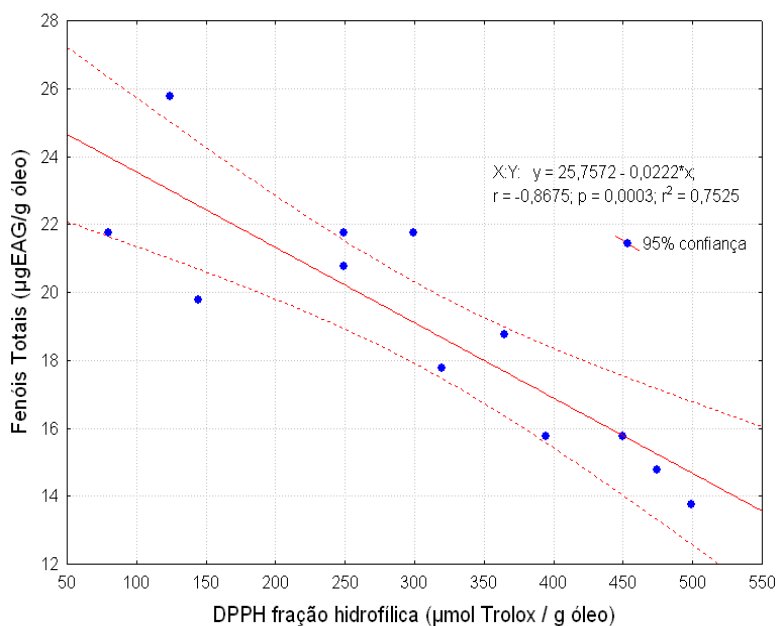


Figura 23: Correlação entre Fenóis Totais e DPPH fração hidrofílica sem os valores da amostra Tanase.

A amostra Tanase apresentou uma tendência contrária às outras amostras sugerindo aumento de atividade antioxidante com a concentração de polifenóis totais, o que pode ter sido ocasionado pela presença de compostos fenólicos diferentes, devido à hidrólise enzimática, diferente das outras amostras.

Além disso, é possível também que existam compostos presentes no extrato hidrofílico com características polares como proteínas e fosfolipídios que possam interferir na atividade antioxidante ou na determinação de polifenóis totais.

Para uma melhor investigação do efeito dos polifenóis do óleo de palma na atividade antioxidante é necessário uma metodologia analítica mais precisa e específica como HPLC/DAD, determinando o perfil fenólico do extrato.

5.4.2 Correlação entre Carotenóides Totais e DPPH

As Figuras 24, 25 e 26, apresentam as correlações entre Carotenóides Totais e DPPH para frações total, lipofílica e hidrofílica respectivamente.

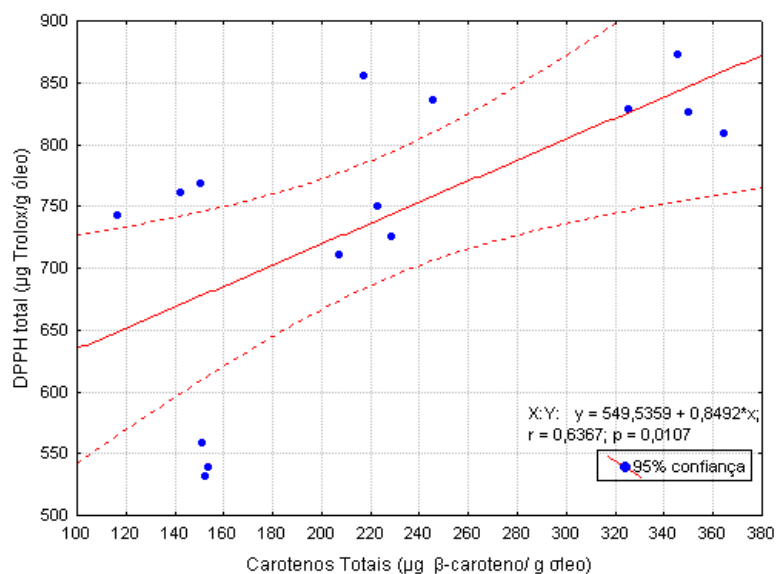


Figura 24: Correlação entre carotenos totais e DPPH fração total óleo

De acordo com as Figuras 24, 25 e 26, é possível observar que a concentração de carotenóides totais apresentou correlação significativa positiva para a atividade antioxidante (DPPH) das frações total, lipofílica e hidrofílica com coeficiente de correlação $r = 0,63$, $r = 0,70$ e $r = 0,9$ respectivamente.

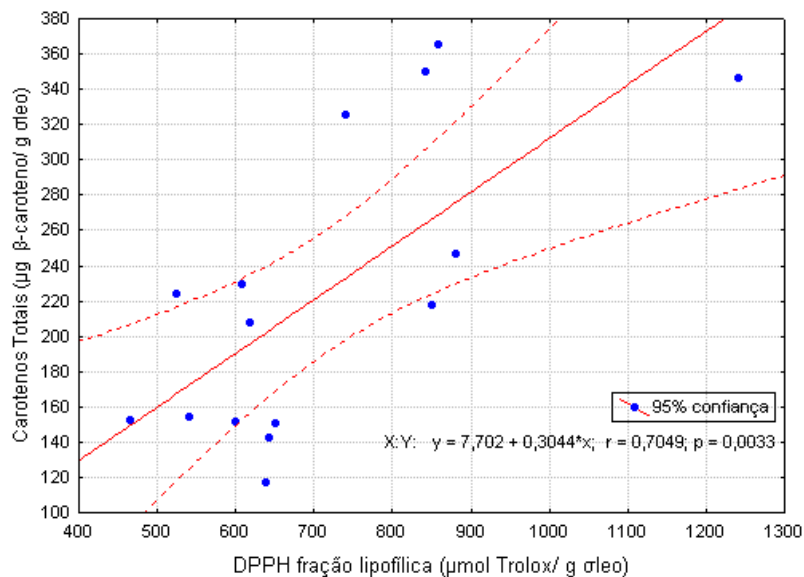


Figura 25: Correlação entre carotenos totais e DPPH fração lipofílica.

