



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINE MARIA CALLIARI

**EXTRAÇÃO TÉRMICA, QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE
PECTINA DE BAGAÇO DE LARANJA**

Londrina
2004

CAROLINE MARIA CALLIARI

**EXTRAÇÃO TÉRMICA, QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE
PECTINA DE BAGAÇO DE LARANJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raúl J. H. Castro Gómez

Londrina
2004

CAROLINE MARIA CALLIARI

**EXTRAÇÃO TÉRMICA, QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE
PECTINA DE BAGAÇO DE LARANJA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raúl J. H. Castro Gómez
Universidade Estadual de Londrina
Centro de Ciências Agrárias
(Presidente – Orientador)

Dra. Wilma Aparecida Spinosa
Fundação Educacional do Município de Assis
Centro de Pesquisa em Ciências
(Membro)

Porfa. Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina
Centro de Ciências Agrárias
(Membro)

Londrina, 14 de abril de 2004.

*Alegam as pessoas que quando souberem, farão.
Cristo afirma que, quando fizermos, saberemos...*

(Fulton Sheen)

AGRADECIMENTOS

O primeiro a quem elevo meus agradecimentos, por ser o único e o mais importante...Deus, por me coroar com tantas bênçãos: a família imensa em tamanho e parceria; os amigos maravilhosos; os mestres (e doutores) donos de imenso potencial enquanto pessoas e profissionais. Entre outras coisas, por me dar saúde, lucidez, teimosia, alegrias e dificuldades...

Ao professor Dr. Raúl Jorge Herman Castro Gómez, figura de vasta competência, ilustre por crer que nada é impossível, por indignar-se com incompetências e injustiças vistas por aí afora, e, claro, pela orientação, bates-papo, cafezinhos, e por incentivar a inovação, sempre...

Às professoras doutoras Marta de Toledo Benassi e Sueli Obara Doi pelas observações pertinentes no Exame de Qualificação.

Aos alunos do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, por confiarem em mim como sua Representante. A todos os colegas e em especial: Adriana Menoli, pelas informações técnicas, bates-papo e caronas; Camilla Pádua (Gêmea) pela energia elevada; Evandro Bona, pelas risadas entre uma informação estatística e outra; MSc. Hevenilton Matiazi, por pensar junto, por ter sido meu vice-representante, meu irmão, por ter tanta história pra contar e tanta coisa a ensinar e pelo “larga mão”; Juliane Sachs, pela amizade, apoio e incentivo; MSc. Neusa Seibel, pela parceria e pelo Carnaval na praia; Rafael Dias, calouro, pelo apoio valoroso; MSc. Sandriel Alves, pela amizade, cafezinhos e risadas..., Thais Danielle de Souza, vizinha de bancada, amiga, irmã, tudo de bom, pelas baladas, pela confiança, apoio e parceria; Viviane Schiabel; Laisiane Nóbrega; Mônica P. Silva; Simoni; Ricardo; Alexandre; Valéria; pela parceria...

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a Patrícia Sambatti, Célia, Marli, Maria Alice e Nelson, pela assessoria valiosa nos laboratórios. A Sandra Rezende pela assessoria geral.

A minha mãe, Dona Maria Lourdes, por segurar a barra, pela amizade e confiança e por me avisar que preciso comer, dormir, essas coisas “básicas”. Ao pai Décio Francisco por me lembrar que na vida se dirige olhando pra frente.

À mana Káryn, outra ponta da estrela, pela assessoria técnica, psíquica, afetiva, pelo festerê e por ser tão LUMINOSA; mana Káira e cunhado Gilmar, pelo interesse, força, amizade eterna e pelos churrascos de legumes...; sobrinha-mana Rakelly, por dividir o teto, as conquistas e os estresses; sobrinho Eduardo, por ser tudo de bom. Mana Tuca, sábia e amiga; mana Karla, queridinha da estrela e mamãe do ano; mano Gian, pela presença musical e pelas idas ao rio Uruguai. Aos cunhados Claiton, Guilmar, Mauro pela amizade e por fazerem felizes as pessoas que tanto amo. Aos sobrinhos Wyllian, Guilherme, Roberto e Catarina (H2004), por existirem e serem meus amigos. Aos primos-compadres Paulo e Lúcia, pela amizade e incentivo; prima Alessandra pelas baladas, e-mails, força...; ao primo Ricardo e ao primo-afilhado Rodrigo pela amizade e carinho.

Aos mestres em Agronomia: Coxa, Ivan e Mateus, pela parceria e pela presença agradável.

Ao Amigo Éder Alexandre Cipriano da Silva, *brother*, pela parceria, baladas e pela presença valiosa neste período. À amiga Letícia Sayuri Murate, pelo apoio, caminhadas e baladas. Ao Bahia, por sempre arrumar uma boa mesa no Valentino. Á prof.^a MSc. Helena Teru Takahashi, primeira grande amiga no TAM. Ao prof. José Júlio Nunes Ferreira, pela força gaúcha. Aos meus amigos de Santa Rosa – RS.

Ao Coral da UEL, ao Grupo NEUMA e Ars Mensurabilis, este na pessoa do médico veterinário e músico Elimar Machado. À Associação Médica de Londrina pelos Encontros Musicais das Segundas-feiras, à Secretaria de Cultura e à Casa de Cultura da UEL por fazerem com que esta cidade respire cultura.

A Cláudia Castro Bravo (filha do Prof. Raúl) por ceder a cepa de *Kluyveromyces marxianus*; à empresa Paraná Citrus S/A, na pessoa de Cláudia Simon de Campos, por fornecer o bagaço de laranja e pelas informações técnicas; ao João Carlos Golfi (Cp Kelco S/A), pelos esclarecimentos técnicos; à empresa Novozymes Latin America Limited, na pessoa de Sabrina Ganem, pelo fornecimento de amostra de enzima.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Fui num pagode acabou a comida, acabou a bebida, acabou a canja. Sobrou pra mim o bagaço da laranja ...

(Zeca Pagodinho)

CALLIARI, Caroline Maria. **Extração Térmica, Química e Enzimática de Pectina de Bagaço de Laranja**. 2004. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

RESUMO

Pectina é um polissacarídeo estrutural presente na parede celular de vegetais com a função de conferir rigidez. Apresenta capacidade de formar gel em condições específicas e devido a essa propriedade, é amplamente utilizada como espessante ou estabilizante na indústria de alimentos. Para a produção industrial de pectina são utilizados bagaço de laranja e de outros citrus, porém a maior parte do bagaço de laranja residual da extração de suco é destinada à alimentação animal. O processo industrial de extração de pectina emprega ácidos minerais como o clorídrico ou o sulfúrico, o que o torna altamente poluente. Visando desenvolver um processo alternativo de extração de pectina a partir de bagaço de laranja obtido da extração industrial de suco, foram testados neste trabalho processos de extração térmica, química e enzimática. Na extração química foram testados os ácidos orgânicos acético e cítrico e na extração enzimática os experimentos foram realizados com poligalacturonase comercial de *Aspergillus niger* e poligalacturonase produzida em laboratório, de *Kluyveromyces marxianus*. Para definir a melhor extração em função do rendimento foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta com delineamentos fatoriais de Box-Behnken 3³. Além disso, foram determinadas as características de poder de geleificação e porcentagem de ácido galacturônico das pectinas extraídas. O grau de esterificação da pectina obtida da extração com ácido cítrico foi determinado. A extração com ácido cítrico foi o processo mais eficiente, com rendimento máximo de 39,23%, quando se utilizou 4% de bagaço de laranja, ácido cítrico 3,5% e temperatura de 75°C. Apesar de ter resultado em rendimento mais baixo (15,61%), a extração com poligalacturonase de *Kluyveromyces fragilis* produzida no laboratório resultou em pectina com características que a indicam como a de melhor qualidade entre as obtidas.

Palavras-chave: Pectina. Amido. Bagaço de laranja.

CALLIARI, Caroline Maria. **Thermal, Chemical, and Enzymatic Extraction of Pectin from Orange Bagasse**. 2004. 89f. Dissertation (Master`s Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ABSTRACT

Pectin is a structural polysaccharide that occur in the cell wall of vegetables. It awards rigidity and is able to gel under specific conditions. Due the gelling property, is widely used as thickening or stabilizer agent in the food industry. Commercial pectin is extracted from bagasse of orange and of other citrus, but the most of orange bagasse remaining from juice extraction is sold to feeding. Pectin manufacturing uses mineral acids as hydrochloric and sulfuric, what makes it a pollutant process. In order to develop an alternative process of pectin extraction from orange bagasse remaining of the juice industry, thermal, chemical, and enzymatic processes were tried in this study. In chemical extraction were tested organic acids, as acetic and citric and the enzymatic processes were realized with commercial polygalacturonase from *Aspergillus niger* and with polygalacturonase produced in the laboratory, from *Kluyveromyces marxianus*. The Response Surface Metodology with factorial Box-Behnken designs 3^3 was applied to define the best extraction, according to the yield. Gelling power and galacturonic acid of the extracted pectins were also determined. Esterification degree of pectin obtained of citric acid extraction was determined. Extraction with citric acid was the most efficient, with a maximum yield of 39,23%, when it was utilized 4% of orange bagasse, citric acid 3,5% and temperature of 75°C. In spite of a lower yield (15,61%), the extraction with polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* produced in the laboratory resulted in pectin with characteristics that indicate it as the best in quality.

Keywords: Pectin. Amylum. Bagasse orange.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exportação de suco de laranja concentrado congelado, em 2002 (a) e em 2003 (b).....	19
Figura 2 – Estrutura química da pectina.....	22
Figura 3 – Ácido Galacturônico	23
Figura 4 – Metil-éster do ácido galacturônico	23
Figura 5 – Condições para geleificação da pectina em função da porcentagem de esterificação (%DE)	25
Figura 6 – Mecanismo de geleificação da pectina ATM	26
Figura 7 – Mecanismo de geleificação da pectina BTM	27
Figura 8 – Efeito da temperatura e da concentração de bagaço de laranja na porcentagem de extração térmica de pectina: linhas de contorno (a) e a superfície de resposta (b).....	56
Figura 9 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido na porcentagem de extração química de pectina com ácido acético: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta	61
Figura 10 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido na porcentagem de extração de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta.....	65
Figura 11 – Efeito da concentração de bagaço de laranja e da agitação na porcentagem de extração enzimática de pectina com poligalacturonase comercial: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta	70
Figura 12 – Efeito da proporção enzima/substrato e da agitação na porcentagem de extração enzimática de pectina com poligalacturonase produzida em laboratório: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta.....	74
Figura 13 – Rendimentos máximos de extração por processo de extração de pectina de bagaço de laranja.....	76
Figura 14 – Viscosidades dos géis das pectinas obtidas nos processos de extração estudados	78
Figura 15 – Porcentagens de ácido galacturônico das pectinas extraídas.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do grau de esterificação da pectina na velocidade de formação de gel.....	28
Tabela 2 – Delineamento experimental para os processos de extração de pectina de bagaço de laranja.....	45
Tabela 3 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo Térmico.....	46
Tabela 4 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo químico com ácido acético	47
Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo químico com ácido cítrico	47
Tabela 6 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo enzimático com poligalacturonase comercial	48
Tabela 7 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo enzimático com poligalacturonase produzida em laboratório	49
Tabela 8 – Delineamento experimental e resultados de rendimento de extração de pectina (%) obtidos no processo térmico	54
Tabela 9 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração, obtidos no processo térmico	55
Tabela 10 – Previsões do modelo para o rendimento de extração térmica de pectina de bagaço de laranja.....	57
Tabela 11 – Delineamento experimental e resultados de rendimento (%) obtidos na extração com ácido acético	59
Tabela 12 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento, obtidos na extração com ácido acético	60
Tabela 13 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com ácido acético.....	62
Tabela 14 – Delineamento experimental e resultados de rendimento (%) obtidos na extração com ácido cítrico.....	63
Tabela 15 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento, obtidos na extração com ácido cítrico	64
Tabela 16 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico.....	66

Tabela 17 – Atividade da enzima poligalacturonase.....	67
Tabela 18 – Delineamento experimental e resultados de rendimento de extração de pectina (%) obtidos no processo enzimático com poligalacturonase comercial	68
Tabela 19 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração, obtidos no processo enzimático com poligalacturonase comercial	69
Tabela 20 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase comercial	71
Tabela 21 – Delineamento experimental e resultados de rendimento de extração de pectina (%) obtidos no processo enzimático com poligalacturonase produzida em laboratório	72
Tabela 22 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração, obtidos no processo enzimático com poligalacturonase produzida em laboratório	73
Tabela 23 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase produzida em laboratório	75
Tabela 24 – Características das pectinas extraídas	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 LARANJA	17
3.2 BAGAÇO DE LARANJA	19
3.3 PECTINA	21
3.3.1 Formação de Gel.....	24
3.3.2 Características da pectina	28
3.3.3 Aplicação	29
3.3.4 Extração de pectina.....	31
4 MATERIAL & MÉTODOS	36
4.1 MATERIAL	36
4.1.1 Bagaço de laranja	36
4.1.2 Enzima poligalacturonase comercial	36
4.1.3 Microrganismo para produção de enzima poligalacturonase	36
4.1.4 Reagentes	37
4.1.5 Equipamentos	37
4.2 MÉTODOS	38
4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de laranja	38
4.2.2 Determinação de umidade	39
4.2.3 Determinação de pectina total no bagaço de laranja	39
4.2.4 Produção de enzima poligalacturonase por <i>Kluyveromyces marxianus</i>	41
4.2.5 Atividade da enzima poligalacturonase	42
4.2.6 Definição do melhor processo de extração de pectina do bagaço de laranja	43
4.2.7 Características da pectina extraída	50

5 RESULTADOS & DISCUSSÃO	53
5.1 Definição do melhor processo de extração de pectina de bagaço de laranja	53
5.1.1 Extração térmica	53
5.1.2 Extração química.....	58
5.1.3 Extração enzimática	67
5.1.4 Rendimento de extração	76
5.2 Características da pectina extraída.....	77
5.2.1 Poder de geleificação	78
5.2.2 Ácido galacturônico	79
5.2.3 Grau de esterificação	81
6 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas e maior exportador de suco de laranja (LARANJA BRASIL, 2003) e a indústria brasileira de suco de laranja concentra sua produção no estado de São Paulo (ABECITRUS, 2003). Da extração de suco de laranja, o bagaço é um dos resíduos, que ocupa espaço físico considerável e em sua maioria é destinado à alimentação animal. Este resíduo consiste em: casca ou flavedo, albedo, membranas e sementes. O albedo é uma porção branca e fibrosa que está na parte interna da casca e que contém a maior concentração de pectina do total do bagaço. O bagaço de laranja obtido da extração industrial de suco é rico em pectina (BELITZ e GROSCH, 1997; EL NAWAWI e SHEHATA, 1987), um polissacarídeo estrutural encontrado nos vegetais e que na indústria de alimentos é utilizado como ingrediente espessante ou estabilizante (BOBBIO E BOBBIO, 1995a).

O processo de extração industrial de pectina emprega ácidos clorídrico ou sulfúrico, e gera resíduos tóxicos (ARTHEY e ASHURST, 1997; BOBBIO e BOBBIO, 1995a; KIMBALL, 1991). Como processos alternativos de extração de pectina de bagaço de laranja pode-se considerar a extração térmica, com água e aplicação de calor (SOLER, 1995), a extração química com ácidos orgânicos (KALE e ADSULE, 1995) ou a extração enzimática com enzimas poligalacturonase (CONTRERAS ESQUIVEL et al., 1997). O ideal para extração de pectina é utilizar um processo que gere resíduos não tóxicos e que preferencialmente possam ser aproveitados. Além disso, deve apresentar bom rendimento de extração e ser brando para a pectina extraída, evitando degradação durante o processo (CONTRERAS ESQUIVEL et al., 1997; EL NAWAWI e SHEHATA, 1987).

Há estudos acerca de processos alternativos de extração de pectina a partir de casca de citrus, empregando diferentes ácidos, como ácido cítrico, tartárico (ATTRI e MAINI, 1996) e nítrico (ROUSE e CRANDALL, 1978). Extração enzimática de pectina de casca de citrus tem sido pesquisada e consiste na utilização da enzima poligalacturonase (CONTRERAS ESQUIVEL et al., 1997; SAKAI, OKUSHIMA e YOSHITAKE, 1984).

Este trabalho de pesquisa objetivou definir um processo térmico, químico ou enzimático de extração de pectina a partir de bagaço de laranja obtido da produção industrial de suco, em função do rendimento, além de determinar algumas características da pectina obtida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Definir um processo térmico, químico ou enzimático visando a extração de pectina a partir de bagaço de laranja obtido da produção industrial de suco, em função do rendimento e das características da pectina obtida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito da temperatura, concentração do extrator, concentração de bagaço de laranja, agitação e tempo de processamento nos processos testados;
- Determinar as características de poder de geleificação e porcentagem de ácido galacturônico das pectinas extraídas. Determinar o grau de esterificação da pectina resultante do processo de melhor rendimento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LARANJA

Laranjas pertencem à família das Rutáceas, ao gênero *Citrus* e à espécie *sinensis*. Respondem por 70% da produção de citrus e frutificam durante o ano todo, porém mais intensamente de abril a setembro (INFO COMM, 2003). Supõe-se que a laranja, assim como as demais frutas do gênero *Citrus*, seja originária do continente asiático (INFO COMM, 2003; KALE e ADSULE, 1995; TODA FRUTA, 2003).

No que se refere ao rendimento de frutas por pé, um pé de laranja produz em média 200 kg, ou seja, cerca de 880 unidades da fruta que rendem 14 kg de suco concentrado. Desses 14 kg, faz-se 100 litros de suco pronto para beber, o suficiente para encher 500 copos de 200 mL. Na safra, um pé de laranja pode fornecer dois copos de suco por dia para 250 pessoas (PETRIN, 2003).

O suco de laranja concentrado congelado é obtido de suco não fermentado, extraído por prensagem de frutas maduras, geralmente das variedades Valência, Pêra e Folha Murcha (PARANÁ CITRUS, 2003). O óleo essencial da casca é separado antes (BARTHOLOMAI, 1991; KALE e ADSULE, 1995) ou durante a extração do suco (PARANÁ CITRUS, 2003). Após a extração, o suco é concentrado por evaporação.

Em termos de valor econômico, os citrus lideram o mercado internacional de frutos e graças à liberalização do comércio e aos avanços tecnológicos, a indústria de citrus tem se tornado cada vez mais global (INFO COMM, 2003).

No Brasil, a produção de laranjas desenvolveu-se muito a partir dos anos 60, quando uma geada destruiu grande parte dos laranjais da Flórida. A partir dessa época, os Estados Unidos passaram a demandar importações, o que impulsionou países como o Brasil a investir nessa cultura. Nesse contexto, foram criadas pequenas fábricas, quase experimentais, no interior paulista (HASSE, 1987).

As estatísticas oficiais registram exportações de suco de laranja em 1961 e 1962, mas a indústria brasileira de cítricos voltada para a exportação nasceu

em 1963, quando exportou mais de 5 mil toneladas de suco, arrecadando mais de 2 milhões de dólares (HASSE, 1987).

Os produtores paulistas foram os primeiros a ter condições de entrar nesse mercado. Nos últimos 20 anos, com a instalação dos laranjais, foram notáveis as mudanças ocorridas na paisagem das regiões produtoras do Estado de São Paulo, especialmente nas proximidades das estradas que interligam os municípios de Limeira, Bebedouro e Araraquara (PROFRUTA, 2003).

