



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

**ESTUDO DA COMBINAÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS NO
RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO AQUOSA DO ÓLEO DA POLPA de *Euterpe
oleracea* Martius**

ERIKA DE SOUZA FERREIRA

Belém/PA
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

**ESTUDO DA COMBINAÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS NO
RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO AQUOSA DO ÓLEO DA POLPA de *Euterpe
oleracea* Martius**

ERIKA DE SOUZA FERREIRA

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Christelle Anne Nicole Paule Herman.

Belém/PA
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Ferreira, Erika de Souza, 1982-

Estudo da combinação de preparações enzimáticas no rendimento de extração aquosa do óleo da polpa de *Euterpe oleracea* Martius / Erika de Souza Ferreira. - 2016.

Orientador: Christelle Anne Nicole Paule Herman.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2016.

1. Açai - Extração aquosa. 2. Óleos vegetais - Açazeiro. 3. Biotecnologia. I. Título.

CDD 22. ed. 634.6

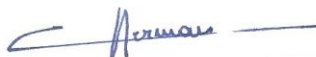
**ESTUDO DA COMBINAÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS NO
RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO AQUOSA DO ÓLEO DA POLPA de *Euterpe
oleracea* Martius**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christelle Anne Nicole Paule Herman.

APROVADA EM: 23/03/2016

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Christelle Anne Nicole Paule Herman
(ICB/UFPA – Orientadora)



Prof.^a Dr.^a Luciana Pereira Xavier
(ICB/UFPA – Membro)



Prof.^a Dr.^a Carmelita de Fátima Amaral Ribeiro
(CCNT/UEPA – Membro)



Prof. Dr. Luis Adriano Santos do Nascimento
(ICB/UFPA – Membro)

*A meu pai (in memoriam) por toda a
dedicação e força que sempre
dispensou à família.*

AGRADECIMENTOS

Esse é um trabalho em que muitas pessoas estiveram envolvidas para que eu conseguisse ter êxito ao final. Uma jornada de 24 meses, que apesar do impulso em desistir algumas vezes, a vontade de concluir mais essa etapa na minha vida superou as dificuldades encontradas.

Agradeço a Deus pela força e amparo em todos os momentos.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe e a minha irmã, por toda a dedicação e atenção dispensada a mim diariamente.

Aos professores por transmitirem e compartilharem seus conhecimentos.

A minha orientadora, Christelle Herman, por ter apostado e acreditado desde o início em mim, por toda a atenção e disponibilidade que sempre teve quando eu precisei, por todo o conhecimento repassado.

Aos amigos, Daniela Cavalcante, Ana Seráfico e Nilson Pinheiro que me inspiraram e incentivaram para que eu encarasse este desafio.

Ao prof. Adriano Nascimento pelo empréstimo do solvente nos momentos finais das análises.

À equipe CVACBA, que direta ou indiretamente contribuiu de alguma forma durante a execução do trabalho, em especial aos colegas que me ajudaram na cansativa tarefa do despulpamento do açaí (Wesllem Sodré, Daniel Silva, Hélber Costa, Bruna Aguiar, Elaine Santos, Josilene Serra, Mariah Nascimento). À Elaine, obrigada ainda pela disponibilidade em me acompanhar e também fazer a coleta e transporte do fruto para mim (em suas muitas viagens a Abaetetuba!). Ao sr. Lúcio Silva por toda atenção e solicitude ao abrir as portas de sua casa para realizarmos as coletas. À Leidiany Ramos por também trazer outra parte dos frutos (eram muitos!). E ao Hélber pela ajuda na estatística.

Aos colegas Cláudio Gibson, pela ajuda prestada no laboratório (em pleno sábado) e Eric Mesquita, por todo o auxílio nas análises iniciais.

À Lúcia Gomes por toda a solicitude sempre que precisei e à Telma Costa pela gentileza em disponibilizar o laboratório para que fosse possível iniciar os ensaios.

Ao Sr. Mário Carneiro por toda a ajuda e explicações durante as extrações no soxhlet e às colegas Milena Passo e Gleice Vasconcelos por facilitarem o acesso ao uso de equipamentos dos laboratórios em que trabalham.

Ao colega Risaldo Amaral, que no início de todas as minhas atividades no laboratório (que eu não sabia por onde começar), foi quem me auxiliou.

Ao colega Saulo Souza pela ajuda com os equipamentos e materiais do laboratório (principalmente na shaker!).

À amiga Edneida Lopes, que se mostrou uma irmã, não medindo esforços para que eu pudesse entender da melhor forma o processo da extração do óleo de açaí durante vários finais de semana.

À Mariah Nascimento, que foi minha ajudante e parceira, auxiliando muito na etapa de separação do óleo durante longos finais de semana.

Ao colega Iuri Souza e ao Prof. Sérgio Pinto pelas horas dispensadas a me ajudar no “Abstract”.

Ao Heitor Barreiros pelo incentivo em não perder o foco na reta final.

Ao meu eterno amigo Eduardo Cordeiro, pelo incentivo, amizade e ajuda de sempre.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Todos fizeram parte dele e o tornaram possível.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

RESUMO

O óleo dos frutos do açazeiro (*Euterpe oleracea*) possui um perfil lipídico benéfico para a saúde com um alto teor de ácidos graxos mono e poli-insaturados, além de substâncias antioxidantes, o que propicia sua valorização na indústria. A extração aquosa de óleos vegetais com o auxílio de enzimas vem sendo amplamente utilizada devido aos benefícios frente aos processos tradicionais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar a melhor combinação de preparações enzimáticas que permitisse maximizar o rendimento de extração aquosa do óleo de frutos de açazeiro a partir da polpa. A polpa de açai foi obtida a partir de frutos coletados em Abaetetuba na safra de 2015. Quatro preparações enzimáticas comerciais (Novozymes) foram utilizadas: Celluclast 1,5L (celulase); Viscozyme L (endo 1,3(4) β -glucanase, xilanase, celulase e hemicelulase); Ultrazym AFP (pectino liase, celulase e poligalacturonase); e Shearzyme 500L (endo 1,4-xilanase). Os ensaios de extração do óleo de açai foram realizados através de um processo desenvolvido neste trabalho com os seguintes parâmetros: granulometria média da polpa de açai de 0,75 cm; matéria-seca global da mistura aquosa da polpa de 15%; concentração enzimática individual de 1% (w:w) em base da polpa; agitação orbital constante de 100 rpm e manual vigorosa a cada 30 minutos; tempo e temperatura de incubação de 4 horas e 50°C, respectivamente. As preparações enzimáticas foram testadas individualmente (1x1) em quadruplicata, ou combinadas (2x2; 3x3 e 4x4) em triplicata, totalizando 89 ensaios. O controle negativo apresentou um rendimento médio de extração de 34,91 \pm 11,81%, sendo o mais baixo de todos os ensaios. Os ensaios realizados com as preparações enzimáticas isoladas permitiram um incremento do rendimento de extração em até 36,66% em relação ao controle negativo, confirmando o papel importante das enzimas no processo de extração aquosa. Os ensaios realizados com as preparações enzimáticas combinadas 3x3 e 4x4 aumentaram o rendimento de extração em até 99,05% em relação ao controle negativo, demonstrando a importância de utilizar combinações de preparações enzimáticas. Entre os diferentes ensaios realizados, a combinação de preparações enzimáticas que teve destaque foi Celluclast 1,5 L, Viscozyme L e Ultrazym AFP por facilitar a recuperação do óleo com um desvio padrão reduzido (\pm 3,01%). Além disso, o rendimento de extração com o uso desta combinação de três preparações enzimáticas é estatisticamente igual ao rendimento de extração usando as quatro preparações enzimáticas, o que se torna interessante para a indústria, pois há redução de custo no processo.

Palavras-chave: Extração aquosa; óleo vegetal; *Euterpe oleracea*; enzimas carboidratases.

ABSTRACT

The oil of the açai palm tree (*Euterpe oleracea*) fruits has a beneficial lipid profile for health with a high content of mono and polyunsaturated fatty acids, besides antioxidant substances, which provides its appreciation on the industry. The aqueous extraction of vegetable oils supported by enzymes has been widely used because of its benefits compared to the traditional processes. In this context, this work aims to identify the best combination of enzymatic preparations, which would maximize the aqueous extraction yield of the oil of the açai palm tree fruits from the pulp. The açai pulp was obtained from fruits collected in Abaetetuba during the 2015 crop. Four commercial enzymatic preparations (Novozymes) were used: Celluclast 1,5L (cellulase); Viscozyme L (endo 1,3(4) β -glucanase, xylanase, cellulase and hemicellulase); Ultrazym AFP (pectin lyase, cellulase and polygalacturonase); and Shearzyme 500L (endo 1,4-xylanase). The tests of açai oil extraction were performed by a process developed in this work with the following parameters: mean granulometry of the açai pulp of 0,75 cm; global dry matter of the aqueous mixtures of the pulp of 15%; individual enzymatic concentration of 1% (w:w) on pulp basis; constant orbital agitation of 100 rpm and vigorous agitation by hand every 30 minutes; incubation time and temperature of 4 hours and 50°C, respectively. The enzymatic preparations were tested individually (1x1) in quadruplicate, or combined (2x2; 3x3 and 4x4) in triplicate, totaling 89 tests. The negative control presented a mean yield of extraction of 34,91 \pm 11,81%, the lowest of all the tests. The tests performed with the isolated enzymatic preparations have enabled an increase of the extraction yield up to 36,66% compared to the negative control, confirming the important role of the enzymes in the aqueous extraction process. The tests performed with the enzymatic preparations combined 3x3 and 4x4 have increased the extraction yield up to 99,05% compared to the negative control, demonstrating the importance of using the combinations of enzymatic preparations. Among the different tests performed, the enzymatic preparations that stood out are Celluclast 1,5 L, Viscozyme L and Ultrazym AFP by facilitating the oil recovery with a reduce standard deviation (\pm 3,01%). Furthermore, the extraction yield using this combination of three enzymatic preparations is statistically equal to the extraction yield using the four enzymatic preparations, which becomes interesting to the industry due to the cost reduction in the process.

Keywords: Aqueous extraction; vegetable oil; *Euterpe oleracea*; carbohydratases enzymes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Fluxograma do processo de extração do óleo de açaí. | 14 |
| Figura 2: Tamanho médio das partículas das amostras liquidificadas em diferentes tempos. | 22 |
| Figura 3: Tamanho médio das partículas das amostras liquidificadas com diferentes volumes de água durante 120 segundos. | 23 |
| Figura 4: Tamanho médio das partículas das amostras liquidificadas em diferentes tempos com adição de 20ml de água. | 23 |
| Figura 5: Rendimento da extração de óleo de açaí em função do tempo de decantação para amostras sem ou com enzima, e sem ou com tratamento térmico. | 24 |
| Figura 6: Rendimento da extração de óleo de açaí em função do tipo de agitação: agitação mecânica sem ou com agitação manual associada para amostras sem ou com enzima, e sem tratamento térmico. | 24 |
| Figura 7: Efeito do pré-tratamento térmico sobre o rendimento do óleo de açaí para amostras sem ou com enzima. | 25 |
| Figura 8: Efeito do uso do banho de gelo sobre o rendimento do óleo de açaí para amostras com enzima | 26 |
| Figura 9: Rendimento da extração de óleo de açaí em função de combinações das quatro preparações enzimáticas comerciais. | 27 |
| Figura 10: Influência da concentração enzimática (1%/enzima versus 1% total) no rendimento de extração do óleo de açaí | 30 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Preparações enzimáticas comerciais | 13 |
| Tabela 2: Testes preliminares..... | 15 |
| Tabela 3: Ensaio enzimáticos | 19 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|-----------------------------------------------|
| SE | Sem enzima |
| CE | Com enzima (no caso, a Protex 1.5L) |
| C | Celluclast 1.5L |
| V | Viscozyme L |
| U | Ultrazym AFP |
| S | Shearzyme 500L |
| P | Protex 1.5 L |
| CP | Celluclast + Protex |
| CV | Celluclast + Viscozyme |
| CU | Celluclast + Ultrazym |
| CS | Celluclast + Shearsyme |
| VU | Viscozyme + Ultrazym |
| VS | Viscozyme + Shearsyme |
| US | Ultrazym + Shearzyme |
| CVU | Celluclast + Viscozyme + Ultrazym |
| CVS | Celluclast + Viscozyme + Shearzyme |
| VUS | Viscozyme + Ultrazym + Shearzyme |
| CUS | Celluclast + Ultrazym + Shearzyme |
| CVUS | Celluclast + Viscozyme + Ultrazym + Shearzyme |
| C/TTO | Com tratamento térmico |
| S/TTO | Sem tratamento térmico |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 3 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 3 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 3.1. Óleos vegetais comestíveis e suas características nutricionais | 4 |
| 3.2. Açaizeiro e seus frutos | 4 |
| 3.3. Características do óleo de açaí..... | 5 |
| 3.4. Métodos de extração de óleos vegetais | 6 |
| 3.5. Extração enzimática em meio aquoso de óleo vegetal | 7 |
| 3.6. Enzimas da parede celular..... | 7 |
| 3.7. Parâmetros do processo de extração enzimática em meio aquoso | 9 |
| 4. MATERIAL E MÉTODO | 12 |
| 4.1. Matéria-prima e sua caracterização | 12 |
| 4.2. Preparações enzimáticas | 12 |
| 4.3. Estratégia geral do trabalho..... | 13 |
| 4.4. Testes preliminares | 15 |
| 4.5. Parâmetros estudados | 16 |
| 4.6. Processo de extração enzimática em meio aquoso | 17 |
| 4.7. Combinação das preparações enzimáticas..... | 19 |
| 4.8. Concentração enzimática total..... | 21 |
| 4.9. Análise estatística | 21 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 22 |
| 5.1. Testes preliminares..... | 22 |