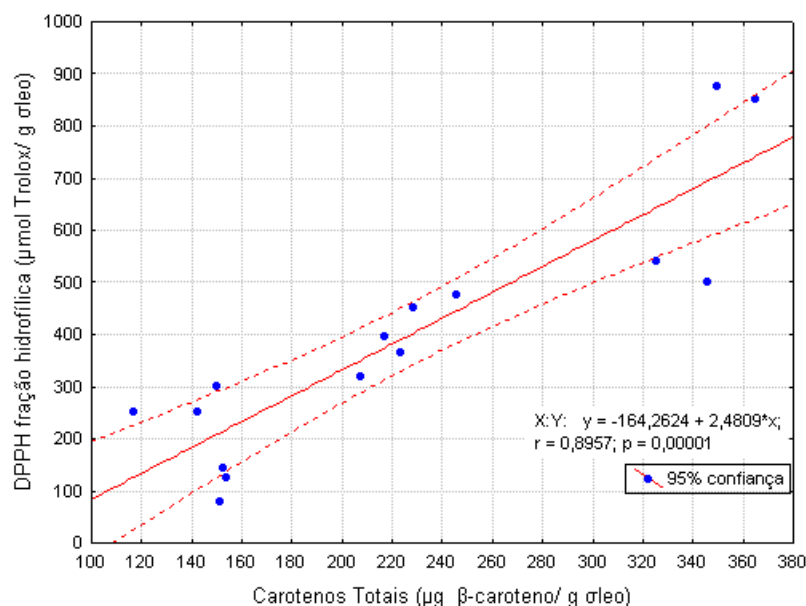


Figura 26: Correlação entre carotenos totais e DPPH da fração hidrofílica.

A correlação mais significativa foi com a fração hidrofílica que corresponde ao extrato metanólico obtido do óleo. Devido à apolaridade dos carotenóides, não é considerada a presença destes na fração hidrofílica do óleo.

De acordo com KRINSKY (1993), a atividade antioxidante de carotenóides em soluções orgânicas é relacionada à concentração de oxigênio, estrutura química dos carotenóides e a presença de outros antioxidantes (polifenóis e tocoferol).

KIOKIAS e OREOPOULOU, (2006) estudaram os efeitos antioxidantes de extratos naturais de carotenóides em emulsões óleo-em-água de girassol (utilizando radical solúvel em água) analisando a formação de hidroperóxidos e verificaram que carotenóides com características polares tinham atividade antioxidante maior. Além disso, verificaram que a mistura de luteína ou β-caroteno com isômeros de tocoferol aumentaram a atividade antioxidante dos carotenóides individuais.

CANO et al., (2003) avaliaram a fração hidrofílica e lipofílica de tomates e verificaram que o licopeno apresentava correlação positiva com atividade antioxidante pelo método ABTS utilizando Trolox como padrão ($r = 0,91$ para $p < 0,05$).

Não foi verificada correlação direta entre Tocoferóis Totais e DPPH (todas as frações). No entanto, não é possível afirmar pois apenas um dado foi obtido das concentrações de tocoferol. Alguns estudos indicam que os tocoferóis apresentam correlação direta e positiva com atividade antioxidante, além disso, são considerados como um potente antioxidante lipofílico.

ROSSI et al., (2007) avaliaram a estabilidade de tocoferóis de diferentes amostras de óleos comerciais durante processo de fritura e verificaram uma correlação positiva entre Tocoferóis Totais e atividade antioxidante (DPPH) com valor de $r = 0,94$.

Para estudar a correlação entre as duas variáveis é necessária uma investigação do efeito dos isômeros de tocoferol isoladamente, pois na literatura é reportado que α -tocoferol tem menor atividade antioxidante, no entanto apresenta maior atividade de vitamina E (BELITZ e GROSCH, 1999; ROSSI et al., 2007).

HUANG et al.,(1994) observaram que a 100 ppm de concentração, α -tocoferol teve maior atividade antioxidante em óleo de milho quando comparados com γ -tocoferol. No entanto, em concentrações maiores que 250 ppm, α -tocoferol começa a apresentar efeitos pró-oxidantes e o tocoferol com melhor atividade em concentrações acima de 1000 ppm foi γ -tocoferol (SILVA et al., 2010).

A falta de correlação entre as duas variáveis pode ser devido à presença de interferentes das análises que estão presentes nas amostras de óleo bruto de palma e poucos dados de concentração de tocoferol.

5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.5.1 Cor, Acidez e Estabilidade oxidativa

As características físico químicas obtidas das amostras de óleo de palma estão representadas na Tabela 24:

Tabela 24: Análises de cor, ácidos graxos livres e estabilidade oxidativa.

Amostras	Cor (vermelho)	Cor (amarelo)	Estabilidade Oxidativa (horas)	AGL (%)¹
P+C	8,4	70	5,35 ^a	1,3 ^a
P+C+T	12,8	70	5,81 ^a	1,72 ^a
Tanase	13,8	70	5,52 ^a	1,48 ^a
Térmico	9,8	70	5,89 ^a	1,38 ^a
Controle	14,1	51	6,2 ^a	1,51 ^a

P+C – Pectinase+Celulase; P+C+T – Pectinase+Celulase+Tanase. Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de confiabilidade.

¹ Ácidos Graxos Livres (% ácido palmítico)

Na Tabela 24 são observados os resultados para as análises de cor, realizadas em duplicata e estabilidade oxidativa (Rancimat) e porcentagem de ácidos graxos livres (AGL %) realizadas em triplicata. A amostra Controle apresentou maior intensidade da cor vermelha (13,8), enquanto a amostra Pectinase+Celulase apresentou menor valor (8,4). Para cor amarela, observou-se que apenas a amostra Controle apresentou valor inferior às outras amostras (51).

Para análise de estabilidade oxidativa (Rancimat), é possível verificar que o tratamento enzimático não teve efeito significativo de acordo com o teste de Tukey a 5% de confiabilidade. A Figura 27 representa a correlação entre Tocoferóis Totais e Estabilidade Oxidativa para as amostras de óleo.

Foi observada uma correlação linear positiva entre as duas variáveis com $r = 0,81$ sendo estatisticamente significativa a 90% de confiança. Isso indica uma possível dependência da concentração de tocoferóis para obter maior estabilidade oxidativa.

APARICIO et al., (1999) estudaram a influência de polifenóis totais, tocoferóis e relação oleico/linoleico para a estabilidade oxidativa (Rancimat) do óleo de oliva e

verificaram que polifenóis totais foi a variável mais significativa, seguida da relação oleico/linoleico e α -tocoferol como variáveis com menor influência sobre a estabilidade oxidativa do óleo de oliva. Além disso, verificou que as amostras com maior estabilidade também apresentavam maiores valores de taxa oleico/linoleico, maior concentração de clorofila, carotenóides totais e α -tocoferol.

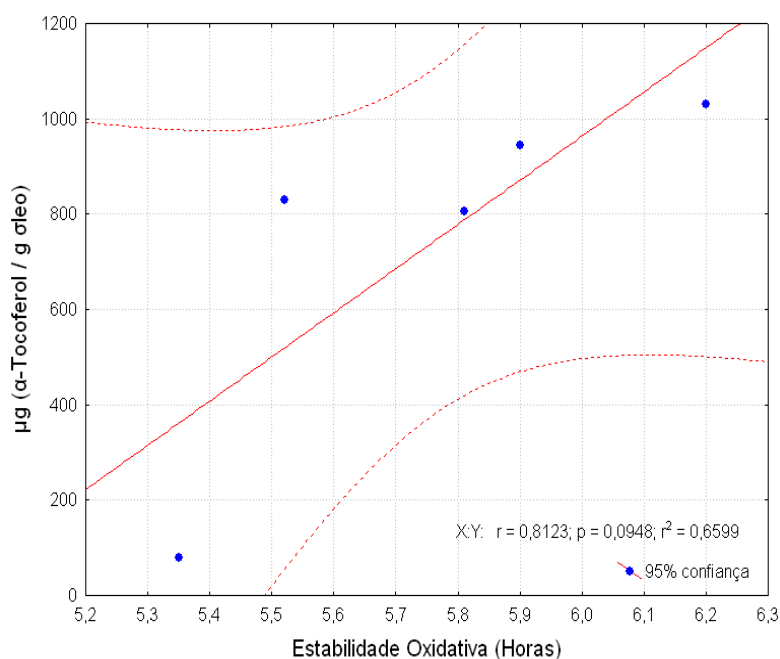


Figura 27: Correlação entre Tocoferóis Totais e Estabilidade Oxidativa.