A partir desse impulso nas exportações e do desenvolvimento da indústria citrícola, o Brasil é hoje o maior produtor mundial de laranjas e maior exportador de suco de laranja (LARANJA BRASIL, 2003; POTAFOS, 2003).

A cadeia citrícola brasileira, a mais competitiva do mundo, caracteriza-se como dinâmica, respondendo rapidamente às alterações do ambiente internacional. A logística montada para o transporte a granel do suco brasileiro é a mais moderna existente. É indiscutível a importância do sistema agroalimentar citrícola para a economia brasileira, gerando divisas em torno de US\$ 1,5 bilhão por ano (NEVES e MARINO, 2002).

A citricultura paulista ocupa o 1º lugar mundial na produção de laranja, suco concentrado e farelo de polpa cítrica para alimentação animal. O estado de São Paulo concentra 83% da produção brasileira e é responsável por 95% das exportações de suco de laranja (POTAFOS, 2003). Além de São Paulo, entre os estados brasileiros que dispõem de considerável produção de laranjas e demais frutos cítricos, destacam-se: Rio de Janeiro, Minas Gerais, Sergipe, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás (PROFRUTA, 2003).

No Brasil, as empresas líderes em exportação de suco de laranja estão localizadas na cidade de Araraquara, no estado de São Paulo. A Sucocítrico Cutrale responde por 30% de todo suco vendido no mundo, sendo sua principal concorrente a empresa Citrosuco, que domina mais de 20% do mercado mundial (SECCO e PATURY, 2003).

Pode-se considerar que até o mês de setembro de 2003 a exportação de suco de laranja concentrado congelado apresentou crescimento em relação ao ano anterior (Figuras 1a e 1b).

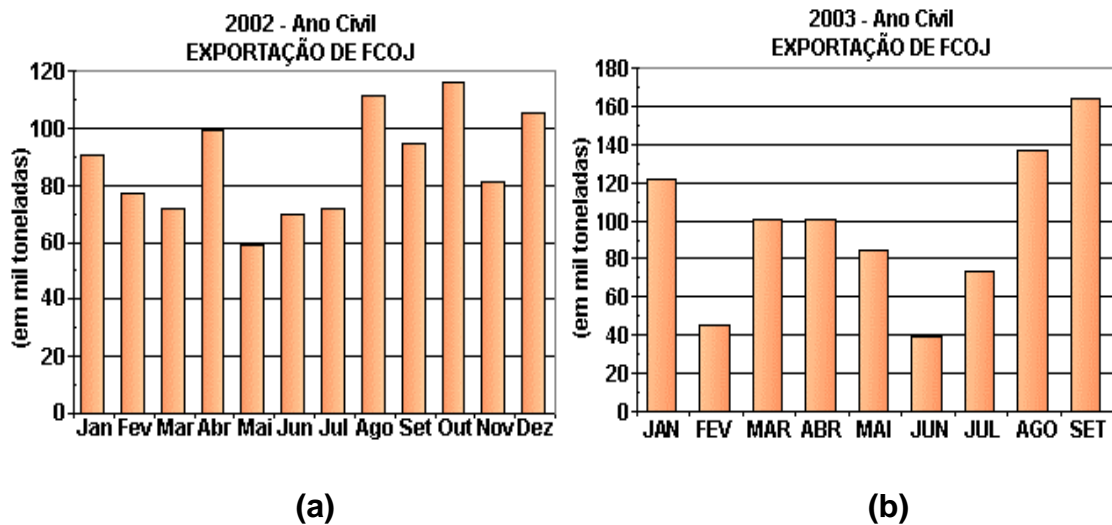


Figura 1 – Exportação de suco de laranja concentrado congelado, em 2002 (a) e em 2003 (b) (ABECITRUS, 2003)

De acordo com a Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos (Abecitrus) a previsão da safra 2003/2004 de laranja é estimada em 260 milhões de caixas no parque citrícola comercial brasileiro. Deste total, serão processadas 220 milhões de caixas e produzidas 900 mil toneladas de suco de laranja. Os números de safra, processamento e produção de suco são os menores desde a safra 1989/90 e a quebra foi causada pela estiagem ocorrida entre setembro e outubro de 2002, época da florada.

Segundo o executivo Ademerval Garcia, presidente da Abecitrus, apesar de a expectativa ser de um aumento na próxima safra, é impossível fazer qualquer previsão antes de março de 2004 (ABECITRUS, 2004).

3.2 BAGAÇO DE LARANJA

O bagaço da laranja, resíduo da produção industrial de suco, é composto por flavedo, albedo, membranas, resíduos de polpa e sementes (FOX, 1991; KALE e ADSULE, 1995). O flavedo é a casca propriamente dita, que contém óleos essenciais e pigmentos. O albedo é a porção branca, fibrosa, de alta porosidade, aderida internamente ao flavedo, sendo esta a camada que contém a

maior concentração de pectina do total contido no bagaço. Membranas presentes no bagaço contêm celulose, hemicelulose, lignina, pectina, compostos fenólicos, flavonóides e limonóides. O resíduo de polpa contém açúcares, ácidos, lipídios, compostos fenólicos, flavonóides, vitaminas e minerais (FOX, 1991).

Quanto à proporção entre a quantidade de laranjas que entram na planta para extração de suco e a quantidade de bagaço restante dessa extração, há variações de acordo com a variedade e o grau maturação da fruta, o tipo de processamento e processos subseqüentes à extração de suco.

Até 60% em peso da fruta são resíduos sólidos (casca, partes da polpa e sementes). Proporcionalmente, a laranja contém de 21,5 a 38,1% de casca; 61,9 a 78,6% de polpa e 23,8 a 51,0% de suco (CONTENTO TRADE, 2003). Segundo a Abecitrus (2003), o bagaço corresponde a cerca de 50%, em peso, das laranjas processadas.

Quanto aos resíduos da extração industrial de suco de laranja, segundo Cláudia Campos, da Empresa Paraná Citrus S/A, localizada na cidade de Paranaíba – PR, 43% da laranja que entra na planta processadora sai como resíduo sólido. A empresa tem capacidade de produção de 32000 caixas / dia, o que gera um volume de 550 toneladas de bagaço.

Um destino para o bagaço de laranja é a comercialização em forma de farelo. O farelo de polpa cítrica peletizado ou farelo de casca de laranja é obtido por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco e é usado principalmente como complemento para a ração animal, notadamente para a pecuária (ABECITRUS, 2003).

De acordo com El Nawawi e Shehata (1987), para destinar os resíduos da indústria de suco e obter maior retorno financeiro na indústria de citrus, os resíduos da extração de suco podem ser utilizados para a produção de pectina. Hegenbart (2001), ressalta a presença de pectina no flavedo, albedo e em membranas de citrus. Soler (1995), cita o uso de maçã ou frutos cítricos como fonte de extração industrial de pectina. Para Kale e Adsule (1995), os resíduos do processamento de maçãs e pêras são usados para extração de pectina, mas não de forma tão econômica como os resíduos de citrus.

Pectina cítrica é derivada de casca de limão e lima e, em menor escala, de casca de laranja e de toranja. Pectina de maçã é mais escura que a pectina cítrica, mas não há diferença substancial nas propriedades de uma e de

outra (CP KELCO, 2003; DANISCO, 2003). Para extração industrial de pectina, a matéria-prima mais utilizada é a casca de citrus.

A quantidade de pectina em bagaço de laranja é variável em função da variedade e do grau de maturação da fruta, do tempo decorrente entre a colheita e a extração de pectina e do processamento ao qual a fruta é submetida. O teor de pectina decresce em frutos conforme avança o amadurecimento (FONSECA, 2001) e conforme aumenta o tempo entre a colheita da laranja e o processamento de extração de pectina.

Em base seca, aproximadamente 30% do bagaço de laranja é pectina (CONTENTO TRADE, 2003; EL NAWAWI e SHEHATA, 1987). Segundo Belitz e Grosch (1997), casca de citrus contém de 20 a 40% de pectina, enquanto no bagaço de maçã esse conteúdo varia de 10 a 20%, em base seca. Fonseca et al. (2001), determinaram teores de pectina total como porcentagem de pectato de cálcio em cascas de laranjas das variedades Pêra, Valência e Hamlin. Em base úmida, os teores médios de pectina foram de 11,8% para laranja Pêra; 13,2% para a Valência e 10,3% para a Hamlin.

Na indústria de citrus, a pectina é um elemento comercial importante. O preço da pectina é em média seis vezes mais alto que o preço da casca de citrus peletizada para alimentação animal (JOHNSTON, 2001).

Segundo Golfi (2004), o preço de venda da pectina é bastante variável, mas para aplicação na indústria de alimentos, a pectina é vendida em média por 12 dólares o quilo.

Além de ser uma alternativa de aproveitamento para o resíduo da indústria processadora de suco de laranja, a extração de pectina a partir desse material é uma forma de agregar valor a esse resíduo, resultando em benefícios econômicos e minimizando danos ao meio ambiente.

3.3 PECTINA

A pectina está presente na parede celular dos vegetais, sob diferentes formas, conforme o avanço da maturação. Abaixo, uma breve definição das substâncias pécticas:

Protopectina – é altamente esterificada com metanol e é insolúvel em água. Durante o amadurecimento da fruta, a enzima protopectinase converte a protopectina a pectina coloidal, ou ácidos pectínicos, que são solúveis em água;

Pectina – é um polissacarídeo estrutural encontrado na parede celular de vegetais com a função de conferir rigidez. Também chamada de ácido pectínico, a pectina (Figura 2) é menos metilada que a protopectina. Os ácidos pectínicos são os ácidos poligalacturônicos coloidais que formam gel em condições específicas. A ação contínua da pectina-metilesterase sobre o ácido pectínico leva à remoção completa dos grupos metil-éster e à formação de ácidos pécticos;

Ácidos pécticos – são ácidos poligalacturônicos isentos de grupos metílicos. São degradados a ácido galacturônico pela enzima poligalacturonase. (GLICKSMAN, 1986; WHISTLER e DANIEL, 1985)

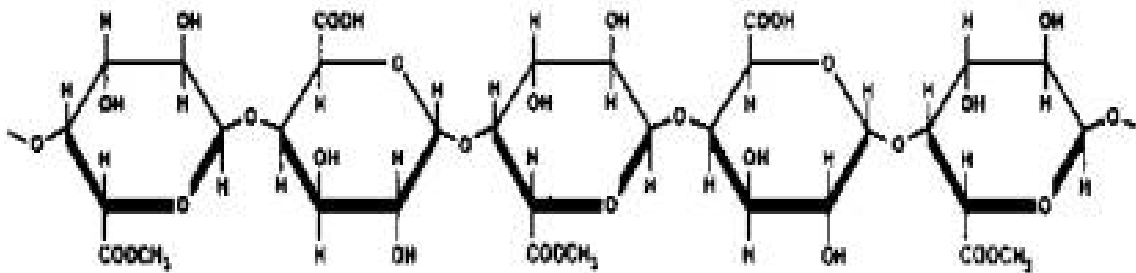


Figura 2 – Estrutura química da pectina (PEKTOWIN, 2003)

Segundo Bobbio e Bobbio (1995a), a pectina é formada por 150 a 1.500 unidades de ácido galacturônico (Figura 3) unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e apresenta peso molecular entre 100.000 a 200.000 Daltons. A composição e as propriedades da pectina variam de acordo com a fonte, o processo de extração empregado e tratamentos posteriores à extração (FENNEMA, 1996).

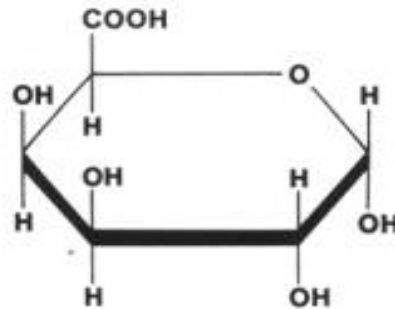


Figura 3 – Ácido Galacturônico (PEKTOWIN, 2003)

As cadeias lineares de ácido galacturônico possuem grupos carboxílicos esterificados (Figura 4) por radicais metoxil (CH_3) em maior ou menor grau. O grau de metoxilação (DM – *degree of metoxilation*) é uma medida da proporção de grupos carboxílicos que estão presentes na forma esterificada. Por exemplo, uma pectina de DM igual a 0,6 indica 60% de esterificação (BOBBIO e BOBBIO, 1995a; JACKIX, 1988).

A proporção de grupos metil-éster decresce conforme o vegetal amadurece. O grau de esterificação é calculado pela razão entre o número de resíduos de ácido D-galacturônico esterificados e o número total de resíduos de ácido D-galacturônico, multiplicado por 100 (WHISTLER e DANIEL, 1985).

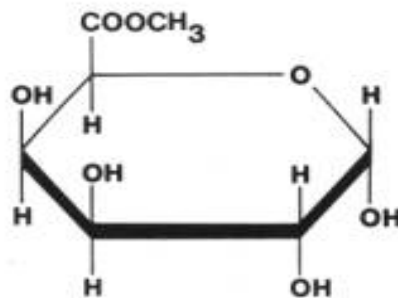


Figura 4 – Metil-éster do Ácido Galacturônico (PEKTOWIN, 2003)

3.3.1 Formação de Gel

A pectina tem a propriedade de formar gel em condições específicas, sendo que a rigidez do gel formado é diretamente proporcional ao peso molecular da pectina utilizada (BOBBIO e BOBBIO, 1995a). Pectinas normalmente produzem ótimo gel na concentração de 1%, mas essa concentração varia de acordo com o tipo de pectina utilizada (WHISTLER e DANIEL, 1985).

A formação do gel de pectina ocorre por dois mecanismos, dependendo do grau de metoxilação (DM). Pectina com DM até 50% é chamada de pectina de baixo teor de grupos metoxílicos (BTM), ou *low metoxil* (LM) e com mais de 50% de grupos metoxílicos é denominada pectina de alto teor de grupos metoxílicos (ATM), ou *high metoxil* (HM) (FENNEMA, 1996).

Nos vegetais, a pectina geralmente apresenta alto grau de metoxilação e a BTM é derivada da ATM por desesterificação (eliminação de radicais CH_3) pela ação de ácidos, enzimas ou alcáli (BOBBIO e BOBBIO, 1995a).

As pectinas intermediárias são aquelas com grau de metoxilação entre 50 e 55%, apresentando tanto características de pectina ATM como de BTM e não requerem condições tão específicas para formar gel. Variando as técnicas de produção industrial é possível obter diferentes tipos de pectina, quanto ao grau de metoxilas (ARTHEY e ASHURST, 1997).

A pectina geleifica em condições específicas e estas condições variam de acordo com o grau de esterificação (Figura 5). Assim, as condições para a formação de gel de pectina ATM diferem das requeridas para a geleificação da BTM (FENNEMA, 1996).

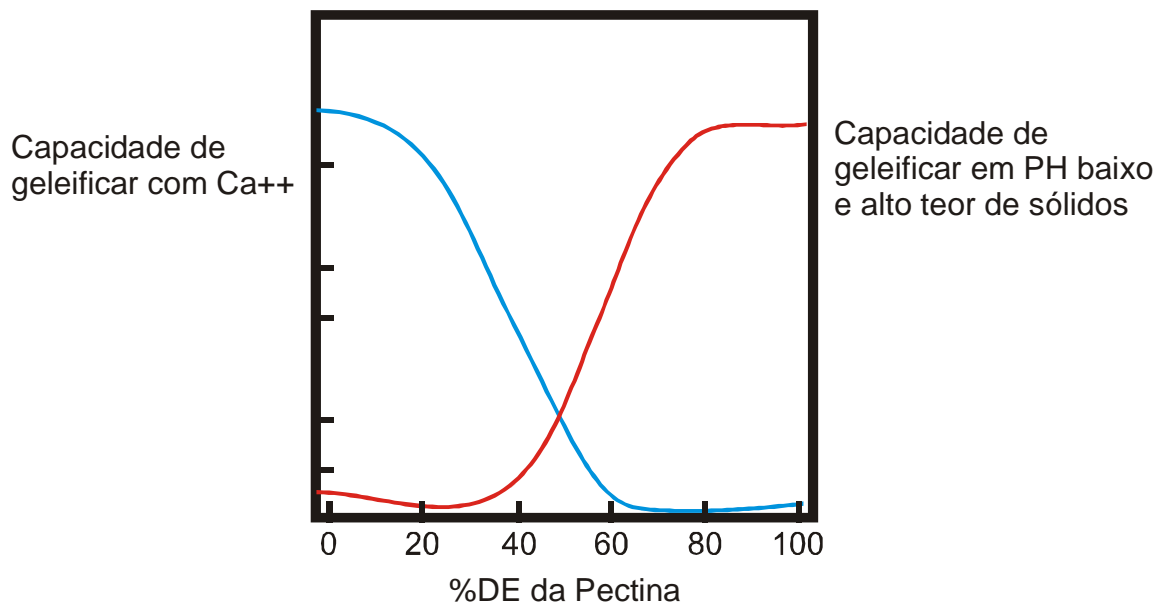


Figura 5 – Condições para geleificação da pectina em função da porcentagem de esterificação (%DE) (HOEFLER, 2004)

Numa solução de água quente contendo 0,3 a 0,4% de pectina, de pH 2,0 a 3,5 e com 60 a 65% de sacarose, no resfriamento o gel é formado e mantém suas características mesmo sob aquecimento a temperaturas próximas a 100°C. O pH entre 2,0 e 3,5 evita a ionização dos grupos carboxilato (que seriam ionizados a pH 7,0) e a sacarose na concentração de 60 a 65% desidrata as moléculas da pectina para permitir a formação de pontes de hidrogênio entre as mesmas (WHISTLER e DANIEL, 1985).

Na utilização da pectina ATM, a formação de gel (Figura 6) se dá pela aproximação das micelas de pectina (altamente hidratadas e carregadas negativamente: COO^-) por eliminação das cargas (COO^-) pelo abaixamento do pH até 2,8-3,5 e eliminação de parte da água (por adição de açúcar: 60-70% do total da solução). Por resfriamento forma-se o gel, que é termo-reversível (BOBBIO e BOBBIO, 1995b).

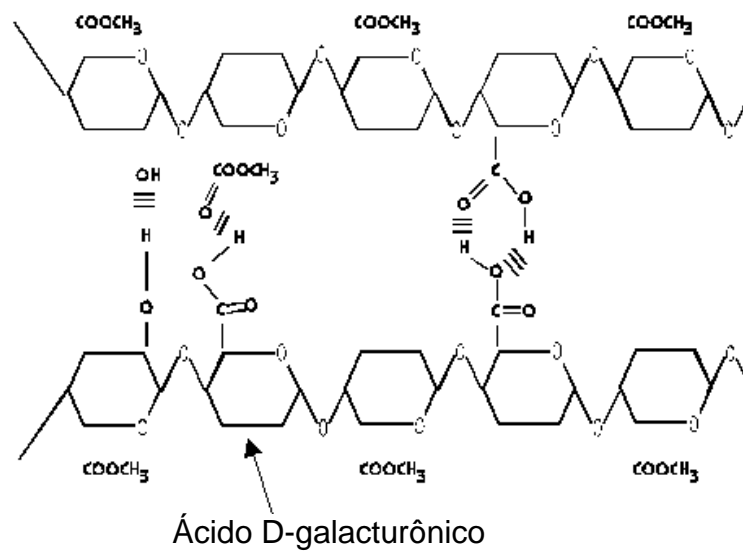


Figura 6 – Mecanismo de geleificação da pectina ATM (HOEFLER, 2004)

A pectina BTM forma gel (Figura 7) estável na ausência de açúcar e requer a presença de íons divalentes para a formação de ligações cruzadas entre as moléculas. No processamento de alimentos geralmente usa-se íons cálcio (Ca^{2+}). Em comparação às pectinas ATM, as pectinas BTM são menos sensíveis a alterações de pH, podendo formar gel na faixa de pH de 2,5 a 6,5. Ainda que a pectina BTM não necessite do açúcar para geleificar, a presença de 10 a 20% de açúcar resulta em gel com melhores propriedades texturais (WHISTLER e DANIEL, 1985).