| | |
|--------------------------------------------------------|----|
| a) Granulometria | 22 |
| b) Tempo de decantação | 23 |
| c) Tipo de agitação | 24 |
| d) Pré-tratamento térmico | 25 |
| e) Velocidade do resfriamento..... | 25 |
| 5.2. Ensaio enzimáticos | 26 |
| 5.3. Influência da concentração enzimática total | 29 |
| 6. CONCLUSÃO | 31 |
| 7. PERSPECTIVAS | 31 |
| REFERÊNCIAS | 32 |

1. INTRODUÇÃO

No cenário mundial a população vem conquistando uma maior longevidade e para que essa conquista seja acompanhada de qualidade de vida, a antiga relação entre uma alimentação saudável e a saúde dos indivíduos voltou a ter destaque. Os compostos bioativos presentes nos alimentos, principalmente os de origem vegetal, vêm sendo objeto frequente de pesquisas (Folly et al., 2014; Ikeda et al., 2010; Lira et al., 2009).

Nesse contexto, os frutos do açazeiro (*Euterpe oleracea* Martius), na forma de polpa e/ou suco, vêm sendo bastante estudados por suas características nutricionais que proporcionam efeitos positivos à saúde, como proteção cardiovascular e ação anti-inflamatória (Portinho et al., 2012). Dentre outros elementos, esses benefícios são obtidos pelo perfil lipídico composto de ácidos graxos mono ou poli-insaturados além de antioxidantes naturais. Entre estes, os mais abundantes no óleo de açaí são o α -tocoferol (67%) e os tocotrienóis, os quais evitam o estresse celular oxidativo e previnem a oxidação lipídica do óleo (Mai et al, 2013; Rocha et al, 2007; Rogez, 2000; Lubrano et al, 1994).

Os métodos comumente aplicados para extração de óleo vegetal são físicos ou químicos, mediante a utilização de solventes orgânicos, prensa, CO₂ supercrítico, etc. Apesar de possuírem alto rendimento, eles são de difícil manipulação, possuem custo elevado e no caso dos solventes ainda acarretam impacto ambiental desfavorável (Li et al, 2014; Hagenmaier et al, 1975; Eapen et al., 1966; Subramanian, 1959).

Neste contexto, a extração enzimática em meio aquoso tem se mostrado um processo promissor a nível industrial. Esse método consiste na utilização de enzimas com atividade específica, determinada em função da composição bioquímica da matriz vegetal. Na maioria dos casos, empregam-se enzimas que inicialmente hidrolisem a parede celular, rica em lignocelulose, para a liberação do óleo para o meio aquoso e posteriormente enzimas que desemulsifiquem o complexo proteína-lipídio permitindo assim maior recuperação e pureza do óleo (Rosenthal, 1996).

Mediante as boas perspectivas de estudos preliminares do grupo de pesquisa sobre o processo mencionado, esse trabalho visa identificar a melhor combinação de preparações enzimáticas no processo de extração enzimática em meio aquoso do óleo de

açaí a partir dos seus frutos, mediante o uso de quatro preparações enzimáticas comerciais (Celluclast 1,5L, Viscozyme L, Shearzyme 500L e Ultrazym AFP).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar a melhor combinação de preparações enzimáticas no processo de extração enzimática em meio aquoso de óleo de frutos de *Euterpe oleracea* visando maior rendimento de extração de óleo.

2.2. Objetivos específicos

- Propor e ajustar uma metodologia completa e reprodutível de extração enzimática de óleo de açaí a partir de metodologias encontradas na literatura científica e mediante a realização de testes preliminares;
- Identificar a melhor combinação de preparações enzimáticas dentre as quatro preparações enzimáticas comerciais (Celluclast 1.5L; Viscozyme L; Shearzyme 500L e Ultrazym AFP) utilizadas de forma isolada ou combinada e expostas aos mesmos parâmetros (tempo, temperatura, concentração enzimática e velocidade de agitação) no processo de extração do óleo de açaí;
- Avaliar o impacto da concentração total das preparações enzimáticas sobre o rendimento da extração de óleo para as três condições que apresentaram o melhor rendimento de extração no ponto anterior.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Óleos vegetais comestíveis e suas características nutricionais

Os óleos vegetais são substâncias que se apresentam na forma líquida à temperatura ambiente, tendo característica lipofílica. São formados principalmente por produtos de condensação entre uma unidade de glicerol e três unidades de ácidos graxos denominados triacilgliceróis. Estes compõem em torno de 95% do óleo vegetal bruto. Os demais constituintes dos óleos vegetais são mono, diacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolípidios, ceras, além de substâncias chamadas de insaponificáveis, como esteróis, vitaminas, pigmentos, hidrocarbonetos e metais (Belitz & Grosch, 1997).

É sabido que deve haver um equilíbrio entre a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados (cerca de 15%), poliinsaturados (cerca de 10%) e saturados (máximo 10%) em nossa ingestão alimentar, pois dessa forma o aparecimento de doenças dislipidêmicas poderá ser evitado (OMS, 2010).

Os óleos vegetais comestíveis na grande maioria possuem em sua composição os ácidos graxos essenciais, linolênico e linoleico, w-3 e w-6, respectivamente, os quais são importantes precursores de metabólitos em nosso organismo. Além desses ácidos, os óleos vegetais possuem substâncias com características antioxidantes como a vitamina E, protegendo a célula da ação dos radicais livres (Bernaud, 2011; Rogez, 2000).

3.2. Açaizeiro e seus frutos

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Martius) é uma das espécies de palmeiras bastante relevante na economia da Amazônia. O Brasil é o principal produtor, consumidor e exportador do fruto, comumente chamado de “açai”. O açai se expandiu para os territórios internacionais, como Estados Unidos, Japão, China e alguns países da Europa, sendo apreciado principalmente na forma de bebida energética (Nascimento et al., 2008; Palencia et al., 2008).

A composição nutricional da polpa contribuiu para o sucesso do seu consumo, tendo uma combinação de lipídios benéfica à saúde (52,64% em base seca), presença de

compostos fenólicos, particularmente as antocianinas, teor relevante de proteínas (13% em base seca), além da presença de fibras alimentares (34% em base seca), o que propicia diversos benefícios à saúde (Rogez, 2000).

3.3. Características do óleo de açaí

O óleo de açaí é um produto muito interessante para a indústria alimentícia ou cosmética. Sua composição nutricional sugere uma relação com a prevenção de doenças cardiovasculares, além de possuir uma ação anti-inflamatória, o que justifica as constantes pesquisas desse produto (Folly, 2014; Mai et al, 2013; Guerra et al, 2011).

O perfil de ácidos graxos do óleo de açaí é composto por 27,5% de ácidos graxos saturados, 59,8% de ácidos graxos monoinsaturados, e 12,6% de ácidos graxos poli-insaturados. Observa-se a prevalência de ácidos graxos insaturados e entre estes o predomínio do ácido oleico (54,9%) seguido do ácido linoleico (11,5%). Entre os ácidos graxos saturados, os principais são o ácido palmítico (25,9%) e o ácido esteárico (1,6%) (Rogez, 2000).

O óleo de açaí destaca-se ainda pela presença de compostos bioativos em sua composição; entre eles, podemos citar a vitamina E. Este micronutriente possui dois grupos de compostos lipossolúveis intimamente relacionados. Esses grupos se diferenciam na estrutura segundo o número e localização de grupos substituintes no anel cromanol. Dessa forma, a “vitamina E” designa oito diferentes compostos, denominados α , β , γ , δ (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (Rupérez et al, 2001; AIN, 1979).

O α -tocoferol é o mais abundante no óleo da polpa (67% do total de tocoferóis), seguido pelos β -tocotrienol e β -tocoferol e (17% e 15%, respectivamente do total de tocotrienóis e tocoferóis) (Lubrano et al, 1994). É um componente que agrega valor nutricional ao fruto, já que confere proteção às células contra o estresse oxidativo, além de protegê-las contra a peroxidação lipídica (Bernaud, 2011).

A vitamina E em conjunto com a vitamina C, o β -caroteno, o selênio e os flavonoides fazem parte dos antioxidantes que tem despertado grande interesse em pesquisas. O consumo desses nutrientes tem sido associado à prevenção de doenças

neurodegenerativas, inflamatórias, ateroscleróticas, cancerosas e do envelhecimento precoce (Bieri, 2002; Bron e Amis, 2001; Traber et al., 2001).

Durante muito tempo, estudou-se apenas a fração α -tocoferol deste grupo, pois se pensava que era a única responsável por propiciar benefícios à saúde. No entanto, Cunha, 2006, demonstrou que o γ -tocoferol tem efeito preventivo sobre o câncer e evita prejuízos ao cérebro após suas artérias terem sofrido oclusão. Além disso, os tocotrienóis parecem ter efeito positivo no controle do colesterol (Cunha, 2006).

A coloração verde escuro do óleo de açaí se dá pela presença do pigmento clorofila, o qual também parece proporcionar vários benefícios à saúde. No entanto, é importante ressaltar que a manutenção desse pigmento está diretamente relacionada à temperatura ao qual é submetido. O tipo de método aplicado no processo de extração do óleo de açaí deve, portanto contemplar as características relevantes a serem preservadas (Marquez, 2003).

3.4.Métodos de extração de óleos vegetais

Dentre as formas de extração de óleos vegetais, as mais utilizadas são os métodos físicos ou químicos, a partir do uso de solventes orgânicos, prensa, CO₂ supercrítico, etc. Mesmo tendo um rendimento de extração importante, esses métodos são de difícil manipulação, possuem alto custo e no caso dos solventes ainda são prejudiciais ao meio ambiente (Li et al, 2014; Hagenmaier et al, 1975; Eapen et al, 1966; Subramanian, 1959).

Nesse contexto, a extração em meio aquoso de óleos vegetais com o auxílio de enzimas vem sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos, seja na extração do óleo como também de seus compostos bioativos (vitaminas, compostos fenólicos, carotenoides) (Yusoff et al, 2015). Esta prática pode ser associada ao uso de micro-ondas ou de congelamento e descongelamento para obtenção de um melhor rendimento de óleo (Sui et al, 2011; Raghavendra et al, 2011).

