

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

# **EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*)**

**Danieli Melo de Freitas**

Orientadores: Dr. José Dalton Cruz Pessoa  
Dra. Cristiane Sanchez Farinas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte integrante dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestre em biotecnologia.

São Carlos 2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F866ep

Freitas, Danieli Melo de.

Extração de polissacarídeos do caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) / Danieli Melo de Freitas. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Polissacarídeos. 3. Carboidratos. 4. Resíduos. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Danieli Melo de Freitas**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

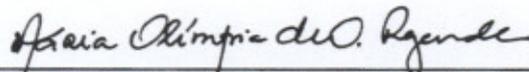
**Aprovado em: 12/08/2010**

**BANCA EXAMINADORA**



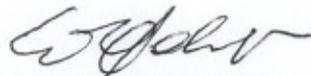
---

Prof. Dr. José Dalton Cruz Pessoa (Orientador)  
EMBRAPA



---

Prof. Dr. Maria Olímpia de Oliveira Rezende  
IQSC – USP – São Carlos



---

Profa. Dra. Wagner Luiz Polito  
IQSC – USP – São Carlos

Dedico aos meus pais,  
Milton de Freitas (*in memoriam*)  
e Vera Lúcia Melo de Freitas  
pelo exemplo de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe, pelo apoio, paciência, pelos momentos de sofrimento que superamos juntas, pelo amor incondicional e principalmente pelo exemplo de mulher guerreira.

As minhas irmãs Maíra e Larisse, minhas amigas que sempre torceram por mim.

Ao meu companheiro Júlio, pela compreensão, amor, amizade e dedicação.

Ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, em especial ao coordenador Prof.Dr. Fernando M. Araújo Moreira.

Aos meus orientadores Dr. Dalton Pessoa e Dra. Cristiane Farinas, pela oportunidade, orientação e contribuição para o meu crescimento acadêmico.

À Dra.Tatiane Albarici pela co-orientação, por toda a sua paciência com os ensinamentos de cromatografia e pelos conselhos para o desenvolvimento do projeto.

Meu muito obrigada ao esse grande educador Prof. Dr. Massami Yonashiro do Departamento de Química da UFSCar pelos conselhos e apoio.

A Prof. Dra Raquel Giordano da Engenharia Química da UFSCar, pela disponibilidade do HPLC, em especial ao Técnico Tiago Martins Pereira, por toda a ajuda no HPLC, por todos os dias perdidos tentando estabilizar o índice de refração e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Edenir do Departamento de Química da UFSCar, pelos ensinamentos em planejamento experimental e otimização de processos.

A Prof. Dra. Tereza Zangirolami do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, pelos ensinamentos e conselhos na banca de qualificação

A toda equipe da Embrapa Instrumentação Agropecuária em especial a Msc. Silviane pela ajuda na montagem dos equipamentos e pela sempre disponibilidade.

Ao pessoal do Laboratório de Inovação em Pós-colheita Ana Lúcia, Karina, Alan, Sandra, ao Bolão (Diego) pela ajuda nos experimentos, a Cleia pela leitura deste trabalho. Ao pessoal que não está mais no laboratório Sassarico, Samuel, Luiz Fernando, Rafael e Alexandre. Essas pessoas especiais tornaram o laboratório parte da minha casa e família.

Em especial quero agradecer a duas grandes amigas, Gisleide e Thaisão, pelas noites no laboratório, pela ajuda nos experimentos, pela leitura deste trabalho e pelos momentos difíceis que passamos juntas, a amizade de vocês eu levarei para a vida inteira.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

**Gandhi**

## Resumo

O desenvolvimento da cadeia produtiva da agroindústria de açaí depende da correta destinação dos subprodutos gerados. Do fruto utiliza-se atualmente apenas o mesocarpo para consumo humano, criando um problema ambiental, uma vez que o caroço representa aproximadamente 75 a 81% do peso total do fruto. Do caroço de açaí a literatura relata a presença de inulina, polifenóis e outros carboidratos. Dentre estes a inulina destaca-se por apresentar baixo teor calórico e por esse motivo aplicado na produção de alimentos light, no fat ou low fat, como substituto da gordura e o açúcar. Apesar de ser difundida mundialmente, não é produzida no Brasil e sua importação a torna um produto de custo elevado. Dessa forma o objetivo do projeto foi desenvolver uma metodologia de extração da inulina em escala de laboratório visando à sua produção industrial. Na primeira etapa do projeto foi feita a adaptação da metodologia de extração aquosa para o caroço de açaí e de métodos analíticos para a quantificação dos compostos. Na segunda etapa do projeto foi feito um planejamento experimental para avaliar o efeito das variáveis do processo de extração no teor de polissacarídeos: temperatura, granulometria do caroço, relação massa/volume e velocidade de agitação da mistura. Na terceira etapa, através das reações de hidrólise e análise HPLC, não foi encontrado o polissacarídeo inulina. Pela análise de RMN e infravermelho propõe-se que o polissacarídeo presente seja uma galactomanana. O teor de polissacarídeos do caroço, solúveis em água, variou de 2 a 7%. A fração insolúvel do caroço, obtida por extração básica, corresponde a 15% da massa total.

**Palavras-chaves:** Açaí. Polissacarídeo. Resíduo.

## **Abstract**

The development of the productive chain of agribusiness açai depends on the proper disposal of by-products generated. The fruit is used currently only the mesocarp for human consumption, creating an environmental problem, since the core represents approximately 75-81% of the total weight of the fruit. The stone of açai literature reports the presence of inulin, polyphenols and other carbohydrates. Among these inulin stands out for its low calorie and therefore applied in food production light in fat or low fat, as a substitute for fat and sugar. Despite being distributed worldwide, is not produced in Brazil and its imports makes it a product of high cost. Thus the design goal was to develop a method for extraction of inulin on a laboratory scale, aiming its industrial production. In the first stage of the project was undertaken to adapt the methodology for aqueous extraction of açai and the core of analytical methods for quantification of compounds. In the second stage of the project was carried out an experimental design to evaluate the effect of variables in the process of extracting the content of polysaccharides: temperature, particle size of the lump, mass / volume ratio and stirring speed of the mixture. In the third step, through the hydrolysis and HPLC analysis, was not found the polysaccharide inulin. By NMR analysis and infrared is proposed that this polysaccharide is a galactomannan. The content of the core polysaccharide, soluble in water, ranged 2-7%. The insoluble fraction of the core, obtained by extracting basic, representing 15% of the total mass.

**Keywords:** Açai. Polysaccharide. Residue.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo .....	3
CAPÍTULO 2 .....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Cadeia Produtiva do Açaí.....	4
2.1.1 O Caroco de Açaí .....	6
2.2 Carboidratos de reserva .....	8
2.2.1 Carboidratos de reserva de parede celular.....	8
2.2.1.1 Manana e galactomanana .....	9
2.2.2 Inulina.....	13
2.2.2.1 Propriedades físico-químicas.....	15
2.2.2.2 Fontes de inulina.....	15
2.2.2.3 Extração de inulina .....	16
2.2.2.4 Mercado de inulina .....	17
2.2.2.5 Inulinase .....	18
2.3 Sacarose .....	18
2.3 Polifenóis.....	19
2.4. Planejamento experimental e otimização de processos.....	20
CAPÍTULO 3 .....	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Métodos .....	22
3.1.1 Moagem do caroco .....	22
3.1.2 Extração de polissacarídeos.....	22
3.1.3 Extração do polissacarídeo insolúvel em água.....	23
3.1.4 Purificação do extrato.....	23
3.1.5 Análise do efeito do tempo de armazenamento.....	24
3.1.6 Estudo cinético da transferência de massa .....	25
3.1.7 Planejamento experimental para análise das variáveis.....	25
3.1.8 Otimização do processo de extração .....	26
3.2 Metodologia analítica .....	27
3.2.1 Quantificação de carboidratos por CLAE .....	27
3.2.2 Quantificação de açúcares totais.....	27
3.2.3 Hidrólise enzimática da inulina .....	27
3.2.3 Hidrólise ácida.....	28
3.2.4 Quantificação de polifenóis .....	28
3.2.5 Espectrometria de infravermelho.....	29
3.2.6 Ressonância Magnética Nuclear H e <sup>13</sup> C.....	29
CAPÍTULO 4 .....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1. Extração e quantificação dos polissacarídeos solúveis .....	30
4.1.1 Quantificação e identificação por HPLC.....	30
4.1.2 Quantificação de açúcares totais.....	32
4.1.3 Hidrólise Enzimática .....	32
4.1.4 Hidrólise Ácida.....	34

4.2 Purificação do extrato aquoso .....	35
4.3 Análise do Efeito do Tempo de Armazenamento.....	36
4.4 Extração e quantificação dos polissacarídeos insolúveis .....	37
4.5 Espectrometria no infravermelho .....	38
4.6 Ressonância magnética nuclear.....	42
4.6.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....	43
4.6.2 Ressonância magnética nuclear de Carbono-13 .....	44
4.7 Estudo Cinético da transferência de massa .....	46
4.8 Planejamento experimental para análise das variáveis.....	47
4.8.1 Polissacarídeo .....	48
4.8.2 Sacarose .....	52
4.8.3 Polifenóis .....	54
4.9 Otimização.....	57
CAPÍTULO 5 .....	61
CONCLUSÃO.....	61
Sugestões para Trabalhos Futuros .....	61
REFERÊNCIAS .....	62

## Sumário de figuras

Figura 1. Palmeira de açai ( <i>Euterpe oleracea</i> ).....	4
Figura 2. Corte transversal do fruto de açai.....	6
Figura 4. Estrutura do xiloglucano .....	9
Figura 5. Estrutura da galactomanana (MERCÊ <i>et al.</i> , 2001).....	10
Figura 3. Estrutura da inulina.....	13
Figura 6. Estrutura da protocianidina. ....	20
Figura 7. Reator encamisado com caroço de açai em água destilada.....	23
Figura 8. Coluna de separação aberta de Sephadex .....	24
Figura 9. Cromatograma do extrato aquoso obtido do caroço de açai. ....	31
Figura 10. Cromatograma do padrão de inulina .....	31
Figura 11. Cromatograma do padrão de sacarose .....	31
Figura 12. Cromatograma da amostra do extrato aquoso obtido do caroço de açai. .....	33
Figura 13. Cromatograma da amostra de extrato obtido do caroço de açai após hidrólise enzimática.....	33
Figura 14. Cromatograma do padrão de inulina após realizada a hidrólise ácida ...	34
Figura 15. Cromatograma do padrão de manana após realizada hidrólise ácida ..	34
Figura 16. Cromatograma do extrato aquoso de caroço de açai depois de realizada a hidrólise ácida.....	34
Figura 17. Amostras obtidas pelo processo de purificação por cromatografia líquida em gel Sephadex do extrato aquoso do caroço de açai. Frações (a), (b) e (c) de carboidratos acordo com o fracionamento na coluna e (d) fração de polifenóis obtidas do extrato aquoso do caroço de açai.....	36
Figura 18. Polissacarídeos insolúveis extraídos em solução alcalina do caroço de açai. ....	38
Figura 19. Espectro na região do infravermelho de polissacarídeos extraídos com solução básica a partir do caroço de açai. ....	39
Figura 20. Espectro na região do infravermelho da fração 1 obtida da purificação por sephadex do extrato aquoso do caroço de açai .....	39
Figura 21. Espectro da região no infravermelho da fração 2 do extrato aquoso do caroço de açai.....	41
Figura 22. Espectro da região do infravermelho da fração 2 purificada do extrato aquoso do caroço de açai.....	42
Figura 23. Espectro de RMN de H para o extrato aquoso de caroço de açai.....	43
Figura 24. Espectro de RMN <sup>13</sup> C para a amostra purificada do extrato aquoso obtido do caroço de açai .....	45
Figura 25: Gráfico da cinética de extração de polissacarídeos solúveis do caroço de açai em função do tempo de extração. ....	47
Figura 26. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de polissacarídeos no extrato aquoso de caroço de açai.....	50
Figura 27. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de sacarose no extrato aquoso de caroço de açai. ....	54

Figura 28. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes na concentração de polifenóis no extrato aquoso de caroço de açaí. .... 56

## Sumário de tabela

Tabela 1. Composição do caroço de açaí: (ALTMAN, 1956) .....	7
Tabela 2. Principais fontes de inulina. (SILVA, 1996) .....	15
Tabela 3: As condições experimentais do planejamento experimental para a extração de polissacarídeos do caroço de açaí .....	25
Tabela 4. Condições experimentais codificadas para a extração de polissacarídeos do caroço de açaí. ....	26
Tabela 5: Condições experimentais para a otimização do processo de extração ..	26
Tabela 6: Quantificação do extrato de polissacarídeo.....	37
Tabela 7. Atribuições para os sinais do espectro de RMN H encontrado na .....	43
Tabela 8 Atribuição dos sinais de RMN - <sup>13</sup> C para polissacarídeos encontrados na literatura.....	44
Tabela 9: Tabela ANOVA para a quantificação de polissacarídeos do caroço de açaí.....	47
Tabela 10. Quantificação de polissacarídeos obtidos por extração aquosa do caroço de açaí.....	49
Tabela 11. Cálculo dos efeitos de polissacarídeos do extrato aquoso do caroço de açaí.....	50
Tabela 12. Análise de variância para o modelo linear para a extração de polissacarídeos do extrato aquoso do caroço de açaí .....	51
Tabela 13. Quantificação de sacarose no planejamento experimental .....	52
Tabela 14. Efeitos para a extração de sacarose .....	53
Tabela 15. Análise de Variância - Modelo Linear.....	54
Tabela 16. Quantificação de polifenóis no extrato aquoso de caroço de açaí .....	55
Tabela 17. Cálculo dos efeitos para os polifenóis no extrato aquoso de caroço de açaí. ....	56
Tabela 18. Teste F para o modelo linear .....	57
Tabela 19. Valores utilizados no planejamento fatorial para a otimização de polissacarídeos do extrato aquoso de açaí.....	58
Tabela 20. Resultados do planejamento fatorial para a extração de polissacarídeos .....	58
Tabela 21. Cálculo dos efeitos para a .....	59
Tabela 22. Análise de variância .....	60

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

O consumo de produtos à base de açaí no Brasil e em diversas partes do mundo está se tornando cada vez mais popular. Esse aumento da produção, principalmente no Estado do Pará, gera grande quantidade de resíduos, formada principalmente por caroços, que são jogados nas ruas e nos leitos dos rios, contaminando a terra e os lençóis freáticos. Desta forma, existe uma grande demanda pelo desenvolvimento de processos visando o aproveitamento desses resíduos, tais como a geração de energia pela queima dos caroços e compostagem. No entanto, ainda não há um processo que consiga dar suporte para todo o resíduo gerado diariamente (ROGEZ 2000; LUCZYNSKI, 2008).

A possibilidade de extração de compostos de alto valor agregado do caroço de açaí vem a ser uma alternativa tecnológica bastante interessante para o aproveitamento desses resíduos. Entre os compostos presentes no caroço de açaí, a literatura relata a presença de galactomanana, inulina e polifenóis (MENEZES NETO, 2004; PAULA, 1975; RODRIGUES *et al.*, 2006).

A literatura relata a presença de enzimas responsáveis pela degradação do polissacarídeo galactomanana no caroço de açaí. Este polissacarídeo é formado por uma cadeia de manose com ramificações de galactose. No entanto, a literatura não dispõe da análise estrutural completa dos polissacarídeos presentes nas sementes de açaí (MENEZES NETO, 2004).