A formação de gel de pectina BTM se dá por formação de ligações entre íons carboxílicos e íons Ca^{2+} (0,1-0,5% do peso do gel), que também ficarão ligados covalentemente a grupos OH. O metal é o ligante das cadeias de pectina, sem necessitar da presença do açúcar. O gel formado é termo-reversível (BOBBIO e BOBBIO, 1995b).

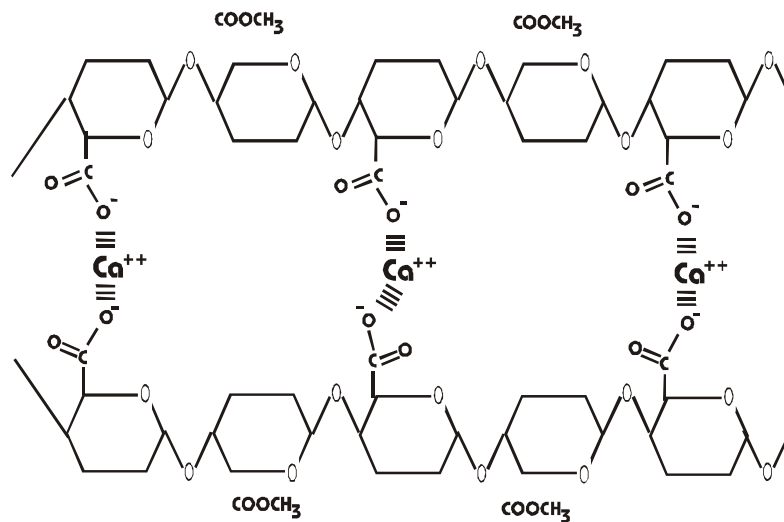


Figura 7 – Mecanismo de geleificação da pectina BTM (HOEFLER, 2004)

A pectina ATM é chamada de pectina rápida e geleifica a temperatura mais alta que a pectina BTM (BOBBIO e BOBBIO, 1995b). A geleificação da pectina rápida começa à temperatura aproximada de 85°C e a da pectina lenta, a aproximadamente 55°C (BRAVERMAN, 1967).

O tempo para formação de gel para as pectinas ATM é menor, provavelmente devido à interação hidrofóbica entre as moléculas de pectina por causa do grau de metilação relativamente alto. Já o fato de o tempo para geleificar ser maior para as pectinas BTM provavelmente se explica pelo aumento da interferência do éster pelos grupos metil-éster com as interações intermoleculares das pontes de hidrogênio (WHISTLER e DANIEL, 1985).

Na Tabela 1 pode-se observar os requisitos para a geleificação das pectinas ATM e BTM, bem como as velocidades de formação de gel.

Tabela 1 – Efeito do grau de esterificação da pectina na velocidade de formação de gel

°E (%)	Requisitos para a formação de gel			Velocidade de formação de gel
	PH	Açúcar (%)	Íon Divalente	
>70	2,8-3,4	65	Não	Rápida
50-70	2,8-3,4	65	Não	Lenta
<50	2,5-6,5	Não	Sim	Rápida

Fonte: WHISTLER e DANIEL (1985, p. 126)

3.3.2 Características da Pectina

Quanto à solubilidade, Kimball (1991) explica que a pectina é solúvel em água e outros solventes, dissolvendo em água quente em torno de 2 a 3%. Pectina homogeneiza melhor que gomas e outros espessantes, promovendo gel mais firme que a gelatina a 49°C. Segundo Fogarty (1983), as soluções aquosas de pectina são altamente viscosas, sendo a viscosidade dependente do peso molecular, do grau de esterificação, da força iônica, do pH, da temperatura e da concentração.

Quanto à estabilidade, a degradação do polímero de pectina é acelerada pelo aumento da temperatura (FOGARTY, 1983). A pectina apresenta maior estabilidade a pH entre 3,0 e 4,0 (BELITZ e GROSCH, 1997). Acidez alta, principalmente a altas temperaturas, causa a degradação da pectina.

A pureza de uma pectina é determinada segundo a porcentagem de ácido galacturônico. Pectinas de citrus de alta pureza apresentam uma porcentagem de ácido galacturônico acima de 74%. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO) o teor mínimo de ácido galacturônico para uma pectina comercial deve ser de 65% (CP KELCO, 2003).

Especificação para pectina comercial preconiza que 90% deve passar por tamis de 60 mesh (0,25 mm). A coloração da pectina comercial varia de bege a castanho amarelado para pectinas precipitadas com álcool e é amarelo esverdeado no caso de pectina precipitada por alumínio (CP KELCO, 2003).

3.3.3 Aplicação

O uso de pectina na fabricação de geléias teve início com experimentos do químico francês Braconnat, em 1820. Nos anos 1900 iniciou-se a produção de pectina em escala industrial, com a construção da primeira planta extratora de pectina, na Califórnia (KIMBALL, 1991).

De acordo com Ward e Andon (2002), a pectina, assim como todos os hidrocolóides, apresenta alta funcionalidade mesmo empregada em pequenas quantidades, podendo o uso resultar em redução de custos na indústria de alimentos.

Devido à capacidade de formar gel e aumentar a viscosidade de soluções, a pectina é um ingrediente amplamente utilizado como agente espessante na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (BOBBIO e BOBBIO, 1995a). Na indústria de alimentos a pectina é utilizada principalmente em produtos de frutas. A capacidade de formar gel permite o uso da pectina também como estabilizante em produtos alimentícios (CP KELCO, 2003).

O extrato de pectina concentrado, ou pectina líquida, pode ser usado diretamente no preparo de geléias (CONTENTO TRADE, 2003). No caso da pectina em pó, esta deve ser dissolvida ou misturada ao açúcar antes de ser adicionada à geléia, para evitar a formação de grumos e garantir que a pectina seja incorporada de forma homogênea no produto (JACKIX, 1988).

Como exemplos de produtos em que a pectina é empregada como espessante ou estabilizante, pode-se citar: geléias, preparados de fruta, concentrados de fruta para bebidas, sobremesas lácteas com sabor de fruta, produtos lácteos fermentados ou acidificados e produtos de confeitaria (CP KELCO, 2003).

Uma vez que a pectina ATM requer 55-85% de açúcar e pH 2,5-3,8 para geleificar, sua aplicação fica limitada ao uso em produtos de frutas adoçados. Cerca de 80% da pectina ATM fabricada no mundo é usada na fabricação de geléias, sendo empregada em produtos que contêm pectina, mas não em quantidade suficiente para resultar nas características desejadas para o produto. A pectina ATM é usada como estabilizante em concentrados de fruta para bebidas e em pós para suco é empregada para promover uma palatabilidade de suco natural.

Também é utilizada como agente de textura em produtos aerados de frutas (CP KELCO, 2003).

Outras aplicações da pectina ATM são: iogurtes, leites acidificados, recheios para bolos e tortas, refrigerantes e produtos de confeitaria (DANISCO, 2003).

Pectinas BTM são usadas em preparados de fruta para iogurte para promover textura firme, mas permitindo que o preparado de fruta seja facilmente misturado no iogurte. A pectina BTM pode ser empregada para a formação instantânea de gel. Um exemplo dessa aplicação é a geleificação por adição de um preparado de frutas contendo de 25 a 30% de sólidos solúveis, pH 4,0 e 2% de pectina BTM a igual proporção de leite frio, mistura esta que resulta em uma sobremesa láctea com sabor de fruta e com consistência gelatinosa (CP KELCO, 2003).

A pectina BTM é utilizada também em geléias com baixo teor de açúcar, preparados de fruta para sorvetes e em recheios para bolos e tortas (DANISCO, 2003).

A pectina tem sido usada em substituição à gelatina em iogurte cremoso. Uma pectina desenvolvida para sistemas lácteos acidificados assegura viscosidade e cremosidade diferenciadas ao produto final, mesmo utilizada em pequena quantidade (aproximadamente 0,1%) e se apresenta como uma alternativa competitiva ao uso de gelatina (FOOD INGREDIENTS, 2002).

Devido às propriedades coloidais, a pectina atua como lubrificante entre o alimento e as paredes do intestino e promove o peristaltismo normal sem irritação, auxiliando no tratamento de prisão de ventre (FOGARTY, 1983). Estudos indicam que a pectina, associada a outras fibras solúveis, bloqueia a síntese de colesterol no organismo (JOYCE, 2004).

Por ter a propriedade de aumentar a viscosidade e estabilizar emulsões e suspensões, a pectina é utilizada em várias preparações farmacêuticas líquidas. Pós, tabletes e suspensões anti-diarréicos geralmente contêm pectina na formulação (CP KELCO, 2003).

3.3.4 Extração de pectina

Segundo Contreras Esquivel et al. (1997), o processo de extração de pectina deve considerar diversos fatores: temperatura, tempo de extração, acidez do meio extrator, características morfológicas e estruturais do material vegetal a ser processado, entre outros. Segundo os autores, a produção industrial de pectina envolve uma série de etapas:

- 1 - Preparação da matéria-prima;
- 2 - Separação de compostos (açúcares, pigmentos, proteínas);
- 3 - Conversão da protopectina contida na matéria-prima em pectina solúvel;
- 4 - Separação de resíduos insolúveis da solução contendo pectina;
- 5 - Precipitação da pectina extraída;
- 6 - Purificação e secagem da pectina;
- 7 - Embalagem, armazenamento e comercialização.

O pré-tratamento de cascas de citrus para a produção de pectina envolve lavagem e branqueamento para remover glicosídeos, açúcares e ácido cítrico e para inibir a atividade da pectinesterase naturalmente presente na casca da fruta. Esse processo diminui o tempo de secagem e permite que o bagaço seja armazenado de maneira que ocorra pouca ou nenhuma alteração no teor de pectina e na estrutura deste carboidrato. O material pode ser então seco para possibilitar armazenamento e transporte a longas distâncias para a extração de pectina (GLICKSMAN, 1986; KIMBALL, 1991).

De acordo com Cruess (1973), em 1913 foi concedida a P. R. Boyles a patente para um processo de preparo de pectina extraída por fervura em água, concentração por aquecimento da solução e precipitação da pectina por adição de álcool.

Em nível industrial, a pectina é fabricada por extração ácida, a qual libera a pectina a partir da protopectina presente no vegetal. Após a extração, a matéria-prima é separada por filtração. Na solução resultante faz-se a precipitação alcoólica da pectina que é então purificada com etanol, seca e moída (DANISCO, 2003).

Segundo Kimball (1991), o processo tradicional de extração de pectina é realizado com ácido diluído, clorídrico ou sulfúrico, a pH 2, a temperatura de 40 a 100°C durante 45 a 60 minutos. Após o tempo de extração, a solução é filtrada usando papel filtro, terra diatomácea ou similar, empregando vácuo. O filtrado contém cerca de 1% de pectina e deve ser concentrado até 3 a 4%. Álcool é adicionado à solução (50 a 70% da quantidade de ácido utilizada), resultando na precipitação da pectina em uma massa gelatinosa. Uma prensa hidráulica geralmente é usada para separar a pectina da solução. Para lavar a pectina, normalmente é usada solução de 50 a 70% de álcool em água, finalizando com uma lavagem alcoólica-aquosa de 80 a 90%. A secagem envolve ar quente, com umidade final de 6 a 10%. A pectina sólida é então moída e embalada, apresentando-se como um pó branco-amarelado. Kimball (1991) ressalta a importância de monitorar e remover metais pesados, impurezas comumente presentes em ácidos de grau técnico, usados nesse tipo de extração.

De acordo com Contreras Esquivel et al. (1997), o processo de extração industrial de pectina é economicamente viável, altamente poluente por gerar resíduos tóxicos, corrosivo para os equipamentos e causa excessiva despolimerização da pectina resultando em pectina de baixo peso molecular. Segundo Arthey e Ashurst (1997), os resíduos da indústria de pectina causam graves problemas ambientais e podem ser empregados na elaboração de ração para gado, seguindo as normas ambientais locais.

Os resíduos do processamento da empresa são destinados: os efluentes são utilizados em irrigação e os resíduos sólidos são comercializados para ração animal (GOLFI, 2004).

De acordo com Kale e Adsule (1995), para extrair pectina, o bagaço é fervido com ácido clorídrico ou sulfúrico 0,015 a 0,20 N ou com ácido cítrico 0,025 M por 40 a 45 minutos. A suspensão é prensada e filtrada para obter a solução de pectina, que é centrifugada para a remoção de sedimento e então concentrada para obtenção da pectina em pó.

Segundo Belitz e Grosch (1997), a extração de pectina é feita a pH de 1,5 a 3,0 e a temperatura de 60 a 100°C.

Arthey e Ashurst (1997), a respeito dos diferentes processos de extração de pectina, afirmam que o tempo de extração pode variar de 30 minutos a

45 horas e a temperatura de 40 a 92°C, variando também a acidez do meio. Os autores relatam estudos de extração a frio, por uso de ultra-som.

Há referências sobre extração térmica de pectina somente em escala não industrial. Em tais processos se utiliza bagaço de frutas cítricas ou polpa de maçã. A extração artesanal de pectina de bagaço de maçã é feita usando água na proporção de 5 partes de bagaço para 4 partes de água, a 100°C por uma hora. O produto desta extração é uma solução de pectina que é filtrada, concentrada por uso de calor e pode ser empregada diretamente em geléias (SOLER, 1995).

Attri e Maini (1996) testaram extração de pectina com diferentes ácidos: clorídrico, nítrico, cítrico e tartárico. O melhor rendimento de extração (15,26% de pectina em base seca) encontrado foi com a aplicação do ácido clorídrico 0,1N, com proporção casca: ácido igual a 1:10, a 100°C, durante 60 minutos. O uso de casca em pó e emprego de duas extrações, auxiliaram na recuperação da pectina. Precipitação alcoólica da pectina extraída apresentou-se mais eficiente que precipitação com cloreto de alumínio. Após a extração ácida e precipitação com etanol 65%, a pectina obtida foi lavada com etanol 65% e 95%, seca em estufa a 40°C e moída em moinho martelo com peneira de 60 mesh. Os autores concluíram que os ácidos minerais apresentaram maior rendimento de extração de pectina de casca de citrus em comparação aos ácidos orgânicos e que ácidos minerais de pH mais baixo resultam em maior recuperação de pectina em relação aos de pH mais alto.

Extração de pectina de casca de lima e de limão foi testada por Rouse e Crandal (1978), utilizando ácido nítrico a pH 1,6. O rendimento da extração de pectina diminuiu proporcionalmente ao avanço no amadurecimento da fruta e a temperatura teve maior influência que o tempo de extração no rendimento do processo em função da pectina extraída.

El Nawawi e Shehata (1987) testaram extração ácida de pectina de casca de laranja, considerando vários parâmetros, como: temperatura e tempo de extração, concentração de ácido, proporção água:casca, agitação e tamanho de partícula. A casca fresca foi lavada em água corrente a 60°C por 30 minutos para remover sementes e sólidos solúveis, então o material foi drenado e prensado, cortado em pedaços de 2 cm de diâmetro e seco em estufa até umidade de 4 a 8%. Após fervura da casca com ácido, esta mistura foi esfriada até 60°C antes de ser separada por centrifugação. O sobrenadante foi precipitado com igual volume de

etanol 96%. Nesses experimentos, baixa temperatura não foi suficiente para hidrolisar a protopectina. As condições encontradas para extração ótima (rendimento entre 21-30%) foram: temperatura de extração de 90°C por 120 minutos (30 minutos para a primeira extração e 90 minutos para a segunda); proporção água:casca igual a 70:1; pH 1,7; velocidade de agitação da mistura de extração de 2200rpm e diâmetro de partícula igual a 0,075mm (EL NAWAWI e SHEHATA, 1987).

Segundo Contreras Esquivel et al. (1997), quando comparado à extração ácida, o processo de extração da pectina via enzimática apresenta maior facilidade de controle, menor consumo de energia, obtenção de polímeros de alto peso molecular e resíduos não tóxicos que podem ser empregados em alimentação animal. A extração enzimática resulta em produto final mais íntegro em comparação à extração ácida, uma vez que o ácido despolimeriza e degrada parcialmente a pectina.

A poligalacturonase é uma glicosilase que pertence ao grupo das hidrolases. Na *Enzyme Commission* (EC) é listada como EC 3.2.1.15, denominada *Poly- α -1,4-D-galacturonic acid glycanohydrolase* (NOLLET, 1996). O meio para produção da enzima poligalacturonase por microrganismos consiste em pectina (ou substância similar), fonte de Nitrogênio, extrato vegetal e sais minerais (FRAZIER, 1972).

Sakai, Okushima e Yoshitake (1984), investigaram a produção de enzimas pectolíticas por diferentes espécies de microrganismos do gênero *Kluyveromyces*. *Kluyveromyces fragilis* produziu enzima poligalacturonase com atividade de protopectinase, sendo capaz de liberar pectina a partir de várias protopectinas, em meio com pH 5,0 e a 30°C.

Um extrato enzimático produzido a partir de *Kluyveromyces fragilis* foi eficaz na extração de pectina de casca de laranja. As condições para extração da pectina foram otimizadas estudando-se a concentração enzimática, a proporção água: casca, a temperatura e o tempo de duração do processo. A mistura de casca, polpa e enzima foi mantida sob constante agitação durante o período de incubação e a quantidade de pectina liberada foi determinada a diferentes temperaturas, vários níveis de atividade enzimática, diferentes proporções água:casca e em intervalos de tempo superiores a 24h. A pectina liberada foi determinada por centrifugação (5000g/15 minutos) da mistura de casca e enzima, seguida por precipitação da pectina no líquido decantado usando 2 volumes de etanol absoluto. A separação da

pectina insolúvel em álcool foi feita por centrifugação (5000g/15 minutos), a lavagem com álcool foi repetida três vezes e a pectina liofilizada até peso constante. Proporção água:casca foi em torno de 12:1. A extração máxima de 12,5% de pectina de casca de laranja utilizando poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces fragilis* foi alcançada com concentração de enzima igual a 1,8 U, a 37°C, por 24h. Melhoras no processo foram observadas ao diminuir a proporção água:casca e ao prolongar o tempo de incubação (DONAGHY e MCKAY, 1994).

Produção de poligalacturonase pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, isolada de cacau foi pesquisada por Shwan e Rose (1994), avaliando o efeito da composição do meio para a produção da enzima. A partir de testes com meios contendo diferentes tipos de açúcares, concluíram ser glicose a mais indicada fonte de carbono e não encontraram efeito da pectina adicionada ao meio no aumento da produção da enzima nas condições estudadas. A temperatura ótima para liberação da poligalacturonase pelas culturas foi na faixa de 35-43°C. Quanto à atividade da poligalacturonase extraída, ao aumentar o valor de pH da mistura reativa de 3,0 para 5,0 houve aumento na atividade, mas em pH acima de 5,0 a atividade diminuiu drasticamente.

Segundo Stinson (*apud* Hegenbart, 2001), a fabricação de pectina oferece muitos desafios, sendo o maior deles o impacto ambiental causado pelo efluente da fabricação, o qual apresenta uma alta DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio). Ainda para Stinson, “Citrus contém muita pectina, é só uma questão de extraí-la de maneira econômica e com um processo ambientalmente seguro” (*apud* HEGENBART, 2001, p. 4).