Na Figura 28 é representada a correlação entre carotenos totais e estabilidade oxidativa que apresentou valor negativo indicando inversa proporcionalidade entre as duas variáveis ($r = -0,64$). No entanto, essa correlação não foi estatisticamente significativa.

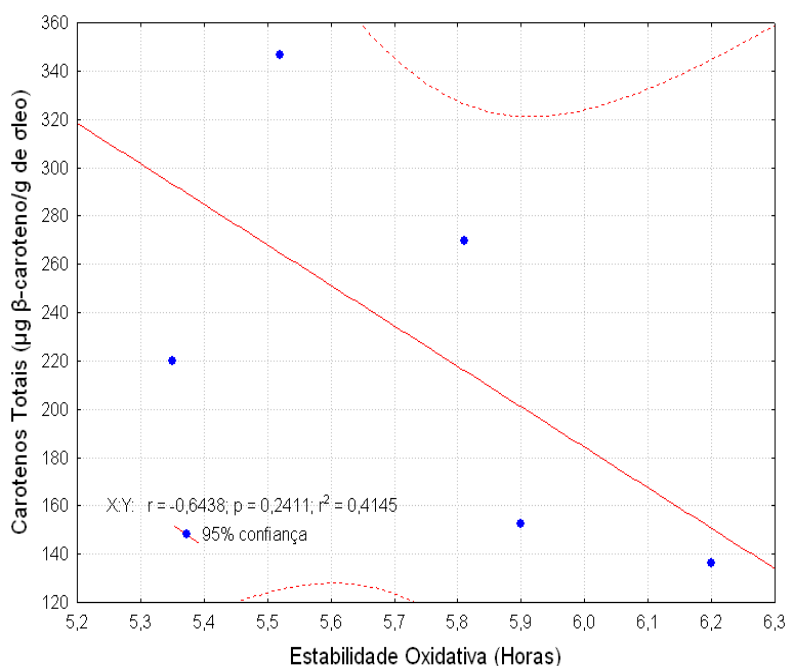


Figura 28: Correlação entre carotenos totais e estabilidade oxidativa.

Alguns trabalhos relacionam a estabilidade oxidativa de óleos com carotenóides devido à presença de licopeno. MONTESANO et al., (2006) reportaram que a adição de 0,5% de licopeno em 1% de azeite de oliva extra virgem preservaram os carotenóides presentes durante o tempo de estocagem devido à proteção de polifenóis e α -tocoferol.

Alguns trabalhos mostram que β -caroteno atua como pró-oxidante durante a oxidação lipídica tanto na luz (TERAO et al., 1980) quanto no escuro (SUZUKI, USUKI, & KANEDA, 1989).

Não foi verificada correlação entre a estabilidade oxidativa e atividade antioxidante (DPPH). O ensaio DPPH é baseado na eliminação do radical cromógeno DPPH; a desvantagem principal deste ensaio é que este radical, que é um radical nitrogênio estável disponível comercialmente não tem qualquer semelhança aos altamente reativos, como os radicais transientes formados na peroxidação lipídica (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

BENAKMOUM , (2008) avaliaram a adição de extrato de polpa de tomate com licopeno em óleo de oliva refinado e óleo de girassol e verificaram aumento de

atividade antioxidante (DPPH) das amostras, no entanto, os resultados não tiveram correlação com estabilidade oxidativa (Rancimat).

KOPRIVNJAK et al., (2008) avaliaram o efeito da adição de fosfolipídios em óleo de oliva e analisaram a atividade antioxidante (DPPH) e a estabilidade oxidativa (Rancimat) e verificaram que o aumento de concentração de fosfolipídios diminuiu a atividade antioxidante enquanto que a estabilidade oxidativa aumentou obtendo uma correlação linear positiva ($r = 0.9849$). Além disso, verificou que o aumento da concentração de lecitina também aumentou a concentração de Tocoferóis Totais.

5.5.2 Perfil de Ácidos Graxos

Na Tabela 25 são apresentados valores dos perfis de ácidos graxos realizados em duplicata para as amostras de óleo de palma:

Tabela 25: Perfil de ácidos graxos das amostras de óleo de palma.

Ácidos Graxos (%)	P+C	P+C+T	Tanase	Térmico	Controle
C 12:0	0,02	0,02	-	0,02	0,02
C 14:0	0,82	0,72	0,63	0,87	0,87
C 16:0	46,78	48,94	46,16	46,02	46,02
C 16:1	0,16	0,18	0,17	0,15	0,15
C17:0	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09
C 18:0	4,39	3,67	4,42	4,73	4,73
C 18:1	37,61	35,71	38,59	38,21	38,21
C 18:2	9,61	10,14	9,58	9,35	9,35
C 18:3	0,32	0,31	0,31	0,34	0,35
C 20:0	0,21	0,21	0,18	0,2	0,21

- P+C – Pectinase+Celulase; P+C+T - Pectinase+Celulase+Tanase

Os dados referentes à composição dos ácidos graxos obtidos apresentados na Tabela 24, na qual observa-se que os ácidos em maiores concentrações foram o palmítico e oleico, respectivamente, de acordo com a composição peculiar do óleo de palma e estão de acordo com os dados do perfil da AGROPALMA (2009). Também é possível observar que os processos não modificaram o perfil de ácidos graxos do óleo de palma. Na Tabela 26 é observada a relação entre ácido oleico e linoleico.

Tabela 26: Relação das concentrações de ácido oleico e linoleico.

Ácido Graxo/Amostra	P+C	P+C+T	Tanase	Térmico	Controle
C 18:1*	37,61	35,71	38,59	38,21	38,21
C 18:2*	9,61	10,14	9,58	9,35	9,35
C18:1/C18:2	3,91	3,52	4,03	4,09	4,09

*Valores em porcentagem para teor total de ácidos graxos presente no óleo. P+C – Pectinase+Celulase; P+C+T – Pectinase+Celulase+Tanase.

Os valores da relação entre as médias de oleico e linoleico demonstram que as amostras Tanase, Térmico e Controle apresentaram maior teor de linoleico em relação ao oleico.