A inulina é um polissacarídeo do tipo frutana e possui diversas aplicações na indústria de alimentos, incluindo seu uso como substituto da gordura e como adoçante natural. A inulina e oligofrutoses são consideradas fibras alimentares, pois são resistentes à digestão na parte superior do sistema gastrointestinal, assim chegam ao intestino grosso intactas e são fermentadas por bifitobactérias presentes no cólon. (ROBERFROID, 1999)

Os polifenóis são metabólicos secundário, essenciais para o crescimento e reprodução de plantas. Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização e estão presentes nos

vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (NACZK & SHAHIDI, 2004). Os polifenóis identificados no caroço de açaí são principalmente protocianidina e epicatequina, pertencentes da classe dos taninos, apresentam utilização na indústria de curtimento de couro, farmacêutica e cosméticos (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Considerando que ainda não foi encontrado na literatura dados sobre a caracterização química do polissacarídeo presente no caroço de açaí e devido ao potencial de aplicação industrial da inulina, galactomamana e também outros componentes como, por exemplo, os polifenóis, o processo investigado neste trabalho foi de grande relevância para a obtenção de importantes informações, que possibilitem a viabilidade do processo de extração de polissacarídeos para a utilização industrial.

O projeto proposto no presente estudo foi realizar a extração do polissacarídeo a partir do caroço do açaí, identificá-la e caracterizá-la, e em seguida, propor metodologia de extração e realizar um planejamento experimental visando a otimização do processo.

## **1.1 Objetivo**

O objetivo do projeto foi a identificação e avaliação das variáveis processo de extração dos polissacarídeos solúveis presentes no caroço de açaí. Diversos estudos estão em andamento, no entanto, nenhum ainda capaz de eliminar ou reutilizar resíduo gerado pela agroindústria do açaí. Dados da literatura apontam para a presença do carboidrato do tipo inulina ou manana no caroço de açaí. Neste trabalho foi feita a extração e caracterização do polissacarídeo presente no caroço de açaí (*Euterpe oleracea*), investigados através das técnicas analíticas de cromatografia líquida, ressonância magnética nuclear e espectrometria de infravermelho. Foi realizada também a análise dos efeitos das variáveis do processo de extração (temperatura, granulometria, relação massa e volume de solução e a velocidade de agitação da mistura) do polissacarídeo solúvel em água.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentadas informações sobre a cadeia produtiva do açaí (*Euterpe oleracea*), principalmente no rejeito gerado, constituído principalmente de caroço. Como o objetivo do trabalho foi focado na extração de inulina são apresentadas informações sobre inulina, suas propriedades químicas, físico-químicas, potencial econômico e métodos de extração. Também informações sobre carboidratos de reserva e polifenóis componentes estruturais encontrados em caroços de diversas espécies de plantas.

#### **2.1 Cadeia Produtiva do Açaí**

O açaizeiro (*Euterpe oleracea*) é uma palmeira (Figura 1) nativa da região Norte, pertencente da família *Arecaceae* (antiga *Palmae*), as palmeiras são plantas monocotiledôneas, lenhosas, formando um grupo natural de plantas com morfologia muito característica, que permite, mesmo aos mais leigos, a sua identificação sem maiores dificuldades. (SODRÉ, 2005).

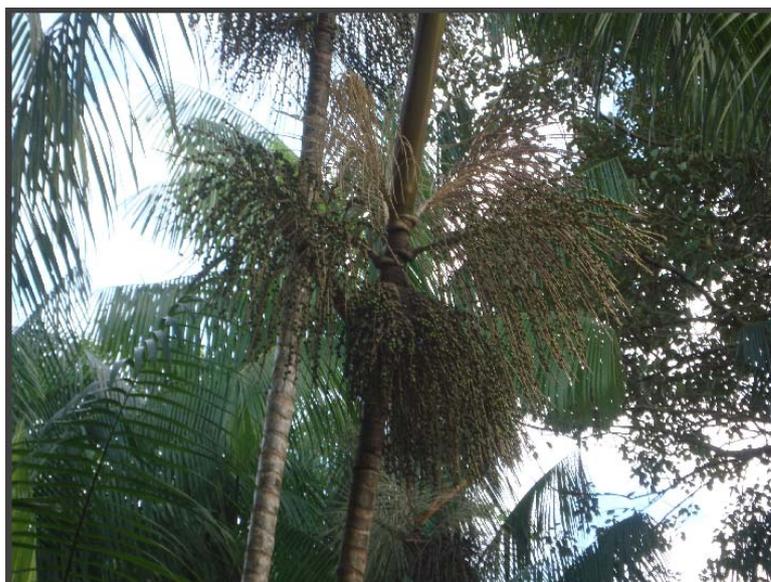


Figura 1. Palmeira de açaí (*Euterpe oleracea*)

Os dois produtos atualmente explorados dessa palmeira são os palmitos e os frutos. O palmito é exportado para outros estados e os frutos são destinados principalmente ao mercado local do Estado do Pará, sendo totalmente informal, constituindo a base de renda de milhares de famílias dessa região. A partir do despulpamento dos frutos é produzida uma bebida chamada açaí, amplamente comercializada no Estado do Pará, que constitui a base da alimentação da população local e vem sendo difundida para outras regiões do país (ROGEZ, 2000).

A polpa também é consumida na forma de creme, licor, geléia, mingau, sorvete, picolé e doces. O caule do tipo estipe é lenhoso e sólido, sendo utilizado em edificações. As folhas são utilizadas para cobertura de barracas provisórias e fechamento de paredes e quando verde pode ser usada na alimentação animal. A palmeira também pode ser usada em ornamentação (TOWNSEND *et al.*, 2001).

O açaizeiro floresce durante todos os meses do ano com um pico de floração entre os meses de fevereiro a julho, porém não é considerada a época de boa colheita. Teoricamente podem-se considerar dois períodos de produção: a safra de inverno (consiste na estação das chuvas), a qual se estende de janeiro a junho e a safra de verão, sendo de julho a dezembro (LUCZYNSKI, 2008).

Desde o início dos anos 90, o açaí teve um crescimento maciço e brutal sobre o mercado externo, prefigurando o desenvolvimento de uma nova produção de renda (LUCZYNSKI, 2008). Segundo Rogez (2000) o consumo de açaí aumentou muito nos últimos anos nos estados do sul e sudeste do país, por consumidores atraídos principalmente pelas suas propriedades calóricas e medicinais. Isso se deve a presença de polifenóis responsáveis pelo seu poder antioxidante, entre eles se destacam as antocianinas, responsáveis pela cor característica do açaí (ALBARICI *et al.*, 2009).

Segundo dados do IBGE (2007) a produção nacional de frutos de açaí nativo, obtidos de forma extrativista, em 2007 totalizou 108 033 toneladas, sendo 6,6% maior que a de 2006. O principal produtor é o Estado do Pará que, na temporada 2007, concentrou 90,4% da produção nacional. No estado encontram-

se 17 dos 20 maiores municípios produtores de frutos de açazeiros nativos do País. No estado do Maranhão a produção extrativista correspondeu a 9,6%.

A alta produção da bebida de açai faz com que a quantidade de resíduo gerado seja maior do que a produção da bebida, uma vez que o caroço de açai representa aproximadamente 75% a 81% do peso total do fruto.

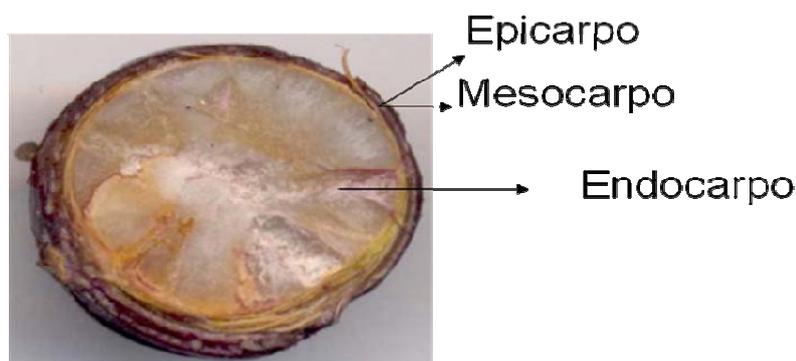


Figura 2. Corte transversal do fruto de açai.

A produção diária de açai produz em média 300 toneladas de lixo orgânico diariamente, gerando problemas ambientais para as cidades que comercializam o produto (ROGEZ, 2000). Muitas indústrias produtoras do vinho de açai descartam o caroço em vias públicas, permanecendo expostos na rua aguardando a coleta da prefeitura, sendo na maioria das vezes colocados em sacas utilizadas para descarte de outros tipos de resíduos domésticos e industriais (LUCZYNSKI, 2008).

### 2.1.1 O Caroço de Açai

O caroço do açai é duro e encontra-se envolvido por uma camada celulósica fibrosa, que o separa da polpa.

A composição do caroço foi determinada por Altman (1956) que verificou que este apresenta uma baixa concentração de nutrientes, apresentando apenas 0,7% de nitrogênio. Os dados da composição do açai estudado estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição do caroço de açaí: (ALTMAN, 1956)

<b>Composição</b>	<b>Porcentagem</b>
Umidade	13,60
Extrato etéreo	3,01
Extrato aquoso	2,80
Proteínas brutas	4,34
Hemicelulose	12,26
Celulose	34,41
Lignina	7,72
Cinzas	1,34

O caroço de açaí tem sido uma fonte de estudos em diversas áreas, devido ao interesse no desenvolvimento de tratamentos adequados para descarte e reutilização deste resíduo. Um estudo realizado por Townsend *et al.* (2001) expôs o reaproveitamento do caroço de açaí como ração animal e também como fertilizante. No entanto, os resultados demonstraram que o caroço de açaí apresenta baixo valor nutricional para a alimentação de ruminantes, sendo recusados pelos animais devido ao seu sabor adstringente devido à presença de polifenóis no caroço.

Um estudo desenvolvido por Teixeira *et al.* (2005) pesquisou a utilização do caroço de açaí e também a capa do palmito no processo de compostagem do solo, através de combinações com outros substratos, obtendo bons resultados. As fibras do caroço de açaí têm sido estudadas como adição em compósitos aumentando a resistência mecânica e termomecânicas de poliofelinas (plásticos) recicladas (ITO *et al.*, 2007). Outra aplicação para o resíduo de açaí é a utilização como substrato para a produção de enzimas por fermentação da lignocelulose, cujo principal interesse é a utilização dessa biomassa para a produção de biocombustíveis (ZUNIGA *et al.*, 2008).

Paula (1975) estudou a anatomia do pericarpo e identificou a presença de cristais de inulina no caroço de açaí, encontrados principalmente no endosperma jovem. O autor realizou a coloração do endosperma da semente, ocorrendo à identificação característica para o carboidrato inulina. No entanto, o autor não disponibiliza a quantificação da inulina presente no caroço.

Uma patente foi depositada com o nome “aproveitamento da inulina e amidos de baixa densidade para a fabricação de uma fibra solúvel oriunda de sementes de *Euterpe oleracea*” onde o autor cita a presença de 0,65 % de inulina no caroço de açaí. Porém nesta patente não há nenhum relato da metodologia analítica utilizada na quantificação da inulina. O processo de obtenção de inulina descrito na patente consiste na moagem e encapsulamento da semente moída (ALENCAR, 2007).

## **2.2 Carboidratos de reserva**

Polissacarídeos são polímeros naturais, que podem ser constituídos de um único ou diferentes tipos de monossacarídeos. Esses polímeros são unidos por ligações glicosídicas diferindo entre si na unidade e no grau de ramificação destas, no tipo de ligações que as unem e no comprimento de suas cadeias. (SILVA *et al.*, 2006). Muitos polissacarídeos possuem aplicações industriais e são extraídas de plantas ou algas via fermentação. Nas plantas superiores, os polissacarídeos podem ser obtidos de sementes, frutos e tubérculos.

O polissacarídeo de reserva mais amplamente distribuído é o amido, seguido das frutanas e dos polissacarídeos de reserva de parede celular. Cada um destes carboidratos apresenta características que os tornam mais convenientes para a planta (BUCKERIDGE *et al.*, 2000a).

### **2.2.1 Carboidratos de reserva de parede celular**

Os polissacarídeos de reserva de parede celular podem ser divididos em três grupos: xiloglucanas, mananas, e os galactanos, sendo que as duas primeiras destacam-se em aplicações industriais (CUNHA *et al.*, 2009).

A estrutura química genérica das xiloglucanas de reserva das sementes consiste de uma cadeia principal celulósica de unidades de D-glucose, as quais podem estar substituídas em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D – xilopirranose (Figura 4). Essas últimas, por sua vez podem estar substituídas por unidades de  $\beta$ -D-galactopirranose (CUNHA *et al.*, 2009).

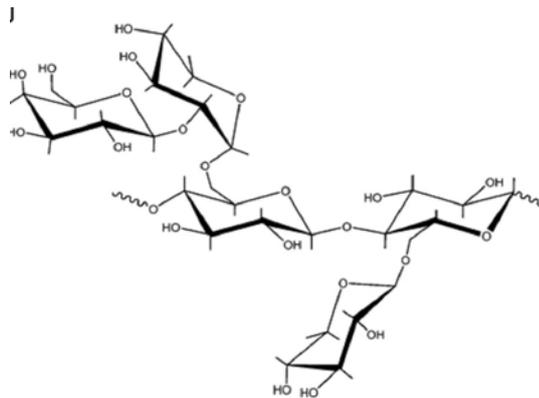


Figura 3. Estrutura do xiloglucano  
(COVIELLO, 2007).

### 2.2.1.1 Manana e galactomanana

As mananas podem ser divididas em mananas puras, glucomananos e galactomananas (LIMA, 2000). Os mananos puros são assim definidos por conter mais de 90% de manose formando uma cadeia linear do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com poucas ou sem ramificações. As galactomananas (Figura 5) são compostos por uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com resíduos de galactose unidos por ligações do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). Os galactanos é formado por uma cadeia de galactose unidas por ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (BUCKERIDGE *et al.*, 2000a).

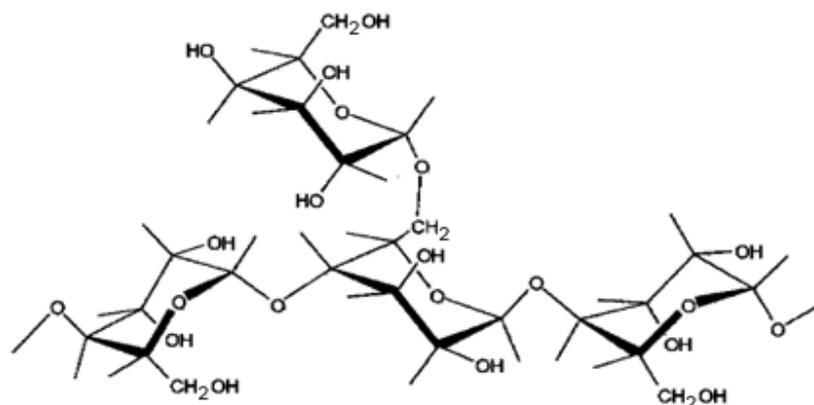


Figura 4. Estrutura da galactomanana (MERCÊ *et al.*, 2001).

Embora as galactomananas clássicas obedeçam à estrutura de manose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com resíduos de galactose unidos por ligações do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), existem algumas delas, com menor frequência, que são diferenciadas, como é o caso da *P.aculeata*. De acordo com Guhra e Singh (1988), esta galactomanana apresenta um polissacarídeo de estrutura multiramificada, com a presença de ligações  $\alpha$  (1-3); (1-4) e (1-6) na cadeia principal.

Segundo Buckeridge *et al* (2000 b), os polissacarídeos de reserva estão associados à dureza (mananos em endosperma de sementes de palmeira, tomate e alface), relações hídricas (xiloglucanos em cotilédones e galactomananos em endospermas de sementes de leguminosas) e no controle da expansão celular (galactanos nos cotilédones de lupino e em menor proporção, em sementes de feijão e soja).

Em plantas superiores a manana é o principal material de reserva presente no endosperma de sementes das famílias Apiaceia, Rubiaceae, Asteaceae e Arecaceae; esta última engloba a espécie *Euterpe oleracea* (PETKOWICZ *et al.*, 2001). Segundo Petkowicz *et al.* (2007) a manana encontrada na espécie *Shizolobium parahybae* não é um polissacarídeo de reserva, uma vez que a análise dos monossacarídeos por cromatografia gasosa demonstrou que esse

polissacarídeo não é consumido na germinação da semente. Assim, este polissacarídeo tem função estrutural na semente em substituição de celulose ausente neste tipo de semente.