4 MATERIAL & MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Bagaço de laranja

O bagaço de laranja utilizado no presente trabalho foi gentilmente fornecido por Paraná Citrus S/A, Paranaíba – PR. A laranja (*Citrus sinensis*) processada pela empresa corresponde às variedades Valência, Pêra e Folha Murcha. O bagaço de laranja foi fornecido *in natura* e congelado.

4.1.2 Enzima Poligalacturonase comercial

O processo por via enzimática foi realizado utilizando extrato enzimático líquido comercial de poligalacturonase de *Aspergillus niger* - Citrozym Cloudy 100L - fornecido pela empresa Novozymes Latin America Limited, Araucária - PR.

4.1.3 Microrganismo para produção de enzima poligalacturonase

Para a produção de enzima poligalacturonase com atividade de protopectinase, foi utilizada uma cepa de *Kluyveromyces marxianus* (CCT 3172) gentilmente cedida por Cláudia Bravo, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

4.1.4 Reagentes

Os reagentes químicos utilizados nos experimentos e análises foram de grau analítico.

4.1.5 Equipamentos

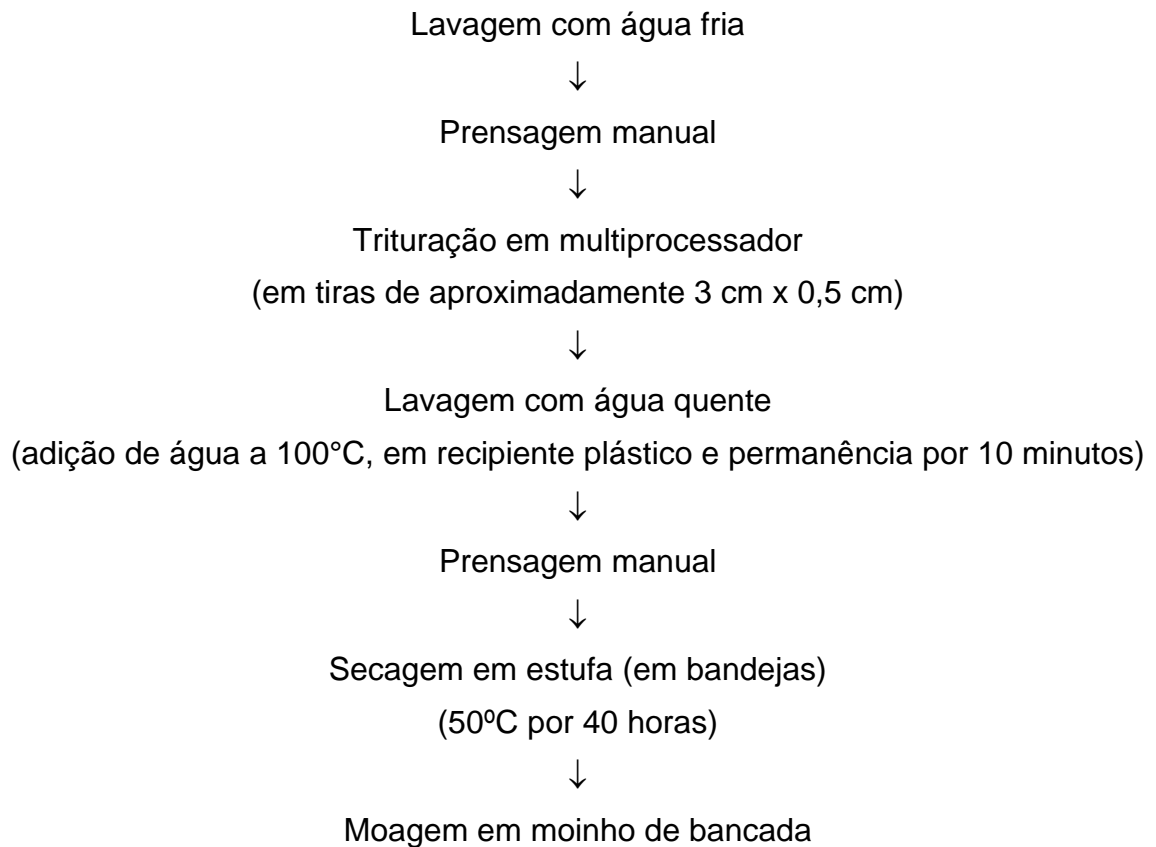
Os principais equipamentos utilizados para a realização dos experimentos foram os que seguem:

- Agitador magnético CORNING Stirrer/hot Plate
- Balança analítica Gehaka AG 200
- Banho-maria CIENTEC com controle de temperatura
- Centrífuga 2250g: EV:025-M Macro IV EVLAB
- Centrífuga refrigerada eppendorf 5804R
- Espectrofotômetro GBC Cintra 20 UV Visible Spectrometer
- Estufa 40°C: FANEM Modelo 311CG
- Estufa 50°C: BIOMATIC
- Estufa 105°C: NEUONI NV 1,5
- Incubadora refrigerada (*Shaker*) MA 830/A Marconi
- Moinho de bancada Janke & Kunkel IKA ANALYSENMÜHLE A 10
- Multiprocessador Mega Master Walita
- Potenciômetro HANNA HI 8314
- Refratômetro de mão ATAGO N1
- Viscosímetro Brookfield Model DV II+

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de laranja

Antes de ser submetido aos processos de extração de pectina, o bagaço de laranja foi preparado, de acordo com Kimball (1991), com algumas adaptações, compreendendo as etapas que seguem:



O pó resultante deste pré-tratamento apresentou coloração laranja-escuro. Este material foi armazenado em recipiente fechado, em câmara fria a 4°C para posterior uso.

4.2.2 Determinação de umidade

A umidade do bagaço foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 2 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976).

4.2.3 Determinação de pectina total no bagaço de laranja

Para esta determinação, a extração da pectina total foi realizada segundo McCready e McComb (1952). A quantidade de pectina, em porcentagem, foi então determinada como ácido galacturônico, segundo a metodologia de Kintner e Van Buren (1982).

a) Extração da pectina total

No método de McCready e McComb (1952) para extração de pectina total, a lavagem da amostra com etanol é realizada para eliminar açúcares. A solução de EDTA tem a finalidade de seqüestrar íons cálcio, os quais iriam interferir na solubilidade de certas frações de pectina. A adição da solução de hidróxido de sódio até pH 11,5 desesterifica a pectina da amostra e o ácido acético é adicionado para corrigir o pH a 5,0 para possibilitar a ação da enzima pectinase, que é responsável pela extração propriamente dita. Este método é adequado para amostras que contêm de 10 a 40% de pectina.

Para extração da pectina total foi pesado 0,5 g da amostra de bagaço de laranja seco e moído, que foi transferido para béquer e adicionado de 30 mL de álcool etílico 80%, sob agitação. A mistura foi filtrada à vácuo usando papel filtro Whatman nº 1. O béquer foi lavado com 30 mL de álcool etílico 80% e a solução foi vertida sobre o funil. Novamente passou-se 30 mL de álcool etílico 80% sobre o resíduo no funil. Retirou-se do funil o filtro contendo o resíduo e este foi transferido para béquer com auxílio de 200mL de solução de EDTA 0,5%, procedendo agitação até total dissolução do resíduo. O pH foi ajustado a 11,5 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e o sistema permaneceu em repouso por

30 minutos, a temperatura ambiente. O pH foi corrigido para 5,0 com ácido acético 50%, adicionou-se 32 μL (1 g) de pectinase Sigma e então manteve-se sob agitação a 150 rpm em agitador orbital durante 60 minutos. O sistema foi transferido para balão volumétrico de 250 mL, o volume completo com água destilada e em seguida filtrou-se em papel de filtro Whatman nº 1. Nesta solução determinou-se a concentração de ácido galacturônico de acordo com Kintner e Van Buren (1982).

b) Concentração de ácido galacturônico

A metodologia colorimétrica de Kintner e Van Buren (1982) emprega m-hidroxidifenil, um reagente específico para ácidos urônicos, sendo praticamente insensível a carboidratos interferentes. Nesta determinação, o branco da amostra, sem m-hidroxidifenil, é realizado para descontar alguma interferência por carboidratos não urônicos. O repouso de 20 minutos antes da leitura da absorbância em espectrofotômetro é essencial, uma vez que as bolhas de gás formadas após a adição de m-hidroxidifenil e agitação podem interferir na leitura, resultando em valores acima dos reais. A determinação de ácido galacturônico, de Kintner e Van Buren (1982) é uma modificação do método de Blumenkrantz e Asboe Hansen (1973).

Procedeu-se o método colorimétrico, em duplicata, transferindo 1 mL da solução resultante da extração de pectina total para tubos de ensaio nº 9820, que foram mantidos em banho de gelo por alguns minutos. Em seguida adicionou-se 6 mL de solução de tetraborato de sódio decahidratado 0,0125 M em ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram agitados lentamente no banho de gelo e então em vórtex, interrompendo e reiniciando a agitação, tendo cuidado para que não aumentasse a temperatura do conteúdo dos tubos. Os tubos foram tampados com bolas de vidro e mantidos em banho-maria fervente por exatamente 5 minutos. Os tubos foram retornados ao banho de gelo até esfriar. Adicionou-se aos tubos 0,1 mL de solução de m-hidroxidifenil 0,15% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,5% e agitou-se muito bem em vórtex. Os tubos foram mantidos em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos para então realizar a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro em comprimento de onda de 520 nm. O branco da amostra foi realizado com uma alíquota de 1 mL de amostra, seguindo os mesmos procedimentos de análise, porém adicionando 0,1 mL de hidróxido de sódio (NaOH)

0,5% no lugar da solução de m-hidroxidifenil 0,15% em hidróxido de sódio (NaOH). O espectrofotômetro foi calibrado com água destilada e a absorbância do branco descontada da absorbância da amostra.

A curva de calibração ($R^2=0,9957$) para esta determinação foi construída utilizando solução de ácido galacturônico em sete concentrações (10 a 70 μg), em duplicata, seguindo o mesmo procedimento descrito para a amostra. O branco para a curva padrão foi realizado utilizando 1 mL de água destilada no lugar do padrão e 0,1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5% no lugar da solução de m-hidroxidifenil 0,15% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,5%. O espectrofotômetro foi calibrado com água destilada e a absorbância do branco descontada da absorbância do padrão.

4.2.4 Produção de enzima poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*

a) Preparo do pré-inóculo

O microrganismo, presente inicialmente em ágar inclinado YEPG (*Yeast Extract Polypeptone Glucose*), foi adaptado ao meio descrito por Bravo (2000), para produção da enzima poligalacturonase: melaço de cana 12°Brix, suplementado com de sulfato de amônio (0,5 g/100 mL) e pectina (0,70 g/100 mL). Para tanto, foi inoculada, de maneira asséptica, uma alçada de *Kluyveromyces marxianus* no meio descrito acima e foi incubado em *shaker* a 28°C e 180 rpm por 24 h (GUILHERME, 2001).

b) Preparo do inóculo

Uma alíquota de 5 mL do pré-inóculo foi transferida para um erlenmeyer contendo o meio composto por melaço de cana, sulfato de amônio e pectina para incubação a 28°C e 180 rpm por 24h (GUILHERME, 2001).

c) Produção da enzima

Para a produção da enzima, foi adicionada uma alíquota de 1 mL do inóculo a um erlenmeyer contendo o meio composto por melaço de cana, sulfato de

amônio e pectina, o qual foi incubado a 28°C e 150 rpm por 48h (BRAVO, 2000). Após este período, o meio foi centrifugado a 17.000g e 4°C por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para um recipiente mantido em banho de gelo (GUILHERME, 2001).

d) Obtenção do extrato enzimático

A enzima presente no filtrado obtido na etapa anterior foi precipitada por adição de 40% (p / v) de sulfato de amônio ao filtrado. Após dissolução do sal, o sistema foi mantido em repouso a 4°C durante minutos. O extrato enzimático precipitado foi separado por centrifugação a 15.000g e 4°C por 15 minutos (GUILHERME, 2001).

O precipitado foi ressuspenso em tampão acetato 0,02M, pH 5,0 e, para eliminação do sulfato de amônio, dialisado contra tampão acetato 0,02M, pH 5,0 a 4°C por 48h, trocando o tampão a cada 12 horas, usando saco de diálise Cut-off de PM de 12.000 a 16.000 Dalton e porosidade de 25 angstroms (GUILHERME, 2001). O extrato enzimático foi armazenado sob refrigeração.

4.2.5 Atividade da enzima poligalacturonase

As atividades das poligalacturonases, tanto da enzima comercial como da produzida no laboratório, foram obtidas por determinação colorimétrica da quantidade de açúcar redutor liberada pela ação das enzimas sobre uma solução de ácido poligalacturônico (PRESSEY e AVANTS, 1973).

Para tanto, preparou-se uma solução de ácido poligalacturônico por adição de 250 mg de ácido poligalacturônico a 100 mL de tampão citrato 0,1M pH 4,0. Para ocorrer a reação enzima-substrato, 1 mL de enzima foi adicionado a 2 mL de solução substrato, em tubo de ensaio, que foi mantido sob aquecimento em banho-maria a 40°C por 30 minutos. Para encerrar a reação, o tubo foi mantido em banho de gelo por alguns minutos, então uma alíquota de 1 mL foi diluída para 25 mL com água destilada para realizar a determinação de açúcares redutores. A atividade enzimática foi medida pela quantidade de açúcares redutores (padrão

glicose) liberados pela ação da enzima nas condições do ensaio. A quantidade de açúcares redutores liberados foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (SOUTHGATE, 1976), utilizando curva padrão ($R^2=0,9972$) com solução de glicose em 5 concentrações (40-120 μg), em duplicata. O resultado da atividade enzimática foi expresso em UAP (Unidade de Atividade de Poligalacturonase), sendo que uma UAP é igual a 1 mg de açúcar redutor (glicose) liberado por mL de enzima por minuto de ensaio.

a) Determinação de proteínas solúveis

A quantidade de proteínas solúveis das enzimas utilizadas nos experimentos foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando o reagente de Folin-Cicolteau e albumina de soro bovina como padrão.

A curva padrão ($R^2=0,9896$) foi construída utilizando solução padrão de albumina de soro bovina em 6 concentrações (100-500 μg), em duplicata.

b) Atividade específica da enzima poligalacturonase

Para definir a atividade específica da enzima, calculou-se a razão entre a atividade da enzima e o teor de proteínas, assim, tendo-se a atividade por unidade de proteína da enzima.

4.2.6 Definição do melhor processo de extração de pectina do bagaço de laranja

A definição do melhor processo de extração de pectina de bagaço de laranja, em função do rendimento (%) e das características das pectinas obtidas, foi realizada pela avaliação de diferentes processos de extração (térmico, químico e enzimático). Foram avaliadas características das pectinas obtidas, tais como: poder de geleificação, porcentagem de ácido galacturônico e grau de esterificação.

Os processos testados foram os seguintes:

- ◆ Processo térmico;
- ◆ Processos químicos:
 - ↳ extração com ácido acético;
 - ↳ extração com ácido cítrico;
- ◆ Processos enzimáticos:
 - ↳ extração com enzima poligalacturonase comercial;
 - ↳ extração com enzima poligalacturonase produzida em laboratório.

Para delinear os experimentos e analisar os resultados obtidos, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (*RSM – Response Surface Methodology*). Decidiu-se por esta metodologia porque a sua aplicação possibilita: amplitude de resposta, avaliação da interação das variáveis e avaliação do efeito de duas ou mais variáveis aplicadas ao mesmo tempo e em diferentes níveis (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001).

Os delineamentos experimentais, bem como a análise dos resultados obtidos, foram realizados utilizando o software *Statistica 5.0*.

Para os experimentos foram utilizados delineamentos fatoriais de Box-Behnken. Este tipo de delineamento é econômico quanto ao número de ensaios necessários e requer o uso de três níveis por fator.

Para cada um dos processos testados foram avaliadas 3 variáveis independentes, em 3 níveis de variação, originando delineamentos fatoriais fracionários Box-Behnken 3^3 , totalizando 15 ensaios por experimento.

Na Tabela 2 está a matriz codificada do delineamento utilizado nos experimentos.

Tabela 2 – Delineamento experimental para os processos de extração de pectina de bagaço de laranja

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Os experimentos foram realizados utilizando frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio extrator, tampados com bonecas.

Para efeito de comparação entre os processos, a variável x_1 , que corresponde à concentração de bagaço de laranja (em porcentagem) utilizada nos experimentos, apresenta os mesmos níveis para os cinco experimentos, sendo que -1, 0 e +1 correspondem a 4, 6 e 8% de bagaço.

As quantidades de bagaço de laranja utilizadas nos experimentos foram definidas considerando dados da literatura: para extração ácida de pectina, El Nawawi e Shehata (1987) usaram 1,43% de casca de laranja, Attri e Maini testaram extração com 2,5 a 10% de casca; para extração enzimática, Donaghy e McKay (1994) usaram em torno de 8% de matéria-prima para extração de pectina; além desses dados, foram considerados resultados de experimentos prévios.

A variável tempo foi testada somente para o processo térmico. Para os outros processos esta variável foi fixada em 60 minutos, de acordo com dados da literatura e resultados de testes prévios.

Os níveis de variação estabelecidos para a temperatura (40, 80 e 120°C) utilizada no processo térmico e nos processos químicos foram dentro de uma faixa ampla para que fosse possível mapear a região de ótimo rendimento em função desta variável. Nos processos enzimáticos, a temperatura foi fixada de acordo com a ideal para atividade da enzima em questão.

a) Extração térmica

No processo de extração térmica de pectina foi utilizado bagaço de laranja suspenso em água com aplicação de diferentes temperaturas, concentrações de bagaço e tempos de processo.

Os níveis de variação das distintas variáveis estudadas no processo térmico, estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo térmico

	- 1	0	+ 1
X ₁	4	6	8
X ₂	30	60	90
X ₃	40	80	120

Onde:

X₁ = Concentração de bagaço de laranja (%)

X₂ = Tempo de processamento (minutos)

X₃ = Temperatura (°C)

b) Extração química

Para a extração química foram utilizados diferentes ácidos orgânicos: ácido acético e ácido cítrico. Para cada processo químico foram variadas as concentrações de bagaço de laranja, concentrações de ácido e temperaturas de extração.

b.1) Extração com ácido acético

Os níveis de variação das distintas variáveis aplicadas na extração com ácido acético estão na Tabela 4.

As concentrações de ácido acético foram padronizadas para obter determinados valores de pH. Foi utilizado ácido acético 2% (pH 2,5), 7% (pH 2,3) e 12% (pH 2,1). A relação entre as porcentagens de ácido acético e a molaridade é: 2% (0,3M), 7% (1M) e 12% (2M).

Tabela 4 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo químico com ácido acético

	- 1	0	+ 1
X ₁	4	6	8
X ₂	2	7	12
X ₃	40	80	120

Onde:

X₁ = Concentração de bagaço de laranja (%)

X₂ = Concentração de ácido (%)

X₃ = Temperatura (°C)

b.2) Extração com ácido cítrico

Kale e Adsule (1995) citam o uso de ácido cítrico 0,025M (0,48%) para extração de pectina. Attri e Maini (1996) testaram extração de pectina com ácido cítrico e outros ácidos orgânicos. As concentrações padronizadas de ácido cítrico foram: 0,5% (pH 2,3), 2% (pH 2,0) e 3,5% (pH 1,8).

As variáveis e os respectivos níveis de variação para o experimento com ácido cítrico estão na Tabela 5.

Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo químico com ácido cítrico

	- 1	0	+ 1
X ₁	4	6	8
X ₂	0,5	2	3,5
X ₃	40	80	120

Onde:

X₁ = Concentração de bagaço de laranja (%)

X₂ = Concentração de ácido cítrico (%)

X₃ = Temperatura (°C)

c) Extração enzimática

Nos processos de extração enzimática as variáveis foram: concentração de substrato (bagaço de laranja), em porcentagem, proporção enzima/substrato (mL/g) e a velocidade de agitação (rpm).

A proporção de enzima em relação ao substrato foi definida com base em resultados de testes prévios, levando em conta a economia de enzima.

Por serem as enzimas extremamente específicas, as condições de temperatura e pH foram constantes, aplicando-se as indicadas como ótimas para cada enzima.

c.1) Extração com enzima poligalacturonase comercial

A extração de pectina por poligalacturonase comercial consistiu em aplicar a enzima Citrozym Cloudy 100L (de *Aspergillus niger*) à solução tampão citrato pH 4,5 contendo bagaço de laranja. Esse sistema foi mantido em *shaker* a 55°C, sob agitação, durante 60 minutos e a reação foi interrompida em banho-de-gelo (Novozymes Latin America Limited, 2002).

As variáveis independentes e os níveis de variação para a extração enzimática com poligalacturonase comercial estão na Tabela 6.

Tabela 6 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo enzimático com poligalacturonase comercial

	- 1	0	+ 1
X ₁	4	6	8
X ₂	0,04	0,06	0,08
X ₃	75	100	125

Onde:

X₁ = Concentração de bagaço de laranja (%)

X₂ = Proporção enzima/substrato (mL/g)

X₃ = Agitação (rpm)

c.2) Extração com enzima poligalacturonase produzida em laboratório

Para a extração de pectina por poligalacturonase de *Kluyveromyces marxianus* produzida em laboratório, esta enzima foi aplicada à solução tampão citrato pH 5,0 contendo bagaço de laranja. O sistema foi mantido em *shaker* a 50°C, sob agitação, por 60 minutos e a reação foi interrompida em banho-de-gelo (GUILHERME, 2001).

O delineamento experimental utilizado foi igual para os dois processos enzimáticos. As variáveis independentes e os níveis de variação para a extração enzimática com poligalacturonase produzida em laboratório estão na Tabela 7.

Tabela 7 – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo enzimático com poligalacturonase produzida em laboratório

	- 1	0	+ 1
X ₁	4	6	8
X ₂	0,04	0,06	0,08
X ₃	75	100	125

Onde:

- X₁ = Concentração de bagaço de laranja (%)
- X₂ = Proporção enzima/substrato (mL/g)
- X₃ = Agitação (rpm)

d) Determinação da pectina liberada

Após terminado o tempo estabelecido para a extração em cada um dos processos, os frascos foram resfriados para seguir a determinação de pectina liberada, segundo Donaghy e Mckay (1994), com algumas modificações.

Nesta determinação a mistura bagaço / meio de extração / pectina extraída foi centrifugada a 2250g por 15 minutos e filtrada à vácuo, em filtro Whatman nº 1. Ao filtrado adicionou-se 12 mL de etanol frio 95% para a precipitação da pectina em uma massa gelatinosa que foi separada por centrifugação a 2250g

por 15 minutos e filtrada à vácuo, usando filtro de viscosa. A pectina foi lavada duas vezes com etanol frio 65% (a 2250g por 15 minutos) e finalmente com etanol frio 95% (a 2250g por 15 minutos) para ser seca em estufa a 40°C *overnight*. O peso final foi a quantidade, em gramas, de pectina extraída.

e) Rendimento de extração

Esta avaliação foi realizada por aplicação de cálculo para avaliar a proporção de pectina extraída em relação ao total de pectina da amostra.

Pectina total - 100%
Pectina extraída - x%

4.2.7 Características da pectina extraída

a) Poder de geleificação

As pectinas obtidas pelos diferentes processos de extração foram testadas quanto à capacidade de geleificar na concentração de 1% em soluções padrão de 67,5% de sacarose e pH 3,0 (JACKIX, 1988).

Em béquer de 125 mL, foram pesados 6,75 g (20% do total de açúcar) de açúcar cristal e 0,5 g (1%) de pectina, que foram bem homogeneizados. Sob agitação, com bastão de vidro, foram adicionados 45 mL de água destilada e a mistura foi mantida sob aquecimento em banho-maria a 100°C até dissolução. Adicionou-se, aos poucos, 27 g (os 47,5% restantes) de açúcar cristal, agitando com bastão de vidro. O aquecimento foi mantido até dissolução total do açúcar e então manteve-se a fervura por mais 2 minutos. Manteve-se o a solução a temperatura ambiente por cinco minutos e adicionou-se 5 mL de solução de ácido cítrico 0,5%. Quando a solução estava a 85°C, foi envasada em frasco de vidro que foi tampado e mantido em repouso a 25°C por 24 horas.

A viscosidade foi medida em viscosímetro Brookfield, a 50 rpm e 25°C.

b) Concentração de ácido galacturônico

Para avaliação da pureza das pectinas extraídas pelos diferentes processos foi determinada a concentração de ácido galacturônico nas pectinas obtidas por cada processo de extração.

A metodologia utilizada foi a de Kintner e Van Buren (1982), descrita no item 4.2.3. Para ajustar a concentração das soluções de pectina à faixa de sensibilidade do método, foram preparadas soluções de 400 µg/mL de pectina, utilizando as pectinas obtidas pelos diferentes processos, e para a determinação foi usado 0,1 mL destas soluções mais 0,9 mL de água destilada, resultando em 1mL de solução contendo 40µg de pectina.

c) Grau de esterificação

O grau de esterificação da pectina obtida pelo processo que resultou em melhor rendimento foi determinado segundo metodologia do *Food Chemical Codex* (apud KIMBALL, 1991, p. 307).

Foram pesados 5 g da amostra de pectina em béquer de 250 mL. Adicionou-se 100 mL de álcool isopropílico 60% e 5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e o sistema foi mantido sob agitação por 10 minutos, em agitador magnético. Filtrou-se à vácuo em funil de vidro sinterizado de 50 mL, lavando a pectina retida seis vezes com 15 mL de solução de HCl:etanol (50:50). Em seguida a pectina foi lavada com álcool isopropílico 60% (até que o álcool aparecesse límpido na saída do funil) e então lavada, ainda no funil, com 20 mL de álcool isorpopílico anidro e seca em estufa a 105°C por duas horas e meia.

Foi transferido 0,5 g do filtrado seco para erlenmeyer de rolha esmerilhada de 250 mL e adicionou-se 2 mL de etanol e em seguida, 100 mL de água destilada fervida, a temperatura ambiente. O frasco foi tampado e foi mantida agitação em agitador magnético ate dissolução total. Adicionou-se 5 gotas de solução de fenolftaleína 1% em álcool isopropílico e titulou-se com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N, anotando o volume (V_1) após a viragem. Adicionou-se 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5N, o frasco foi tampado, agitado vigorosamente e mantido em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 20 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,5N e o frasco foi agitado ate desaparecimento da cor

rosa. Adicionou-se então 3 gotas de solução de fenolftaleína 1% em álcool isopropílico e titulou-se com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N até um rosa claro que persistisse mesmo com vigorosa agitação, anotando o volume da titulação (V_2).

O grau de esterificação, em porcentagem, foi calculado por:

$$E^{\circ} = \frac{V_2 \cdot (100\%)}{V_T}$$

Onde:

$^{\circ}E$ = grau de esterificação;

$V_T = V_1 + V_2$.

De acordo com a metodologia, a porcentagem de ácido galacturônico pode ser calculada por:

$$AG = 3,52 V_1 + 3,80 V_2$$

5 RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 DEFINIÇÃO DO MELHOR PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE PECTINA DO BAGAÇO DE LARANJA

O bagaço de laranja utilizado nos experimentos apresentou umidade de 5,07% e teor de pectina total igual a 29,30%, em base seca.

Este resultado vai ao encontro de Ashurst (1995), El Nawawi e Shehata (1987) e Kale e Adsule (1995), os quais descrevem que, em base seca, de 20 a 40% do bagaço de laranja é pectina.

5.1.1 Extração térmica

O delineamento experimental fatorial de Box-Behnken 3^3 utilizado neste experimento, bem como os resultados de rendimento de extração de pectina (%), estão na Tabela 8.

Tabela 8 – Delineamento experimental e resultados de rendimento de extração de pectina (%) obtidos no processo térmico

Ensaio	Variáveis			Resposta
	x_1	x_2	x_3	y
1	4	30	80	0
2	8	30	80	2,62
3	4	90	80	0
4	8	90	80	5,93
5	4	60	40	0
6	8	60	40	0
7	4	60	120	7,71
8	8	60	120	18,92
9	6	30	40	0
10	6	90	40	0
11	6	30	120	16,13
12	6	90	120	8,78
13	6	60	80	0
14	6	60	80	0
15	6	60	80	0

Onde: x_1 = concentração de bagaço de laranja (%); x_2 = tempo (minutos); x_3 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$); y = rendimento de extração (%).

Os efeitos das variáveis sobre a resposta rendimento de extração (%), obtidos a partir do delineamento fatorial de Box-Behnken 3^3 , estão na Tabela 9.

Tabela 9 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração, obtidos no processo térmico

Fonte de variação	Efeito	p
(1) Concentração de bagaço (L)	4,94	0,010602*
Concentração de bagaço (Q)	-1,28375	0,219588
(2) Tempo (L)	-1,01	0,453524
Tempo (Q)	-0,85375	0,393651
(3) Temperatura (L)	12,885	0,000144*
Temperatura (Q)	-5,37375	0,002032*
1L x 2L	1,655	0,389801
1L x 3L	5,605	0,024328*
2L x 3L	-3,675	0,090895
Coeficiente de Determinação (R^2) = 0,9722		

* Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$)

Pela análise estatística dos resultados pode-se observar (Tabela 9) que o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,9722, demonstrando que 97,22% da variação da resposta é explicada pelo modelo.

De acordo com a Tabela 9, verifica-se que as variáveis concentração de bagaço de laranja e temperatura, bem como a interação destas duas variáveis, apresentaram efeito linear significativo ($p < 0,05$) sobre a resposta rendimento de extração de pectina. O efeito quadrático da temperatura foi negativamente significativo e menor que o efeito linear. O efeito da variável tempo não foi significativo sobre o rendimento, ao nível de 5%.

Na Figuras 8a e 8b estão as linhas de contorno e a superfície de resposta do efeito das variáveis estatisticamente significativas, temperatura e concentração de bagaço de laranja sobre o rendimento de extração térmica de pectina, em 60 minutos de processamento.

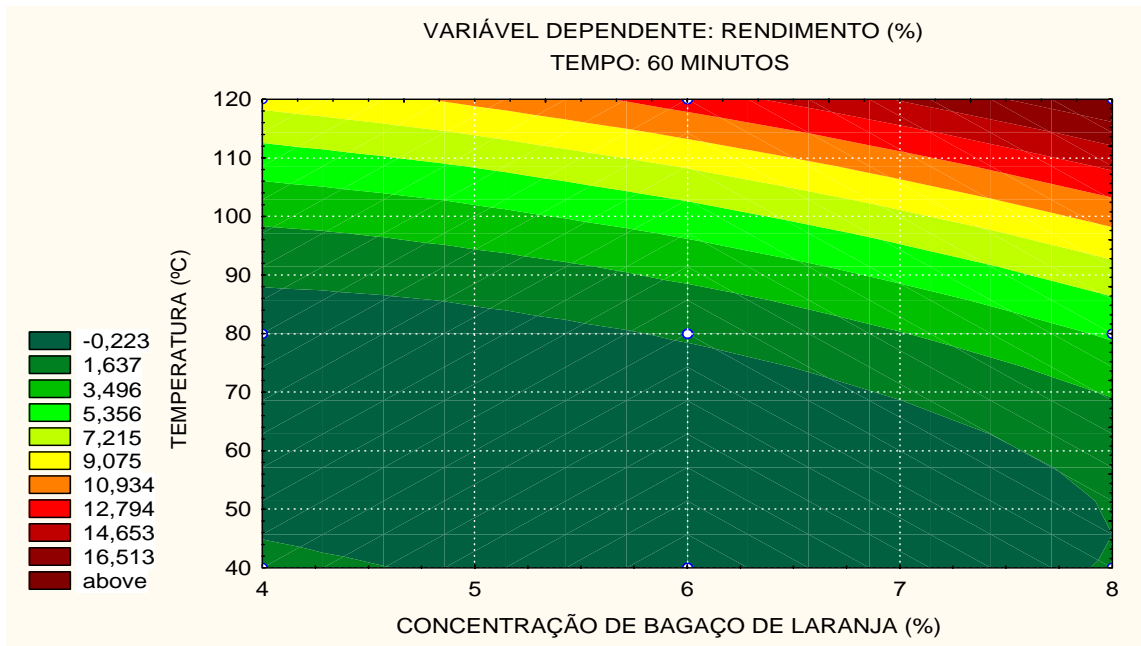


Figura 8 (a)

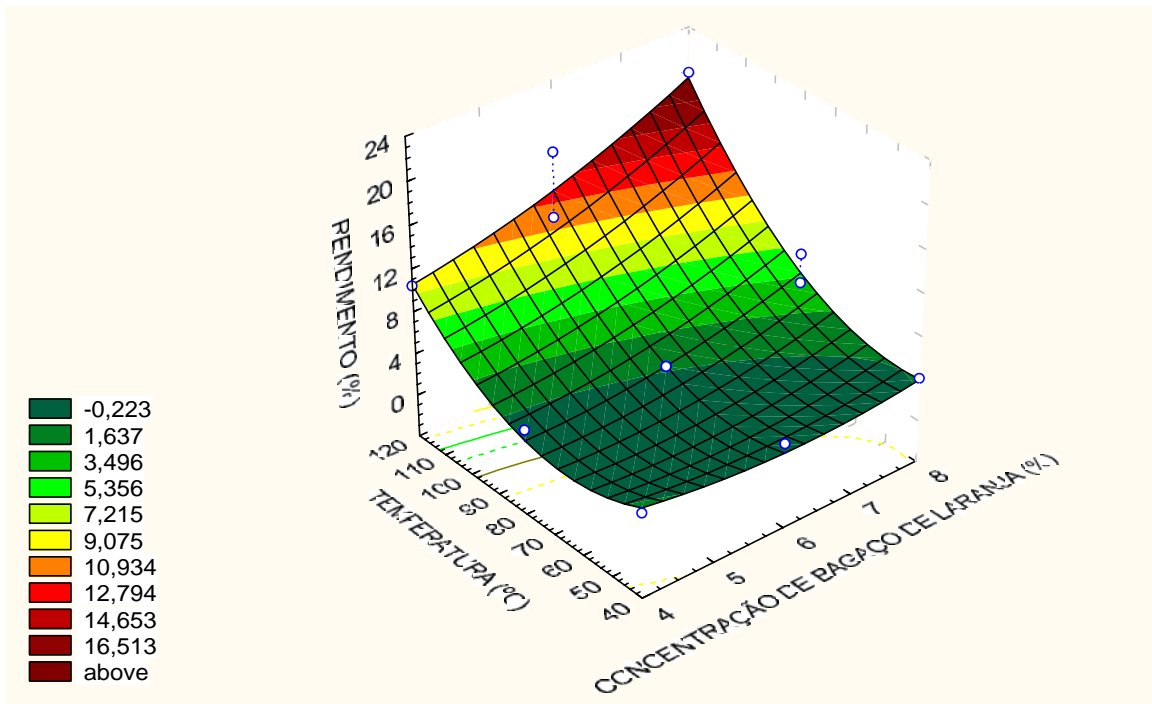


Figura 8 (b)

Figura 8 – Efeito da temperatura e da concentração de bagaço de laranja na porcentagem de extração térmica de pectina: linhas de contorno (a) e a superfície de resposta (b)

Considerando as condições do experimento, nos gráficos (Figuras 8a e 8b) pode-se observar que na faixa de temperatura de 40 a 100°C, ocorre pouca variação no rendimento de extração de pectina. Verifica-se que o rendimento aumenta com o avanço da concentração de bagaço de laranja e da temperatura, assim, há tendência de rendimento máximo nos níveis dessas duas variáveis próximos aos superiores, ou seja, de 7,5 a 8% de bagaço e nas temperaturas entre 115 e 120°C. Por não ter apresentado efeito significativo ao nível de 5%, a variável tempo para a construção do gráfico foi fixada no ponto central (60 minutos).

Para todos os processos estudados foram realizadas previsões segundo o modelo gerado de acordo com os resultados dos experimentos. As previsões do modelo para os experimentos foram realizadas para determinar quais seriam os valores das variáveis que resultariam em máximo rendimento de extração, além de demonstrar os rendimentos mais baixos obtidos utilizando outros valores.

Na Tabela 10 observa-se uma estimativa dos rendimentos de extração obtidos utilizando os níveis das variáveis considerados como os que levariam aos rendimentos mais altos de extração térmica de pectina.

Tabela 10 – Previsões do modelo para o rendimento de extração térmica de pectina de bagaço de laranja

Variáveis independentes			Variável dependente
Concentração de bagaço de laranja (%)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
8	90	120	17,7113
8	30	120	20,7413*
8	60	120	18,3725
8	30	80	4,2850
8	40	120	19,7619
8	90	40	2,8962
8	90	80	4,9300
8	30	100	11,1697
8	60	100	9,7197
8	60	110	13,7102
8	30	110	15,6196

* Maior rendimento

Analisando a Tabela 10, verifica-se que o rendimento de extração térmica de pectina de bagaço de laranja poderia atingir um valor máximo de 20,74%,

no caso de utilizar 8% de bagaço de laranja e aplicar a temperatura de 120°C durante 30 minutos. Observa-se também que outros valores, na faixa de variação estabelecida para as variáveis testadas, resultariam em menor rendimento de extração.

Ainda que a variável tempo não tenha apresentado efeito significativo (Tabela 9) neste experimento, de acordo com as previsões do modelo (Tabela 10) há uma tendência de diminuição do rendimento com o avanço do tempo de extração. Com base nos resultados da previsão (Tabela 10) supõe-se que, ultrapassando o tempo necessário para a liberação da pectina do bagaço de laranja, a pectina no meio aquoso seja degradada pelo calor (FOGARTY, 1983).

Conforme a Tabela 10 e as Figuras 8a e 8b, é provável que a região de ótimo rendimento para a extração térmica esteja a temperaturas superiores a 120°C, porém, provavelmente a aplicação de tais temperaturas não resultaria em rendimentos muito mais altos, uma vez que a pectina é degradada pelo calor (FOGARTY, 1983). Além disso, o uso de temperaturas superiores a 120°C não seria viável do ponto de vista econômico e operacional.

5.1.2 Extração química

a) Extração com ácido acético

O delineamento experimental de Box-Behnken 3³ utilizado bem como os resultados de rendimento (%) para a extração com ácido acético estão na Tabela 11.

Tabela 11 – Delineamento experimental e resultados de rendimento (%) obtidos na extração com ácido acético

Ensaio	Variáveis			Resposta
	x_1	x_2	x_3	y
1	4	2	80	8,65
2	8	2	80	8,42
3	4	12	80	17,49
4	8	12	80	12,47
5	4	7	40	5,31
6	8	7	40	5,99
7	4	7	120	20,28
8	8	7	120	27,89
9	6	2	40	3,60
10	6	12	40	5,77
11	6	2	120	25,33
12	6	12	120	24,85
13	6	7	80	13,70
14	6	7	80	9,85
15	6	7	80	12,08

Onde: x_1 = concentração de bagaço de laranja (%); x_2 = concentração de ácido acético (%); x_3 = temperatura ($^{\circ}$ C); y = rendimento de extração (%).