3.5.Extração enzimática em meio aquoso de óleo vegetal

Esse método consiste na utilização de enzimas com atividade específica, determinadas em função da composição bioquímica da matriz vegetal. Na maioria dos casos, empregam-se enzimas que atuam na hidrólise de ligações glicosídicas, como as da subclasse 3.2 (celulase, hemicelulase ou ainda a poligalacturonase) e da subclasse 4.2 (pectino liase) no intuito de favorecer o aumento da permeabilidade e o rompimento da parede celular, rica em lignocelulose, e promover a liberação do óleo para o meio aquoso (Rosenthal et al, 1996).

Para as matrizes vegetais com alta concentração proteica, como é o caso do açaí, pode-se usar, posteriormente, outro grupo de enzimas da subclasse 3.4 (hidrólise das ligações peptídicas), tais como protease, que desemulsifiquem o complexo proteína-lipídio permitindo assim maior recuperação e pureza do óleo (Yusoff et al, 2015).

A combinação destas preparações enzimáticas vem sendo muito utilizada nestes 5 últimos anos (2010-2015) nos processos de extração enzimática de óleo em meio aquoso de várias matérias-primas vegetais com características semelhantes ao açaí em termos de composição bioquímica (alta concentração de lipídio e proteína). Pode-se citar: farelo de arroz (Hernandez et al, 2000), coco (Sant'Anna et al, 2003; Chen et al, 2003; Raghavendra et al, 2011), germe de milho (Moreau et al, 2004), canola (Latif et al, 2008), girassol (Latif et al, 2009), pitaia (Hanming et al, 2009), amendoim (Jiang et al, 2010), pinhão (Li et al, 2011), sementes de melancia (Sui et al, 2011), gergelim (Latif et al, 2011), , cártamo (Gibbins et al, 2012), bayberry (Zhang et al, 2012), isatis indigoga (Gai et al, 2013), mostarda (Tabtabaei et al, 2013), gac (Mai et al, 2013), abóbora (Jiao et al, 2014), dentre outros, devido à necessidade da indústria ter uma nova abordagem tecnológica por questões de segurança e de regulamentação ambiental (Li et al, 2014). Ver **ANEXO 1** para maiores detalhes.

3.6.Enzimas da parede celular

A parede celular que circunda a célula vegetal é composta principalmente por celulose, hemicelulose, pectina e lignina. As enzimas que trabalham nestes substratos estão listadas abaixo com suas respectivas características (Rosenthal et al, 1996):

a) Celulase

As celulases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases, e são responsáveis por clivarem ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de “x” varia conforme o tipo de celulase avaliada (Anand e Vithayathil, 1989).

Segundo seu local de atuação, as celulases classificam-se em: 1. Endoglucanases (EnG), as quais clivam ligações internas da fibra celulósica; 2. Exoglucanases (ExG), as quais atuam na região externa da celulose; 3. β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (Olsson e Hahn-Hagerdal, 1996).

As Endoglucanases (EnG) são classificadas como EC 3.2.1.4, tendo como nome sistemático, 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase. São responsáveis em iniciar o processo de hidrólise, sendo responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico devido a sua fragmentação em oligossacarídeos (Fracheboud e Canevascini, 1989).

As Exoglucanases (ExG) constituem-se por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A GH (EC 3.2.1.7.4), que tem o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A CBH (EC 3.2.1.9.1) tem nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase. A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, o que acarreta em um aumento na ruptura da célula por tornar as regiões cristalinas do polímero mais expostas às celulases (Olsson e Hahn-Hagerdal, 1996). As β -glicosidases (BG), ou β -glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.2.1), que é seu nome sistemático, apresenta a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (Castro, 2010).

As enzimas do complexo celulolítico, quando atuam em conjunto, apresentam um melhor rendimento, efeito conhecido como sinergia (Olsson e Hahn-Hagerdal, 1996).

b) Hemicelulase

As hemicelulases também pertencem à classe das hidrolases, pertencendo à EC: 3.1 Seu substrato, hemicelulose, é um polímero ramificado. Sua hidrólise ocorre de maneira aleatória, sendo que as enzimas envolvidas nesse processo dividem-se nas que

degradam a cadeia principal e nas que degradam as cadeias laterais (Eriksson et al.; 1990; Kuhad et al.; 1997).

A mistura de um complexo enzimático contendo exo-xilanases, mananases, β -xilosidase, α -glicuronidase e α -arabinofuranosidase se torna necessário para a degradação enzimática das hemiceluloses, pois elas possuem uma estrutura complexa. A 1-4- β -D-xilanase e a endo 1-4- β -D-mananase são as principais degradadoras da hemicelulase. A principal enzima para despolimerização da xilana é a endo-1-4- β -D-xilanase (EC 3.2.1.8), sendo que a ação ocorre em sua cadeia principal (Biely, 1995).

c) **Pectinase**

De acordo com a preferência pelo substrato e o tipo de ação enzimática requerida, as enzimas pécnicas se dividem em 3 grupos: as desesterificantes (pectina esterase) que removem os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases), as quais catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécnicas; e, as protopectinases que solubilizam a protopectina para formar a pectina. Neste trabalho, a enzima pécnica de interesse foi a despolimerizante do tipo “liase” (transeliminativa), que pertence á classificação enzimática EC 4.2. Essas enzimas rompem as ligações glicosídicas, formando galacturonídeos, incluindo as pectina liases e as pectato liases (Uenojo e Pastore, 2007).

A pectina liase (polimetilgalacturonato liase – PMGL) catalisa a β -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico que podem estar mais ou menos esterificados, tendo temperatura ótima entre 40°C e 50°C enquanto a pectato liase (poligalacturonato liase – PGL) realiza a catálise de clivagem de ligações α -1,4 de ácido pécnico, requerendo temperatura ótima de 40°C e 50°C (Uenojo e Pastore, 2007).

3.7. Parâmetros do processo de extração enzimática em meio aquoso

Destacam-se alguns parâmetros importantes que influenciam o processo de extração enzimática de óleos vegetais em meio aquoso. Identifica-se também a faixa de valores comumente utilizada pelos autores citados anteriormente.

1. Proporção de enzima/substrato (~ 2%) – Quanto maior a quantidade de enzima

adicionada, maior será a cinética e a taxa de ruptura de ligações glicosídicas e peptídicas. O aumento da concentração enzimática potencializa a degradação da parede celular e o rompimento das ligações peptídicas. É preciso estar atento, porém aos valores da concentração utilizada, pois se for muito alto, pode acarretar em alteração de sabor com amargor no produto final e/ou no custo do processo (Jiang et al, 2010).

2. Proporção de água na mistura (~ 1:6 w/w) – A água apresenta duas funções: como meio de extração e como regulador da atividade de água da matriz vegetal, auxiliando na mobilidade das enzimas. É necessário que haja uma quantidade adequada de água. Se houver muita umidade haverá interferência na concentração enzimática, reduzindo o rendimento do óleo. Se o teor de água for baixo haverá suspensão espessa de partículas reduzindo também a eficácia das enzimas (Yusoff et al, 2015).

3. Potencial hidrogeniônico do meio (pH) (4,0 a 4,5) – O pH irá variar de acordo com o tipo de enzima utilizada no processo. Cada enzima tem seu pH (ou faixa) ideal para exercer sua atividade máxima. Para a extração de óleo, é necessário avaliar além do pH da enzima a ser utilizada o pH da amostra estudada, pois se o pH da mesma não atuar no pH enzimático, isto agirá como inibidor para a liberação do óleo. Por isso, geralmente é utilizado uma mistura enzimática (Rosenthal et al, 1996).

4. Temperatura (45 a 55°C) - Cada enzima possui uma temperatura (ou faixa) ideal para exercer sua atividade. Tem sido observado que o rendimento do óleo aumenta e sua qualidade melhora quando submetido a temperaturas mais baixas. Isso porque altas temperaturas além de desnaturarem as enzimas, podem formar compostos indesejáveis no óleo (Yusoff et al, 2015).

5. Tempo de incubação (2 à 5h) – Estudos tem demonstrado que um maior tempo de incubação promove um maior rendimento do óleo. No entanto, é preciso se chegar a um tempo viável para ser praticado pela indústria, além do que tempos exaustivamente prolongados interferem na qualidade do óleo (Yusoff et al, 2015).

6. Velocidade de agitação (120 a 200 rpm) – Este é um dos fatores que afetam a ruptura celular, sendo importante chegar a um valor adequado, pois se for muito vagarosa não contribui para a separação do óleo da fase aquosa e se for muito acelerada eleva o consumo de energia, formando também uma emulsão muito estável o que compromete o processo de extração (Abdulkarim et al, 2006; Sharma et al, 2002).

7. Tamanho das partículas – O tamanho também é importante, pois teoricamente

um tamanho reduzido irá favorecer a ação enzimática e conseqüente o rompimento da parede celular, aumentando o rendimento do óleo. As enzimas conseguem romper mais facilmente e em maior proporção a parede celular de partículas menores. Não há um consenso sobre o tamanho ideal. Apesar de ser uma variável importante, a granulometria poucas vezes é estudada (Yusoff et al, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Matéria-prima e sua caracterização

A fase que antecedeu a extração do óleo de açaí foi composta pelas seguintes etapas:

1. Coleta dos frutos: os frutos de açaí foram obtidos no município de Abaetetuba (Pará, Brasil) durante o período de Outubro/2015 (Lote 1) e Dezembro/2015 (Lote 2);

2. Higienização dos frutos – os frutos foram lavados e higienizados em água corrente;

3. Amolecimento do fruto: os frutos foram submetidos a um amolecimento em água pré-aquecida, aproximadamente 40°C;

4. Despolpamento manual: Os frutos sofreram um despolpamento por fricção manual. O pericarpo foi removido por atrito sobre uma peneira grossa, de onde se obteve uns pedaços de polpa de açaí, comumente chamados de decotos;

5. Armazenamento: Foi feito o armazenamento dos decotos a -20°C até a realização dos ensaios de extração enzimática em meio aquoso de óleo de açaí.

A matéria-seca (MS) e o teor de lipídeos totais (LIP) dos decotos dos dois lotes foram determinados através das metodologias oficiais AOCS Cc7-25 e AOCS Bd 3-52, respectivamente.

A determinação da granulometria média foi realizada manualmente por meio de três peneiras com 2,0; 1,0 e 0,3 mm de diâmetro. Foram usados 50g de decotos secos (105°C em estufa com circulação de ar forçada por 24h).

4.2. Preparações enzimáticas

As cinco preparações enzimáticas foram escolhidas em função do pH da mistura de polpa bruta de açaí com água (~ pH 4,7), da temperatura do processo, entre 30°C e 70°C, além do seu perfil de atuação de acordo com a composição do açaí (**Tabela 1**).

Tabela 1: Preparações enzimáticas comerciais

| NOME COMERCIAL | TIPO DE ENZIMA | T (°C) | pH |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|---------|-----------|
| Celluclast 1.5L | Celulase | 50 – 60 | 4.5 – 6.0 |
| Viscosyme L | Endo 1,3(4) β -glucanase, xilanase, celulase, hemicelulase | 40 - 50 | 3.3 – 5.5 |
| Ultrasym AFP | Pectino liase, celulase, poligalacturonase | 35 – 50 | 4.0 – 5.0 |
| Shearsyme 500L | Endo 1,4-xilanase | 55 – 70 | 5.5 – 6.0 |
| Protex 1.5 L | Protease | | |

Fonte: Dados extraídos das fichas técnicas fornecidas pela empresa “Novozymes”.

4.3.Estratégia geral do trabalho

Vários trabalhos já vêm sendo realizados pelo grupo de pesquisa do Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA - UFPA) no que diz respeito ao processo de extração enzimática de óleo de açaí em meio aquoso e permitiram um desenvolvimento parcial do processo de extração. O processo desenvolvido está esquematicamente apresentado na **Figura 1** e realiza-se em aproximadamente 3 dias.

- a) Antes de realizar efetivamente os ensaios enzimáticos, a primeira parte do trabalho dedicou-se a realização de alguns **TESTES PRELIMINARES** (ensaios 1 a 29) visando a obter um processo de extração padrão e reprodutível.
- b) Em um segundo tempo, em base ao processo otimizado, foram realizados os **ENSAIOS ENZIMÁTICOS**.