A partir da extração de polissacarídeos de *Schizolobium amazonicum*, popularmente conhecida como pinho cuiabano, identificou-se a presença de manana linear. Esse polissacarídeo é responsável por 20% da massa do endosperma dessa planta. A presença de manana linear foi confirmada com extração aquosa com 18% de NaOH e as caracterizações realizadas por HPLC e RMN. Há uma diminuição constante de galactose e glicose quando a concentração de NaOH passa de 4% para 18%, chegando a 98% de manana. A extração de polissacarídeos de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu) foi analisada depois da germinação das sementes e o autor demonstrou que a manana não é um material de reserva já que este se mantém após a germinação (PETKOWICZ *et al.*, 2001, 2007).

Segundo um estudo realizado por Rao & Mukherjee (1962), a extração de polissacarídeos dos caroços dos frutos de uma palmeira (*Borassus flavellifer*) mostrou a presença de galactomanana e manana. Segundo os autores a extração sucessiva com água e solução de NaOH 4% proporcionou a extração de galactomananas, enquanto a extração com uma solução de 18% de NaOH forneceram mananas.

As concentrações de manana e galactomanana variam com o amadurecimento das sementes. Em sementes verdes aparecem em maior proporção as galactomananas, e em sementes maduras a maior parte do polissacarídeo encontrado é manana. Segundo o autor a relação de manana e galactomanana durante o amadurecimento do fruto é significativa, provavelmente a galactomanana é substituída por uma manana nos estágios mais avançados de amadurecimento da semente. As espécies mais utilizadas industrialmente são as extraídas de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) e de *Ceratonia siliqua* (alfarroba). A proporção de manose (M) e galactose (G) destes polissacarídeos é respectivamente 1,7:1 e 3:1. (CUNHA *et al.*, 2009).

Para Matheson & Saini (1977) a manana é o principal constituinte das células endospermicas das sementes de palmeiras, pode ser encontrada em 60% das sementes de palmeiras e ocorre como principal constituinte da parede celular, conferindo característica muito espessa. Nestas sementes a manana desempenha duas funções: confere resistência mecânica permitindo maior proteção para o embrião; serve como carboidrato de reserva que são digeridos durante a germinação e convertidos a sacarose para nutrição da plântula em desenvolvimento.

Panza (2004) afirma que a espécie *Euterpe edulis* apresenta em seu endosperma paredes espessa, apresentando proteínas, lipídios e manana. Menezes Neto (2004) identificou a presença da enzima endo- $\beta$ -mananase, responsável pela degradação da manana no endosperma do caroço de açaí. Segundo o autor a manana é hidrolisada, produzindo manose e transportada até o eixo embrionário onde é convertida em sacarose.

Atividades biológicas como antivirais, antitumorais, antioxidante, anticoagulantes e antitrombóticos estão sendo investigadas para polissacarídeos de diversas fontes. Os polímeros de carboidratos possuem grande aplicabilidade na indústria de alimentos. Algumas vezes estão presentes por razões tecnológicas, como auxiliares no processo, para estabilizar emulsões e suspensões ou para fornecer a estrutura física necessária para o empacotamento e distribuição. No entanto, seu uso mais freqüente está associado à sua capacidade de espessar e gelificar soluções, sendo aplicados para melhorar e padronizar a qualidade dos alimentos processados LAPASIN & PRICL (1995) citados por (TONELI 2006).

O principal uso desses polissacarídeos na indústria são em alimentos dietéticos, uma vez que ela não é absorvida pelo corpo humano. Além de modificar a viscosidade do produto final, possui capacidade de complexar íons metálicos como ferro para ser utilizado como complexo alimentar (MERCÊ *et al.*, 2001).

Gouveia (2007) afirma que durante a germinação de sementes de *Euterpe oleracea* os açúcares consumidos pelos embriões são representados por

sacarose e manose. Segundo o autor o consumo de manose pelo embrião é maior que o de sacarose, afirmando que a manana é o principal carboidrato de reserva em sementes de açaizeiro.

Na área de suplementos alimentares para peixes, a utilização desses polissacarídeos é devido a sua capacidade de atuar como um prebiótico nos peixes, fornecendo bons resultados. O suplemento alimentar contendo 25 % de mananoligossacarídeo e 30 % de  $\beta$ -glucano) por kg de ração durante 37 dias, reduz a profundidade de criptas intestinais e favorece o aproveitamento de proteínas na dieta, refletindo na melhora do desempenho produtivo e da uniformidade dos peixes (GARCIA, 2008).

### 2.2.2 Inulina

A inulina é um carboidrato de reserva do tipo frutano que junto com o amido e os glucomananos são os principais compostos de reserva em bulbos, tubérculos e rizomas de plantas (Hincha *et al.*, 2007). É composta por um polímero de cadeia linear de frutose unida por ligações glicosídicas  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), com uma glicose terminal (Figura 3). Uma vez que oligossacarídeos são definidos como polímeros de frutose com uma molécula de glicose terminal, a inulina pode ser classificada como fruto oligossacarídeo (FOS) (SILVA, 1996; ROBERFROID, 1999).

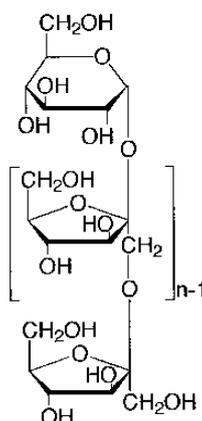


Figura 5. Estrutura da inulina  
(ROBERFROID, 1999).

A inulina é composta por uma mistura de oligômeros de diferentes graus de polimerização (GP) variando de 2 até 60. Quando apresenta grau de polimerização maior que 10 são chamadas de inulina, quando o polímero apresenta grau de polimerização menor que 10 são chamadas de oligofrutoses e estas podem ser obtidas por hidrólise enzimática da inulina. (ROBERFROID, 1999).

O nome inulina deve-se ao isolamento desse polissacarídeo obtido por extração a quente de uma planta conhecida como *Inula helenium* e descrito em 1804. (ROBERFROID, 2005 citado por GRZYBOWSKI, 2008).

Devido a sua estrutura apresentar ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), a inulina e os oligossarídeos não são hidrolisados pelo sistema digestivo humano, assim chegam ao intestino grosso intactos, onde serão fermentados pelas bifidobactérias presentes no cólon. A inulina e as oligofrutoses são classificadas como fibras alimentares influenciando os parâmetros fisiológicos do sistema digestivo, como esvaziamento gástrico, tempo de trânsito, pH, e massa fecal de forma similar às fibras dietéticas (ROBERFROID *et al.*, 1993; ROBERFROID, 1999).

O valor calórico da inulina foi estudado por Roberfroid (1999) a partir da avaliação do gasto energético para a fermentação da inulina no cólon. O autor determina que o valor calórico da inulina seja 1,5 Kcal, quase três vezes menos se comparado com o da sacarose (6,3 Kcal).

A inulina e as oligofrutoses têm sido muito utilizadas para substituição da gordura ou açúcar, a fim de se reduzir as calorias em alimentos; tais como sorvete, produtos lácteos, doces e produtos de panificação. Contudo, por não ser digerida pelo sistema digestivo humano sua maior utilização é como fibra alimentar adicionada a alimentos (HAULY & MOSCATTO, 2002).

### 2.2.2.1 Propriedades físico-químicas

A inulina é solúvel em água, essa solubilidade é dependente da temperatura da água. A 10 °C a solubilidade é de aproximadamente 6% enquanto que a 90 °C essa solubilidade passa a ser 35%. Em condições normais a inulina se dispersa em água. Em solução a inulina reduz o ponto de congelamento da água e aumenta o ponto de ebulição (SILVA, 1996).

A inulina possui a propriedade de formar um gel, estável em condições ácidas, essa capacidade é dependente de uma série de fatores: do grau de polimerização, o tamanho da partícula do teor de sólidos, da concentração de inulina e a adição de cátions mono ou divalentes e hidrocoloides.

Em soluções contendo de 11 a 30% pode-se notar um gradual aumento da viscosidade e a formação de uma solução com características de gel. Quando há a formação de gel a inulina está dispersa em pequenas partículas (SILVA, 1996).

### 2.2.2.2 Fontes de inulina

A inulina está presente em mais de 30.000 plantas, principalmente no alho, chicória e dália, conforme apresentado na Tabela 2. Outras fontes encontradas de inulina são fungos e bactérias (SILVA, 1996). O tempo de coleta e condições de armazenamento influencia o perfil de açúcares presentes no fruto (LEONEL, 2006).

Tabela 2. Principais fontes de inulina. (SILVA, 1996)

<b>Planta</b>	<b>Concentração de inulina (%)</b>
Trigo	1-4
Cebola	2-6
Alho porro	10-15
Aspargos	10-15
Raiz de chicória	13-20
Yacon	15-20
Barbas de bode	15-20
Alcachofra de Jerusalém	15-20
Tubérculos de Dália	15-20
Alho	15-25

### 2.2.2.3 Extração de inulina

Diversos métodos de extração de inulina foram estudados e patenteados. O método mais utilizado é a extração por difusão a quente. O uso de temperaturas elevadas também possui como vantagem a inativação das enzimas presentes nos alimentos, que podem interferir em processos posteriores. Além disso, o uso de altas temperaturas no processo de extração resulta em menores quantidades de compostos nitrogenados no produto final (TONELI, 2006).

Cataldo *et al.* (2001) estudaram a extração de inulina utilizando dióxido de carbono supercrítico em um extrator de aço inox. No entanto a eficiência da extração foi abaixo de 10% devido a grande massa molecular da inulina.

Galante (2008) estudou a extração de inulina a partir do alho, comparando o processo em batelada e o processo contínuo realizado em coluna de leito fixo com recirculação de solvente. O processo em coluna com uma única passagem de solvente obteve o melhor resultado com rendimento de 16,20 g de inulina por 100 g de alho.

Van Loo *et al.* (1995), em estudo sobre a presença de inulina em diversos produtos vegetais que fazem parte da dieta do oeste europeu, utilizaram a extração por difusão em água quente. Com a finalidade de prevenir a hidrólise por enzimas vegetais liberadas durante o processo de extração, foi adicionada água destilada fervente à amostra, na proporção mínima de 1:5 (amostra: água). A extração da inulina foi realizada em banho-maria a 75°C, durante 1 hora, sob agitação constante.

Toneli (2006) desenvolveu um processo de obtenção de um concentrado de inulina a partir de raízes de chicória, utilizando a técnica de abaixamento de temperatura e posterior separação física. No processo, as raízes de chicória foram lavadas, descascadas e picadas antes do processo de extração. O extrato obtido foi filtrado e posteriormente concentrado em seguida foi levado a uma câmara de congelamento (temperaturas entre -8°C e -50°C), onde ocorreu a decantação de

inulina pelo abaixamento de temperatura. Após descongelamento dos extratos, foi realizada a separação física entre as fases sobrenadante (líquida) e precipitada, obtidas pelo abaixamento de temperatura do extrato.

O método de extração da inulina a partir de alcachofra de Jerusalém foi investigado através da utilização da metodologia de superfície de resposta e aplicando-se ultra-som para aumentar a eficiência da extração. A influência do pH, do tempo, temperatura e razão massa: volume de solvente na extração foi avaliado e uma comparação entre procedimentos convencionais de extração e aplicando com sonicação, demonstrou que o emprego da extração com sonicação de forma indireta aumentou a eficiência da extração. (LINGYUN *et al.*, 2007)

#### **2.2.2.4 Mercado de inulina**

Devido aos atributos funcionais e nutricionais apresentados pela inulina e pelas oligofrutoses, o grupo Rhône-Poulenc decidiu comercializar estas fibras alimentares através de um acordo com o grupo Raffinerie Tirlemontoise S.A., na Bélgica. Sob os nomes comerciais Raftiline® e Raftilose®, esses produtos são hoje comercializados em 16 países da Europa, no Japão e nos EUA. Raftiline® atua como fibra dietética, bem como substituto da gordura. Ela contribui para uma boa sensação tátil e melhora a estabilidade de espumas e emulsões. Raftilose® é comumente usado como um substituto do açúcar em sorvetes e outros produtos lácteos, altamente solúvel e com uma viscosidade semelhante a da glicose (APPLIED TECHNOLOGY, 1993).

Apesar da produção e aplicação da inulina serem muito difundidas em alguns países, no Brasil o seu uso ainda é muito restrito. Por se tratar de um produto que não é produzido no mercado nacional, ela precisa ser importada, o que a torna um ingrediente caro e dificulta sua aplicação (TONELI, 2006). Atualmente o processamento industrial extrai o composto das raízes de chicória na Europa em países como a Bélgica e Holanda. Atualmente a inulina é comercializada no mercado brasileiro pela Orafiti e vendida por 15 dólares o quilo do produto puro.

### **2.2.2.5 Inulinase**

As inulinases são 2,1- $\beta$ -D frutohidrolases que convertem inulina à frutose e glicose, sendo que esta enzima é utilizada na produção de xaropes de alta concentração de frutose. As inulinases mais utilizadas são aquelas obtidas do fungo do gênero *Aspergillus*. Levando em conta os mecanismos de reação e os produtos liberados na reação, há dois tipos inulinases: as exoinulinases que liberam sucessivamente resíduos de frutose e as endoinulinases que hidrolisam a molécula de inulina quebrando ligações frutósidas ao acaso e gerando inulotriose, inulotetraose e inulopentaose. (GRZYBOWSKI, 2008).

Atualmente há muitos estudos sobre a cinética da hidrólise pela ação da inulinase, relacionando temperatura, concentração do substrato e tempo de reação, principalmente visando à produção de frutose a partir de inulina (RICA *et al.*, 2009).

### **2.2.3 Sacarose**

A sacarose ou o açúcar de cana é um dissacarídeo formado por glicose e frutose (LEHNINGER, 1991). A sacarose é o principal carboidrato solúvel encontrado em sementes maduras de várias espécies de plantas. Esse açúcar, além de atuar como substrato para reações metabólicas. (UEMURA & STEPONKUS, 2003 citado por HELLMAN, 2008).

Lorenço (2000) estudou a obtenção de frutose a partir de sacarose pela ação da enzima inulinase, seguida da separação de glicose e frutose feita em colunas de adsorção contendo zeólitas Y. A autora justifica que o mercado de consumo da frutose tem aumentado significativamente nos últimos anos, visto que este açúcar está sendo cada vez mais utilizado em substituição à sacarose, devido aos benefícios fisiológicos. A frutose é tolerada por pacientes diabéticos e está relacionada com o aumento da absorção de ferro em crianças (PESSOA & VITTOLO, 1999).

## **2.3 Polifenóis**

Os compostos fenólicos são de grande interesse e amplamente estudados. Presentes no fruto de açaí geram mais valor ao consumo dos produtos obtidos após seu processamento. No entanto no caroço de açaí também são encontrados polifénóis que podem ser estudados e aplicados na indústria de alimentos e cosméticos dentre outras.

Os compostos fenólicos formam uma das principais classes de metabólitos secundários essenciais para o crescimento e reprodução de plantas, tem funções antipatogênicos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. (NACZK & SHAHIDI, 2004).

A estrutura química dos polifenóis é composta de um anel aromático e uma ou mais hidroxilas, são antioxidantes capazes de doar átomos de hidrogênio, reduzindo radicais livres a espécies químicas não radicalares de baixa reatividade e oxidando os polifénóis. Compostos fenólicos incluem a classe do flavonoídes, flavonas, taninos, ligninas e lignanas, antraquinonas entre outros (GEORGE *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante dos polifenóis está relacionada com a capacidade de neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes de polifenóis são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura dos compostos fenólicos (SOUSA, 2007).

Segundo Rodrigues (2006), o caroço de açaí apresenta uma grande atividade antioxidante. Nesse estudo, utilizando-se a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, os autores identificaram a, protocatequina, equicatequina, e cinco tipos de protocianidina (Figura 6) (dímero, trímero, tetrâmero e dois diferentes pentâmeros) como sendo o polifenol presente no caroço de açaí, e sabe-se que estas pertencem à classe dos taninos condensados. Também foi realizada a otimização do processo de extração deste polifenol.