A Figura 28 representa a correlação entre ácidos graxos livres (AGL) e a relação oleico/linoleico. Essa correlação apresentou valor negativo de $r = - 0,7$ no entanto não foi significativa estatisticamente. O sentido negativo indica uma relação de inversa proporcionalidade entre as duas variáveis. O aumento de ácidos graxos livres (AGL) é responsável pela diminuição no valor de ácidos graxos polinsaturados (C18:2) que são os mais suscetíveis à hidrólise.

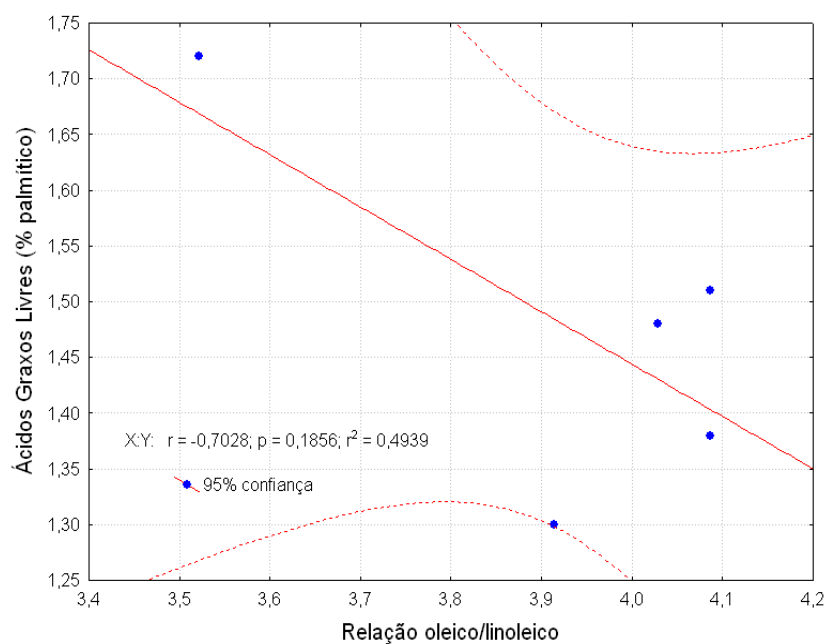


Figura 29: Correlação entre ácidos graxos livres e relação oleico/linoleico.

Na figura 29 é observado a correlação entre atividade antioxidante (DPPH fração lipofílica) e relação oleico/linoleico que apresentou correlação negativa ($r = -0,81$) indicando um decaimento na atividade antioxidante com o aumento da relação oleico/linoleico.

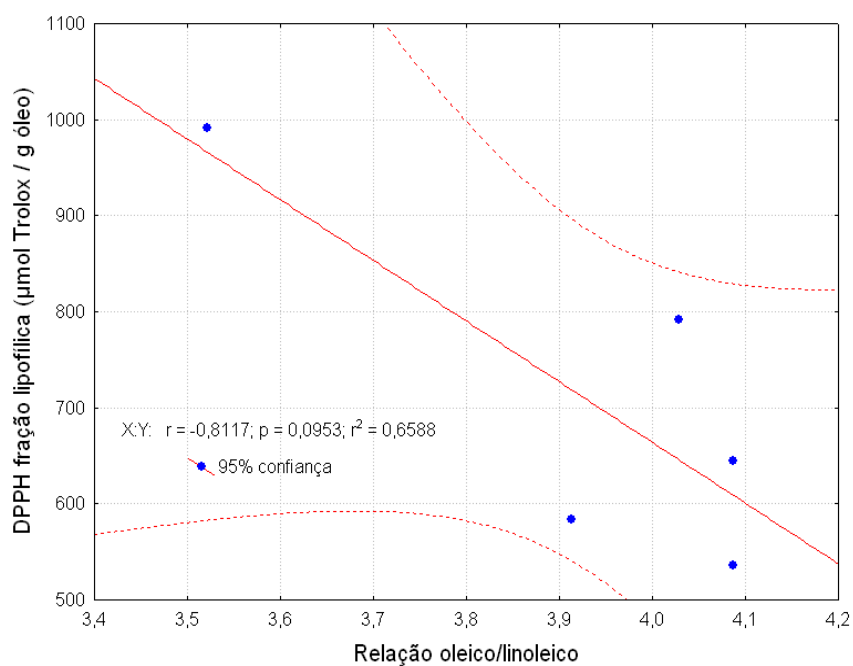


Figura 30: Correlação entre relação oleico/linoleico e DPPH fração lipofílica.

A atividade antioxidante é medida pela reação de neutralização do radical DPPH durante determinado tempo, gerando uma diferença de concentração da inicial que é expressa como a concentração equivalente a um antioxidante sintético (Trolox) capaz de neutralizar uma certa concentração de DPPH. Considerando a matriz óleo, esse radical não necessariamente reagirá apenas com os antioxidantes presentes na matriz, podendo reagir com ácidos graxos polinsaturados (moléculas reativas devida às insaturações) que serão oxidados pelo DPPH e conseqüentemente neutralizando o radical, indicando uma diminuição da concentração de DPPH e induzindo à conclusão de aumento de atividade antioxidante.

De acordo com SIMONNE e EITENMILLER, (1998), tocoferóis e tocotrienóis parecem degradar mais rápido em óleos com maior fração de ácidos graxos saturados. Na verdade, pode ser suposto que, no caso de óleos contendo altos níveis de ácidos graxos polinsaturados, as duplas ligações que determinam a insaturação competem com tocoferóis e tocotrienóis como substratos para oxidação, determinando um decaimento mais lento desses antioxidantes.

Não foi verificado correlação entre a relação oleico/linoleico e estabilidade oxidativa (Rancimat) do óleo de palma no presente estudo.

APARICIO et al., (1999) verificaram que a relação oleico/linoleico apresentava efeito positivo na regressão para modelo preditivo que reproduz os dados de estabilidade oxidativa (Rancimat) de óleo de oliva.

CECI e CARELLI , (2010) avaliaram a estabilidade oxidativa de azeite de oliva proveniente da Argentina e verificaram que o efeito da relação oleico/linoleico era maior que o do Polifenóis Totais para a estabilidade oxidativa do óleo.