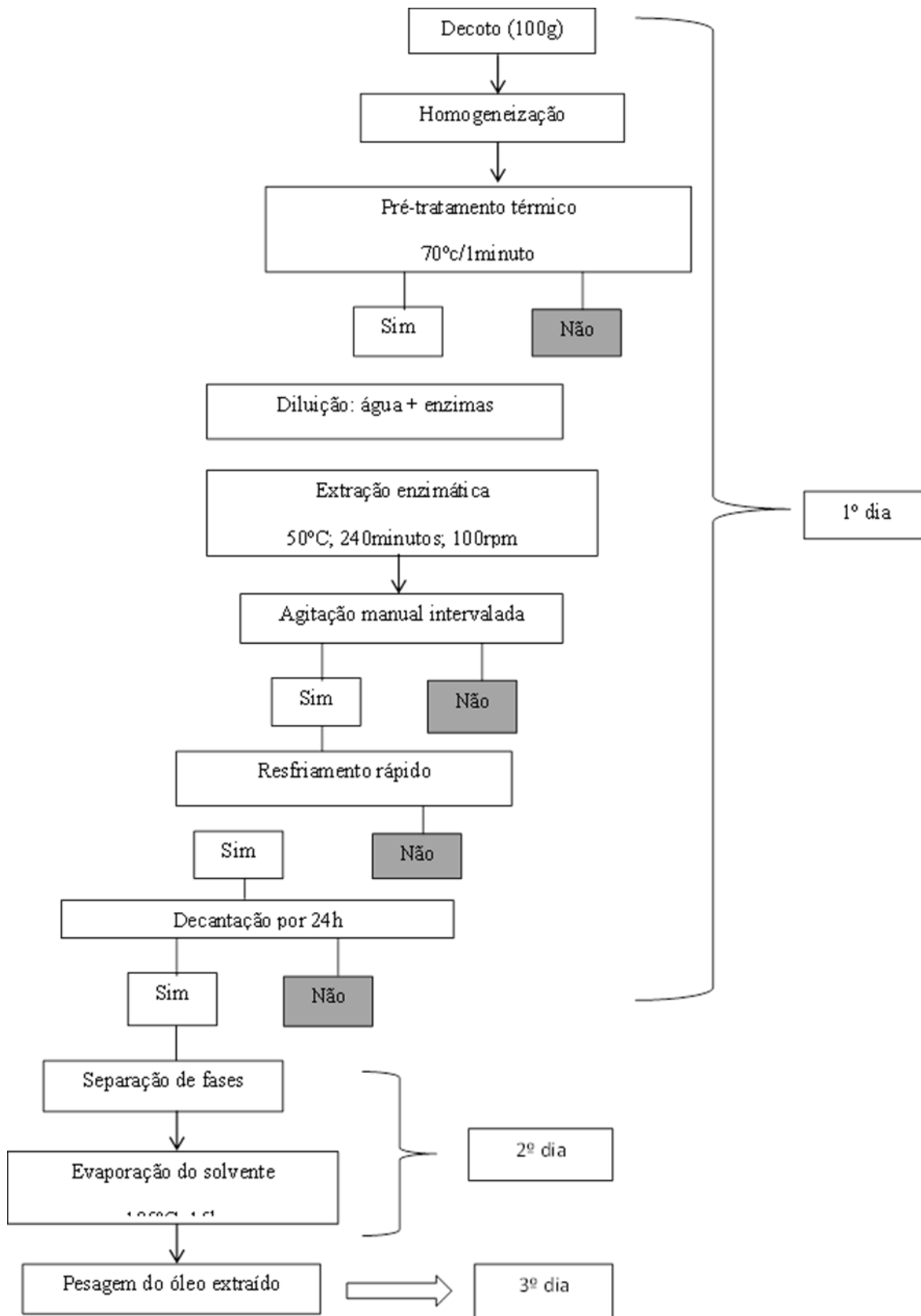


Figura 1: Fluxograma do processo de extração do óleo de açai.

4.4. Testes preliminares

Neste trabalho, foram realizados 29 ensaios preliminares, os quais estão apresentados na **Tabela 2**. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a) granulometria; b) tempo de decantação (ensaios “5 a 12”); c) tipo de agitação; d) pré-tratamento térmico; e) velocidade de resfriamento.

Tabela 2: Testes preliminares

| Ensaio | Amostra (g) | Tto térmico | Banho Gelo | Preparações enzimáticas | Concentração preparações | Tempo Decantação (h) |
|--------|-------------|-------------|------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|
| 1 | 100 | NÃO | NÃO | SE | 0% | 1 |
| 2 | 100 | NÃO | NÃO | C | 1% | 1 |
| 3 | 100 | NÃO | NÃO | CP | 1% | 1 |
| 4 | 100 | NÃO | NÃO | CP | 1% | 24 |
| 5 | 100 | SIM | NÃO | SE | 0% | 1 |
| 6 | 100 | SIM | NÃO | CP | 1% | 1 |
| 7 | 100 | NÃO | NÃO | SE | 0% | 1 |
| 8 | 100 | NÃO | NÃO | CP | 1% | 1 |
| 9 | 100 | SIM | NÃO | SE | 0% | 24 |
| 10 | 100 | SIM | NÃO | CP | 1% | 24 |
| 11 | 100 | NÃO | NÃO | SE | 0% | 24 |
| 12 | 100 | NÃO | NÃO | CP | 1% | 24 |
| 13 | 100 | SIM | NÃO | SE | 0% | 24 |
| 14 | 100 | SIM | NÃO | CP | 1% | 24 |
| 15 | 100 | NÃO | NÃO | SE | 0% | 24 |
| 16 | 100 | NÃO | NÃO | CP | 1% | 24 |
| 17 | 100 | SIM | NÃO | SE | 0% | 24 |
| 18 | 100 | SIM | NÃO | CP | 1% | 24 |
| 19 | 100 | SIM | NÃO | C | 1% | 24 |
| 20 | 100 | SIM | NÃO | CP | 1% | 24 |
| 21 | 100 | SIM | SIM | CP | 1% | 24 |
| 22 | 100 | SIM | SIM | SE | 0% | 24 |
| 23 | 100 | SIM | SIM | CP | 1% | 24 |
| 24 | 100 | SIM | SIM | C | 1% | 24 |
| 25 | 100 | SIM | SIM | CP | 1% | 24 |
| 26 | 50 | SIM | SIM | SE | 0% | 24 |
| 27 | 50 | SIM | SIM | C | 1% | 24 |
| 28 | 50 | SIM | SIM | CP | 1% | 24 |
| 29 | 50 | SIM | SIM | V | 1% | 24 |

4.5. Parâmetros estudados

a) Granulometria

Foi feita a determinação da granulometria dos decotos para verificar se haveria muita diferença entre o tamanho das partículas da seguinte forma:

1. Amostra não liquidificada;
2. Amostra liquidificada nos seguintes tempos: 10/20/30/60/90/120/180 segundos;
3. A amostra liquidificada à adição de pequenos volumes de água (10/20/30ml).

Para liquidificar o material foi usado um liquidificador comercial.

b) Tempo de decantação

O tempo de decantação da amostra antes da separação de fases foi feito em dois tempos: 1h x 24h. Os béqueres foram identificados, vedados com papel alumínio e colocados em um recipiente metálico durante o tempo de “descanso”.

Na primeira análise, após 1h de decantação, foi feita a separação do sobrenadante (água e óleo) e o material fibroso que permanecia no béquer era desprezado, dando-se continuidade ao processo; Na segunda análise, o béquer contendo o material fibroso foi guardado à temperatura ambiente até 24 horas. O óleo desprendido desse material foi recuperado por meio de micropipeta e pesado a fim de se avaliar o diferencial de massa de óleo recuperado nos dois tempos de decantação: 1 hora (ensaios 3; 5; 6; 7; 8 – **Tabela 2**) e 24 horas (ensaios 4; 9; 10; 11 e 12 – **Tabela 2**).

c) Tipo de agitação

Vários estudos vêm demonstrando a importância da agitação no processo de extração enzimática em meio aquoso de óleo vegetal, pois conseguem obter melhores resultados no rendimento de óleo (Gai et al, 2013; Jiao et al, 2014; Mai et al., 2013; Yussof et al, 2015). O trabalho ainda não publicado de Ferreira et al., mostra também a importância da agitação no processo de extração do óleo de açaí, permitindo um aumento em 10,86% do rendimento de extração do óleo.

Neste contexto, os primeiros ensaios (1; 3; 4) foram realizados com a agitação da incubadora shaker a uma velocidade de 100rpm, com base nos trabalhos já realizados até o momento. No entanto, o tipo de agitação do equipamento (orbital) não foi tão eficiente para o desprendimento do óleo, o qual ainda ficou bastante retido na amostra. Optou-se então por utilizar a combinação da agitação orbital constante de 100 rpm (na

incubadora shaker) com uma agitação manual realizada com o auxílio de espátula de metal a cada 30 minutos (ensaios 7; 8; 11; 12).

d) Pré-tratamento térmico

Os ensaios 5 a 16 na **Tabela 2** visaram a testar a influência do tratamento térmico sobre o rendimento de extração do óleo na extração enzimática. Foram colocadas 100g de amostra em um recipiente de metal e posteriormente levados a um vaporizador elétrico até a temperatura de 70°C medida por termômetro químico (ensaios 5; 6; 9; 10; 13; 14). Em contrapartida, os ensaios 7; 8; 11; 12; 15 ; 16 não receberam esse tratamento para então os resultados quanto ao rendimento do óleo poderem ser comparados.

e) Velocidade do resfriamento

Fez-se a comparação entre a utilização do “banho de gelo” (ensaios 21 ao 29) para o resfriamento rápido das amostras e conseqüente redução da temperatura para que as enzimas utilizadas cessassem sua ação logo após o término do período na incubadora shaker, com amostras sem terem passado por essa etapa (ensaios 1 a 20).

Os béqueres foram colocados em uma vasilha plástica com água à cerca de 15°C sem a vedação de alumínio e ali permaneciam até atingirem cerca de 25°C. A temperatura foi medida por termômetro infravermelho.

Todos estes testes foram feitos em duas condições: controle negativo (SE- sem adição de preparação enzimática) e com adição de preparações enzimáticas, “Celluclast 1,5 L” (C) e “Protex 1,5L” (P) (1% em base a matéria-seca, respectivamente).

4.6.Processo de extração enzimática em meio aquoso

Cada ensaio foi feito com 100g de decotos de açaí de granulometria média de 0,75 cm. Depois de homogeneizados e pesados, os decotos foram colocados de forma espalhada em bandejas de alumínio e submetidos a um pré-tratamento térmico em um vaporizador elétrico até atingirem a temperatura de 70°C, medida por termômetro químico. Esta temperatura foi mantida por um minuto. Esse procedimento tem por objetivo desnaturar as enzimas presentes na polpa do açaí, além de favorecer a degradação da lignina.

Após essa etapa, os decotos foram transferidos para um béquer (160mm de

altura x 80,73mm de diâmetro) com um volume de 600 ml e adicionou-se 240ml de água destilada em temperatura ambiente para proporcionar uma mistura de 15% de MS, visto que um estudo (dados ainda não publicados) identificou esta diluição como ideal para a extração do óleo de açaí facilitando a ação das preparações enzimáticas. As enzimas foram então inseridas individualmente (1g de enzima para 100g de decoto fresco) ou em conjunto com outras de acordo com o ensaio realizado; a escolha da concentração enzimática também se fez tendo como base estudo preliminar (dados ainda não publicados) onde se analisou parcialmente a importância desta variável na extração do óleo de açaí. Fez-se então uma mistura manual do conteúdo (decoto, água e enzima) com uma espátula metálica.

Os béqueres foram vedados com papel alumínio e levados (em grupos de 5 ou 6) a uma incubadora de tipo shaker (Solab, Incubadora Shaker SL – 222) por 240 minutos a uma temperatura de 50°C e a uma velocidade de agitação (orbital) de 100rpm. A cada 30 minutos, a função “agitação” do aparelho foi pausada e fez-se uma agitação manual mais vigorosa por cerca de um minuto em cada béquer para promover uma melhor atuação das enzimas e conseqüentemente um melhor desprendimento do óleo.