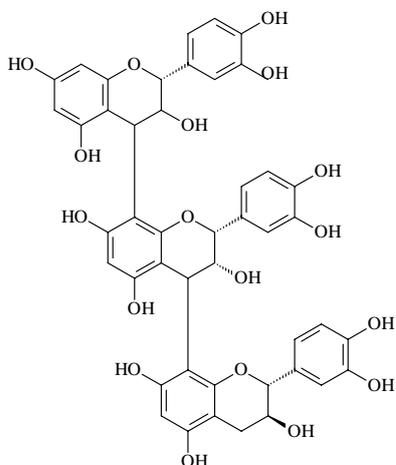


Figura 6. Estrutura da protocianidina.

A aplicação dos taninos destaca-se principalmente na indústria de curtimento do couro, pela capacidade da associação de polifenóis com a proteína colágeno (PANSERA *et al.*, 2003).

#### **2.4. Planejamento experimental e otimização de processos**

A metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, baseadas nos fundamentos estatísticos vêm sendo considerada uma ferramenta poderosa e imprescindível para o desenvolvimento de processos e otimização, formulação de produtos dentro das especificações desejadas ou análise dos efeitos e impactos que alguns fatores podem ter sobre o processo. Esse método é indispensável principalmente quando um grande número de variáveis está envolvido no processo (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Após a determinação das variáveis significativas através de planejamento fatorial uma metodologia de análise de superfícies de respostas pode ser executada para otimização do experimento. Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores. A metodologia

de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (TEOFILO, 2006).

O processo de extração de inulina a partir de raízes de chicória foi estudado por Oliveira (2004). O processo de extração por difusão em água, as variáveis estudadas foram a temperatura e relação massa volume, indicando que as melhores condições pra a extração de inulina de raízes de chicória foi a maior temperatura e menor relação massa: volume.

O processo de extração da polpa de açaí foi otimizado apontando que as condições ótimas para a extração. As variáveis significativas estudadas foram a temperatura, proporção de etanol e concentração de ácido. As condições ótimas para a extração foi encontrada através da superfície de resposta (POMPEU, 2009).

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Métodos**

##### **3.1.1 Moagem do caroço**

As sementes de açaí (*Euterpe Oleracea* Mart) utilizadas foram provenientes da cidade de Belém no estado do Pará. Após a chegada no laboratório foi realizada a limpeza, seguida de secagem dos caroços em estufa a 50 °C. A moagem das sementes foi realizada com auxílio de um moinho de facas e a determinação da granulometria realizada através de peneiras granulométricas. Na extração foram utilizadas do caroço de açaí as partes correspondentes ao endocarpo e pericarpo (semente e fibras).

##### **3.1.2 Extração de polissacarídeos**

Os carboidratos foram obtidos por difusão em água quente. As extrações foram realizadas em um reator encamisado fabricado para esse projeto (Figura 7) de volume 250 mL (5,0 cm de diâmetro). Em todas as extrações o solvente utilizado foi água destilada, uma vez que o produto a ser extraído tem maior utilização na indústria de alimentos, a temperatura mantida através de um banho termostático. A agitação da mistura de caroço de água foi realizada com um agitador mecânico, com impelidor de duas pás inclinadas. A amostra foi filtrada com auxílio de um papel de filtro e sob vácuo. As amostras foram congeladas para posteriores análises. A massa utilizada para as extrações foi de 30 g de caroço moído com granulometria determinada em peneiras granulométricas para cada tipo de experimento.



Figura 7. Reator encamisado com caroço de açai em água destilada

### **3.1.3 Extração do polissacarídeo insolúvel em água**

Os caroços de açai (30 g) foram lavados com água à temperatura ambiente por 3x e uma com água quente por 30 minutos cada lavagem. Da parte insolúvel foi realizada a extração com 150 mL de hidróxido de sódio 2 mol/L por 1 hora e com aquecimento a 100 °C. A amostra foi filtrada e realizada a diálise por 3 dias para a retirada dos sais presentes na amostra.

### **3.1.4 Purificação do extrato**

A purificação do extrato aquoso foi realizada por cromatografia em gel de separação Sephadex LH-20 como fase estacionária, em uma coluna de vidro 1,0 metros x 0,50 mm (Figura 8), água foi utilizada como fase móvel para a fração de carboidratos, os polifenóis com eluição em metanol. As quatro frações foram congeladas e colocadas em um liofilizador para a secagem e depois armazenadas a temperatura ambiente para posteriores análises. A limpeza do sephadex foi realizada com tratamento ácido e seguida de tratamento básico após a eluição dos polifenóis. (OKUDA *et al.*, 1989).



Figura 8. Coluna de separação aberta de Sephadex

### 3.1.5 Análise do efeito do tempo de armazenamento

As amostras de açaí (*Euterpe oleracea*) foram coletadas no dia 11 de novembro de 2008, no estado do Pará, despulpadas 24 horas pós-colheita e as extrações realizadas 2, 8, 15, 60 dias pós-colheita. O armazenamento dos caroços foi realizado em temperatura ambiente, os caroços eram moídos no dia das respectivas extrações. Também foi analisada uma amostra de 1 ano e meio pós-colheita. As condições experimentais foram temperatura a 90°C, rotação de 300 rpm, granulometria 1 mm e relação massa: volume 1:5 g/mL. A quantificação dos carboidratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração.

### 3.1.6 Estudo cinético da transferência de massa

Para a determinação do melhor tempo necessário para a extração de uma maior quantidade de polissacarídeo realizou-se o estudo cinético. As extrações foram realizadas conforme descrito em 3.1.1. As condições experimentais foram: temperatura da água 80 °C, agitação de 450 rpm, relação massa: volume de 1:5 e granulometria do caroço de 1 mm. A variável tempo foi acompanhada nos intervalos de 15; 30; 60 e 90 min.

### 3.1.7 Planejamento experimental para análise das variáveis

Foi realizado um planejamento dos ensaios de extração de acordo com a metodologia de planejamento estatístico experimental (BARROS NETO *et al.*, 2001). Para verificar o efeito das seguintes variáveis independentes no processo de extração: temperatura, relação entre a massa do caroço e o volume de solvente, rotação do impelidor e granulometria do caroço. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com 3 repetições no ponto central, totalizando 19 experimentos. A análise dos efeitos foi realizada utilizando o *software* Statistica 7.0. Na tabela 3 está descrita às condições experimentais utilizadas no planejamento.

Tabela 3: As condições experimentais do planejamento experimental para a extração de polissacarídeos do caroço de açaí

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	70	80	90
Relação m: v (g/mL)	1:3	1:5	1:7
Rotação (RPM)	150	300	450
Granulometria (mm)	0,5	1	1,4

Os experimentos codificados utilizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Condições experimentais codificadas para a extração de polissacarídeos do caroço de açaí.

Ensaio	Temperatura (°C)	Relação m: v (g /mL)	Rotação (rpm)	Granulometria (mm)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

### 3.1.8 Otimização do processo de extração

Para a otimização do processo de extração e construção da superfície de resposta foram adicionados pontos axiais (-2 e +2) ao planejamento experimental demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5: Condições experimentais para a otimização do processo de extração de polissacarídeos.

Variáveis	-2	-1	0	+1	2
Temperatura (°C)	60	70	80	90	100
Relação m: v (g/mL)	1:1	1:3	1:5	1:7	1:9
Rotação (rpm)	45	150	300	450	600
Granulometria (mm)	0.1	0,5	1	1,4	2

Foram adicionados mais 8 ensaios ao planejamento experimental para a realização do planejamento composto central.

## **3.2 Metodologia analítica**

### **3.2.1 Quantificação de carboidratos por CLAE**

A identificação e quantificação dos polissacarídeos foram feitas por CLAE de acordo com o método AOAC usado para identificar e quantificar inulina presente em alimentos complexos (QUEMENER *et al.*, 1994).

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Varian com detector de índice de refração Varian e injetor manual. As condições experimentais utilizadas foram: fase móvel água deionizada, coluna HPX 87C (300 mm x 7,8 mm), vazão 0,6 mL/min, temperatura do forno para a coluna 75 °C e do detector 40 °C, injeção de 20 µL de amostra, tempo de corrida de 15 min. O padrão utilizado foi inulina (obtida de raízes de chicória, marca Sigma) nas concentrações 5, 4, 3, 2 e 1g/L.

### **3.2.2 Quantificação de açúcares totais**

O método empregado foi fenol sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Esse método quantifica todos os açúcares presentes na amostra. Em um tubo de ensaio adicionar 500 µL de amostra, 500 µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado em seguida agitados com auxílio de um vortex e colocadas para reagir em temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura é realizada com um espectrofotômetro na região do visível em 490nm. O espectrofotômetro utilizado foi Shimadzu UV.

### **3.2.3 Hidrólise enzimática da inulina**

A enzima inulinase utilizada foi produzida por *Aspergillus niger* da marca Sigma. Realizou-se a hidrólise na temperatura 50 °C durante 2 horas em tampão fosfato pH 5, foram adicionados 100 µL de inulinase em 30 mL de solução contendo

a amostra em concentração de 3 g/L. A hidrólise foi realizada para o padrão de inulina e para a amostra nas mesmas condições. A hidrólise foi realizada conforme descrito por RICA *et al.* (2009).

### **3.2.3 Hidrólise ácida**

A hidrólise ácida da amostra e dos padrões de inulina e manana foram realizadas com ácido sulfúrico 10 mM pH 2, por 30 minutos a 80 °C em banho Maria seguida de resfriamento banho de gelo (GRZYBOWSKI, 2008).

### **3.2.4 Quantificação de polifenóis**

O método utilizado foi o Folin-Ciocalteu, a mistura de ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxidos de tungstíco e molibdeno de cor azul. Esta reação ocorre em meio básico com a adição de carbonato de sódio. A leitura é realizada em 760 nm e o ácido gálico como padrão. Os valores de compostos fenólicos totais são expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 mg de sólidos totais)(KUSKOSKI 2006).

As soluções preparadas são solução de Folin 2/10, solução carbonato de sódio 75g/L e solução padrão de ácido gálico foram preparada nas seguintes concentrações: 25 , 20, 15, 10 e 5 mg. As medidas foram realizadas adicionando em um tubo de ensaio 500µL de água (branco), ácido gálico (padrão) ou amostra diluída; 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, a amostra foi deixada em repouso durante 2 minutos a temperatura ambiente em seguida foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio, agitado com um vortex e novamente foi deixado em repouso durante 15 minutos em um banho de água a 50 °C; as amostras foram rapidamente resfriadas em um banho de gelo; as leituras da absorbância foram realizadas em 760 m e todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores de fenólicos totais são expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 mg de sólidos totais) (ALBARICI *et al.*, 2009; GEORGE *et al.*, 2005).

### **3.2.5 Espectrometria de infravermelho**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Perkin-Elmer, modelo 1600 com transformada de Fourier de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ . A amostra foi preparada com pastilhas de KBr.

### **3.2.6 Ressonância Magnética Nuclear H e $^{13}\text{C}$**

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em um aparelho BRUKER DRX-500, com ressonância de  $^{13}\text{C}$ , de 500 MHz, em probe de diâmetro 5 mm com amostras solubilizadas em água deuterada, a temperatura ambiente.

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### ***4.1. Extração e quantificação dos polissacarídeos solúveis***

O extrato aquoso foi obtido a partir do caroço de açaí por difusão em água quente (80°C), a temperatura deve ser alta, pois a inulina possui uma maior solubilidade com o aumento da temperatura (SILVA, 1996). O uso de temperaturas elevadas também possui como vantagem a inativação das enzimas presentes nos alimentos, que podem interferir em processos posteriores. Além disso, o uso de altas temperaturas no processo de extração resulta em menores quantidades de compostos nitrogenados no produto final (TONELI, 2006).

##### **4.1.1 Quantificação e identificação por HPLC**

A identificação do polissacarídeo solúvel presente no caroço de açaí foi obtida através da comparação dos cromatogramas das amostras com padrões de inulina e manana. Esses padrões foram selecionados de acordo com trabalhos publicados na literatura indicando a presença de inulina (PAULA, 1975) ou manana no caroço de açaí. (MENEZES, 2004). A literatura relata a presença de manana como constituinte celular da maior parte de palmeiras estudadas, a inulina é um carboidrato de reserva que apesar de encontrado dados na literatura como estando presente no caroço de açaí, não há relatos de sua presença em nenhuma semente de palmeiras.

A identificação dos compostos presentes no extrato aquoso foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de índice de refração. Foi realizada a comparação do tempo de retenção dos dois picos intensos que aparecem no cromatograma do extrato aquoso obtido do caroço de açaí (Figura 9) com padrão de inulina (Figura 10). O padrão estava na concentração de 5 g/L.

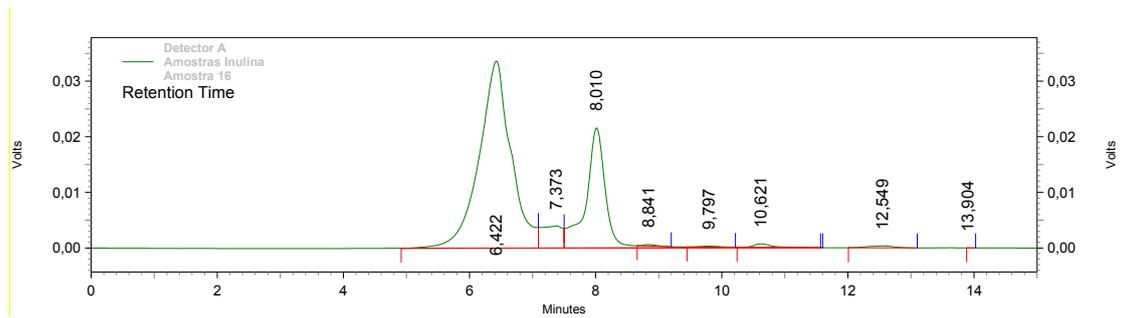


Figura 9. Cromatograma do extrato aquoso obtido do caroço de açai.

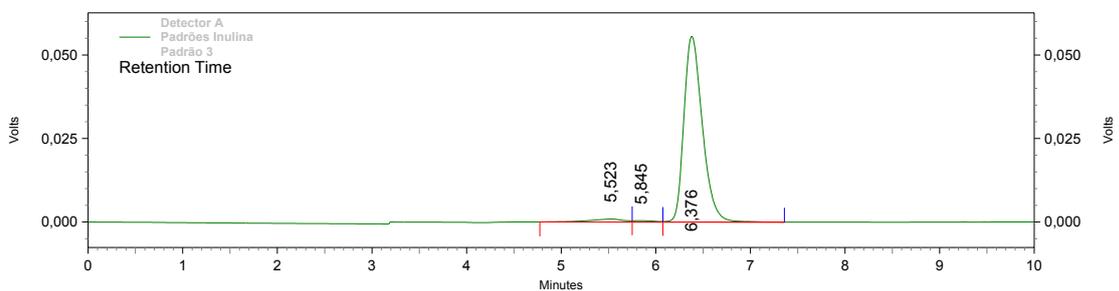


Figura 10. Cromatograma do padrão de inulina

No cromatograma da Figura 9 o pico com tempo de retenção em 6,422 minutos apresenta o tempo de retenção próximo da inulina, o pico observado com tempo de retenção 8,010 minutos foi comparado com o padrão de sacarose e apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão (Figura 11).