5.6 REGRESSÃO MÚLTIPLA

Os dados obtidos para concentrações de Carotenóides Totais e Tocoferóis Totais tiveram correlação direta significativa com a Estabilidade Oxidativa (Rancimat) e por isso foram submetidos à regressão múltipla para verificar um

possível modelo preditivo para representar a Estabilidade Oxidativa a partir das concentrações desses compostos antioxidantes. Na Figura 31 é ilustrada a superfície de resposta que representa a regressão:

Carotenóides:Tocoferóis:Rancimat: Multiple R(z/xy) = 0,9819; p = 0,0359
 Rancimat = 5,8004-0,0023*x+0,0007*y R² = 0,964

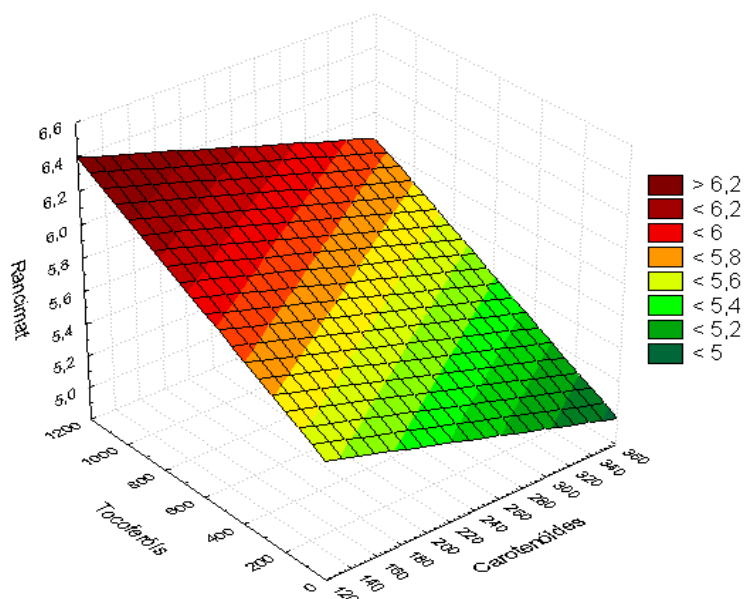


Figura 31: Regressão múltipla entre Carotenóides e Tocoferóis para resposta Rancimat.

Na Tabela 27 são apresentados os valores dos coeficientes para a equação de regressão:

Tabela 27: Valores dos coeficientes para Regressão Múltipla.

Parâmetros	B	Erro Padrão de B	p
	5,800449	0,167268	0,000831
Carotenóides	-0,002313	0,000560	0,053825
Tocoferóis	0,000730	0,000117	0,024830

*Significativo a 5% de confiabilidade. R² = 0,964 ; R² ajustado = 0,928

Os coeficientes obtidos para regressão foram significativos estatisticamente a 90% de confiança. Para 95%, apenas Tocoferóis foi significativo. Os efeitos das concentrações desses compostos são significativos para a Estabilidade oxidativa do óleo de palma extraído por processo aquoso térmico ou enzimático. Na Tabela 28 estão representados os dados da Análise de Variância para regressão:

	Soma dos Quadrados	gL	Média dos Quadrados	Fcalc	Ftab	p
Regressão	0,422782	2	0,211391	26,863	19	0,036
Resíduos	0,015738	2	0,007869			
Total	0,438520					

GL – Graus de liberdade. Fcalc – Valor de F calculado. Ftab – Valor de F tabelado. Confiabilidade de 5%.

A Análise de Variância (ANOVA) revela que a Regressão foi significativa em relação aos Resíduos, demonstrando que o modelo apresentou baixos desvios para os pontos experimentais, permitindo concluir que o modelo pode ser considerado como preditivo para a resposta Estabilidade Oxidativa, de acordo com as condições de contorno empregadas no presente estudo.

APARICIO et al., (1999) avaliaram os efeitos de compostos antioxidantes para estabilidade oxidativa do azeite de oliva (variedades *Picual* e *Hojiblanca*) medida por Rancimat. Uma regressão linear baseada na relação oleico/linoleico e concentrações de fenóis e tocoferóis mostrou boa correlação (R^2 ajustado = 0,91 para *Hojiblanca* e 0.95 para *Picual*) com a estabilidade (Rancimat). O efeito da concentração de fenóis foi maior (50%) para a estabilidade seguido da relação oleico/linoleico (27%), Tocoferóis (9%) e 14% para variável não identificada. Além disso, concluíram que 78% da estabilidade é explicada pelo efeito combinado das variáveis fenóis e relação oleico/linoleico.

6 CONCLUSÕES

- A operação de pré-tratamento enzimático teve resultados de rendimento de extração aquosa de óleo de palma maiores que o tratamento térmico obtendo resultados superiores a 90% do teor total de lipídeos na polpa.
- A Tanase apresentou atividade em matriz lipídica, possivelmente hidrolisando compostos fenólicos, aumentando a extração de polifenóis de menor cadeia solubilizados na fração aquosa do sistema devido à polaridade desses compostos.
- A atividade antioxidante teve aumento significativo com o tratamento enzimático com a enzima Tanase.
- As amostras extraídas com a enzima Tanase apresentaram maior valor de concentração de carotenóides totais indicando possível efeito da enzima na extração desses compostos. Além disso, tiveram correlação positiva com a atividade antioxidante.
- Os valores de estabilidade oxidativa apresentaram correlação direta positiva com os valores de Tocoferóis Totais e negativa com os Carotenóides Totais. O tratamento enzimático não teve efeito significativo sobre a estabilidade oxidativa medida pelo Rancimat.
- O tratamento enzimático permite utilizar temperaturas mais brandas e por isso evita a degradação de compostos fenólicos além do menor consumo de energia no processo.
- A adição de enzimas aplicadas combinadas a um processo mecânico de prensagem convencional pode aumentar o rendimento de extração de óleo e de compostos antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 197-216, 2000.

AHMED, M.K.; DAUN, J.K.; PRZYBYLSKI, R. FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2005, 18, 359-364.

AHRENS, D. Comparison of tray, thin-film deodorization. **International news on fats, oils and related materials**, v.9, no. 6, p. 566-576, 1998.

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FVAELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 296-302, 2001a.

AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; RAMÍREZ-CORONEL, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p. 47-59, 2007.

AGROPALMA www.agropalma.com.br , 2009. Acessado em Janeiro de 2010.

AGUILAR, C. N.; AUGUR C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.26, p. 296- 302, 2001a.

AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, v.7, p. 373-382, 2001b.

AISSAM, H.; ERRACHIDI, F.; PENNINGCKX, M. J.; MERZOUKI, M.; BENLEMLIH, M. Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and olive mill waste waters. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p. 609-614, 2005.

ALIAKBARIAN, B., DE FAVERI, D.; CONVERTI, A; PEREGO, P. Optimisation of olive oil extraction by means of enzyme processing aids using response surface methodology . **Biochemical Engineering Journal**, v.42, p. 34–40, (2008).

ANDRIKOPOULUS, N. K., KALOGEROPOULOS, N., ZERVA, A., ZERVA, U., HASSAPIDOU, M., KAPOULAS, V. M. . Evaluation of cholesterol and other nutrient parameters in Greek cheese varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.155–167, 2003.

AOCS. **American Oil Chemists Society**. “Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists’ Society”. 5° edition, Champaign, 2002.

AOAC (**Association of Official Analytical Chemists**) Official of analysis. 16ed. 3 rev. Washington, 1997.

APARICIO, R., RODA, L.,ALBI, M. A, GUTIERREZ, F. Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat . **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.4150–4155 , 1999.