Após o tempo de incubação, foi feito um resfriamento rápido da mistura através de um “banho de gelo”, até a mesma atingir a temperatura média de 25°C, medida por termômetro infravermelho.

Os béqueres foram deixados em repouso por 24h à temperatura ambiente para que pudesse ocorrer a separação natural das diferentes fases da mistura por decantação: “torta” (parte fibrosa e proteica da mistura), água e óleo.

Após esse período, a parte sobrenadante da mistura (água e óleo) foi retirada através de pipeta volumétrica e colocada em um funil de decantação. Utilizou-se um solvente orgânico (cerca de 20ml de hexano) para facilitar a separação de fases da mistura. De acordo com observado nos ensaios experimentais, mesmo com o cuidado do manipulador, uma pequena parte da torta sempre foi transferida para o funil de decantação, entupindo o mesmo e dificultando muito a saída do óleo junto ao solvente. Dessa forma, através de um pequeno funil de vidro, transferia-se o conteúdo líquido do funil de decantação para um béquer (600ml) e depois se retirava o óleo junto ao solvente deste recipiente com ajuda de uma micropipeta para um béquer (100ml) previamente pesado.

Esses béqueres foram então levados a uma estufa a uma temperatura média de 105°C durante cerca de 15h para que o solvente pudesse ser evaporado. Os béqueres

foram então retirados da estufa e resfriados em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, eles foram pesados até terem peso constante para se obter a massa de óleo extraído pelo processo de extração enzimática em meio aquoso.

O cálculo do rendimento de extração do óleo, expresso em porcentagem, foi determinado por balanço de massa, considerando o peso do óleo extraído pelo processo e o óleo total presente na amostra inicial determinado pela metodologia oficial AOCS.

O óleo extraído foi transferido para tubos plásticos de 1,5ml tipo eppendorfs, os quais foram embalados em papel alumínio, identificados e armazenados à temperatura média de 5°C.

4.7. Combinação das preparações enzimáticas

Os ensaios enzimáticos foram realizados usando os decotos do lote 1 (ensaios 30 a 64) e lote 2 (65 a 89), exceto os ensaios 77 a 79 (ver ponto 4.7) com uma concentração de 1% de cada preparação enzimática individualmente (**Tabela 3**). Portanto, os ensaios enzimáticos realizados com a combinação de duas, três e quatro preparações enzimáticas apresentaram uma concentração enzimática total de 2, 3 e 4%, respectivamente. Foram realizados: 01 ensaio sem preparação enzimática (controle negativo), 04 ensaios com preparações enzimáticas isoladas, 06 ensaios com preparações enzimáticas combinadas duas a duas, 04 ensaios com as preparações enzimáticas três a três e 01 ensaio com as quatro preparações enzimáticas. Todos os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata, totalizando-se 56 ensaios enzimáticos.

Tabela 3: Ensaios enzimáticos

| Ensaios | Amostra (g) | Tto térmico | Banho Gelo | Preparações enzimáticas | Concentração preparações | Tempo Decantação (h) |
|---------|-------------|-------------|------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|
| 30 | 100 | SIM | SIM | V | 1% | 24 |
| 31 | 100 | SIM | SIM | U | 1% | 24 |
| 32 | 100 | SIM | SIM | S | 1% | 24 |
| 33 | 100 | SIM | SIM | CV | 1% | 24 |
| 34 | 100 | SIM | SIM | CU | 1% | 24 |
| 35 | 100 | SIM | SIM | CS | 1% | 24 |
| 36 | 100 | SIM | SIM | VU | 1% | 24 |
| 37 | 100 | SIM | SIM | VS | 1% | 24 |
| 38 | 100 | SIM | SIM | US | 1% | 24 |

| | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-------|----------|----|
| 39 | 100 | SIM | SIM | CVU | 1% | 24 |
| 41 | 100 | SIM | SIM | VUS | 1% | 24 |
| 42 | 100 | SIM | SIM | CUS | 1% | 24 |
| 43 | 100 | SIM | SIM | CVUS | 1% | 24 |
| 44 | 100 | SIM | SIM | SE | 0% | 24 |
| 45 | 100 | SIM | SIM | C | 1% | 24 |
| 46 | 100 | SIM | SIM | V | 1% | 24 |
| 47 | 100 | SIM | SIM | U | 1% | 24 |
| 48 | 100 | SIM | SIM | S | 1% | 24 |
| 49 | 100 | SIM | SIM | - | 1% | 24 |
| 50 | 100 | SIM | SIM | C | 1% | 24 |
| 51 | 100 | SIM | SIM | V | 1% | 24 |
| 52 | 100 | SIM | SIM | U | 1% | 24 |
| 53 | 100 | SIM | SIM | S | 1% | 24 |
| 54 | 100 | SIM | SIM | CV | 1% | 24 |
| 55 | 100 | SIM | SIM | CU | 1% | 24 |
| 56 | 100 | SIM | SIM | CS | 1% | 24 |
| 57 | 100 | SIM | SIM | VU | 1% | 24 |
| 58 | 100 | SIM | SIM | VS | 1% | 24 |
| 59 | 100 | SIM | SIM | US | 1% | 24 |
| 60 | 100 | SIM | SIM | CVU | 1% | 24 |
| 61 | 100 | SIM | SIM | CVS | 1% | 24 |
| 62 | 100 | SIM | SIM | VUS | 1% | 24 |
| 63 | 100 | SIM | SIM | CUS | 1% | 24 |
| 64 | 100 | SIM | SIM | C VUS | 1% | 24 |
| 65 | 100 | SIM | SIM | CVUS | 1% | 24 |
| 66 | 100 | SIM | SIM | C U | 1% | 24 |
| 67 | 100 | SIM | SIM | S | 1% | 24 |
| 68 | 100 | SIM | SIM | SE | 0% | 24 |
| 69 | 100 | SIM | SIM | US | 1% | 24 |
| 70 | 100 | SIM | SIM | VUS | 1% | 24 |
| 71 | 100 | SIM | SIM | CVUS | 1% | 24 |
| 72 | 100 | SIM | SIM | CU | 1% | 24 |
| 73 | 100 | SIM | SIM | S | 1% | 24 |
| 74 | 100 | SIM | SIM | SE | 0% | 24 |
| 75 | 100 | SIM | SIM | US | 1% | 24 |
| 76 | 100 | SIM | SIM | VUS | 1% | 24 |
| 77 | 100 | SIM | sim | CU | 1% total | 24 |
| 78 | 100 | SIM | sim | CVU | 1% total | 24 |
| 79 | 100 | SIM | sim | CVUS | 1% total | 24 |
| 80 | 100 | SIM | sim | C | 1% | 24 |
| 81 | 100 | SIM | sim | V | 1% | 24 |
| 82 | 100 | SIM | sim | U | 1% | 24 |
| 83 | 100 | SIM | sim | CV | 1% | 24 |
| 84 | 100 | SIM | sim | CS | 1% | 24 |
| 85 | 100 | SIM | sim | VU | 1% | 24 |

| | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| 86 | 100 | SIM | sim | VS | 1% | 24 |
| 87 | 100 | SIM | sim | CVU | 1% | 24 |
| 88 | 100 | SIM | sim | CVS | 1% | 24 |
| 89 | 100 | SIM | sim | CUS | 1% | 24 |

Fonte: Elaborado pela autora

4.8. Concentração enzimática total

Três ensaios enzimáticos que tiveram os melhores rendimentos de extração de óleo e a composição mais heterogênea, no que diz respeito às preparações enzimáticas, foram selecionados para a avaliação do efeito da concentração enzimática total sobre o rendimento de extração de óleo. Os ensaios 77 a 79 foram realizados com uma concentração enzimática total de 1%. Os resultados do rendimento de extração foram comparados aos obtidos com 1% de cada enzima (ver ponto 4.6).

4.9. Análise estatística

Foi realizada através do programa “STATISTICA” por meio do “Teste de Turkey”, sendo os ensaios feitos no mínimo em triplicata (p 0,05).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes preliminares

a) Granulometria

Os resultados desses ensaios preliminares demonstraram que liquidificar a amostra a partir de 90 segundos provocava uma redução no tamanho da partícula em 40% (**Figura 2**). Porém, o óleo já começava a se desprender desde essa etapa, o que acarretava perdas associação da amostra liquidificada à adição de água também trouxe resultados interessantes na redução do tamanho da partícula (27%), mas dessa forma, a perda de óleo também era bem nítida visualmente (**Figura 4**). Portanto, optou-se em utilizar a amostra não liquidificada e sem adição de água, com base nos ensaios feitos e pensando na diminuição de etapas para o processo industrial.

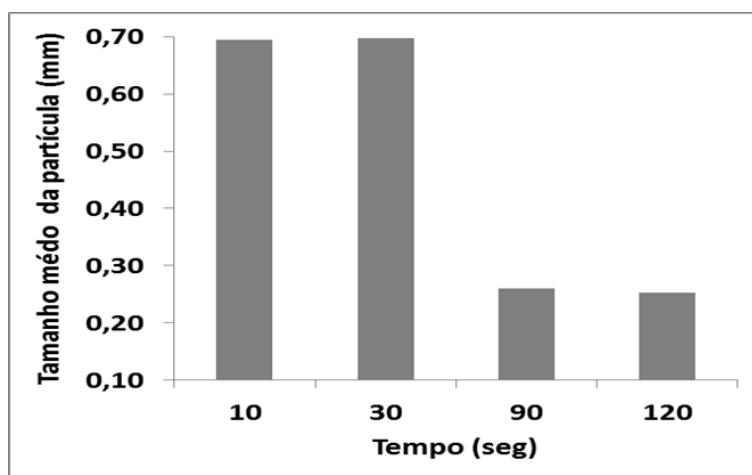


Figura 2: Tamanho médio das partículas das amostras liquidificadas em diferentes tempos.

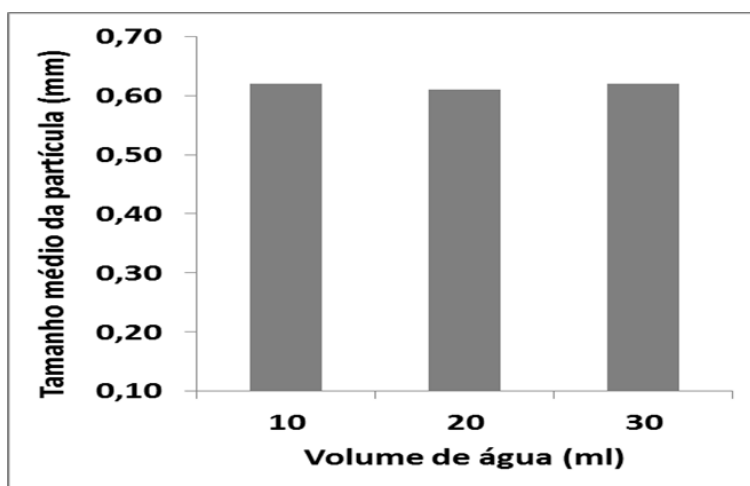


Figura 3: Tamanho médio das partículas das amostras liquidificadas com diferentes volumes de água durante 120 segundos.

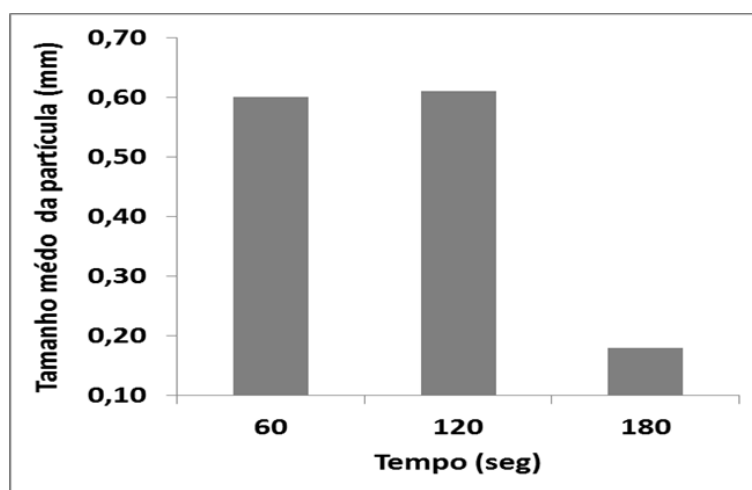


Figura 4: Tamanho médio das partículas das amostras liquidificadas em diferentes tempos com adição de 20ml de água.