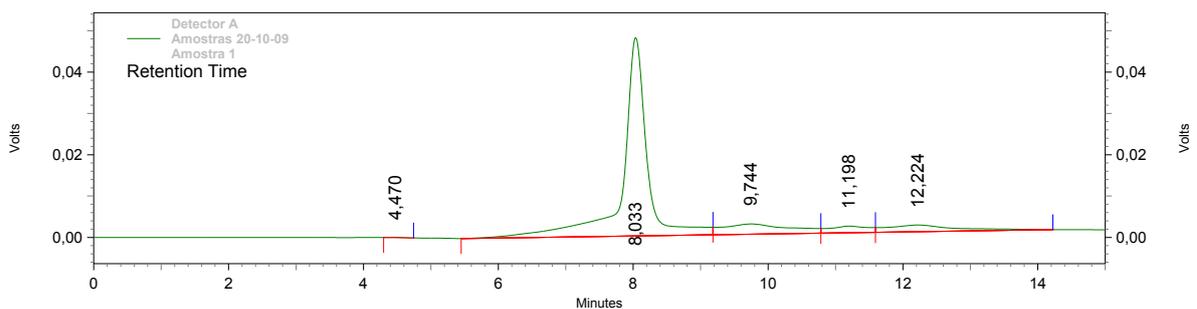


Figura 11. Cromatograma do padrão de sacarose

A diferença entre o tempo de retenção do padrão de inulina e da amostra de caroço de açai (6,376 e 6,442 minutos respectivamente) pode ser devido à diferença no grau de polimerização do padrão de inulina (aproximadamente 23)

em comparação com o polissacarídeo encontrado na amostra ou uma mistura de polissacarídeos.

A quantificação do pico presente na amostra do extrato aquoso de caroço de açaí, que apresenta o mesmo tempo de retenção da inulina, foi realizada através da curva de calibração construída com padrão. A quantificação apresentou um teor de  $(4.85 \pm 0,11)$  % por grama de caroço para o mesmo lote de caroço de açaí realizadas nas condições experimentais de temperatura 80 °C, rotação de 300 rpm, relação massa/volume de 1:5 e granulometria de 1mm.

O teor de polissacarídeos encontrados na quantificação do extrato aquoso do caroço de açaí apresentou uma concentração maior que o valor citado por Alencar (2007), segundo o autor a concentração de inulina no caroço de açaí seria de 0,6%.

#### **4.1.2 Quantificação de açúcares totais**

Foi realizada a quantificação de açúcares total no extrato aquoso de caroço de açaí pelo método fenol sulfúrico. A quantificação pelo método colorimétrico apresentou uma concentração de  $(5,95 \pm 0,18)$  % de açúcares totais por grama de caroço no extrato aquoso de açaí. A quantificação pelo método apresentou valores bem próximo comparados com aqueles quantificados por HPLC que apresentou um teor de  $(4.85 \pm 0,11)$  % por grama de caroço para o mesmo lote de caroço de açaí.

#### **4.1.3 Hidrólise Enzimática**

A hidrólise enzimática foi realizada como uma metodologia de identificação do pico de retenção próximo ao da inulina, complementar ao HPLC uma vez que o índice de refração não é um detector universal, ou seja, não é possível identificar compostos com o mesmo tempo de retenção. A inulinase é uma enzima específica para ligações  $\beta$  (1→2), característica da inulina. A banda larga identificada no cromatograma da amostra de caroço de açaí com tempo de retenção próximo ao do padrão de inulina (Figura 12) sugeriu a presença ou de mistura de inulina em

diferentes graus de polimerização ou de uma mistura de polissacarídeos. A amostra submetida à hidrólise foi extraída nas seguintes condições: temperatura 80 °C, relação massa: volume 1:5, granulometria 1 mm e rotação do impelidor de 300 rpm (Figura 13).

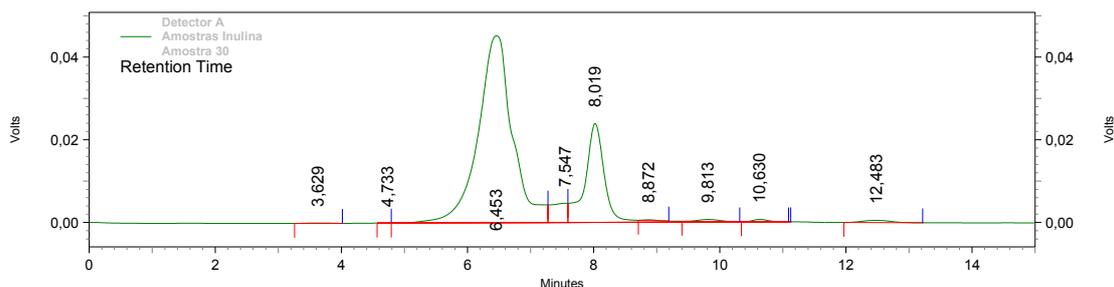


Figura 12. Cromatograma da amostra do extrato aquoso obtido do caroço de açai.

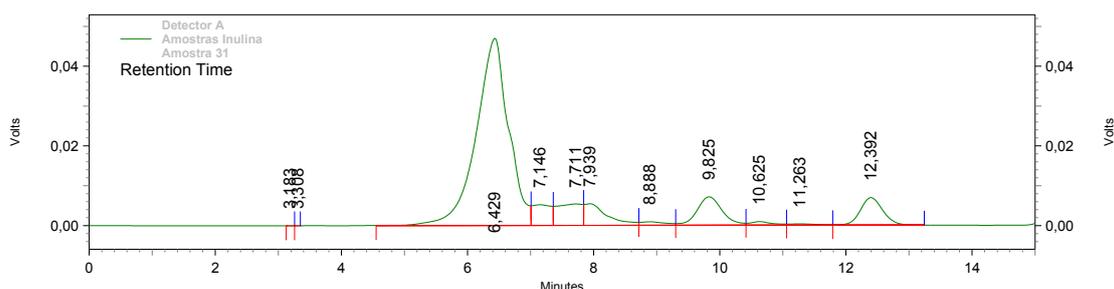


Figura 13. Cromatograma da amostra de extrato obtido do caroço de açai após hidrólise enzimática.

No cromatograma da Figura 13, o pico que apresenta o mesmo tempo de retenção do padrão de inulina em 6,429 minutos não sofreu hidrólise com a adição da enzima inulinase (Figura 13). O carboidrato que sofreu hidrólise pela ação da enzima foi sacarose, que possui uma frutose e uma glicose em sua estrutura e pode ser confirmada pelo padrão de sacarose com tempo de retenção de 8.033 min. Os picos com tempo de retenção em 9.825 min e 12.392 min são correspondentes a moléculas glicose e frutose respectivamente, identificadas através da comparação do tempo de retenção da amostra com o padrão de glicose e frutose. Uma amostra de galactomanana foi analisada em HPLC apresentou o mesmo tempo de retenção da inulina.

#### 4.1.4 Hidrólise Ácida

Para a identificação dos possíveis polissacarídeos presentes no caroço de açaí foi realizada a hidrólise ácida para o padrão de manana e para a amostra. A hidrólise ácida foi realizada para as amostras de padrão de inulina (Figura 14), padrão de manana (Figura 15) e para o extrato aquoso obtido do caroço de açaí (Figura 16). Todas as hidrólises foram realizadas nas mesmas condições.

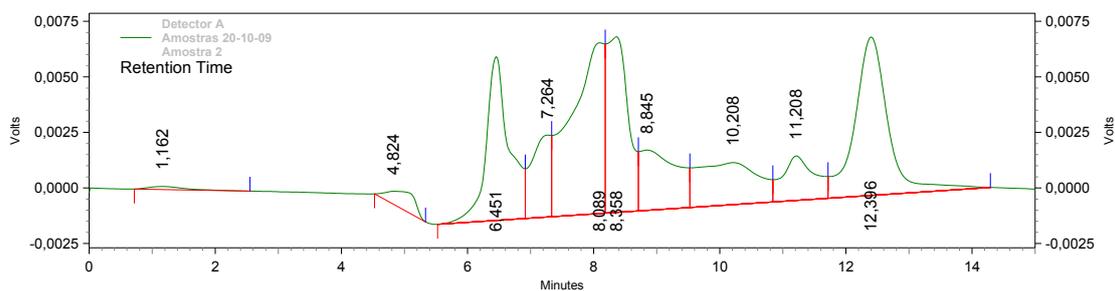


Figura 14. Cromatograma do padrão de inulina após realizada a hidrólise ácida

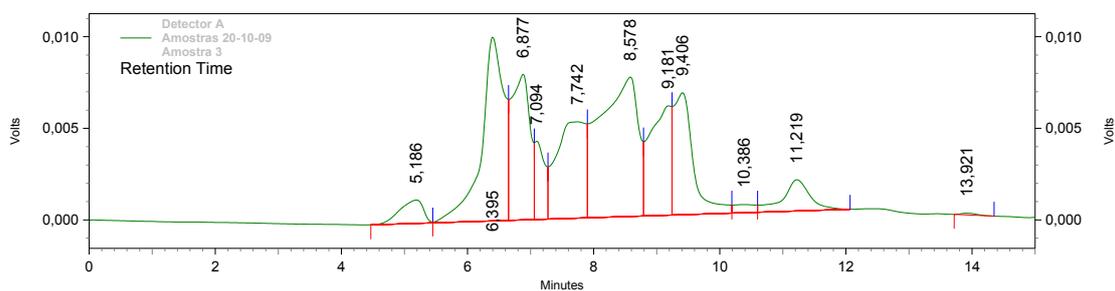


Figura 15. Cromatograma do padrão de manana após realizada hidrólise ácida

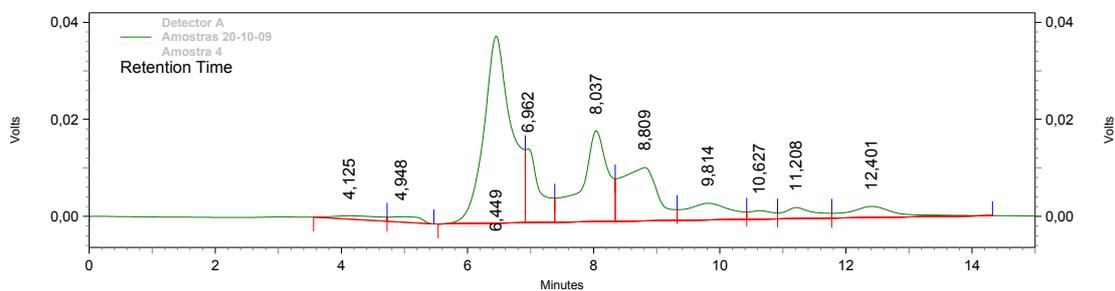


Figura 16. Cromatograma do extrato aquoso de caroço de açaí depois de realizada a hidrólise ácida.

Apesar da baixa resolução dos picos dos cromatogramas possivelmente pela presença de intermediários e do ácido utilizado pode-se observar que apenas o padrão de inulina sofreu hidrólise. Pela análise dos demais cromatogramas não foi possível fazer a identificação estrutural do polissacarídeo presente no caroço de açaí. Através da análise de hidrólise enzimática e hidrólise ácida foi possível determinar que na extração aquosa do caroço de açaí não foi encontrado o polissacarídeo inulina.

#### **4.2 Purificação do extrato aquoso**

Os polissacarídeos possuem uma forte interação com os polifenóis presente no caroço de açaí o que dificulta a purificação. O método de purificação utilizado foi por gel de separação Sephadex LH-20 como fase estacionária e fase móvel água ou metanol (OKUDA, 1989).

A fase estacionária Sephadex é um gel de separação por exclusão de tamanho, dessa forma os carboidratos maiores são fracionados primeiramente, seguidos por sacarose e polifenóis. O fracionamento na coluna de Sephadex do extrato aquoso produziu três frações (Figura 17) com água destilada e uma fração fracionada com metanol, que foram posteriormente liofilizadas e reservadas para análises futuras de RMN e IV.

O método de separação a separação dos compostos por abaixamento da temperatura também foi realizada. O abaixamento da temperatura do extrato aquoso foi realizado conforme descrito por Toneli (2006) resfriando a amostra lentamente, com a temperatura variando de 16 até - 8 °C em um intervalo de 0,1°C por hora. Esse processo de congelamento foi realizado em um hidroconservador de imersão em água e propileno glicol desenvolvido pelo Laboratório de Inovação em pós-colheita da Embrapa Instrumentação Agropecuária (LASSO 2003). No entanto, este método não conseguiu separar adequadamente o polissacarídeo dos polifenóis presentes na amostra.

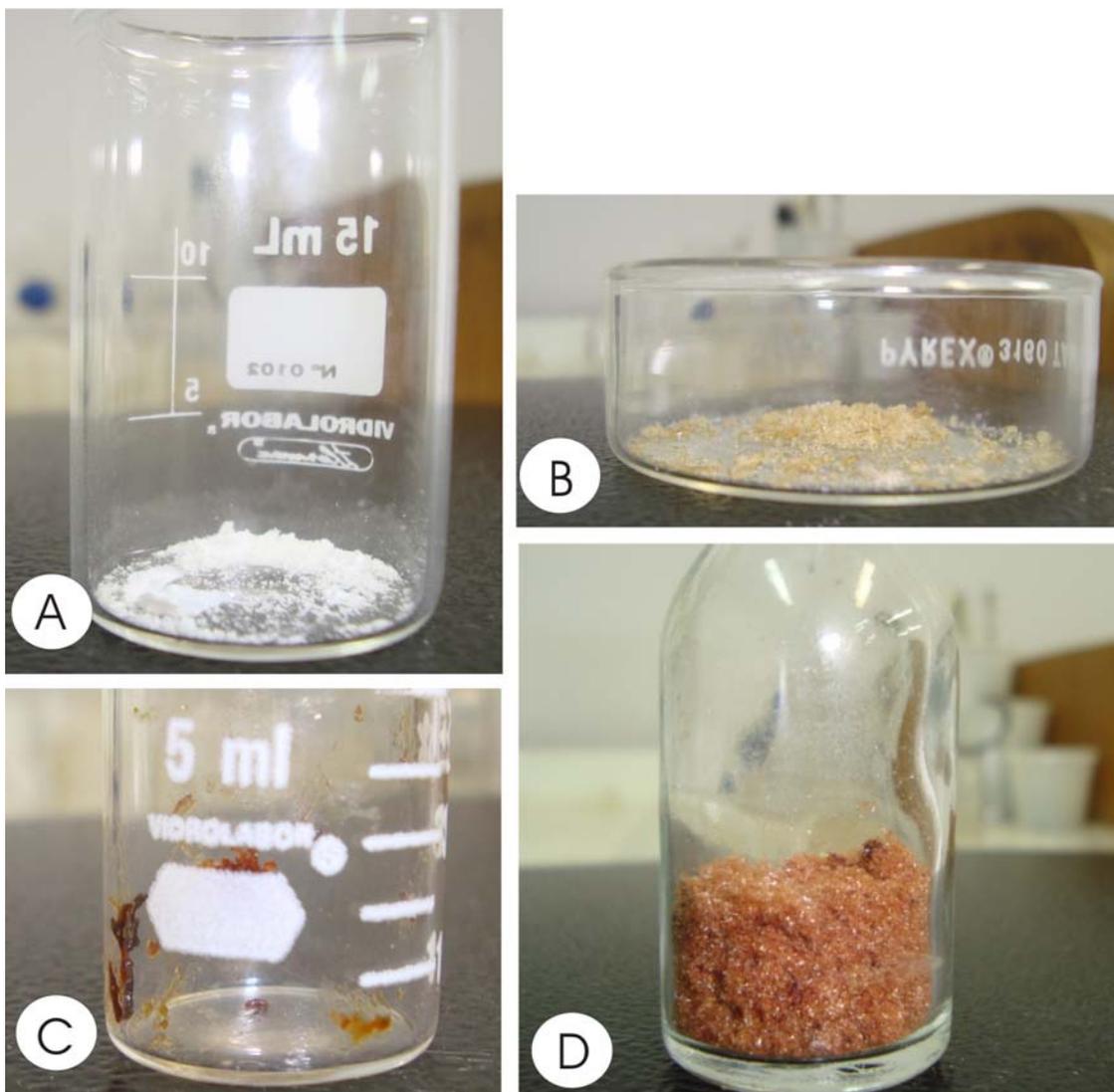


Figura 17. Amostras obtidas pelo processo de purificação por cromatografia líquida em gel Sephadex do extrato aquoso do caroço de açai. Frações (a), (b) e (c) de carboidratos acordo com o fracionamento na coluna e (d) fração de polifenóis obtidas do extrato aquoso do caroço de açai.