ASBRAM (Associação Brasileira das Indústrias de Suplementos Minerais). Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível na Internet : <http://www.asbram.org.br>

AU YEUNG, K.J.; SMITH, A. ZHAO, A.; MADDEN, K.B.; ELFREY, J.; SULLIVAN, C.; LEVANDER, O.; URBAN, J.F.; SHEA-DONOHUE, T.; **Experimental Parasitology** , v.109, p.201-208, 2005.

BALCHEN, S.; GANI, R.; ADLER-NISSEN, **Journal of Deodorization Principles**, v.10, n.3, p. 245 – 262, 1999.

BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal of Basic Microbiology**. v.41, n.6, p.313-318, 2001.

BASIRON, Y. HUI, Y.H. Palm Oil. In: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 5 ed., v.2, New York: John Wiley & Sons, p.271-377, 1996.

BATRA, A.; SAXENA, R. K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry**, v.40, p. 1553-1557, 2005.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p. 63-72, 2004.

BATTESTIN, V., PASTORE, G., MACEDO, G.. Optimizing the fermentation broth for tannase production by a new isolated strain *Paecilomyces variotii*. In **Abstracts of the 12th European Congress in Biotechnology** . Denmark, Copenhagen. Journal of Biotechnology, p.118, S.49, (2005)

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Purification and biochemical characterization of tannase from a newly isolated strain of *Paecilomyces variotii*. **Food Biotechnology** v.21, p. 207-216, 2007a.

BELITZ, H. D., GROSCH, W. **Lipids**. In **Food chemistry** (2nd ed., pp. 152–236). Berlin: Springer (1999).

BELMARES, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; CORONEL, A. R.; AGUILAR, C. N. Microbial production of tannase: an enzyme with

potential use in food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, p. 857-864, p. 2004.

BENAKMOUM, A., ABBEDDOU, S., AMMOUCHE, A., KEFALAS ,P., GERASOPOULOS, D. Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste . **Food Chemistry**, v.110, p.684–690 , (2008).

BHAT, M. K. Cellulases related enzymes in biothecnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.355-383, 2000

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v.37, p.911–917, (1959).

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p.497-503, 2001.

BRAVO. C. E. C.; de CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24 (edição especial), p.137-152, 2000

CANO, A., ACOSTA, M., ARNAO, M.B. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) . **Postharvest Biology and Technology**, v.28, p.59-65, (2003).

CAHOON EB, HALL S.E, RIPP K.G, GANZKE T.S, HITZ W.D, COUGHLAN S.J Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. **Nature Biotechnology**, v.21, p.1082-1087, (2003)

CALDER, P. C. Immunoregulatory and antiinflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 4, p. 467-490, 1998a.

CARPITA, N.C.; GILBEAUT D.M, Structural Models of Primary Cell Walls in Flowering Plants: Consistency of Molecular Structure with the Physical Properties of the Walls during the Growth. **The Plant Journal**, v.3, p.1-30, 1993

CECI, L. N. CARELLI, A. A. Relation Between Oxidative Stability and Composition in Argentinian Olive Oils . **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.87, p.1189–1197 , (2010).

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

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1995. 451p

COST (Coopération Européenne dans le domaine de la recherche scientifique et technique). **Methods for the determination of vitamins in food**. Edited by BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. Elsevier Applied Science Publishers, London. p. 23-32. 1991.

D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa**. 165 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DEBIER, C.; KOVACS, C.; LYDERSEN, C.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y Vitamin E and vitamin A contents, fatty acid profiles, and gross composition of harp and hooded seal milk through lactation. **Canadian Journal of Zoology**, v.77, p.952-958, 1999.

DE FAVERI, D., ALIAKBARIAN, B., AVOGADRO, PEREGO, M.P., CONVERTI, A. Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulations: effect of different enzymatic activities and concentrations, **Biochemical Engineering Journal**. v.41, p.149–156, (2008).

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Review of Food Science and Nutrition.**, v. 40, p.173-289, 2000.

DESCHAMPS, A. M.; OTUK, G.; LEBEAULT, J. M. Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v.61, p. 55-59, 1983.

DRESCHER, M.; PETER, S. & WEIDNER, E. Investigations on Physical Refining of Animal fats and Vegetable Oils, **Fett/Lipid**, v.101, n.4, p.138-141, 1999.

DUGGAL, A. **Solvent extraction characteristics of dehusked soy cotyledons and soy flakes**. Unpublished M.Sc. thesis. Department of Food Science and Technology, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, India, (1987).

EDWARD, P.A, LEMONGELLO, D; KANE, J; SHECHTER, I; FOGELMAN, A.M. Properties of purified rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and regulation of enzyme activity. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.3715–25, 1980.

EITENMILLER, R.; LEE, J. **Vitamin E: food chemistry, composition and analysis**. New York: Marcel Dekker, p.530, 2004.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: www.embrapa.br . Acesso em 25/04/2009.

ESKIN, N. A. M.; SNAIT, T. **Dictionary of nutraceuticals and functional foods. Functional foods and nutraceuticals series**, n° 8. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis.. p. 479-482 2006.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; VILLAÑO, D.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.101-108, 2006.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**.v.31, p.605, 2005,

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p.228-265, 2004.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v.57, p.51-55 ,1996.

FREITAS, S. P. CABRAL, L. C. ; HARTMAN, Leopold . Economic evaluation of soymilk production: comparative study of two processes. **Alimentaria (Madrid)**, Madrid - Espanha, v. 281, p. 97-107, 1996.

GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, 1311-1319, 1994

GOMES, C. A. O; PINTO, G. A. S.; TERZI, S. C.; FREITAS, S. P. ; COURI, S. Aqueous Enzymatic Extraction of Peach Palm Oil . **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5: p.211-216, 2002 .

GOODWIN C.D, COOPER B.W, MARGOLIS S. Rat liver cholesterol 7 α -hydroxylase. Modulation of enzyme activity by changes in phosphorylation state. **Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.4469 –4472, 1982.

GUEDES, A. M. M. Estudo da extração de óleo da polpa de tucumã por CO₂ supercrítico. **Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** – Univerisade Federal do Pará. Belém, 2006.

HANDAYANI, A. D., SUTRISNO, INDRASWATI, N., ISMADJI , S. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic . **Bioresource Technology**. v.99, p.4414–4419 , (2008).

HANMOUNGJAI, P., PYLE, L., NIRANJAN, K. Extraction of rice bran oil using aqueous media . **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** ,v.75, p.348-352, (2000).

HIRAYAMA, O., et al. Singlet oxygen quenching ability of naturally-occurring carotenoids. **Lipids**, Champaign, v. 29, n. 2, p. 149-150, 1994.

HORNERO-MÉNDEZ, D.; MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; Bioaccessibility of carotenes from carrots: effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Science Emerging Technology**, v. 8, p.407-412, 2007.

JIANG, L., HUA, D., WANG, Z., XU , S. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. **Food and Bioproducts Process.** doi:10.1016/j.fbp.2009.08.002, (2009).

KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R.; **Bioresource Technology**, v.77, p.215, 2001.

KASHYAP, M.C., AGRAWAL, Y.C. ,GHOSH, P.K., JAYAS, D.S., SARKAR, B.C., SINGH, B.P.N. Oil extraction rates of enzymatically hydrolyzed soybeans . **Journal of Food Engineering**, v.81, p.611–617 , (2007).

KIM, H. K. Aqueous extraction of oil from palm kernel. **Journal of Food Science** v.54, p.491-492 , 1989.

KIOKIAS, S.; GORDON, M. H. Antioxidant Properties of Carotenoids *in vitro* and *in vivo*. **Food Reviews International**, v. 20, n. 2, p. 99–121, 2004.

KIOKIAS, S., OREOPOULOU, V. Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions . **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.7, p.132 – 139 , (2006).

KOPRIVNJAK, O., ŠKEVIN, D., VALIC, S., MAJETIC, V. PETRICEVIC, S. LJUBENKOV , I. The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids . **Food Chemistry**, v.111, p.121–126 , (2008).

KRINSKY, N. I. Actions of carotenoids in biological systems. **Annual Review of Nutrition**, v.13, p.561–587, (1993).

KREMER, J. M. n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 3495-3515, 2000.

KUMAR, R.; SHARMA, J.; SINGH, R. Production of tannase from *Aspergillus rubber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. **Microbiological Research**, v.162, p. 384-390, 2007

LAMPI, A. M.; KAMAL-ELDIN; PIIRONEN. Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains, LLC. In: SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, M.L. ed. **Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects**. Boca Raton: CRC Press, Chapter 1, 2002. 432p.

LAW, M. R. Plant sterol and stanol margarines and health. **British Medical Journal**, v.320, p.861–864, (2000).

LATIF, S.; ANWAR, F. Effect of Aqueous Enzymatic Processes on Sunflower Oil Quality . **Journal of American Oil Chemist's Society**. v.86, p.393–400 , (2009).

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, 2002, in press

LINS, R. T. **Determinação de tocoferóis e carotenóides em frutas amazônicas: implantação de uma metodologia** /Roseana Telles Lins 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2006.

MACEDO, G. A .; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V.; Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos . **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 29, n. 4, p. 833-838, 2005.

MACHLIN, L. J. Vitamin E. In: MACHLIN, L. J. Handbook of vitamins. New York: Marcel Dekker, p. 99-145, 1984.

MADEIRA JUNIOR, J. V. Estudo da produção simultânea de fitase e tanase por *Paecilomyces variotii* e detoxificação de resíduos agroindustriais para reuso em ração animal / José Valdo Madeira Junior Dissertação (mestrado) – **Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.** -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ-CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ-SONOJA, R.; SANCHEZ, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. **Appl. Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p.484-488, 2003

MARIANO, R.G.B. **Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) por processos convencionais combinados com tecnologia enzimática.** Dissertação (mestrado) – UFRRJ, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008.

MATOS H. R., et al. Lycopene and β -carotene protect in vivo iron-induced oxidative stress damage in rat prostate. **Brazilian Journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 2, p. 203-210, 2006.

MOHAPATRA, P. K.; MAITY, C.; RAO, R. S.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. **Food Research International**, v.42, p. 430-435, 2009.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B. R. Colorimetric assay method for determination of the Tannin Acyl Hidrolase activity. **Analytics Biochemistry**, [S.I.], v. 295, p. 168-171, 2001.

MONTESANO, D., COSSIGNANI, L., D'ARCO, G., SIMONETTI, M. S., & DAMIANI, P. Pure lycopene from tomato preserves extra virgin olive oil from natural oxidative events during storage. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.83, p.933–941, (2006).

MORTENSEN , A. Analysis of a complex mixture of carotenes from oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit extract . **Food Research International**, v.38, p.847–853 , (2005).

MURPHY, D. J. **Plant Lipids: Biology, Utilisation and Manipulation**. 1st Ed., 2005; Blackwell Publishing.

NAJAFIAN. L , A. GHODSVALI B, M.H., HADDAD KHODAPARAST C, L.L. DIOSADY Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes **Food Research International**, v.42, p.171–175, (2009).

NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.P. **Composição de ácidos graxos de óleo de açaí obtido através de extração aquosa enzimática**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 30, n.2, p. 498-502, 2008.

NEO, Y., ARIFFIN, A., TAN, C., TAN, Y. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts . **Food Chemistry**, v.122, p.353–359, (2010).

NESTEL, P.J. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 1, p. 228S-231S, 2000.

NOVOZYMES. **Alcalase food grade**. Special Food 08281-01, 2001.

NOVOZYMES. **Celluclast 1,5L FG**. Special Food 08524-01, 2001.

OBATA, T., IWATA, H., NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. Lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2387-2394, 1977.

O'BRIEN, R.D. **Fats and Oils – Formulating and Processing for Applications**. Ed. Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, p. 251- 326, 1998.

O'BRIEN, R.D. **Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications, 2 ed.**, New York: CRC Press, 2004.

PAPADOPOULOS, G., BOSKOU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.68, n.9, p.669-671, 1991.

PASSOS C. P., SULE YILMAZ A, C. M. SILVA A, MANUEL A. COIMBRA
Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail **Food Chemistry**, v.115, p.48–53, (2009).

PEIXOTO, C. A. **Recuperação de tocoferóis do destilado da desodorização do óleo de palma, Fracionamento com dióxido de carbono supercrítico**. Campinas,SP [s.n.]. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2004.

PELLEGRINI, N.; VISIOLI, F.; BURATTI, S.; BRIGHENTI, F.; **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.2532-2538, 2001.

PEREZ-JIMENEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791–800, (2006).

PEREZ-JIMENEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DIAZ-RUBIO, M. E., SERRANO, J. ,GONI, I.,SAURA-CALIXTO , F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results . **Food Research International**, v.41, p.274–285 , (2008).

PRATT, D.E. Natural antioxidants from plant material. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, p.1720-1722, 1979.

PRYDE, E.H. Composition of Soybean Oil. In: ERICKSON, D.R. **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**, Champaign: AOCS Books, p.13-31, 1995.

PUROHIT, J. S.; DUTTA, J. R.; NANDA, R. K.; BANERJEE, R. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v.97, p. 795-801, 2006.

RAMOS, L. P., BREUIL, C., KUSHNER, D. J., SADDLER, J. N. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. **Holzforschung**, v.46, p.149-154,1992.

RANALLI, A., DE MATTIA, G., Characterisation of olive oil produced with a new enzyme processing aid. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.74, p.1105–1113, (1997).

RITTNER, H. In: **Óleo de palma: processamento e utilização**. São Paulo, 1ed., 320p., 1996.

RODRIGO, N.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; **Journal of Chromatography A**, v.947, p.97-102. 2002.

RODRIGUES, A.M.C; DARNET, S.H; SILVA, L.H. Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocayumvulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripi*) Fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society** (impresso), v. 21, p.2000-2004, (2010)

RODRIGUES, T. H. S.; DANTAS, M. A. A.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Tannase production by solid-state fermentation of cashew apple bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136-140, p. 675-688, 2007.