Fonte: Elaborada pela autora

b) Tempo de decantação

Observa-se na **Figura 5** que o tempo de decantação de 24 horas permite uma maior liberação de óleo que o tempo de decantação de 60 minutos. Portanto, na sequência do trabalho, o tempo de decantação foi mantido fixo igual a 24 horas.

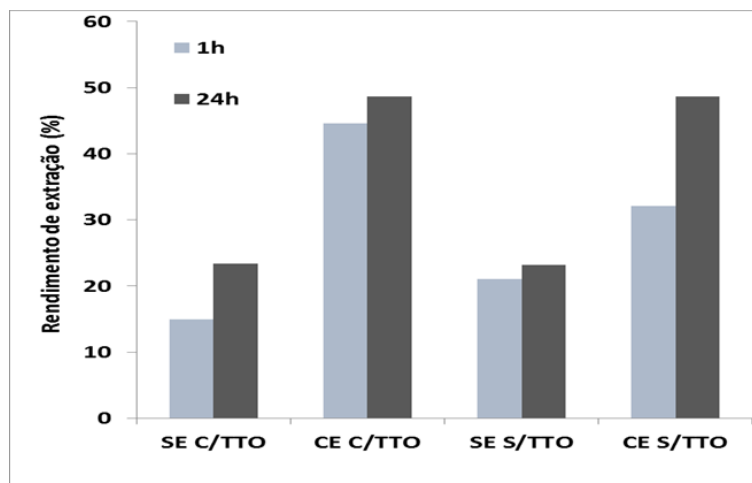


Figura 5: Rendimento da extração de óleo de açai em função do tempo de decantação para amostras sem ou com enzima, e sem ou com tratamento térmico.

Legenda: C/TTO: com tratamento térmico; S/TTO: sem tratamento térmico; C/E: com enzima; S/E: sem enzima.

Fonte: Elaborada pela autora

c) Tipo de agitação

Observa-se na **Figura 6** que os resultados do rendimento da extração são mais expressivos quando se usou a combinação da agitação orbital constante de 100 rpm (na incubadora shaker) com uma agitação manual realizada com auxílio de espátula de metal a cada 30 minutos (**Figura 6**).

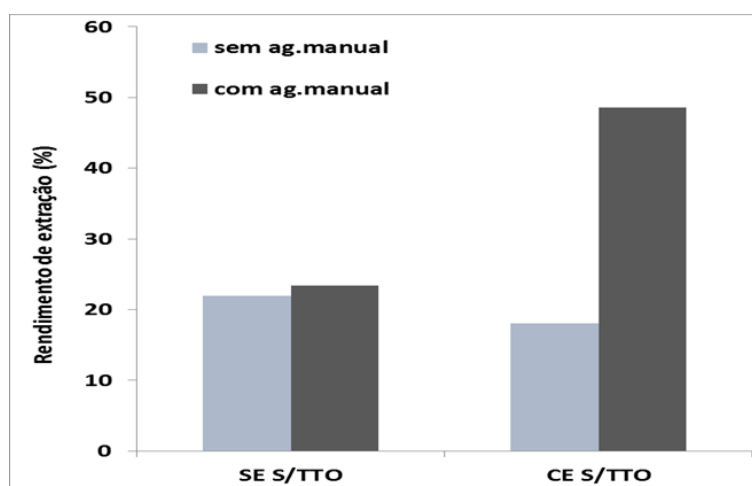


Figura 6: Rendimento da extração de óleo de açai em função do tipo de agitação: agitação mecânica sem ou com agitação manual associada para amostras sem ou com enzima, e sem tratamento térmico.

Legenda: SE: sem enzima; CE: com enzima; S/TTO: sem tratamento; C/TTO: com tratamento

Fonte: Elaborada pela autora

d) Pré-tratamento térmico

Verificou-se que quando as amostras foram submetidas aos mesmos parâmetros do processo, mas não receberam o tratamento térmico (S/TTO), os resultados não tiveram uma regularidade, o que dificultou a reprodutibilidade (**Figura 7**). O pré-tratamento térmico nos decotos de açaí foi realizado por um período que a amostra permanecesse por 1 minuto a 70°C. Esse procedimento além de desnaturar as enzimas, naturalmente presentes na amostra promovem a inativação de micro-organismos (Baardseth e Slinde, 1980).

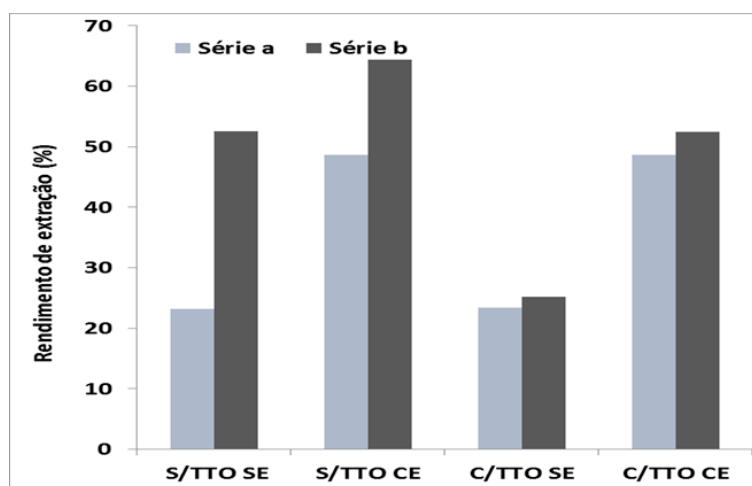


Figura 7: Efeito do pré-tratamento térmico sobre o rendimento do óleo de açaí para amostras sem ou com enzima.

Legenda: C/TTO: com tratamento; S/TTO: sem tratamento; C/E: com enzima; S/E: sem enzima.

Fonte: Elaborada pela Autora

e) Velocidade do resfriamento

Comprovou-se que a não utilização do “banho de gelo” imediatamente após as amostras saírem da incubadora shaker faz com que as enzimas utilizadas no processo continuem atuando até saírem da sua faixa de temperatura, o que promove um aumento no rendimento do óleo em comparação com as amostras que passam pelo banho de gelo. No entanto, as amostras quando submetidas ao resfriamento rápido tiveram melhor reprodutibilidade. Foi definido então que seria realizado além do pré-tratamento térmico, o banho de gelo em todas as amostras (**Figura 8**).

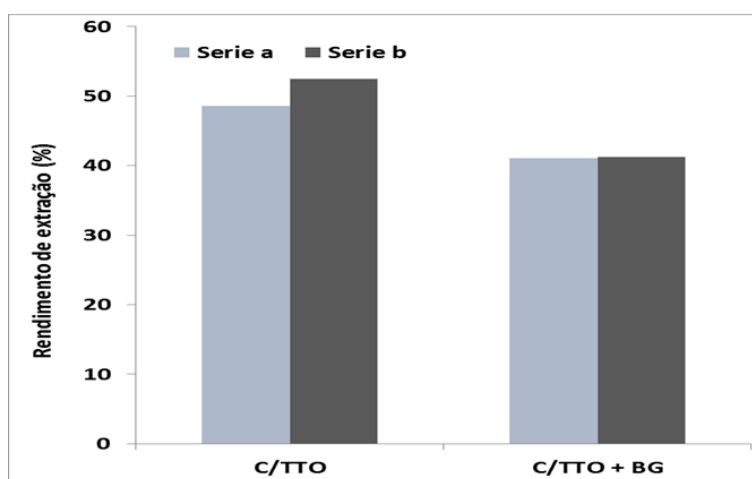


Figura 8: Efeito do uso do banho de gelo sobre o rendimento do óleo de açaí para amostras com enzima

Legenda: C/TTO: com tratamento; BG: banho de gelo

Fonte: Elaborada pela autora

5.2. Ensaio enzimáticos

Os resultados abaixo mostram o rendimento de extração de óleo a partir da polpa de açaí, expressos em porcentagem, para os diferentes ensaios enzimáticos: as quatro preparações enzimáticas isoladas e as combinações de duas, três e quatro preparações enzimáticas juntas.

O ensaio do controle negativo (realizado sem enzimas) deu um rendimento de extração de óleo de açaí de $34,91 \pm 11,81\%$, sendo inferior a todos os outros rendimentos de extração dos ensaios realizados com enzima(s). Esse resultado é similar ao que existe na literatura empregando enzimas para a extração em meio aquoso de óleo de matérias-primas vegetais (Yusoff et al, 2015).

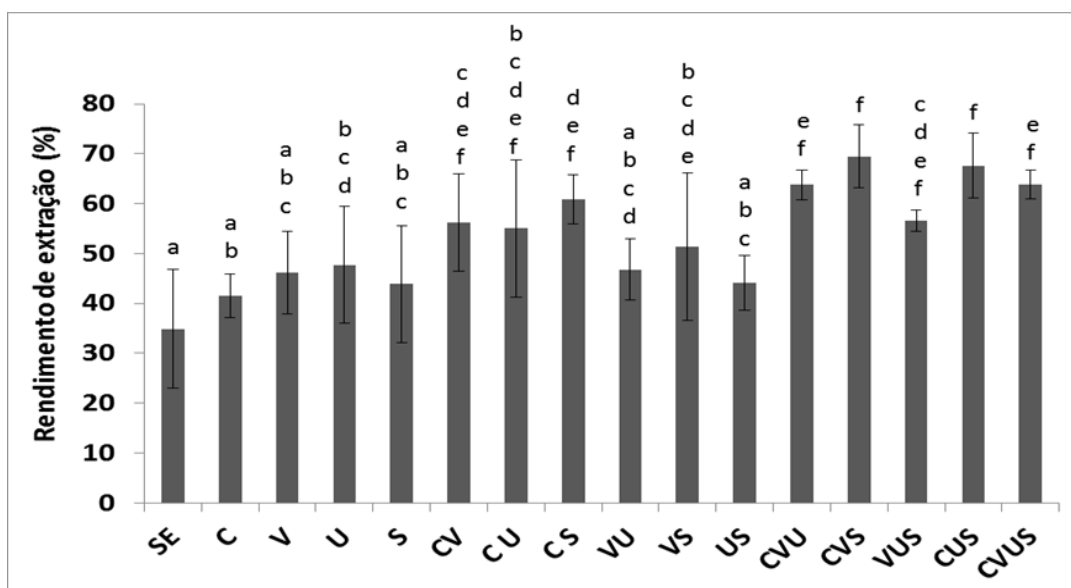


Figura 9: Rendimento da extração de óleo de açaí em função de combinações das quatro preparações enzimáticas comerciais.

**As letras (de “a” a “f”) iguais entre os ensaios identificam os ensaios que não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$)*

Fonte: Elaborada pela autora

Os quatro ensaios enzimáticos realizados com as preparações enzimáticas de forma isolada apresentaram resultados médios de rendimento de extração de óleo bem diferentes, mas todos acima do controle negativo (entre $41,52 \pm 4,31\%$ para Celluclast 1,5L e $47,71 \pm 11,72\%$ para a Ultrazym AFP). Um incremento acima de 20% do rendimento de extração em relação ao controle negativo é também observado por vários autores (Abdulkarim et al, 2006; Hanming et al, 2009; Latif et al, 2011; Gai et al, 2013; Mai et al, 2013; Li et al, 2011). Apesar de usar preparações enzimáticas que atuam em diferentes sítios enzimáticos, os resultados mostram que não há diferença significativa entre as quatro preparações enzimáticas utilizadas de forma isolada. Conclusões semelhantes foram obtidas por outros autores (Mai et al, 2013).