### **4.3 Análise do Efeito do Tempo de Armazenamento**

O estudo do efeito do tempo de armazenamento sobre a concentração do polissacarídeo encontrado no caroço de açai é importante para o melhor rendimento da extração, podendo determinar se o caroço pode ser armazenado após a colheita ou se a extração deve ser realizada em uma faixa de tempo pós-

colheita. Na tabela 6 está a quantificação do polissacarídeo extraído do caroço de açaí em função do tempo pós-colheita do caroço.

Tabela 6: Quantificação do extrato de polissacarídeo

<b>Amostra</b>	<b>Dia</b>	<b>% no caroço</b>
1	2 <sup>o</sup> dia	1,789
2	8 <sup>o</sup> dia	2,156
3	15 <sup>o</sup> dia	2,929
4	2 meses	2,946
5	1 ano e meio	3,181

A partir dos dados da Tabela 6 podemos verificar que a concentração total de polissacarídeo variou em média 1% entre o segundo dia pós-colheita e o após 15 dias pós-colheita e pode-se concluir que o metabolismo que ocorre caroço de açaí não é interrompido com o despulpamento do fruto. Ocorrendo possivelmente polimerização das moléculas presentes (LEONEL, 2006).

A extração da amostra 5 não foi comparada diretamente com as demais extrações uma vez que a amostra utilizada não é do mesmo lote das demais. O tempo de coleta, tempo e condições de armazenamento influenciam o perfil de açúcares presentes no fruto (LEONEL, 2006).

#### ***4.4 Extração e quantificação dos polissacarídeos insolúveis***

Foi realizada a extração de polissacarídeos insolúveis com solução de hidróxido de sódio 2 mol/L com temperatura de 90° C, seguida do processo de separação por diálise. A amostra apresentou um teor de 15 % de polissacarídeos insolúveis em água por grama de caroço de açaí (Figura 18). Essa extração foi realizada para verificar a relação estrutural entre os polissacarídeos solúveis e insolúveis.

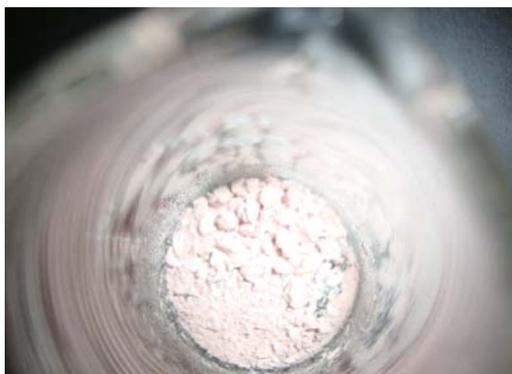


Figura 18. Polissacarídeos insolúveis extraídos em solução alcalina do caroço de açaí.

Rao & Mukherjee (1962), verificaram que a concentração de galactomanana em sementes de palmeira (*Borassus flabelifer*) pode variar durante seu amadurecimento; neste trabalho o autor observou que em frutos verdes predomina a formação de galactomanana enquanto a parede celular não está completamente formada. Em frutos maduro predomina o aparecimento de mananas formando a parede celular rígida. Ribeiro (2010), que observou que nos primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos de *E. oleracea* o endosperma das paredes celulares é pouco celularizado e com aspecto leitoso, tornando-se rígido quando atinge seu ponto de maturação.

#### **4.5 Espectrometria no infravermelho**

Existem ligações ao longo da cadeia de polissacarídeos que podem ser observadas, de forma qualitativa, por espectrometria no infravermelho, pois indicam possíveis estiramentos e deformações da molécula em estudo. Assim as frações purificadas por coluna em separação em gel de Sephadex e os polissacarídeos obtidos por extração com solução básica foram analisadas. O espectro representado na Figura 19 corresponde ao polissacarídeo extraído com solução básica.

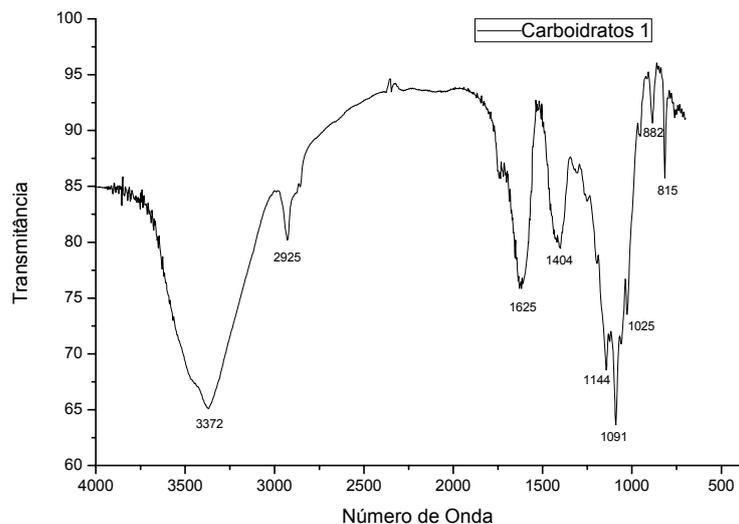


Figura 19. Espectro na região do infravermelho de polissacarídeos extraídos com solução básica a partir do caroço de açaí.

O espectro representado na Figura 20 é referente à primeira fração retirada da coluna de Sephadex da purificação da extração aquosa. Os espectros apresentam absorções muito similares.

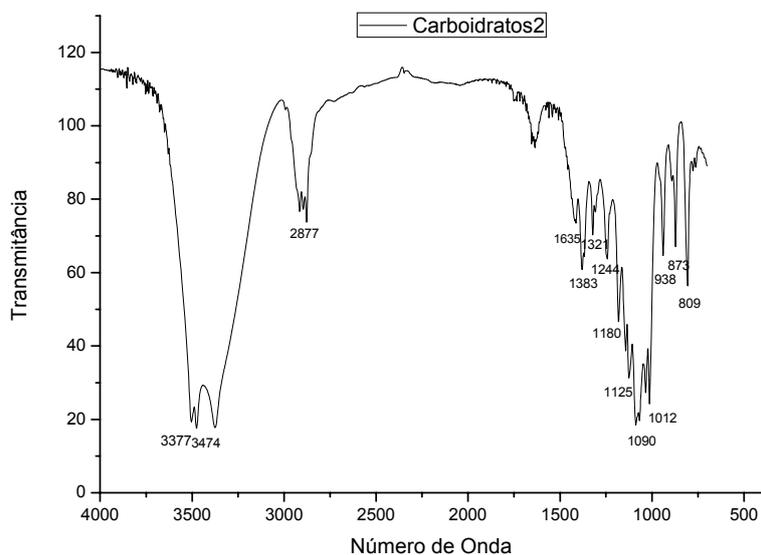


Figura 20. Espectro na região do infravermelho da fração 1 obtida da purificação por sephadex do extrato aquoso do caroço de açaí

O espectro de infravermelho para as duas amostras apresentam bandas na região entre 1200 e 900  $\text{cm}^{-1}$  características de ligação C-O-C de carboidratos, confirmando a ligação entre os monômeros formadores de polissacarídeos. As absorções na região em 1241 e 1238  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao grupo C-O-C em anéis de 5 carbonos (pentoses), enquanto que a faixa 1160 e 1050  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos grupos C-O-C de hexoses que foram observadas nos três espectros referentes a polissacarídeos. Em 1029  $\text{cm}^{-1}$  observou-se a deformação angular da ligação C-O de álcoois. A banda na faixa de 1060 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada com o estiramento de ligações C-O e vibração do anel.

Em 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  observa-se a banda da ligação O-H existente nas estruturas dos polissacarídeos e também a banda em 1029  $\text{cm}^{-1}$  onde se observa a deformação angular da ligação C-O de álcoois, comum na estrutura das três amostras. O estiramento assimétrico do grupamento  $\text{CH}_2$  é observado em 2900 a 2950  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Segundo Shingel (2002) o pico encontrado na região de 1090  $\text{cm}^{-1}$  representa o carbono anomérico. A faixa de 1200 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  é considerada como deformação de CH e  $\text{CH}_2$ . A banda de absorção em 1625  $\text{cm}^{-1}$  sugere a presença de proteínas na amostra ocorrendo possivelmente uma associação entre carboidratos e proteínas (LIMA, 2009).

Figueiro *et al.* (2004) mostram bandas de absorção em 812 e 871  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de unidades de configuração  $\alpha$  e unidades de configuração  $\beta$  respectivamente.

Pode-se concluir, com as análises de infravermelho, que os espectros representam polissacarídeos, a amostra do extrato aquoso do caroço de açaí e a amostra de obtida por extração básica apresentam em sua estrutura ligações com configuração  $\alpha$  e  $\beta$ . Por essa análise podemos dizer que o polissacarídeo encontrado no caroço de açaí deve possuir em sua estrutura uma cadeia com monômeros ligados em configuração  $\alpha$  e  $\beta$ . Pelas análises podemos verificar que não foi encontrada a molécula de inulina, pois esta apresenta apenas ligações do tipo  $\beta$ . a molécula de galactomanana é caracterizada por ligações do tipo  $\alpha$  e  $\beta$ .

O espectro da Figura 21 é referente à fração 2, obtida da coluna de purificação. No espectro da Figura 21 é possível identificar 5 bandas de absorção em 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , observa-se a banda da ligação O-H existente nas estruturas dos polissacarídeos. O estiramento assimétrico do grupamento  $\text{CH}_2$  é observado em 2931  $\text{cm}^{-1}$ . A banda na faixa de 1060 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada com o estiramento de ligações C-O e vibração do anel. Em 1425  $\text{cm}^{-1}$  ocorre a deformação angular do  $\text{CH}_2$ . A banda em 1625  $\text{cm}^{-1}$  pode indicar a presença de proteínas na amostra.

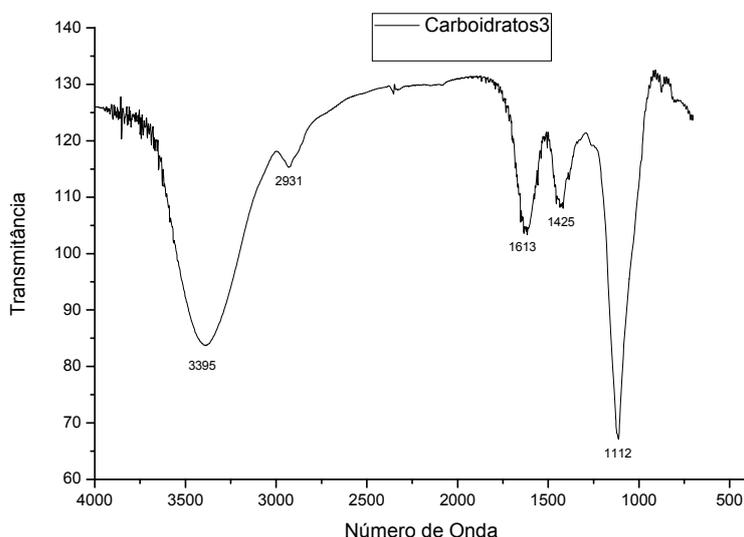


Figura 21. Espectro da região no infravermelho da fração 2 do extrato aquoso do caroço de açaí.

O espectro apresentado na Figura 22 representa a fração 3 da purificação em coluna de Sephadex. Essa amostra apresentou uma coloração avermelhada indicando a presença de polifenóis.

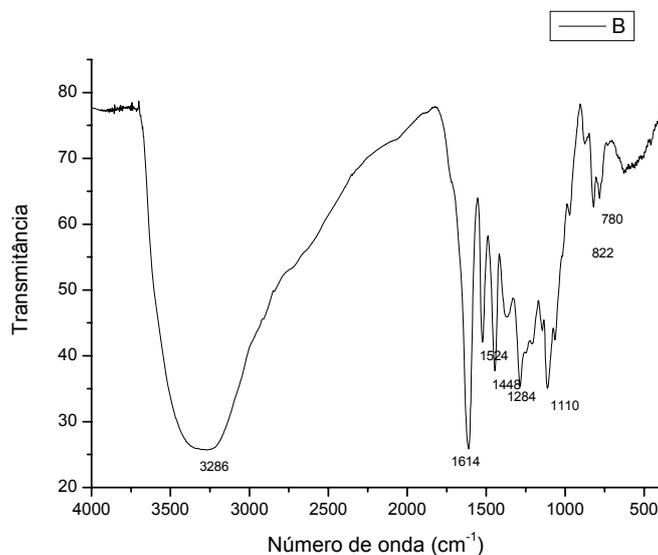


Figura 22. Espectro da região do infravermelho da fração 2 purificada do extrato aquoso do caroço de açai.

O sinal em  $780\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao estiramento de C-H em anéis aromáticos da natureza fenólica. A banda de absorção em  $1285\text{ cm}^{-1}$  pode ser associada a grupo C-O característica de protocianidina. (ENDELMANN e LENDI, 2002). A banda de absorção em  $3200\text{ cm}^{-1}$  apresenta a deformação axial O-H das ligações de hidrogênio, as bandas na região de  $1614$  e  $1524\text{ cm}^{-1}$  são referente a deformação axial da do anel aromático. A região em  $1284\text{ cm}^{-1}$  é a deformação axial C-O. Na região de  $1100\text{ cm}^{-1}$  está representada a deformação angular de C-O, e absorção em  $822\text{ cm}^{-1}$  é equivalente a banda do C-H fora do plano, relativa a substituição do anel aromático.

#### **4.6 Ressonância magnética nuclear**

A ressonância magnética nuclear é uma das técnicas mais utilizadas para a identificação de carboidratos. Os espectros de RMN de hidrogênio e de carbono  $^{13}$  foram realizados apenas para a fração 1 da purificação do extrato aquoso de caroço de açai, este espectro demonstrou que é uma mistura complexa e foi comparada a espectros de polissacarídeos encontrados na literatura.

#### 4.6.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os deslocamentos químicos para os polissacarídeos mais encontrados em sementes de diversas plantas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Atribuições para os sinais do espectro de RMN H encontrado na literatura

Polissacarídeo	H1	H2	H3	H4	H5	H6
D-galactopiranosil	5,4	3,6	3,92	3,99	3,87	4,07
D- manopiransil	5,1	4,18	3,78	3,85	3,54	3,94
Manana $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3	5,2	4,10	3,87			
Manana $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2	5,2	4,1	3,87			

O espectro de RMN H foi obtido para a fração 1 da amostra purificada do extrato aquoso do caroço de açaí (Figura 23).

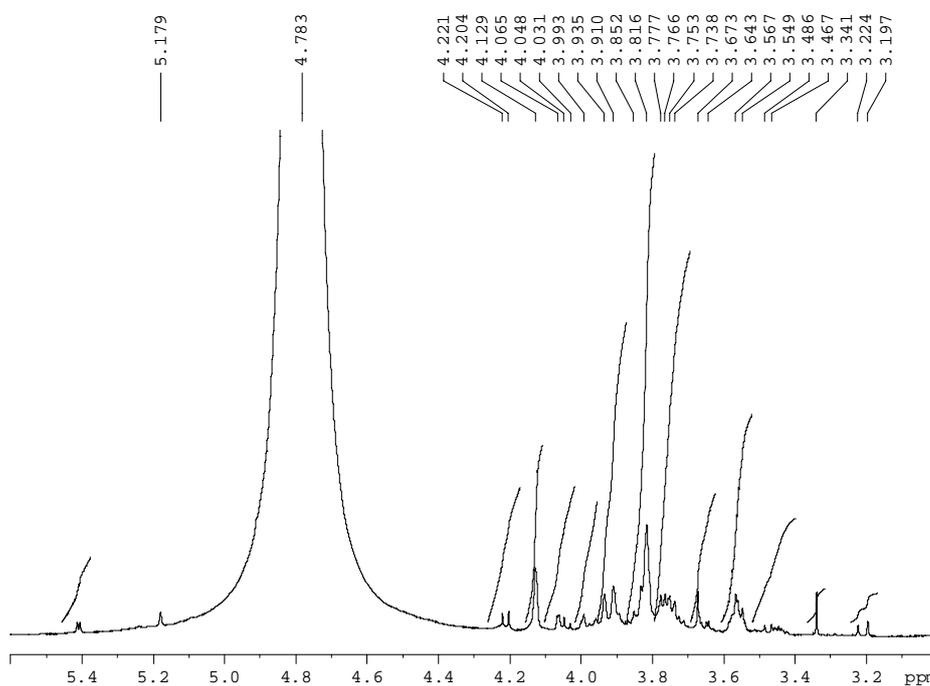


Figura 23. Espectro de RMN de H para o extrato aquoso de caroço de açaí.