Na Tabela 12 estão os efeitos das variáveis sobre o rendimento da extração de pectina com ácido acético.

Tabela 12 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento, obtidos na extração com ácido acético

Fonte de variação	Efeito	p
(1) Concentração de bagaço (L)	0,76	0,742822
Concentração de bagaço (Q)	0,069583	0,967253
(2) Concentração de ácido acético (L)	3,645	0,157092
Concentração de ácido acético (Q)	0,049583	0,976661
(3) Temperatura (L)	19,42	0,000304*
Temperatura (Q)	-3,06042	0,116193
1L x 2L	-2,395	0,474514
1L x 3L	3,465	0,314306
2L x 3L	-1,325	0,686735
Coeficiente de Determinação (R^2) = 0,9457		

* Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$)

A análise estatística dos resultados indica que o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9457, demonstrando que 94,57% da variação da resposta y é explicada pelo modelo.

De acordo com a Tabela acima, verifica-se que a variável temperatura afetou a extração de pectina de forma mais significativa ($p < 0,05$) que a variável concentração de ácido acético ($p < 0,20$), ou seja, teve um efeito maior. A temperatura apresentou efeito linear e este foi o maior efeito sobre a extração de pectina, seguida pela concentração de ácido acético e pela concentração de bagaço de laranja, sendo os efeitos 19,42, 3,65 e 0,76%, respectivamente. Entre as variáveis estudadas, a temperatura e concentração de ácido acético representam as que realmente influem no rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja quando aplicado este método, dentro da faixa de variação estabelecida para as variáveis.

As Figuras 9a e 9b apresentam as linhas de contorno e a superfície de resposta do rendimento de extração de pectina com ácido acético, em função da temperatura e da concentração de ácido, com 6% de bagaço de laranja.

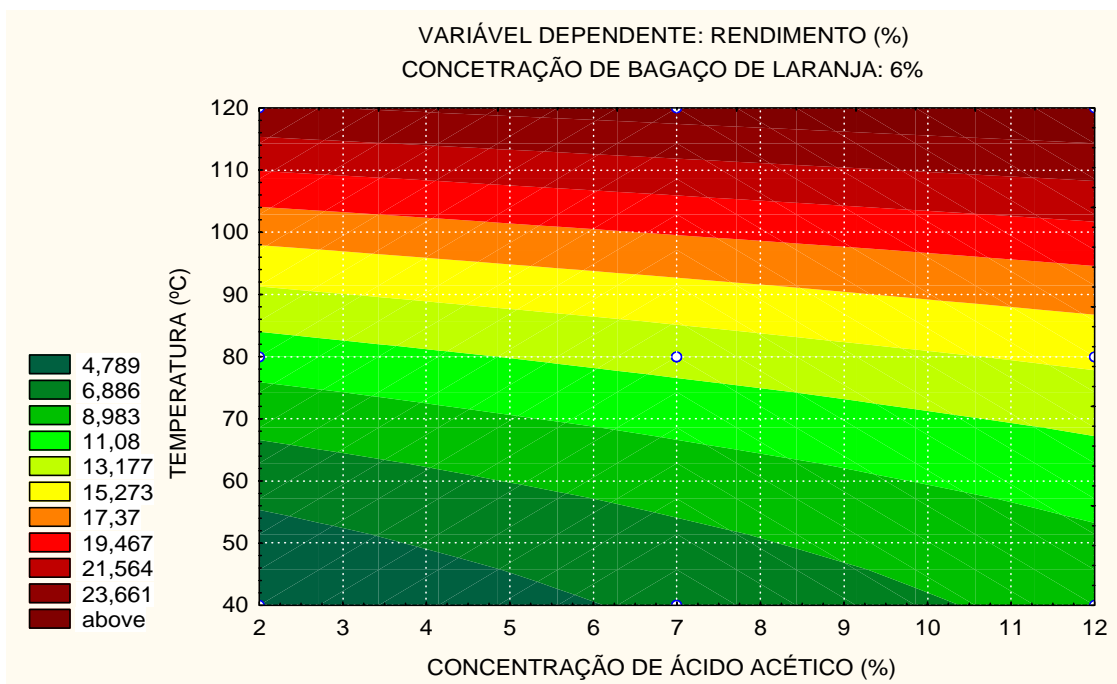


Figura 9 (a)

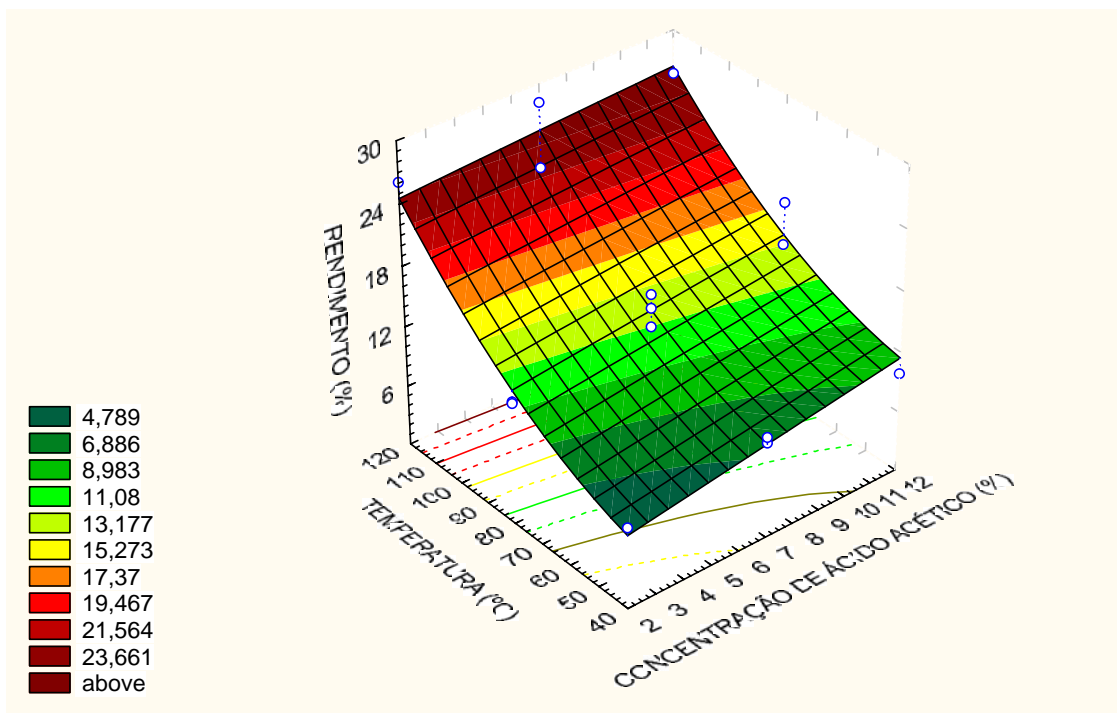


Figura 9 (b)

Figura 9 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido na porcentagem de extração química de pectina com ácido acético: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta

Pela análise dos gráficos (Figuras 9a e 9b), pode-se observar que na faixa de temperaturas entre 40°C a 95°C o aumento na concentração de ácido provoca aumentos pouco significativos no rendimento de extração de pectina. Por outro lado, quando a temperatura de extração é superior aos 100°C, fica evidenciado que um aumento da concentração do ácido não altera significativamente o rendimento de extração, deixando o rendimento quase que independente da concentração de ácido. Nas condições do experimento, a extração máxima é observada a na faixa de temperatura de 115 a 120°C e nas concentrações de ácido acético de 5 a 12%. A concentração de bagaço teve o menor efeito sobre a resposta, e não foi significativo ao nível de 5%.

Na Tabela 13 são observados os rendimentos estimados para a extração de pectina com ácido acético.

Tabela 13 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com ácido acético

Variáveis independentes			Variável dependente
Concentração de bagaço de laranja (%)	Concentração de ácido acético (%)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
8	2	120	26,6779
8	12	120	26,6029
8	5	120	26,6971*
8	12	100	18,9176
6	7	80	11,8767
6	5	120	24,1752
4	7	80	11,4271
4	5	120	21,5141
4	12	120	24,7729
6	12	120	25,7575

* Maior rendimento

Na tabela acima observa-se que o rendimento máximo (26,70%) de extração de pectina com ácido acético seria obtido com o emprego de 8% de bagaço de laranja, ácido acético 5% e temperatura de 120°C. Apesar de a extração ter sido máxima com ácido acético 5%, de acordo com a previsão, observa-se (Tabela 13) que a concentração de ácido poderia ser mais baixa, resultando em rendimentos similares.

Semelhante ao observado na extração térmica, a extração com ácido acético tende a apresentar faixa de ótimo rendimento em temperaturas acima

de 120°C, porém, como discutido anteriormente (item 5.1.1), essas temperaturas mais elevadas causariam a degradação da pectina extraída e aumento dos custos diretos de produção.

b) Extração com ácido cítrico

O delineamento experimental de Box-Behnken 3^3 utilizado e os resultados de rendimento de extração (%), obtidos no processo com ácido cítrico estão na Tabela 14.

Tabela 14 – Delineamento experimental e resultados de rendimento (%) obtidos na extração com ácido cítrico

Ensaio	Variáveis			Resposta
	x_1	x_2	x_3	y
1	4	0,5	80	16,52
2	8	0,5	80	11,86
3	4	3,5	80	44,44
4	8	3,5	80	33,27
5	4	2	40	17,95
6	8	2	40	12,50
7	4	2	120	22,71
8	8	2	120	28,18
9	6	0,5	40	6,15
10	6	3,5	40	25,36
11	6	0,5	120	21,80
12	6	3,5	120	24,98
13	6	2	80	27,11
14	6	2	80	34,47
15	6	2	80	29,93

Onde: x_1 = concentração de bagaço de laranja (%); x_2 = concentração de ácido cítrico (%); x_3 = temperatura (°C); y = rendimento de extração (%).

Na Tabela 15 estão os efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração de pectina com ácido cítrico.

Tabela 15 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento, obtidos na extração com ácido cítrico

Fonte de variação	Efeito	p
(1) Concentração de bagaço (L)	-3,9625	0,358203
Concentração de bagaço (Q)	1,614167	0,599736
(2) Concentração de ácido cítrico (L)	17,94	0,005951*
Concentração de ácido cítrico (Q)	2,376667	0,447289
(3) Temperatura (L)	8,9275	0,07164
Temperatura (Q)	8,554167	0,03127*
1L x 2L	-3,235	0,584629
1L x 3L	5,46	0,369626
2L x 3L	-8,015	0,207626
Coeficiente de Determinação (R^2) = 0,8885		

* Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$)

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,8885 indica que 88,85% da variação da resposta y é explicada pelo modelo.

Pela análise dos efeitos das variáveis sobre a resposta (Tabela 15), observa-se que a concentração de ácido cítrico afeta significativamente ($p < 0,05$) e de maneira linear a resposta rendimento de extração. No caso da variável temperatura, se verifica um efeito linear significativo somente ao nível de 7,16%, sendo que o efeito quadrático se apresenta significativo ao nível 5%. A concentração de bagaço de laranja nas condições experimentais estudadas não afeta o rendimento de extração, ao nível de 5% de significância, ou seja, variando a concentração de bagaço a resposta rendimento não será afetada.

Nas Figuras 10a e 10b estão as linhas de contorno e a superfície de resposta do rendimento de extração de pectina em função da temperatura e da concentração de ácido cítrico, com porcentagem de bagaço igual a 6.

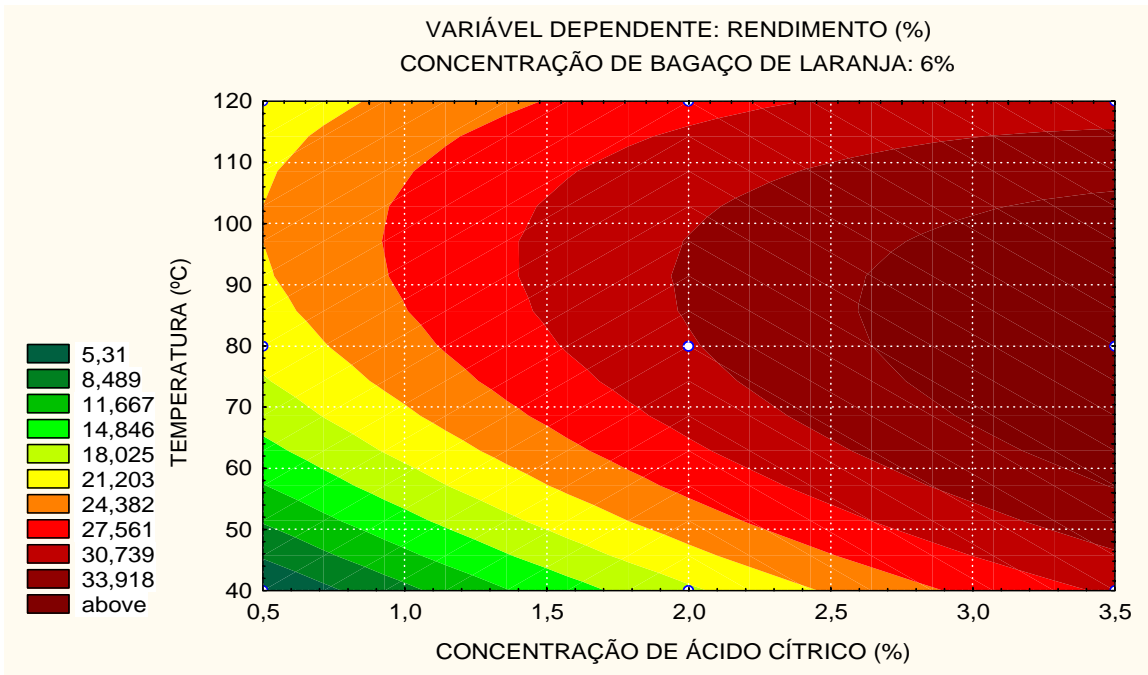


Figura 10 (a)

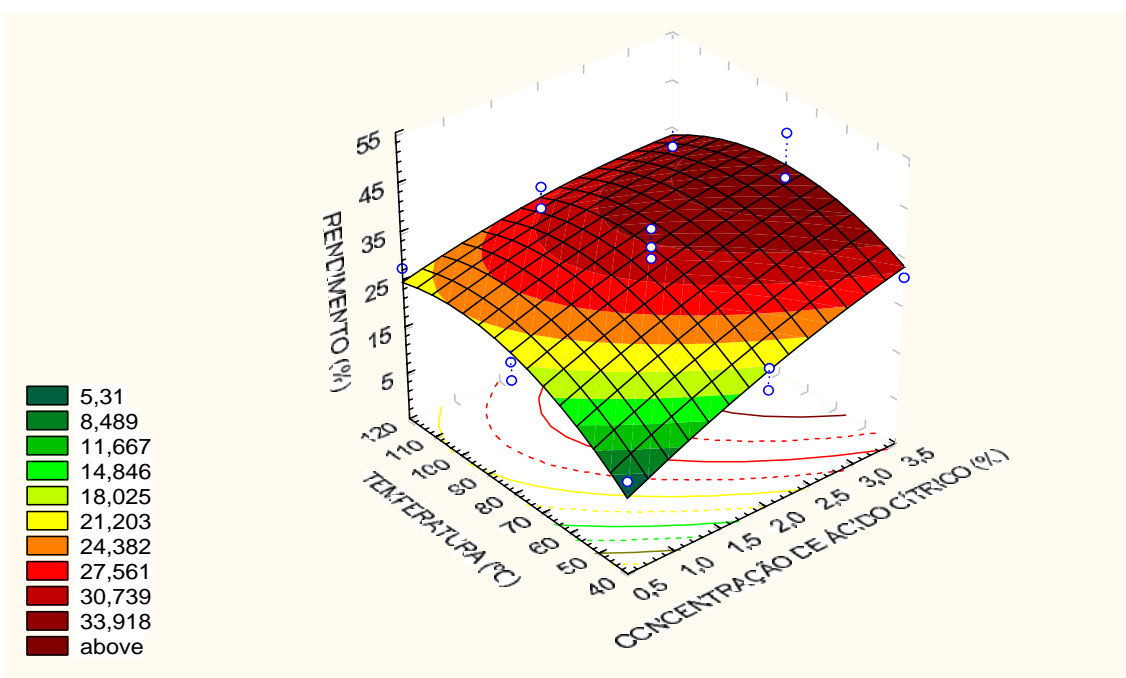


Figura 10 (b)

Figura 10 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido na porcentagem de extração de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta

Nas figuras acima observa-se que na faixa de temperatura de 40 a 90°C e nas concentrações de ácido cítrico de 0,5 a 2,5%, o rendimento aumenta com variação considerável, conforme aumentam os valores das variáveis. A porcentagem de extração tende a ser máxima quando a temperatura de extração se situa na faixa entre 60°C a 105°C e nas concentrações de ácido cítrico de 2,6 a 3,5%.

As previsões de rendimento de extração de pectina com ácido cítrico, considerando a busca pelo rendimento máximo, estão na Tabela 16.

Tabela 16 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico

Variáveis independentes			Variável dependente
Concentração de bagaço de laranja (%)	Concentração de ácido cítrico (%)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
4	3,5	100	35,8058
4	3,5	60	38,0796
4	3,5	75	39,2318*
4	2,6	75	34,5751
6	3,5	75	36,9060
6	2,6	75	33,2198
8	2,6	75	28,6361
4	2	40	20,5825
8	3,5	75	31,3518

*Maior rendimento

Na previsão (Tabela 16), pode se verificar diferentes rendimentos em função de diferentes condições de extração de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico, incluindo a condição resultante no máximo rendimento de extração. Assim, quando a extração se realiza com 4% de bagaço, 3,5% ácido cítrico e 75°C de temperatura, se consegue o rendimento máximo de 39,23%

Segundo a previsão da Tabela 16, o rendimento tende a ser maior nas menores concentrações de bagaço de laranja, verificando-se que a concentração de bagaço de laranja afeta o rendimento de extração de pectina, ainda que o efeito desta variável não tenha sido significativo.

Em relação às extrações estudadas até agora neste trabalho, o uso de ácido cítrico apresentou rendimento máximo a temperaturas mais amenas.

5.1.3 Extração enzimática

As atividades das enzimas poligalacturonase utilizadas nas extrações, tanto da enzima comercial de *Aspergillus niger* como a da produzida no laboratório a partir de *Kluyveromyces marxianus*, encontram-se na Tabela 17. A atividade é dada em UAP (Unidade de Atividade de Poligalacturonase). Uma UAP corresponde a 1 mg de glicose liberado por mL de enzima, a cada minuto do ensaio. A atividade específica é a atividade por mg de proteínas solúveis da enzima.

Tabela 17 – Atividade da enzima poligalacturonase

Enzima Poligalacturonase	UAP (mg/ml/min)	Proteínas (mg/mL)	Atividade específica (UAP/mg proteína)
Comercial	0,03	100	0,0003
Produzida no laboratório	0,01	0,21	0,0476

Os dados da Tabela 17 demonstram que a enzima poligalacturonase comercial apresentou uma maior atividade de degradar ácido poligalacturônico em comparação à enzima produzida no laboratório. Por outro lado, a atividade específica da enzima comercial foi muito menor que a da enzima produzida no laboratório.

a) Extração com enzima poligalacturonase comercial

O delineamento experimental de Box-Behnken 3³ utilizado, bem como os resultados de rendimento de extração de pectina (%), para extração com enzima poligalacturonase comercial, estão na Tabela 18.