A preparação enzimática que teve destaque no processo de extração enzimática de óleo de açaí em meio aquoso foi a “Ultrazym AFP”, composta por pectino liase, celulase e poligalacturonase. Apesar de não apresentar um resultado significativamente diferente em relação às outras três preparações enzimáticas, ele apresenta um resultado significativamente superior ao controle negativo. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, os quais trabalharam com outras matérias primas. Hanming et al, 2009, em seus experimentos de extração enzimática de óleo das sementes de pitaita, mostraram um melhor rendimento com o uso de pectinase, seguido de protease, celulase

e α -amylase. Gai et al, 2013, Jiao et al, 2014 e Mai et al, 2013, também mostraram que a pectinase está entre as principais enzimas que contribuem para o maior rendimento de extração do óleo de *Isatis indigoga*, abóbora e gac, respectivamente, logo após a celulase e/ou a protease. Outros trabalhos mostram que a pectinase está entre as enzimas de menor influência no processo de extração de óleo (Abdulkarim et al, 2006).

A predominância de uma enzima à outra depende muito da estrutura da matriz vegetal. No caso do açaí, Lopes (2015) também observou que a preparação enzimática “Ultrazym AFP” foi a mais eficaz para desestruturar a parede celular da polpa de açaí sugerindo que enzimas do tipo pectinase sejam a de maior eficácia neste processo, já que a pectina faz parte da parede vegetal desse fruto na parte mais superficial, tendo que ser rompida para que então a hemicelulose possa ser alcançada.

Os resultados de rendimento de extração de óleo relativos aos tratamentos enzimáticos usando a combinação das preparações enzimáticas duas a duas apontam para a importância da enzima “C”, em conjunto com outras enzimas. Os rendimentos médios de extração dos ensaios enzimáticos “CS”, “CV” e “CU” (60,97%; 56,20%; 55,02%, respectivamente) apresentam-se superiores aos resultados dos demais tratamentos (VU com 46,81%; VS com 51,33% e US com 44,09%). É importante ressaltar que os ensaios “VU” e “US” não diferem estatisticamente do controle negativo, sendo, portanto uma combinação de preparações enzimáticas não vantajosas. Isso pode ser explicado pela ausência da celulase nessas combinações, já que é uma das “enzimas de entrada” para romper as ligações na parede celular. Interessante notar que essas combinações são formadas por exclusivamente por hemicelulases e que no caso da preparação enzimática “U”, quando usada isoladamente, teve destaque na extração do óleo de açaí.

Esses resultados demonstraram que quando as preparações enzimáticas foram usadas de forma isolada não promoveram um rendimento do óleo tão eficaz quando combinadas duas a duas. A mistura de preparações enzimáticas tem um efeito positivo no incremento do rendimento do óleo de açaí, provavelmente por atuarem em diferentes sítios enzimáticos. Outros autores como Tabetabaei et al., 2013 e Mai et al., 2013 também apontaram para este resultado, nos ensaios de extração enzimática de óleo de mostarda e gac, respectivamente.

Os resultados de rendimento de extração de óleo relativos aos tratamentos enzimáticos usando a combinação das preparações enzimáticas três a três apontam

também para a importância da enzima “C”, em conjunto com outras enzimas. Assim, o único ensaio enzimático que apresenta um rendimento estatisticamente inferior é “VUS” (56,57%). Os rendimentos médios de extração dos ensaios “CVS”, “CUS” e “CVU” são de 69,49%, 67,62% e 63,78%, respectivamente. O rendimento de extração do ensaio realizado com as quatro enzimas também está dentro dessa faixa, com um valor médio de 63,85%.

De acordo com os resultados dos ensaios enzimáticos (fig.9), combinação de duas preparações enzimáticas seria suficiente para desestruturar a parede celular e favorecer a extração do óleo. No entanto, é importante salientar que do ponto de vista prático, o uso de mais de duas preparações enzimáticas facilita muito a recuperação do óleo, além de reduzir o desvio padrão, facilitando a reprodutibilidade dos resultados. Assim, além de preparações enzimáticas do tipo celulase e hemicelulase, a adição de uma terceira enzima, prioritariamente de tipo pectinase (“U”) facilita muito a extração de óleo a nível industrial (Mai et al., 2013; Rui et al., 2009).

Fazendo uma análise do desvio padrão, as combinações “VUS” e “CVUS” são as que apresentam os menores valores (2,06% e 2,87%, respectivamente), porém, não necessariamente maiores rendimentos. Em contrapartida, a combinação “CVU” apresenta um valor de desvio padrão reduzido (3,01%) e um rendimento relevante. Dessa forma, sugere-se dar continuidade ao trabalho com esta combinação de três preparações enzimáticas, as quais atuam preferencialmente nas mesmas faixas de temperatura e pH.

5.3. Influência da concentração enzimática total

Em posse dos resultados anteriores, selecionaram-se três ensaios com bons rendimentos de extração de óleo, realizados com preparações enzimáticas de classe diferentes.

Os ensaios selecionados foram: “CU”; “CVU” e “CVUS”. Foram realizados novos ensaios de extração enzimática empregando uma concentração enzimática total de 1%. Os resultados de rendimentos de extração de óleo estão comparados aos obtidos com uma concentração de 1% para cada preparação enzimática utilizada (**Figura 10**).

Observou-se que quando foi utilizada uma concentração enzimática total de 1%, houve um decréscimo em torno de 10%, 5,8% e 1,3% no rendimento de extração para os ensaios “CU”, “CVU” e “CVUS”, respectivamente.

Esses resultados sugerem que ao utilizarmos a concentração enzimática total de 1%, se estava mais distante do valor máximo adequado para cada preparação enzimática (efeito platô); a concentração total de 3% a 4% parece ser a ideal para se atingir um melhor rendimento do óleo de açaí.

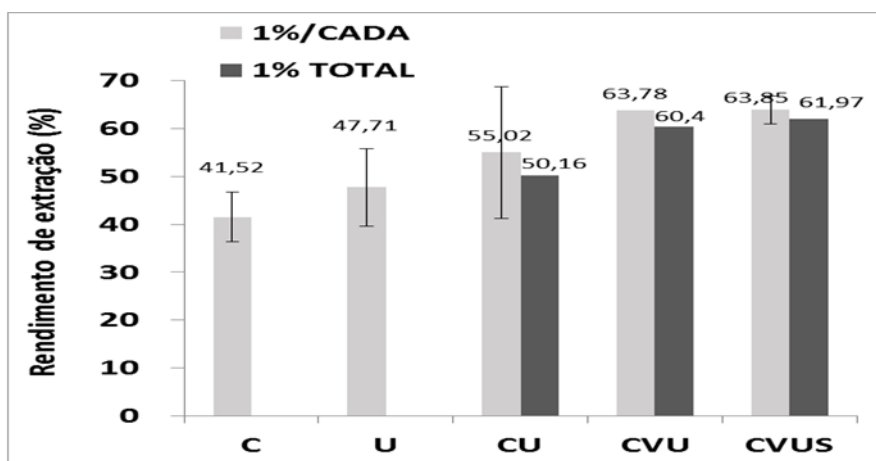


Figura 10: Influência da concentração enzimática (1%/enzima versus 1% total) no rendimento de extração do óleo de açaí

Legenda: C: Celluclast; U: Ultrazym; V: Viscozyme; S: Shearzyme
Fonte: Elaborada pela autora

6. CONCLUSÃO

Observou-se que todos os parâmetros avaliados nos ensaios preliminares - 1. tempo de decantação; 2. tipo de agitação; 3. utilização de tratamento térmico; 4. velocidade de resfriamento - foram relevantes no processo de extração do óleo de açaí para que a metodologia pudesse ser padronizada. Os parâmetros “1” e “2” são eficazes no aumento do rendimento e os parâmetros “3” e “4” proporcionam a padronização nos resultados.

Os resultados dos ensaios enzimáticos demonstram que a combinação com mais de duas preparações enzimáticas permitem aumentar significativamente o rendimento de extração de óleo em relação ao controle negativo, realizado sem enzimas. O uso de três preparações enzimáticas, incluindo uma celulase, uma hemicelulase e uma pectinase, mostra-se a combinação mais pertinente para aumentar o rendimento de extração de óleo e possibilitar a reprodutibilidade dos resultados.

Entre as diferentes combinações de preparações enzimáticas realizadas, as mais interessantes são “CVU” ou “CVUS” com uma concentração enzimática total de 1% ou com uma concentração individual de 1% por preparação enzimática.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade direta do trabalho, seria interessante realizar uma otimização da concentração das diferentes preparações enzimáticas através do uso de um plano de mistura.

Estudos posteriores são também necessários para que sejam avaliados os outros parâmetros do processo de extração enzimática em meio aquoso, tais como o binômio tempo x temperatura e a velocidade de agitação.

Para a indústria, teria que ser avaliado qual o parâmetro mais importante: se acrescentar uma enzima ao processo (“CVUS” - 1% total) ou se aumentar a concentração de cada enzima usada (“CVU” - 1%/cada).

REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, S. M.; LAI, O. M.; MUHAMMAD, S. K. S.; Long, K.; Ghazali, H. M. Use of enzymes to enhance oil recovery during aqueous extraction of *moringa oleifera* seed oil, *Journal of Food Lipids*, v.13. pg. 113–130, 2006.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L.; *Process Biochem*; 33, 21, 1998.

ALMEIDA, C.; BRÁNYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J.; *Process Biochem*; 40, 1937, 2005.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION - AIN. Nomenclature policy: generic descriptors and trivial names for vitamins and related compounds. *The Journal of Nutrition*. p.8-15. 1979.

ANAND, L.; VITHAYATHIL, P.; *J. Ferm. Bioeng.* v.67. pg.380, 1989.

AOCS Methods AOCS. Em *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*; 5th ed.; Firestone, D., ed.; AOCS Press: Champaign, 1998.

BAARDSETH, P.; SLINDE, E. Heat inactivation and pH optima of peroxidase and catalase in carrot, Sweede and Brussels sprouts, *Food Chemistry*. v.5, pg. 169-174, 1980.

BELITZ, H.-D; GROSCH, W. *Química de los alimentos*. 2ª ed, 1997.

BERNAUD, F.S.R; FUNCHAL, C. Atividade antioxidante do açaí. *Nutrição Brasil*. v.10. n.5. pg. 310-316, 2011.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, v.3, n. 11, pg. 286-290, 1985.

BIERI, J.G. Comments on the new dietary reference intake for vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 75, n. 4, pg. 781, 2002.

BRON, D.; AMIS, R. Vitamin E and prevention of atherosclerosis. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*. v.72, n.1, pg. 32- 7, 2002.

CASTRO, A.M.; PEREIRA, J.N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 33 (1). 181-188, 2010.

CHEN, B.K.; DIOSADY, L.L. Enzymatic Aqueous Processing of Coconuts. *International Journal of Applied Science and Engineering*; v. 1. n.1. pg. 55-61, 2003.

CUNHA, S.; AMARAL, J.; FERNANDES, J.; OLIVEIRA, M. B. Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006.

EAPEN, K.E., KALBAG, S.S. & SUBRAHMANYAN, V. Operations in the wet rendering of peanut for the separation of protein, oil and starch. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 43, 585–589, 1966.

ERIKSSON, R.; KARL-ERIK, L.; ROBERT, A. B. P.; Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, 1990.

FOLLY, G.A.F. Efeito do consumo da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) sobre as concentrações de citocinas e citocinas inflamatórias, medidas antropométricas, de composição corporal, parâmetros bioquímicos, clínicos e dietéticos em mulheres jovens aparentemente saudáveis. 128fl. Dissertação (Mestrado em Saúde e Nutrição). Escola de Nutrição. Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais, 2014.

FRACHEBOUD, D.; CANEVASCINI, G. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 220, 1989.

GAI, Q.Y.; JIAO, J.; MU, P.S.; WANG, W.; LUO, M.; LI, C.Y.; ZU, Y.G.; WEI, F.Y.; FU, Y.J. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from *Isatis indigotica*

seeds and its evaluation of physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*; 45, 303– 311, 2013.

GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A.; *YEAST*; 10, 1311, 1994.

GIBBINS, R.D.; AKSOY, H. A.; USTUN, G. Enzyme-assisted aqueous extraction of safflower oil: optimization by response surface methodology *International Journal of Food Science and Technology*; 47, 1055–1062, 2012.