Lima (2009) relacionou os sinais em  $\delta$  5.4 e 5.1 a uma D-galactose e a uma D-manose respectivamente.

Segundo Fischer (2002) os sinais em  $\delta$  2,226 corresponde a uma  $\beta$  galactose e o sinal  $\delta$  5,274 corresponde a uma  $\alpha$  manana.

Segundo Lizicarova (2007) os sinais no espectro de hidrogênio característicos de uma configuração  $\beta$ -manana  $\delta$  4,75 a 4,92, enquanto que os sinais em  $\delta$  5,38-4,90 são característicos de uma configuração  $\alpha$ -manana.

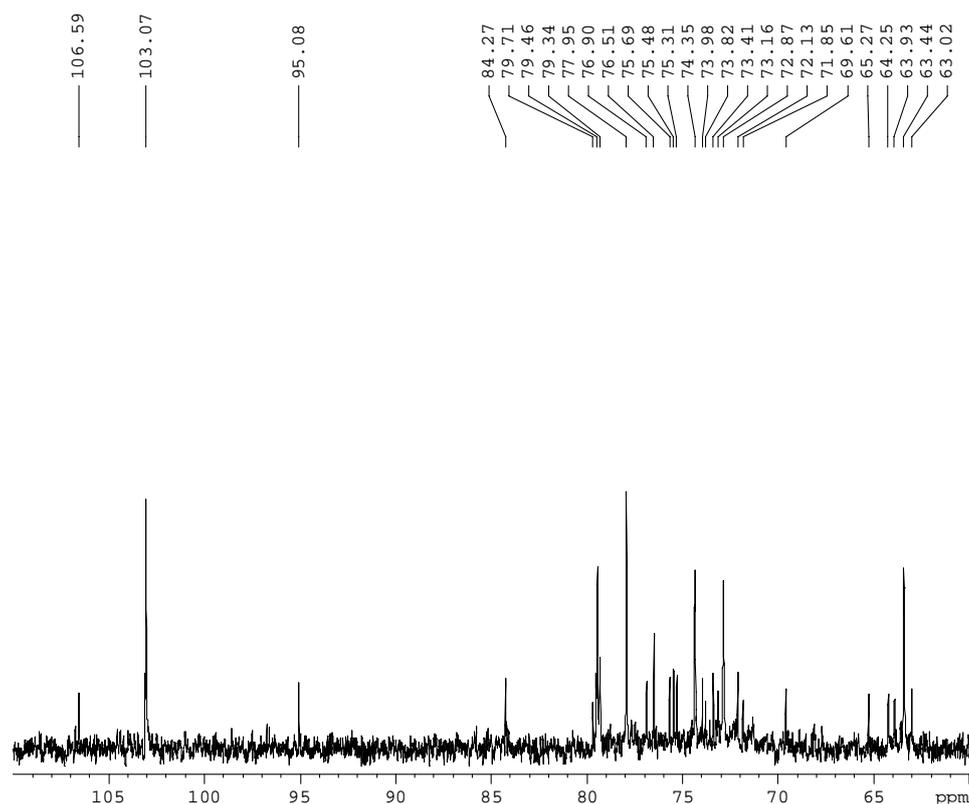
#### 4.6.2 Ressonância magnética nuclear de Carbono-13

Para a interpretação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de polissacarídeos pode ser analisada a região do carbono anomérico ( $\delta$  110 -90). Os deslocamentos químicos para os polissacarídeos mais encontrados em sementes de diversas plantas estão listados na Tabela 8.

Tabela 8 Atribuição dos sinais de RMN -  $^{13}\text{C}$  para polissacarídeos encontrados na literatura

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Ref
Inulina $\beta$ (2 $\rightarrow$ 1)	92,2	71,8	73,2	70,3	72,8	61,6	Grybowski, 2008
B – Mann (1 $\rightarrow$ 4) <i>C. juncea</i>	100,1	70,0	71,5	76,3	75,0	60,5	Bento, 2008
$\beta$ - Man (1 $\rightarrow$ 4) <i>S. virgata</i>	100,2	70,1	71,6	76,5	75,0	60,6	Bento, 2008
Manana $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)	103,8/ 94,4	80,6	79,8				Gorin, 1973
Manana $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)	102,94	70,98					Kobayashi 1995
Manana $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)	99,20	79,20					Lizicarova, 2007.
Manana $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)	101,8	71,6	73,0	78,1	76,5	62,0	Petkowicz, 2001
Manana $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)	103,1						Lizicarova, 2007.
$\beta$ - D-gal (1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ man	106,6			68	71,9	63.8	Tischer 2002

O espectro da amostra de polissacarídeo podemos identificar 3 carbonos na região anomérica. Os deslocamentos químicos para inulina (Tabela 8) observados por GRZYBOWSKI (2008) não foram encontrados no espectro (Figura 24) da amostra de extrato aquoso do caroço de açaí



**Figura 24.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a amostra purificada do extrato aquoso obtido do caroço de açaí

Os espectros foram comparados com os dados da literatura (GORIN, 1973). O sinal na região anomérica em  $\delta$  106.6 foi atribuído ao C1 das unidades de galactose ligada  $\beta(1\rightarrow6)$  na cadeia de manana ligada  $\alpha(1\rightarrow2)$ , o sinal em  $\delta$  63,44 foi atribuído ao carbono C6 (TISCHER, 1999). Os outros carbonos anoméricos foram atribuídos a manana ligada  $\alpha(1\rightarrow2)$  e  $\alpha(1\rightarrow3)$  em  $\delta$  103,5 (PRADO *et al* 1999) e unidades de manose redutora em  $\delta$  95.5. O sinal em  $\delta$  79,8 indica a presença de C3 substituído com configuração  $\alpha$ , o sinal em  $\delta$  77,95 pode ser

atribuído ao C5 e o sinal em  $\delta$  69,6 foi atribuído ao C6 da manana substituída, o sinal em  $\delta$  79.2 indica a presença de substituições no carbono C2.

Pela análise de RMN foi possível propor que na amostra de polissacarídeo é uma cadeia de manana ligada  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) e  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) com ramificações de galactose no ligadas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6).

Essa configuração de manana ligada  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) não é comum em sementes, sendo encontrada em fungos estudados por Gorin (1973) que utilizou os espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN para caracterizar diferentes espécies de *Saccharomyces* através dos padrões de substituição de manana encontradas na parede celular.

A realização da fração de polissacarídeos extraídos com solução básica não foi realizada devido à baixa solubilidade do composto e a falta de equipamento com temperatura controlada.

#### **4.7 Estudo Cinético da transferência de massa**

O estudo cinético foi realizado para a determinação do tempo necessário para uma maior extração de polissacarídeo. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas para o ponto central do planejamento experimental, temperatura de 80 °C, granulometria 1 mm, relação massa; volume 1:5, e rotação de 300 rpm. Essa análise é fundamental para se evitar desperdício de tempo e energia na extração aquosa do caroço de açaí. O resultado do estudo cinético para a concentração de carboidratos em função do tempo é apresentado na Figura 25.

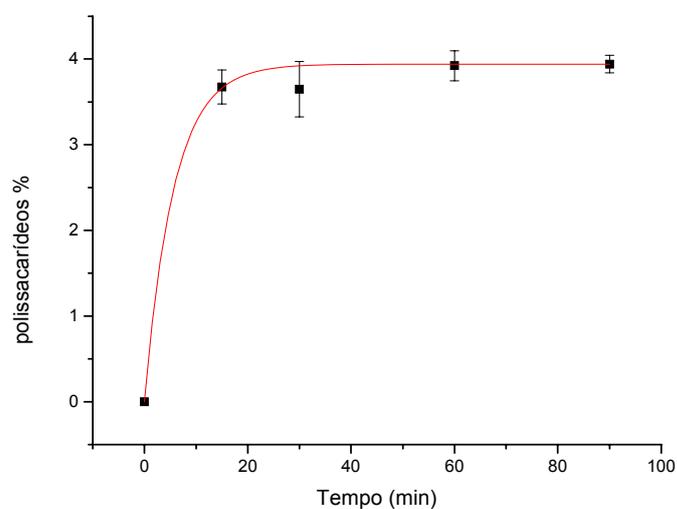


Figura 25: Gráfico da cinética de extração de polissacarídeos solúveis do caroço de açaí em função do tempo de extração.

A análise da variância também foi realizada para verificar se há diferença significativa na extração em função do tempo. De acordo com a tabela de análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 9, os dados encontrados não são significativos a 95% de confiança, ou seja, não há diferença no teor de carboidratos extraído em função do tempo.

Tabela 9: Tabela ANOVA para a quantificação de polissacarídeos do caroço de açaí

Fontes de variação	GL	SQ	QM
tratamentos	3	0,180	0,060
erro	8	0,322	0,040
F =	1,4896		
(p) =	0,2891		

O tempo de extração foi padronizado para 15 minutos em todas as extrações.

#### **4.8 Planejamento experimental para análise das variáveis**

Para a otimização do processo de extração por difusão a quente dos polissacarídeos presentes no caroço de açaí, foram analisadas as variáveis do processo de extração. Essas variáveis foram: temperatura, a relação da massa/volume, a velocidade de agitação e a granulometria do caroço de açaí. Um planejamento fatorial completo  $2^4$  foi realizado totalizando 16 ensaios e 3 repetições no ponto central. As respostas analisadas foram a concentração de polissacarídeos, sacarose e os polifenóis presentes no extrato aquoso. A análise dos efeitos de 4 variáveis foi realizada para um modelo de primeira ordem utilizando o software Statistica 7.0.

#### **4.8.1 Polissacarídeo**

O planejamento experimental utilizado para avaliar a influência da temperatura, granulometria, rotação do impelidor e a relação entre a massa e o volume de solvente na etapa de extração bem como os resultados da concentração de polissacarídeos estão apresentados na Tabela 10.

Através da quantificação realizada concentração de polissacarídeo no caroço variou de 2,75 a 5,10 % de polissacarídeo por grama de caroço. O maior valor encontrado para a concentração de polissacarídeo foi na condição com parâmetros mais altos para a temperatura, rotação e relação massa/volume e menor parâmetro de granulometria. Os valores encontrados para o ponto central ficou acima dos demais valores encontrados para a extração de polissacarídeos.

Tabela 10. Quantificação de polissacarídeos obtidos por extração aquosa do caroço de açaí.

Ensaio	Temperatura (°C)	Relação m: v G/ mL	Rotação (rpm)	Granulometria (mm)	% de polissacarídeo
1	70	1:3	150	0,5	2,92
2	90	1:3	150	0,5	3,38
3	70	1:7	150	0,5	4,50
4	90	1:7	150	0,5	3,50
5	70	1:3	450	0,5	2,75
6	90	1:3	450	0,5	3,26
7	70	1:7	450	0,5	4,40
8	90	1:7	450	0,5	5,10
9	70	1:3	150	1,4	3,37
10	90	1:3	150	1,4	3,52
11	70	1:7	150	1,4	3,05
12	90	1:7	150	1,4	3,33
13	70	1:3	450	1,4	3,10
14	90	1:3	450	1,4	3,77
15	70	1:7	450	1,4	3,10
16	90	1:7	450	1,4	4,24
17	80	1:5	300	1	4,76
18	80	1:5	300	1	4,90
19	80	1:5	300	1	4,99

A partir dos dados de quantificação do polissacarídeo presente no caroço realizou-se um estudo estatístico para a identificação das variáveis significativa no processo de extração de acordo com o modelo matemático utilizando o *software* Statistica 7.0. Os resultados dos cálculos dos efeitos e o p-valor estão apresentados na Tabela 11.

Todos os fatores foram estatisticamente significativos para  $p < 0,05$  (95% de confiança); a temperatura conforme esperado apresentou um efeito positivo na extração, pois a alta temperatura aumenta a difusão do meio de extração e a solubilidade dos polissacarídeos; assim quando maior a temperatura, maior será a extração de polissacarídeos. A rotação também teve um efeito positivo, assim quanto maior agitação, maior será a extração de polissacarídeos. Apenas a granulometria teve um efeito negativo assim com uma menor granulometria melhor é a extração de polissacarídeos do caroço de açaí (Figura 26).

Tabela 11. Cálculo dos efeitos de polissacarídeos do extrato aquoso do caroço de açaí

Variáveis e interações	Efeitos	p-valor
<i>Média</i>	3,7865805	4,9E-05
(1) Temperatura	0,36375	0,02445
(2) Relação massa: volume	0,64375	0,00801
3) Rotação (rpm)	0,26875	0,04349
(4) Granulometria	-0,29125	0,03738
Interação T e M	-0,08375	0,28528
Interação T e R	0,39125	0,02124
Interação T e G	0,19625	0,07723
Interação M e R	0,34625	0,02689
Interação R e G	-0,65375	0,0077
Interação R e G	-0,03375	0,61921

A variável com o maior efeito sobre o processo de extração é a relação de da massa de caroço de açaí em relação ao volume de solvente adicionado (p-valor 0,00801).

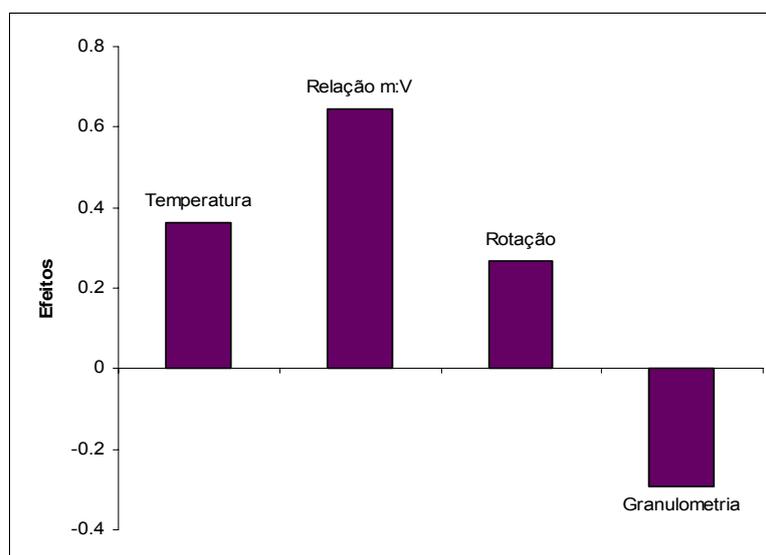


Figura 26. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de polissacarídeos no extrato aquoso de caroço de açaí.

Algumas interações também tiveram efeitos significativos: a temperatura e a rotação, a temperatura e granulometria, a relação massa: volume e a rotação e a relação massa: volume com a granulometria.

O procedimento para verificar a validade destes modelos tem como princípio básico os critérios estatísticos de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o teste F. O coeficiente de determinação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos valores das respostas previstas pelo modelo proposto com a variância da própria população dos pontos experimentais. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de  $R^2$  entre os valores previstos e os valores experimentais, melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas.

O fundamento do teste F consiste em verificar se existe ou não relação entre as variáveis e a resposta. Quando não há relação entre a variável e a resposta, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas MQR e MQr segue uma distribuição F. Portanto, razão entre o  $F_{calc}$  (MQR/MQr) e o  $F_{tab}$  deve ser maior que 1, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada e o modelo é considerado válido (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2002).