Tabela 18 – Delineamento experimental e resultados de rendimento de extração de pectina (%) obtidos no processo enzimático com poligalacturonase comercial

Ensaio	Variáveis			Resposta
	x_1	x_2	x_3	y
1	4	0,04	100	3,34
2	8	0,04	100	0,84
3	4	0,08	100	2,11
4	8	0,08	100	0,52
5	4	0,06	75	1,62
6	8	0,06	75	0,55
7	4	0,06	125	5,12
8	8	0,06	125	0,71
9	6	0,04	75	1,91
10	6	0,08	75	0,52
11	6	0,04	125	1,00
12	6	0,08	125	1,81
13	6	0,06	100	0,84
14	6	0,06	100	1,55
15	6	0,06	100	1,20

Onde: x_1 = concentração de bagaço de laranja (%); x_2 = proporção enzima/substrato (mL/g); x_3 = agitação (rpm); y = rendimento de extração (%).

Na Tabela 19 estão os efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração de pectina com poligalacturonase comercial.

Tabela 19 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração, obtidos no processo enzimático com poligalacturonase comercial

Fonte de variação	Efeito	p
(1) Concentração de bagaço (L)	-2,3925	0,002919*
Concentração de bagaço (Q)	-0,59792	0,125644
(2) Proporção enzima / substrato (L)	-0,5325	0,282464
Proporção enzima / substrato (Q)	0,092083	0,788592
(3) Agitação (L)	1,01	0,071208
Agitação (Q)	-0,20542	0,555706
1L x 2L	0,455	0,499562
1L x 3L	-1,67	0,044346*
2L x 3L	1,1	0,138954
Coeficiente de Determinação (R^2) = 0,9099		

* Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$)

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,9099 indica que 90,99% da variação de y é explicada pelo modelo.

Como visto na Tabela 19, no processo enzimático com poligalacturonase comercial a variável concentração de bagaço, bem como a interação da desta e da agitação, apresentaram efeito linear negativamente significativo ($p < 0,05$), enquanto a agitação teve efeito positivo e linear a 7,12% de significância. A variável proporção enzima/substrato não teve efeito significativo a 5%, sobre a resposta estudada.

As linhas de contorno e a superfície de resposta do rendimento de extração de pectina com poligalacturonase produzida em laboratório, em função da concentração de bagaço de laranja e da agitação, com proporção enzima/substrato igual a 0,06 mL/g, estão nas Figuras 11a e 11b.

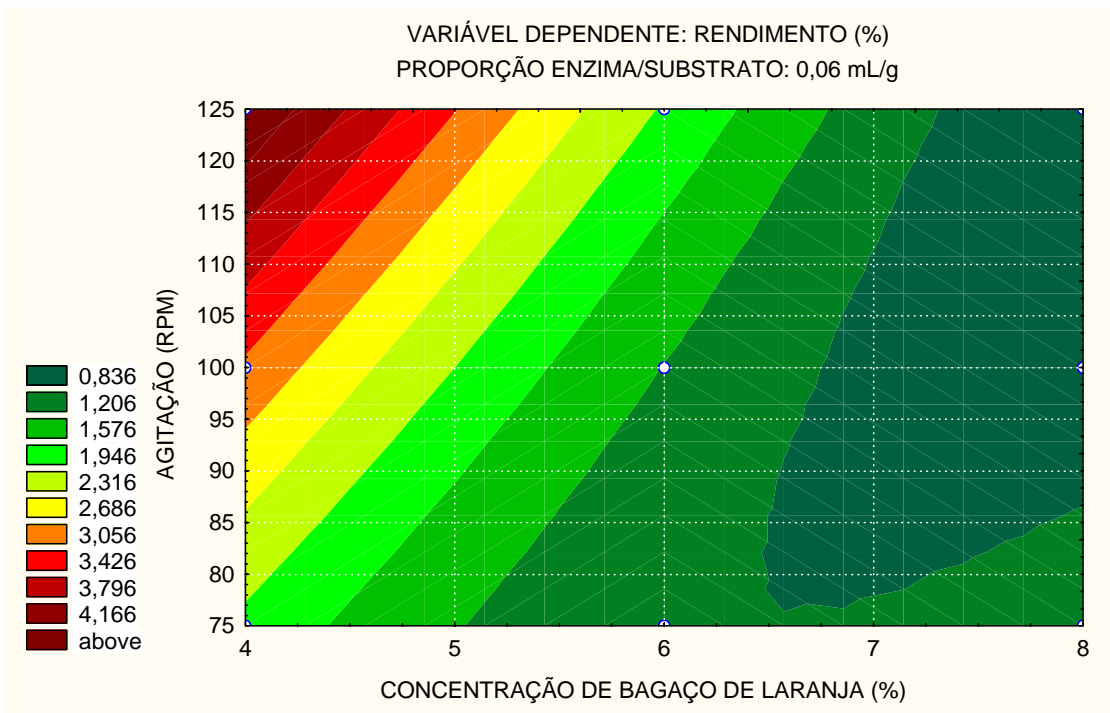


Figura 11 (a)

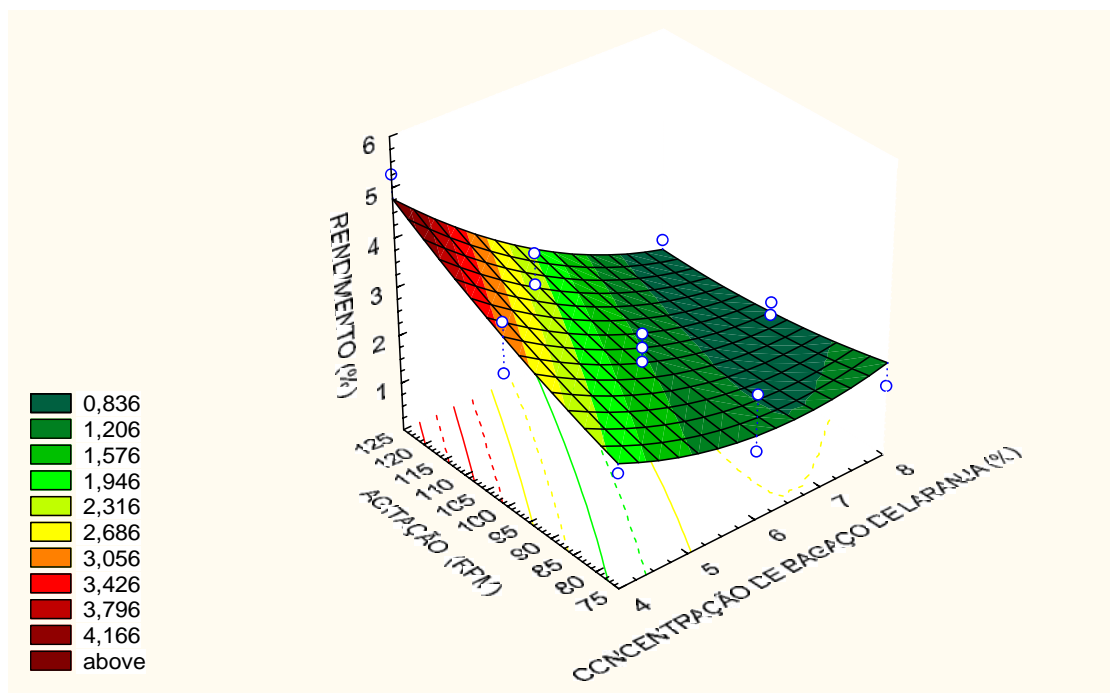


Figura 11 (b)

Figura 11 – Efeito da concentração de bagaço de laranja e da agitação na porcentagem de extração enzimática de pectina com poligalacturonase comercial: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta

Observa-se nos gráficos (Figuras 11a e 11b) que o aumento da agitação ocasiona aumento no rendimento e que o aumento da concentração de bagaço de laranja tem efeito inverso no rendimento de extração. Neste processo, nas condições estudadas e à proporção enzima/substrato constante de 0,06mL/g, o máximo rendimento é observado com agitação próxima ao nível superior (125 rpm), sendo de 120 a 125 rpm e com concentração de bagaço de laranja próximo ao nível inferior (4%), sendo de 4 a 4,2%.

As previsões de rendimento de extração para o experimento de extração de pectina com poligalacturonase comercial, estão na Tabela 20.

Tabela 20 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase comercial

Variáveis independentes			Variável dependente
Concentração de bagaço de laranja (%)	Proporção enzima/substrato (mL/g)	Agitação (rpm)	Rendimento (%)
4	0,04	125	4,3879
4	0,08	125	4,5000
4	0,06	125	4,5300
4	0,07	100	2,7209
6	0,04	125	1,5312
8	0,08	125	0,8929
6	0,06	75	0,8971
6	0,06	100	1,1967
4	0,07	125	4,5400*

* Maior rendimento

Os valores das variáveis que resultariam no rendimento máximo (4,54%) de extração de pectina por poligalacturonase comercial são: 4% de bagaço de laranja, 0,07 mL de enzima por grama de bagaço, ou seja, 70 μ L de enzima e 125 rpm de agitação, conforme a Tabela 20.

Pela previsão (Tabela 20), a proporção enzima/substrato causa pouca variação no rendimento, sendo essa relação inversamente proporcional, o que pode ser devido à ação da enzima como degradante de parte da pectina extraída.

b) Extração com enzima poligalacturonase produzida em laboratório

O delineamento experimental de Box-Behnken 3^3 utilizados, bem como os resultados de rendimento de extração de pectina (%), para a extração com enzima poligalacturonase produzida em laboratório estão na Tabela 21.

Tabela 21 – Delineamento experimental e resultados de rendimento de extração de pectina (%) obtidos no processo enzimático com poligalacturonase produzida em laboratório

Ensaio	Variáveis			Resposta
	x_1	x_2	x_3	y
1	4	0,04	100	8,39
2	8	0,04	100	11,08
3	4	0,08	100	7,71
4	8	0,08	100	4,60
5	4	0,06	75	4,57
6	8	0,06	75	7,06
7	4	0,06	125	9,88
8	8	0,06	125	8,97
9	6	0,04	75	7,55
10	6	0,08	75	8,94
11	6	0,04	125	14,54
12	6	0,08	125	3,08
13	6	0,06	100	12,73
14	6	0,06	100	3,60
15	6	0,06	100	5,22

Onde: x_1 = concentração de bagaço de laranja (%); x_2 = proporção enzima/substrato (mL/g); x_3 = agitação (rpm); y = rendimento de extração (%).

Na Tabela 22 estão os efeitos e as respectivas significâncias das variáveis sobre a resposta, no processo enzimático com poligalacturonase produzida em laboratório.

Tabela 22 – Efeitos das variáveis sobre o rendimento de extração, obtidos no processo enzimático com poligalacturonase produzida em laboratório

Fonte de variação	Efeito	p
(1) Concentração de bagaço (L)	0,29	0,905246
Concentração de bagaço (Q)	0,072917	0,967539
(2) Proporção enzima / substrato (L)	-4,3075	0,122033
Proporção enzima / substrato (Q)	-0,83458	0,645172
(3) Agitação (L)	2,0875	0,408791
Agitação (Q)	-0,50958	0,777032
1L x 2L	-2,9	0,416546
1L x 3L	-1,7	0,625936
2L x 3L	-6,425	0,107104
Coeficiente de Determinação (R^2) = 0,6553		

Este experimento apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,6553, assim, 65,53% da resposta é explicada pelo modelo.

Pela análise da Tabela 22, observa-se que as variáveis não apresentaram efeito significativo, ao nível de 5%, sobre a resposta e que o maior efeito observado para as variáveis foi o da proporção enzima/substrato, sendo negativo e linear, à significância de 12,20%.

Nas Figuras 12a e 12b estão as linhas de contorno e a superfície de resposta do rendimento de extração de pectina com poligalacturonase produzida em laboratório, em função da proporção enzima/substrato e da agitação, com 6% de bagaço de laranja.

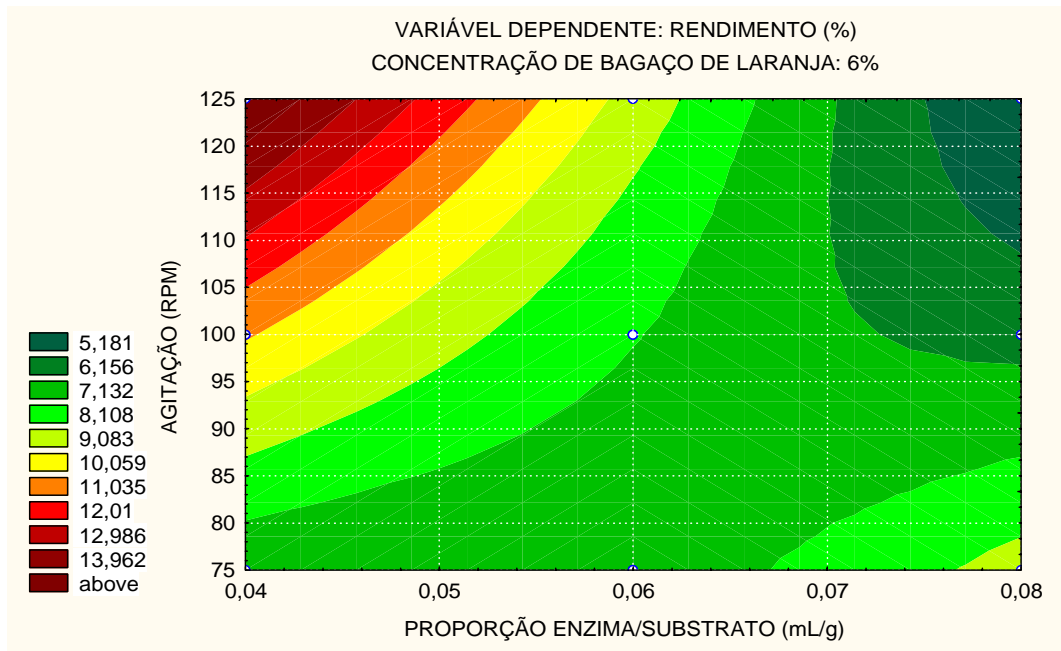


Figura 12 (a)

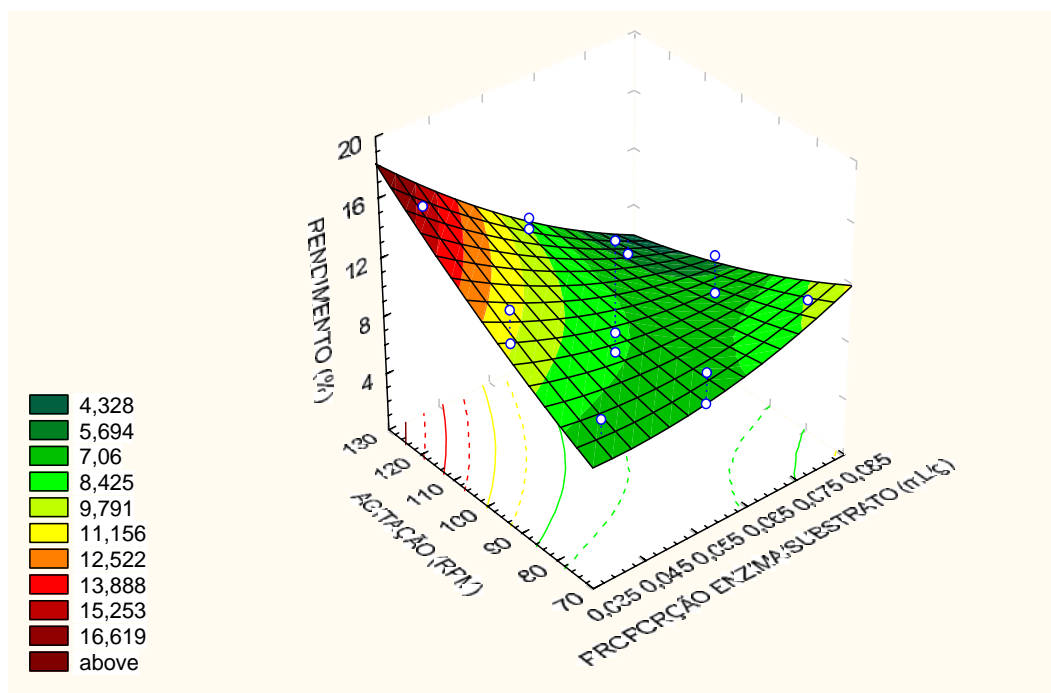


Figura 12 (b)

Figura 12 – Efeito da proporção enzima/substrato e da agitação na porcentagem de extração enzimática de pectina com poligalacturonase produzida em laboratório: (a) linhas de contorno e (b) superfície de resposta

Observando os gráficos (Figuras 12a e 12b), pode-se dizer que o aumento da agitação promoveu maior rendimento, enquanto o avanço da proporção enzima/substrato atuou no sentido de diminuir o rendimento de extração. Com 6% de bagaço de laranja o máximo rendimento de extração foi obtido com agitação muito próxima ao nível superior, sendo entre 120 e 125 rpm e com proporção enzima/substrato menor que 0,05mL/g, ou seja, próxima ao nível inferior estabelecido para esta variável.

A estimativa de rendimentos de extração de pectina pela enzima poligalacturonase produzida em laboratório, está na Tabela 23.

Tabela 23 – Previsões do modelo para o rendimento de extração de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase produzida em laboratório

Variáveis independentes			Variável dependente
Concentração de bagaço de laranja (%)	Proporção enzima/substrato (mL/g)	Agitação (rpm)	Rendimento (%)
4	0,04	125	14,1196
6	0,04	125	14,9375
8	0,04	125	15,6096*
4	0,04	75	3,9071
6	0,06	100	7,1833
6	0,04	75	6,4250
8	0,08	125	1,9771
6	0,04	100	10,1717
6	0,08	100	5,8642
8	0,06	125	7,9587

* Maior rendimento

As condições que resultariam na máxima extração (15,61%) de pectina de bagaço de laranja pela poligalacturonase produzida em laboratório, segundo as previsões (Tabela 23), seriam: 8% de bagaço de laranja, 0,04 mL de enzima por grama de bagaço, ou seja, 20 μ L de enzima e agitação de 125 rpm.

Apesar de nenhuma das variáveis ter sido significativa neste experimento, pode-se observar (Figura 12 e Tabela 23) que as variáveis testadas têm algum efeito no rendimento de extração. O rendimento tende a aumentar conforme avança a velocidade de agitação, o que vai ao encontro do verificado na extração enzimática com poligalacturonase comercial (item 5.1.3a). Conforme a Tabela 23, existe uma tendência de os rendimentos serem maiores quando se utilizam proporções enzima/substrato mais baixas e isso ocorre provavelmente

devido à degradação da pectina pela enzima utilizada, o que é observado também na extração com poligalacturonase comercial (item 5.1.3a).

5.1.4 Rendimento de extração

Os rendimentos máximos obtidos nos cinco processos de extração de pectina de bagaço de laranja estudados, estão na Figura 13.

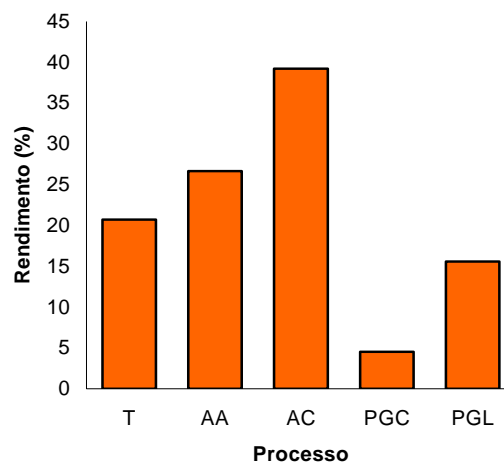


Figura 13 – Rendimentos máximos de extração por processo de extração de pectina de bagaço de laranja

Onde:

- T: extração térmica de pectina de bagaço de laranja
- AA: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido acético
- AC: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico
- PGC: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase comercial
- PGL: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase produzida em laboratório

Por comparação dos rendimentos máximos de extração de pectina obtidos em cada processo, nota-se (Figura 13) que a extração química com ácido

cítrico resultou no maior rendimento (39,23%) e o segundo melhor rendimento (26,70%) foi obtido na extração com ácido acético. Os outros rendimentos foram mais baixos, sendo 20,74%, 15,61% e 4,54%, obtidos nos processos térmico, enzimático com poligalacturonase de laboratório (de *Kluyveromyces marxianus*) e enzimático com poligalacturonase comercial (de *Aspergillus niger*), respectivamente.