RODRIGUES-AMAYA, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, Washington, DC: OMNI Research ILSI Press, 1999, 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review . **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.726–740 , (2010).

RODRÍGUEZ, H.; RIVAS, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MUÑOZ, R. Characterization of tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p. 92-98, 2008.

ROSENTHAL A, PYLE D.L, NIRANJAN K, Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.402-420, (1996).

ROSENTHAL, A.; PYLE, D.L.; NIRANJAN, K.; GILMOUR, S.; TRINCA, L. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 6, p. 499-509, 2001.

ROSSI, M., GIANAZZA, M., ALMPRESE, C., STANGA, F. The Effect of Bleaching and Physical Refining on Color and Minor Components of Palm Oil. **Journal of American Oil Chemical Society**. V.78, no.10, p.1051-1055, 2001.

ROSSI, M., ALAMPRESE, C., RATTI , S. Tocopherols and tocotrienols as free radical-scavengers in refined vegetable oils and their stability during deep-fat frying. **Food Chemistry**, v.102, p.812–817, (2007) .

ROWLEY, B. I., BULL, T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 879-899, 1977.

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

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

SAMBANTHAMURTHI, R. SUNDRAM, K. , TAN, Y.A. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research** , Oxford, v.39, p.507-558, 2000.

SAN ANDRÉS, M. P., OTERO, J., VERA. S. High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of α -, γ -, δ -tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/n-propanol in mobile phase. **Food Chemistry**, v.126, p.1470-1474, (2011).

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A . Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas v. 25, p.132-138, março 2005.

SCHONS, P. F. Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico. Dissertação de Mestrado – **UNICAMP-FEA**, 2009.

SEGEL, I. H. (1979). *Bioquímica*, Rio de Janeiro, 2ª ed., Livros Técnicos e Científicos, p.527.

SHANKAR, D.; AGRAWAL, Y.C.; SARKAR, B.C.; SINEH, B.P.N. Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatments to soybean for enhanced oil availability and recovery. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 74, n. 12, p. 1543-1547, 1997.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Statistical optimization for tannase production from *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p. 132-138, 2007

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresource Technology**, v.99, p. 2544-2551, 2008.

SILVA, L. L. **Avaliação do efeito do sal volátil carbamato de amônio sobre a estabilidade de enzimas**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

SILVA, L., PINTO, J., CARROLA, J , PAIVA-MARTINS, F. Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. **Food Chemistry**. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.001 , (2010).

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista da Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1,Jan. 2002 .

SOTO, C.; CHAMY, R.; ZÚNIGA, M.E. Enzymatic hidrolisis and pressing conditions effect on borage oil extraction by cold pressing. **Food Chemistry**, v.102, p.834–840, 2006.

SOUZA, J. C. **Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de suco de uva e da norbixina** / Jane Cristina de Souza. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

STATSOFT, INC. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.

STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., Comparison of the antioxidant activity of aspalathin modification of low-density lipoprotein that increase (Aspalathus linearis), α -tocopherol, BHT and BHA. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.632-638, 1997

SU, Q.; ROWLEY, K. G.; BALAZS, N. D. H. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. **Journal of Cromatography A**, v. 781, 393-418, 2002.

SUBAGIO, A., MORITA, N. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. **Food Research International**, v.34, p.183–188, (2001).

SUZUKI, T., USUKI, R., & KANEDA, T. The role of carotenoids in the oxidative deterioration of edible oils. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, v.38, p.486–491, (1989).

SWERN, D. Composition and Characteristics of Individual Fats and Oils. In: MATTIL, K. F.; NORRIS, F. A.; STIRTON, A. J. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 3 ed., New York: John Wiley & Sons, p.165-247, 1964.

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Dohler designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial technology**, v. 25, p.411-419, 1999.

TERAO, J., YAMAUCHI, R., MURAKAMI, H., & MATSUSHITA, S. Inhibitory effects of tocopherols and β -carotene on singlet oxygen-initiated photooxidation of methyl linoleate and soybean oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.4, p.79–93, (1980).

TREVIÑO-CUETO, B.; LUIS, M.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILERA, A.; AGUILAR, C. N. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). **Bioresource Technology**, v.98, p. 721-724, 2007.

TUBEROSO, C. I.G., KOWALCZYK, A., SARRITZU, E., CABRAS, P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. **Food Chemistry**, v.103, p.1494–1501, (2007).

TURATTI, J.M. PASOTRE, G.M.; **Extração de Óleos Vegetais Utilizando-se Enzimas no Pré-tratamento das Sementes**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP. [s.n], 1999.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais** / Mariana Uenojo. – Campinas, SP: [s.n.], Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2003.

UENOJO, M. **Biotransformação de β -caroteno para produção de compostos de aromas norisoprenóides** / Mariana Uenojo. -- Campinas, SP: [s.n.], Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2008.

VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production. **Process Biochemistry**, v.40, p. 1773-1782, 2005.

VAN DEN BERG, H., et al. The potential for the improvement of carotenoids levels in food and the likely systemic effects. **Journal of the science food and agriculture**, Chichester, v. 80, n. 7, p. 880-912, 2000.

VELASCO J, DOBARGANES C. Oxidative stability of virgin olive oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.104, p.661–676, 2002.

VIERHUIS, E. et al. Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.1218–1223, (2001).

VON GADOW, A., JOUBERT, E., HANSMANN, C.F. Effect of extraction time and additional heating on the antioxidant activity of Rooibos tea. (*Aspalathus linearis*) extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.1370-1374, 1997.

WADA, J.K.A. **Produção de gorduras alimentícias zero trans utilizando óleo de palma, estearina de palma e óleo de soja totalmente hidrogenado** / Joyce Kazue Alves Wada. Campinas, SP: [s.n.], Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2007.

WALSH, L., WINTERS, R.L., GONZALEZ, R.G. **Optimizing deodorizer distillate tocopherol yields**. Inform, v.9, no.1, p. 78-83, 1998.

WEI PUAH, C., Y. MAY CHOO, NGAN MA, A., HOCK CHUAH, C. The Effect of Physical Refining on Palm Vitamin E (Tocopherol, Tocotrienol and Tocomonoenol) . **American Journal of Applied Sciences**, v.6, p.374-377, 2007

WINTERHALTER, P.; ROUSEFF, R. Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. Carotenoid-Derived Aroma Compounds. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: **American Chemical Society**, p.1-17, 2002.

WOERFEL, J.B. Soybean Oil Processing Byproducts and their Utilization. In: ERICKSON, D.R., **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**, Champaign: AOCS Books, p.306-313, 1995.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, p.825-830, 2000.

ZORN, H.; SCHULER, M.; BERGER, R. G. Pyruvate decarboxylase catalysed formation of terpenoid α -hydroxy ketones. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 21, n. 6, p.341-347, 2003.