GUERRA, J.F.C., MAGALHÃES, C.L.B., COSTA, D.C., SILVA, M.E., PEDROSA, M.L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr*; v. 49. n.3. pg.188-94, 2011.

HAGENMAIER, R.D., CARTER, C.M. & MATTIL, K.F. Aqueous processing of coconuts: economic analysis. *Journal of American Oil Chemists' Society*; 52, 5–9, 1975.

HANMING, R.; ZHANG, L.; LI, Z.; PAN, Y. Extraction and characteristics of seed kernel oil white pitaya. *Journal Food engineering*; 482-486, 2009.

HERNANDEZ, M.; ALEGRIA, M.E.R.; GONZALES, F.; MUNGUIA, A.L. Enzymatic Treatment of Rice Bran to Improve Processing. *JAOC*S; v.77, n. 2, 2000.

IKEDA, A.A; MORAES, A.; MESQUITA, G. Considerações sobre tendências e oportunidades dos alimentos funcionais. *P&D em Engenharia de Produção*; v. 08 n. 02, p. 40-56, 2000.

JIANG, L.; HUA, D.; WANG, Z.; XU, S. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*; 88, 233–238, 2010.

JIAO, J.; LI, Z. G.; GAI, Q . Y.; LI, X. J.; WEI, F. Y.; FU, Y. J.; MA, W. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food Chemistry*; 147, 17–24, 2014.

KARAM, N. E.; BELARBI, A.; World J. Microbiol. Biotechnol. 1995, 11, 559.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R.; World J. Microbiol. Biotechnol; 16, 277, 2000.

KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R.; Bioresour. Technol. 2001, 77, 215.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls, 1997.

LATIF, S.; ANWAR, F. Aqueous Enzymatic Sesame Oil and Protein Extraction. Food Chemistry; 125, 679–684, 2011.

LATIF, S.; ANWAR, F. Effect of Aqueous Enzymatic Process on Sunflower Oil Quality. J Am Oil Chem Soc; 86:393–400, 2009.

LATIF, S.; DIOSADY, L.L.; ANWAR, F. Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein from canola (*Brassica napus* L.) seeds. Eur. J. Lipid Sci. Technol; 110, 887–892 887, 2008.

LI, Y., JIANG, L.; SUI, X.; WANG, S. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of pine kernel oil by response surface methodology Procedia Engineering, 15, 4641-4652, 2011.

LI, Y.; FINE, F.; TIXIER, A.S. F; VIAN, M.A.; CARRE, P.; PAGES, X.; CHERMAT, F. Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. C.R.Chimie; 17, 242-251, 2014.

LIRA, C.R.G.; ZUCCO, F.; NEGRÃO, A.N.; SILVA, M.A.S.; MURAKAMI, F.S. Nutracêuticos: aspectos sobre segurança, controle de qualidade e legislação, Rev. Bras. Farm.; 90 (1): 45-49, 45, 2009.

LOPES, E. N. S. Caracterização da morfoanatomia do mesocarpo do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e estudo fundamental da interação entre seus constituintes naturais e enzimas celulósicas. 47fl. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Pará, 2015.

LUBRANO, C.; ROBIN, J. R.; KHAIAT, A. Fatty acids, sterol and tocopherol composition of oil from the fruits mesocarp of six palm species in French Guiana. *Oléagineux*, **1994**.

MAI, H.C.; TRUONG, V.; DEBASTE, F. Optimization of Enzyme-Aided Extraction of Oil Rich in Carotenoids from Gac Fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.). **2013**.

MARQUEZ, U.M.L. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão; v. 39, n.3; 2003.

MOREAU, R.A.; JOHNSTON, D.B.; POWELL, M.J.; HICKS, K.B. A Comparison of Commercial Enzymes for the Aqueous Enzymatic Extraction of Corn Oil from Corn Germ. *JAOCS*; Vol. 81, no. 11, 2004.

NASCIMENTO, R.J.S.; COURI, S.; ASSI, R.A.; FREITAS, S.P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal – SP; 30, 2, 498-502, 2008.

OLSSON, L; HAHN, -HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and microbial technology*, v.18, n.5, p.312-331, 1996.

PALENCIA, L.A.P.; TALCOTT, S.M.; TALCOTT, S.T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem*; 56, 12, 4631-4636, 2008.

PORTINHO, J.A.; ZIMMERMAN, L.M.; BRUCK, M.R. Efeitos benéficos do açaí. *International Journal of Nutrology*; v.5, n.1, p. 15-20, 2012.

RAGHAVENDRA, S.N.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous Extraction and Enzymatic Destabilization of Coconut Milk Emulsions. *J Am Oil ChemSoc*; 88, 481–487, 2011.

ROCHA AP, CARVALHO L.C, SOUSA M.A, MADEIRA S.V, SOUSA P.J, TANO, T. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol*; 46(2):97-104, 2007.

ROGEZ, H. Açai: preparo, composição e melhoramento da conservação, ed.Edufpa, Belém, 2000.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D.L.; NIRANJAN, K. Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*; 19: 402-420, 1996.

RUI, H.; ZHANG, L.; LI, Z.; PAN, Y. Extraction and characteristics of seed kernel oil from white pitaya. *Journal of Food Engineering* 93, 482–486, 2009.

RUPÉREZ, F. J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography*; v. 935, p. 45-69, 2001.

SANT'ANNA, B.P.M.; FREITAS, S.P.; COELHO, M.A.Z. Enzymatic Aqueous Technology for simultaneous Coconut Protein and Oil Extraction. *Grasas y Aceites*; v. 54. n.1, pg. 77-80, 2003.

SHARMA, A.; KHARE, S. K.; GUPTA, M. N. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Peanut Oil. *JAOCS*; v. 79, n. 3, 2002.

SUBRAMANIAN, N. Integrated processing of peanut for the separation of major constituents. *Journal of American Oil Chemists' Society*; 36, 66–70, 1959.

SUI, X.; JIANG, L.; LI, Y.; LIU, S. The research on extracting oil from watermelon seeds by aqueous enzymatic extraction method. *Procedia Engineering*; 15, 4673-4680, 2011.

TABTABAEI, S.; DIOSADY, L.L. Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. *Food Research International*; 52, 547–556, 2013.

TRABER, M. G. Vitamin E: too much or to not enough? *American Journal Clinical Nutrition*; v. 73, n. 6, p. 997-98, 2001.

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

WHITAKER, J. R.; *Principles of Enzimology for the Food Sciences*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc.: New York, 1994, p. 425 – 436.

YUSOFF, M.M.; GORDON, M.H.; NIRANJAN, K. Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*; 41, 60 e 82, 2015.

ZHANG, Y.; LI, S.; YIN, C.; JIANG, D.; YAN, F.; XU, T. Response surface Optimisation of Aqueous Enzymatic oil Extraction from Bayberry (*Myrica rubra*) kernels. *Journal Food Chemistry*; 135, 304–308, 2012.

ANEXO

Extração enzimática aquosa de óleo de frutos.

| Matéria-prima | Preparações enzimáticas | Temperatura °C | Tempo min ou h | Condições de processo | | | | Observações complementares | Ano |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------|
| | | | | Concentração de enzima | Diluição (sólido/água) | Agitação rpm | pH | | |
| Farelo de arroz | Thermamyl 120L α-amilase; Viscosyme e | Thermamyl - 90 Diazyme - 60 | Thermamyl - 2h | 1% w/w | 25%w/w | 200 | Thermamyl - 6 | Houve tratamento térmico: 120°C, 1 atm 15 min | 2000 |
| Coco | Hemicelulase; Pectinase, Celulase, complexo | 50 ; 55 | 20 h | 2%w/w | 1:10w/w | Suave por 5 h | 4,5 | Foi utilizado extração alcalina (pH 11.5) em temperatura | 2003 |
| Coco | Viscosyme L; Termaly 120L; Pectinex 3XL; | Protease - 60 Celulase - 50 | 30 min | 0.6%w/w - Viscosyme 0.3%w/w - Neutrased | 1:6 ; 1:9w/w | - | 6, 7 e 9 | - | 2003 |
| Germe de milho | Novosyme Alcalase ProteaseP4860; | 50 ; 65 | 4h ; 16 h | 0,1 ml - ; Multifect GC/GC220 | 24 g / 100 ml | 160 | 4 | - | 2004 |
| Canola | Protex 7L; Multifect Pectinase FE; Multifect CX | 45 | 2h | Quantidade ótima para cada preparação | 1:6w/w | 120 | ótimo pra cada | Quantificação de tocoferol por solvente e EEA | 2008 |
| Pitãia | Celulase; Pectinase; Protease | 50 | 60 min | 50g; 250g; 300g | 6g/48ml | 90 | 7 | Utilização de micoondas | 2009 |
| Girassol | Protex 7L; Alcalase 2.4L; | 45 | 2 h | Quantidade ótima para cada preparação | 1:6w/w | 120 | ótimo pra cada | Quantificação de tocoferol por solvente e EEA | 2009 |
| Amendoim | Alcalase 2.4L; Nutrase; Protamex; Novozymes Complex Cellulase | Protizyme - 40 As1398 - 45 Nutrase - 55 Alcalase - 60 | Protizyme - 18 h As1398 - 5 h Neutrased - 5 h | 5%w/w- Protisyme 2%w/w - As1398 2%w/w - Nutrase 1.5%w/w - Alcalase | 1:5w/w | 120 | Protisyme - 4 Protamex - 6 AS1398 - 7 Nutrase - 7.5 | Preparação multienzimática | 2010 |
| Sementes de melancia | Protex 6L | 40; 45; 50; 55 | 2; 3; 4; 5 e 6 h | 1.5, 2.25, 2.5, 3 %w/w | 1:4; 1:5; 1:6; 1:7w/w | - | 7; 8; 9; 10 | - | 2011 |
| Pinhão | Alcalase | 40; 45; 50; 55; 60; 65 | 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3.5; 4.5 e | 0,5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5%w/w | 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; 1:10; 1:12 w/w | - | 7; 8; 9; 10 e 11 | - | 2011 |
| Gergelim | Protex 7L; Alcalase 2.4L; Viscosyme L; Natuzyme e | 45 | 120 min | 2%w/w | 1:6w/w | 120 | ótimo pra cada | Quantificação de tocoferol por solvente e EEA | 2011 |
| Coco | Aspártico protease | 37 | 3 h | 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.05 e 0.1 mg/g | - | - | 6 | Congelamento (5, 10, 15 e 20°C) e descongelamento (6 h) | 2011 |
| Cártamo | Alcalase 2.5L e Celluclast 1.5L | 20 a 60 | 4h a 8h | 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3%w/w | 1:3; 1:5; 1:4; 1:9w/w | 100 a 400 | 4 a 8 | Granulometria 0.6 a 1mm | 2012 |
| Bayberry (Myrica) | Celulase e Protease | 35; 45; 55 | 4; 5 e 6h | 2; 3; 4 % w/w | 1:4; 1:5; 1:6w/w | - | Celulase - 4,8 Protease - | - | 2012 |
| Isatis indigoga | Celulase; Pectinase; Hemicelulase; β- | | 40 a 100 min | 1% a 2%w/w | 1:7w/w | 200 | 5 | Utilização de Micro-ondas 300 a 500w; granulometria de 60mesh; | 2013 |
| Mostarda | Alcalase 2.4; Protease; ViscosymeL; Celluclast | 25 e 40 | 20 e 30 min e 3h | 1; 1.5; 3%w/w | 1:4w/w | - | 4,8 e 11 | - | 2013 |
| Gac | PectinexUltra SP-L; Protease as Neutrased; Cellusoft-L; Thermamyl 120 | 40 a 80 | 60 a 180min | 5% a 25%w/w | 1:6w/w | 50 a 250 | 4,5 a 7,5 | - | 2013 |
| Abóbora | Celulase; Pectinase; Hemicelulase; β- | 45 a 55 | 40 a 80 min | 1.25 a 1.5%w/w | 1:6w/w | 200 | 5 | Utilização de micro-ondas - 300 a 600w; granulometria - 80mesh | 2014 |