Das extrações enzimáticas, as diferenças de rendimento encontradas estão relacionadas à natureza da fonte de obtenção da enzima. Aparentemente a enzima comercial de *Aspergillus niger*, tem maior atividade degradante do que extratora de pectina, como se observou no item 5.1.3b, o que originou rendimentos menores.

5.2 CARACTERÍSTICAS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS

Objetivando verificar o efeito dos processos de extração da pectina nas suas características físico-químicas, foram realizadas algumas determinações que se encontram na Tabela 24.

Tabela 24 – Características das pectinas extraídas

	Processo				
	T	AA	AC	PGC	PGL
Viscosidade do gel (Cp)	11,70	9,70	14,50	12,20	17,40
Ácido Galacturônico (%)	51,68	76,65	64,10	33,2	72,45

Onde:

- T: extração térmica de pectina de bagaço de laranja
- AA: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido acético
- AC: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico
- PGC: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase comercial
- PGL: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase produzida em laboratório

5.2.1 Poder de geleificação

Uma vez que a pectina é utilizada em diversos tipos de produtos para conferir consistência, é importante que seja determinada sua capacidade de formar gel. Além disso, a rigidez do gel formado é diretamente proporcional ao peso molecular da pectina utilizada (BOBBIO e BOBBIO, 1995a), então a partir desse teste pode-se ter noção do peso molecular das pectinas.

Para o teste as pectinas foram aplicadas a soluções padrão de sacarose, com aquecimento e após 24 horas de repouso à temperatura ambiente foi feita a medição das viscosidades destas soluções.

A capacidade de geleificar foi avaliada de acordo com a viscosidade do gel formado de cada pectina. As viscosidades dos géis das pectinas obtidas nos processos testados estão apresentadas, já demonstradas na Tabela 24, estão na Figura 14.

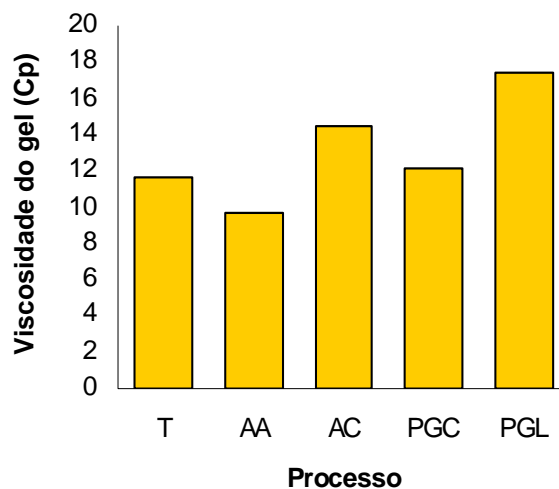


Figura 14 – Viscosidades dos géis das pectinas obtidas nos processos de extração estudados

Onde:

- T: extração térmica de pectina de bagaço de laranja
- AA: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido acético
- AC: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico

- PGC: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase comercial
- PGL: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase produzida em laboratório

Como pode-se observar na Figura 14, o gel de maior viscosidade foi o da pectina obtida no processo enzimático com poligalacturonase de laboratório (17,40 Cp), seguido pelo gel da pectina extraída por ácido cítrico (14,50 Cp). As pectinas obtidas pelos outros processos resultaram em géis de viscosidades mais baixas: 12,20 Cp, 11,70 Cp e 9,70 Cp, para as pectinas extraídas por poligalacturonase comercial, processo térmico e processo químico com ácido acético, respectivamente.

Os resultados indicam a pectina extraída pela poligalacturonase produzida em laboratório como a de melhor geleificação nas condições do teste e provavelmente esta pectina apresenta o peso molecular mais alto entre as extraídas pelos processos testados.

5.2.2 Ácido galacturônico

Para avaliar a pureza das pectinas extraídas, determinou-se a porcentagem de ácido galacturônico, a fim de avaliar a possível presença de outros componentes na pectina.

Na Figura 15 podem ser observadas as porcentagens de ácido galacturônico das pectinas extraídas pelos diferentes processos testados.

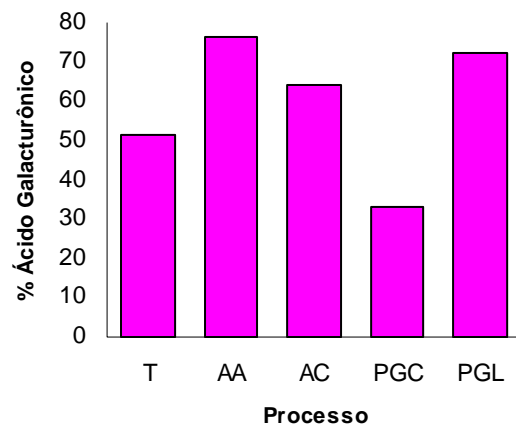


Figura 15 – Porcentagens de ácido galacturônico das pectinas extraídas

Onde:

- T: extração térmica de pectina de bagaço de laranja
- AA: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido acético
- AC: extração química de pectina de bagaço de laranja com ácido cítrico
- PGC: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase comercial
- PGL: extração enzimática de pectina de bagaço de laranja com poligalacturonase produzida em laboratório

Pela observação do gráfico (Figura 15), verifica-se que a pectina extraída com ácido acético apresentou maior porcentagem de ácido galacturônico (76,65%), seguida pela pectina obtida por extração com poligalacturonase produzida em laboratório (72,45%). Com concentrações mais baixas de ácido galacturônico estão as pectinas obtidas por extração com ácido cítrico (64,10%), térmica (51,68%) e com poligalacturonase comercial (33,20%).

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), as pectinas de citrus de alta pureza apresentam uma porcentagem de ácido galacturônico acima de 74% e a porcentagem mínima de ácido galacturônico para pectinas comerciais deve ser de 65%. De acordo com esses requisitos, a pectina extraída pelo processo com ácido acético apresenta alta pureza e a obtida da extração com a enzima poligalacturonase de laboratório se enquadra na pureza requerida para as pectinas

comerciais. Provavelmente, se passar por maior purificação, a pectina obtida da extração com ácido cítrico também possa atender ao padrão comercial

5.2.3 Grau de esterificação

As condições para a geleificação de uma pectina são determinadas pelo grau de esterificação da mesma, assim, o grau de esterificação ($^{\circ}E$) da pectina determina qual poderá ser sua aplicação, de acordo com as condições requeridas para a geleificação (FENNEMA, 1996). A pectina de alto grau de esterificação ($^{\circ}E > 50\%$) geleifica a pH 2,0 a 3,5 e com 60 a 65% de sacarose, enquanto a de baixo grau de esterificação ($^{\circ}E < 50\%$) forma gel na ausência de açúcar e requer a presença de cátions divalentes (o cálcio é utilizado no caso de alimentos), podendo geleificar na faixa de pH de 2,5 a 6,5 (WHISTLER e DANIEL, 1985).

Sabe-se que o grau de esterificação de uma pectina determina sob quais condições (pH, % de sólidos totais e presença de íons cálcio) esta geleifica. Diante disso, como a pectina obtida por extração química com ácido cítrico apresentou 37,5% de esterificação, esta é uma pectina de baixo grau de esterificação ($^{\circ}E < 50\%$) e requer a presença de íons cálcio para geleificar (WHISTLER e DANIEL, 1985).

Como o poder de geleificação (item 5.2.1) foi avaliado usando uma solução com as características ideais para a geleificação da pectina de alto grau de esterificação (67,5% de sacarose e pH 3,0), considera-se que a viscosidade de cada gel formado é diretamente proporcional ao grau de esterificação de cada pectina utilizada (WHISTLER e DANIEL, 1985).

Diante disso, provavelmente a pectina extraída pela poligalacturonase de laboratório seja a de maior grau de esterificação, seguida pela obtida da extração com ácido cítrico. Os graus de esterificação das pectinas extraídas por poligalacturonase comercial, por processo térmico e por processo químico com ácido acético seriam os mais baixos.

De acordo com os resultados de viscosidade de gel (Tabela 24) e com base no grau de esterificação determinado da pectina extraída com ácido cítrico, supõe-se que as pectinas obtidas em todos os processos de extração

estudados apresentem grau de esterificação inferior a 50%. Portanto, a aplicação dessas pectinas seria indicada para produtos com baixo teor de açúcar e com presença de cálcio (cátion divalente) na formulação (WHISTLER e DANIEL, 1985).

6 CONCLUSÃO

- A extração com ácido cítrico foi a mais eficiente, com rendimento máximo de 39,23%;
- A concentração de ácido galacturônico da pectina obtida da extração por ácido cítrico foi muito próxima do padrão comercial;
- A pectina obtida da extração com ácido acético apresentou o maior grau de pureza, com 76,65% de ácido galacturônico;
- As características de porcentagem de ácido galacturônico (72,45%) e de viscosidade do gel (17,40 Cp), da pectina extraída por poligalacturonase de *Kluyveromyces marxianus*, indicam que esta pectina apresenta alta pureza e alto peso molecular;
- Além de resultar em rendimentos baixos, os processos de extração térmica e por poligalacturonase comercial resultaram em pectinas cujos parâmetros físico-químicos ficaram abaixo do padrão comercial.

REFERÊNCIAS

ABECITRUS. **Informativo da Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos**. 10 de Out. 2003. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/informa.html>. Acesso em: 15 de Out. 2003.

ABECITRUS. **Informativo da Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos**. 17 de Fev. 2004. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/informa.html#nota mercado>. Acesso em: 26 de Fev. 2004.

ARTHEY, D.; ASHURST, P. R. **Procesado de Frutas**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1997.

ATTRI, B. L.; MAINI, S. B. Pectin from galgal (*Citrus pseudolimon Tan*) peel. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 89-91, 1996.

BAKER, R. Potential Dietary Benefits of Citrus Pectin and Fiber. **Food Technology**, v. 48, n. 11, p. 133-139, 1994.

BARTHOLOMAI, A. **Fábricas de Alimentos**. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1991.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de Los Alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1995a.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1995b.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experiments**. New York: John Wiley & Sons, 1978.

BRADDOCK, R. J.; CADWALLADER, K. R. Citrus By-Products Manufacture for FoodUse. **Food Technology**, p. 105-110, Fev., 1992.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introducción a la Bioquímica de los Alimentos**. Barcelona: Ed. Ortega, 1967.

BRAVO, C. E. C. et al. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. Agrotec.**, v. 24 (Edição Especial), p. 137-152, dez., 2000.

CONTENTO TRADE. **Pectins**. Disponível em: <http://www.contentotrade.com/Terpene/eng/Pectina.htm>. Acesso em: 04 de Fev. 2003.

CONTRERAS ESQUIVEL, J. C. et al. Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 47, n. 3, 1997.

CORRÊA NETO, R. e FARIA, J. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 153-160, 1999.

CP KELCO. **Powder Characteristics and Storage Stability**. Disponível em: <http://www.cpkelco.com/pectin/commercial.html>. Acesso em: 24 de Fev. 2003.

CRUESS, W. V. **Produtos Industriais de Frutas e Hortaliças**. v. 1. São Paulo: Editora Edgar Blücher LTDA., 1973.

DANISCO. **Textural Ingredients – Pectin**. Disponível em: http://ingredients.danisco.com/products/detail.jsp?pid=2_1_12_1. Acesso em: 14 de Jul. 2003.

DIETZ, J. H.; ROUSE, A. H. A rapid method for estimating pectic substances in citrus juices. **Food Research**, v. 18, p. 169-177, 1953.

DONAGHY, J.; MCKAY, A. Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. **Bioresource Technology**, v. 47, n. 1, p. 25-28, 1994.

EL NAWAWI, S. A.; SHEHATA, F. R. Extraction of pectin of Egyptian orange peel: factors affecting the extraction. **Biological Wastes**, v. 20, n. 4, p. 281-290, 1987.

FENNEMA, O. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

FOGARTY, W. M. **Microbial Enzymes and Biotechnology**. New York: Applied Science Publishers, 1983.

FONSECA, A. A. O., et al. Teores de pectina total na casca de laranjas 'Pêra', 'Valência' e 'Hamlin', durante a maturação. **Magistra**, v. 13, n. 2, jul./dez., 2001.

FOOD INGREDIENTS. **Substituição de Gelatina em Iogurte Cremoso**. Mar./abr. 2002. Disponível em: http://www.revistafi.com.br/Main/revistas/ed_17/i&a/i&a.htm. Acesso em: 30 de Jan. 2004.

FOX, P. **Food Enzymology**. v. 1. New York: Elsevier Science Publishers Ltd, 1991.

FRAZIER, W. **Microbiologia de Los Alimentos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1972.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. Vol III. Florida: CRC Press, 1986.

GOLFI, J. C. (joão.c.golfi@cpkelco.com). Informação sobre Pectina. 15 de mar. 2004. Enviado às 14h15min. Mensagem para: Caroline Maria Calliari (carolinemariac@yahoo.com.br)

GUILHERME, R. **Purificação e caracterização parcial de poligalacturonase obtida de *Kluyveromyces marxianus (fragilis)* e sua aplicação em casca de laranja para extração de pectina**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

HASSE, G. **A Laranja no Brasil**. São Paulo: Duprat & Iobe Propaganda, 1987.

HEGENBART, S. **Squeezing Out Opportunities for Citrus Ingredients**. Set. 2001. Disponível em: <http://www.foodproductdesign.com/archive/2001/0901ap.html>. Acesso em: 04 de Fev. 2003.

HOEFLER, A. C. **Pectin - Chemistry, Functionality, & Applications**. Disponível em: <http://members.aol.com/ahoefer/ptalk.htm>. Acesso em: 30 de Jan. 2004.

INFO COMM. **Market information in the commodities area**. Disponível em: <http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/orange/characteristics.htm>. Acesso em: 09 de Nov. 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976.

JACKIX, M. **Doces, Geléias e Frutas em Calda**. São Paulo: Ícone, 1988.

JOHNSTON, R. B. **Producing Pectin Peel**. 12 de Mar. 2001. Disponível em: http://www.vincentcorp.com/applications/citrus/fmc2_sg.html. Acesso em: 19 de Mar. 2003.

JOYCE, D. **A Safe, Natural, Effective Way to Lower Your Cholesterol**. Disponível em: <http://www.circulatorycenter.com/products.cfm>. Acesso em: 25 de Mar. 2004.

KALE, P. N.; ADSULE, P. G. Citrus. In: SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. **Handbook of Fruit Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 39-65.

KIMBALL, D. **Citrus Processing – Quality Control and Technology**. New York: Van Nostrand Reinold, 1991.

KINTNER, K. P.; VAN BUREN, J. P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenil method. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 756-764, 1982.

LARANJA BRASIL. **A Indústria da Laranja**. Disponível em: <http://www.laranjaesaude.com.br/default.htm?link=multinivel&pagina=laranjabrasil>. Acesso em: 10 de Nov. 2003.

LIMA, D. C. Extração de Pectina do Maracujá. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 63-69, 1971/72.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAIA, M. L. **Citricultura Paulista: evolução, estrutura e acordos de preços**. São Paulo: IEA, 1996.

McCOMB, E. A.; McCREADY, R. M. Colorimetric Determination of Pectic Substances. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 1630-1632, 1952.

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, 1952.

MENOLI, A. V. **Pré-cocção e cocção de tecidos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e solubilização de substância pécnicas e amido**. 2003. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MESEGUER, I. et al. Extraction and Colorimetric Quantification of Uronic Acids of the Pectic Fraction in Fruit and Vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 11, p. 285-291, 1998.

MÜLLER, M. S.; CORNELSEN, J. M. **Normas e Padrões para Teses, Dissertações e Monografias**. 5. ed. Londrina: Eduel, 2003.

MUNÓZ, R.; BARCELÓ, A. R. Enzymes. In: NOLLET, L. M. L. **Handbook of Food Analysis**. v. 1. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. p. 311-330.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.

NEVES, M. F. e MARINO, M. K. **Estudo da Competitividade de Cadeias Integradas no Brasil: impactos das zonas de livre comércio**. Campinas: UNICAMP. 2002.

NOLLET, L. M. L. **Handbook of Food Analysis**. v. 1. New York: Marcel Dekker Inc., 1996.

NOVOZYMES LATIN AMERICA LIMITED. **Ficha Técnica – Enzima Citrozym Cloudy 100L**. Araucária, 2002.

OAKENFULL, D.; SCOTT, A. Hydrophobic Interaction in the Gelation of High Methoxyl Pectins. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1093-1098, 1984.

PARANÁ CITRUS S/A. “**Dos nossos pomares para seu copo**”. Enviado por e-mail, Jun. de 2003.

PEKTOWIN. **Chemical structure of pectin**. Disponível em: <http://www.pektowin.com.pl/ang/wysoko a.htm>. Acesso em: 26 de Fev. 2003.

PETRIN, O. Hora de colher...e lucrar. **Jornal Folha de Londrina**, 28 de Jun. 2003. Caderno Folha Rural, p. 6-7.

POTAFOS. **São Paulo em evidência na produção de citros**. Disponível em: <http://www.potafos.org/>. Acesso em: 09 de Nov. 2003.

PROFRUTA. **Estudos sobre o Mercado de Frutas**. Disponível em: <http://www.defesaagropecuaria.gov.br/sarc/profruta/html/profruta.htm>. Acesso em: 10 de Nov. 2003.

PRESSEY, R. ; AVANTS, J. K. Separation and Characterization of Endopolygalacturonase and Exopolygalacturonase from Peaches. **Plant Physiology**, v. 52, n. 3, p. 252-256, 1973.

ROUSE, A. H.; GRANDAL, P. G. Pectin content of lime and lemon peel as extracted by nitric acid. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 72-73, 1978.

SAKAI, T.; OKUSHIMA, M.; YOSHITAKE, S. Purification, Crystallization and Some Properties of Endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 48, n. 8, p. 1951-1961, 1984.

SECCO, A.; PATURY, F. O Campeão Mundial do Suco de Laranja. **Revista Veja**. Edição 1802, ano 36, nº19, p. 38-45, 14 de Maio 2003.

SHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 62-67, 1994.

SIGUEMOTO, A. T. Propriedades da Pectina – BRASPECTINA. In: SOLER, M. P. **Industrialização de Geléias** - Manual Técnico Nº7. Campinas: ITAL, 1991. p. 48-68.

SOLER, M. P. (Coord). **FRUTAS – compotas, doces em massa, geléias e frutas cristalizadas** - Manual para a micro e pequena empresa. Campinas: ITAL, 1995.

SOUTHGATE, D. A. T. **Determination of Food Carbohydrates**. Essex: Applied Science Publishers Ltda, 1976.

TODAFRUTA. **Curiosidades**. Disponível em: http://www.TODAFRUTA.com.br/TODAFRUTA/noticias_su.asp?menu=165. Acesso em: 09 de Nov. 2003.

WARD, F.; ANDON, A. Hydrocolloids as Film Formers, Adhesives, and Gelling Agents for Bakery and Cereal Products. **Cereal Foods World**, v. 47, n. 2, p. 53-55, 2002.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 69-137.