Tabela 12. Análise de variância para o modelo linear para a extração de polissacarídeos do extrato aquoso do caroço de açaí

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma de Quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b><math>F_{calc}</math></b>	<b><i>p</i>-valor</b>
Regressão	5,803	10	0,580321	0,9383	0,547
Resíduos	4,948	8	0,618477		
F. Ajuste	4,921	6	0,820201		
Erro Puro	0,027	2	0,013305		
Total	10,75	18			

O valor de F calculado dividido pelo  $F_{tabelado}$  foi de 0,28, o que significa que há evidência de falta de ajuste do modelo. Assim pode-se concluir que o modelo não se ajusta bem aos dados experimentais. O modelo apresentou um  $R^2$  53,98. Esse fato pode ocorrer quando o planejamento está na região de ótimo e podem ser confirmados pelos valores encontrados no ponto central, estes são

maiores que os valores tabelados para a extração de polissacarídeos do caroço de açaí.

#### 4.8.2 Sacarose

Os compostos presentes no extrato aquoso do caroço de açaí foram quantificados, a sacarose é um interferente na extração de polissacarídeo. A menor extração de sacarose no processo auxilia a purificação do polissacarídeo do extrato aquoso. A concentração total de sacarose variou de 0,71% a 2,75 % (Tabela 13). As variáveis significativas para a extração de sacarose foram a granulometria, a temperatura e a velocidade de rotação do impelidor.

Tabela 13. Quantificação de sacarose no planejamento experimental

Ensaio	Temperatura (°C)	Relação m: v (g/ mL)	Rotação (RPM)	Granulometria (mm)	% sacarose
1	70	1:3	150	0,5	1,81
2	90	1:3	150	0,5	1,72
3	70	1:7	150	0,5	1,82
4	90	1:7	150	0,5	1,69
5	70	1:3	450	0,5	1,58
6	90	1:3	450	0,5	1,74
7	70	1:7	450	0,5	1,93
8	90	1:7	450	0,5	2,75
9	70	1:3	150	1,4	1,04
10	90	1:3	150	1,4	1,06
11	70	1:7	150	1,4	0,71
12	90	1:7	150	1,4	0,71
13	70	1:3	450	1,4	1,00
14	90	1:3	450	1,4	1,46
15	70	1:7	450	1,4	0,71
16	90	1:7	450	1,4	1,64
17	80	1:5	300	1	1,81
18	80	1:5	300	1	1,94
19	80	1:5	300	1	1,84

Os efeitos das variáveis foram calculados e as variáveis significativas determinadas de acordo com o p-valor com nível de significância de  $\alpha=0,05$ . Os dados estão na tabela 14.

Tabela 14. Efeitos para a extração de sacarose

<b>Variáveis e interações</b>	<b>Efeitos</b>	<b>p-valor</b>
Média	1,5242105	0,0001
Temperatura	0,27125	0,01538
Relação massa:volume	0,06875	0,18081
rotação	0,28125	0,01433
Granulometria	-0,83875	0,00164
12	0,13375	0,05907
13	0,32125	0,01104
14	0,08125	0,13963
23	0,24375	0,01894
24	-0,26625	0,01595
34	0,04125	0,34926

Na extração de sacarose as variáveis significativas são: a temperatura, rotação, a rotação além das interações, temperatura e rotação do impelidor, relação massa: volume, rotação e relação massa volume e granulometria (Figura 27). Os parâmetros mais altos de temperatura e rotação favorecem a extração enquanto que o parâmetro baixo de granulometria favorece a resposta.

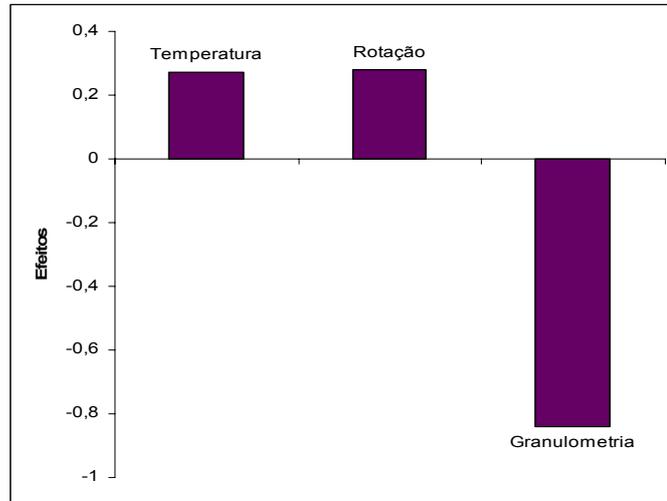


Figura 27. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de sacarose no extrato aquoso de caroço de açaí.

Para a validação do método foi realizado a análise da variância e o teste F(Tabela 15).

Tabela 15. Análise de Variância - Modelo Linear

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F <sub>calc.</sub>	p-valor
Regressão	4,482	10	0,448241	6,4629	0,00719
Resíduos	0,555	8	0,069356		
F. Ajuste	0,546	6	0,090931	19,625	0,04921
Erro Puro	0,009	2	0,004633		
Total	5,037	18			

O valor de F<sub>calc</sub> para falta de ajuste ficou acima do valor de F<sub>tab</sub>, e o R<sup>2</sup> = 0.89 assim o modelo linear é válido para descrever a extração de sacarose obtida do caroço de açaí.

#### 4.8.3 Polifenóis

O estudo das variáveis foi realizado para a determinação de polifenóis presentes no caroço de açaí (Tabela 16). Os polifenóis são interferentes na

extração de polissacarídeos, dessa forma, uma extração menor de polifenóis facilita a extração e purificação de polissacarídeos.

Tabela 16. Quantificação de polifenóis no extrato aquoso de caroço de açaí

Ensaio	Temperatura (°C)	Relação m: v (g/ mL)	Rotação (rpm)	Granulometria (mm)	% de polifenóis
1	70	1:3	150	0,5	1,95
2	90	1:3	150	0,5	1,47
3	70	1:7	150	0,5	2,54
4	90	1:7	150	0,5	1,83
5	70	1:3	450	0,5	1,83
6	90	1:3	450	0,5	1,57
7	70	1:7	450	0,5	2,20
8	90	1:7	450	0,5	1,84
9	70	1:3	150	1,4	2,04
10	90	1:3	150	1,4	1,97
11	70	1:7	150	1,4	2,02
12	90	1:7	150	1,4	2,26
13	70	1:3	450	1,4	2,19
14	90	1:3	450	1,4	1,90
15	70	1:7	450	1,4	2,04
16	90	1:7	450	1,4	1,83
17	80	1:5	300	1	2,55
18	80	1:5	300	1	2,54
19	80	1:5	300	1	2,50

A partir dos valores de polifenóis analisaram-se os efeitos das variáveis no processo de acordo com a tabela 17. A concentração de polifenóis totais variou de 1.47 % a 2.5% dentro do planejamento experimental.

Tabela 17. Cálculo dos efeitos para os polifenóis no extrato aquoso de caroço de açaí.

Variáveis e nterações	Efeitos	p-valor
Média	2,0567	8E-06
Temperatura (1)	-0,21392	0,0035
Relação massa: volume (2)	0,20548	0,0038
Rotação (3)	-0,08228	0,0232
Granulometria (4)	0,127	0,0099
1 x 4	0,05865	0,0442
1 x 3	0,03924	0,0914
1 x 4	0,23839	0,0028
2 x 3	-0,1	0,0159
2 x 4	-0,19114	0,0044
3 x 4	0,00211	0,8838

Para um nível de significância de 95% podemos observar que todas as variáveis são significativas. Dessa forma a extração de polifenóis apresenta um menor rendimento a altas temperaturas devido ao seu efeito negativo; uma menor relação massa de caroço e volume de solvente que apresentou efeito positivo; menor volume de extração e maior granulometria do caroço (Figura 28).

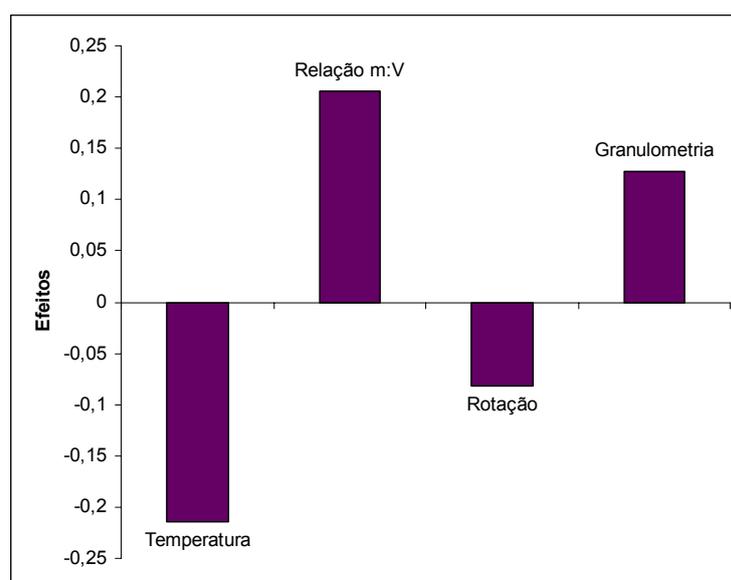


Figura 28. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes na concentração de polifenóis no extrato aquoso de caroço de açaí.

O valor de F calculado para falta de ajuste ficou abaixo do valor de F tabelado (Tabela 18), o que significa que há evidência de falta de ajuste do modelo.

Tabela 18. Teste F para o modelo linear

<b>FV</b>	<b>SQ</b>	<b>nGL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcalc.</b>	<b>p</b>
Regressão	1,005	14	0,071786	0,358	0,932514
Resíduos	0,803	4	0,20063		
F. Ajuste	0,801	2	0,40061	616	0,001621
Erro Puro	0,001	2	0,00065		
Total	1,808	18			

O valor de  $F_{calc}/F_{tab}$  indicou que há evidência de falta de ajuste do modelo. Assim pode-se concluir que o modelo não se ajusta bem aos dados experimentais. Esse fato pode ocorrer quando o planejamento está na região de ótimo e podem ser confirmados pelos valores encontrados no ponto central que possuem concentração maior no planejamento experimental.

#### **4.9 Otimização**

A otimização do processo de extração de polissacarídeos do caroço de açaí por difusão em água quente foi realizada utilizando os dados encontrados para as variáveis do sistema analisadas anteriormente, todas as variáveis do sistema de extração foram significativas para o processo de extração. As variáveis, temperatura, relação massa: volume, rotação e granulometria. Ao planejamento estudado anteriormente foram adicionados pontos axiais, gerando modelos quadráticos, permitindo o conhecimento sobre a curvatura da superfície de resposta. Planejamento fatorial  $2^4$ , adicionados 8 ensaios axiais e mais 5 repetições no ponto central totalizaram 29 ensaios Os valores utilizados em cada nível estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Valores utilizados no planejamento fatorial para a otimização de polissacarídeos do extrato aquoso de açaí.

<b>Variáveis</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>2</b>
Temperatura (°C)	60	70	80	90	100
Relação m: v (g/mL)	1:1	1:3	1:5	1:7	1:9
Rotação (rpm)	45	150	300	450	600
Granulometria (mm)	0.1	0,5	1	1,4	2

A extração de polissacarídeos do caroço de açaí é favorecida pelo aumento da temperatura, diminuição na relação massa; volume, maior velocidade de agitação e menor granulometria.

Através dos resultados do planejamento é possível determinar os coeficientes de regressão (Tabela 20). Para a reposta concentração de polissacarídeos, calcular a ANOVA e construir as superfícies de resposta.

Tabela 20. Resultados do planejamento fatorial para a extração de polissacarídeos

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Relação m: v (g /mL)</b>	<b>Rotação (rpm)</b>	<b>Granulometria (mm)</b>	<b>Teor de polissacarídeos</b>
1	-1	-1	-1	-1	2,92
2	+1	-1	-1	-1	3,38
3	-1	+1	-1	-1	4,50
4	+1	+1	-1	-1	3,50
5	-1	-1	+1	-1	2,75
6	+1	-1	+1	-1	3,26
7	-1	+1	+1	-1	4,40
8	+1	+1	+1	-1	5,10
9	-1	-1	-1	+1	3,37
10	+1	-1	-1	+1	3,52
11	-1	+1	-1	+1	3,05
12	+1	+1	-1	+1	3,33
13	-1	-1	+1	+1	3,10
14	+1	-1	+1	+1	3,77
15	-1	+1	+1	+1	3,10
16	+1	+1	+1	+1	4,24
17	-2	0	0	0	3.84
18	+2	0	0	0	4.74
19	0	-2	0	0	2.12
20	0	+2	0	0	4.43
21	0	0	-2	0	3.08

22	0	0	+2	0	4.43
23	0	0	0	-2	7.50
24	0	0	0	+2	3.67
25	0	0	0	0	4,76
26	0	0	0	0	4,90
27	0	0	0	0	4,99
28	0	0	0	0	4,78
29	0	0	0	0	4,95

Foi realizada a análise dos efeitos (Tabela 21), para um nível de significância de 95%, os números (1) é referente a variável granulometria, (2) rotação do impelidor, (3) relação massa:volume e (4) temperatura.

A tabela de análise de variância fornece informações sobre o quanto o ajuste foi adequado, sendo possível propor o modelo probabilístico que correlaciona a resposta em função das variáveis estudadas, construindo a superfície de resposta para a determinação da faixa ótima de operação.

Tabela 21. Cálculo dos efeitos para a extração de polissacarídeos

Variáveis	Efeito	p
	4,90822	0,000003
(1)F (L)	-0,39583	0,002687
F (Q)	0,16568	0,030627
(2)F (L)	0,65417	0,000611
F (Q)	-0,74932	0,000408
(3)F (L)	0,39417	0,002720
F (Q)	-1,24432	0,000090
(4) (L)	-0,04417	0,378641
F (Q)	-0,48182	0,001510
1L x 2L	-0,08375	0,208923
1L x 3L	0,39125	0,005002
1L x 4L	0,19625	0,033387
2L x 3L	0,34625	0,007095
2L x 4L	-0,65375	0,001116
3L x 4L	-0,03375	0,566070

Todas as variáveis são significativas para o modelo de segundo grau extração de polissacarídeos obtido do caroço de açaí.

O procedimento para verificar a validade destes modelos tem como princípio básico os critérios estatísticos de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o teste F. O coeficiente de determinação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos valores das respostas previstas pelo modelo proposto com a variância da própria população dos pontos experimentais. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de  $R^2$  entre os valores previstos e os valores experimentais, melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas.

O teste Fischer de significância é usualmente utilizado para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais, comparando-se o valor estimado para F a partir dos resultados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência. O fundamento do teste F consiste em verificar se existe ou não relação entre as variáveis e a resposta. Quando não há relação entre a variável e a resposta, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas MQR e MQr segue uma distribuição F. (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2002).

Tabela 22. Análise de variância

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F calc</i>	<i>p</i>
Regressão	14	20,94020902	1,495729216	2,106107502	0,087905599
Resíduo	14	9,942611667	0,710186548		
Total	28	30,88282069			

O valor de  $F_{calc}$  para falta de ajuste ficou muito abaixo do valor de  $F_{tab}$ , o que significa que há evidência de falta de ajuste do modelo. O  $R^2 = 0.67$  devido a falta de ajuste do modelo. Assim o modelo não pode ser considerado preditivo e não pode ser utilizado para a construção das superfícies de resposta para a extração de polissacarídeos do caroço de açaí.

As variáveis escolhidas para a otimização não permitem uma maior variação de parâmetros; a temperatura deve ser mantida alta para a inativação das enzimas; a granulometria abaixo dos valores apresentados dificulta a filtração do extrato e a velocidade utilizada está dentro dos limites do equipamento utilizado.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSÃO**

Os procedimentos e as técnicas analíticas utilizadas indicam a presença do polissacarídeo de reserva do tipo galactomanana. Não foram encontradas evidências da presença de da frutana do tipo inulina no caroço de açáí.

Com o planejamento experimental realizado o maior percentual de galactomanana encontrado foi de 7%.

A concentração de polissacarídeos insolúveis encontrada foi de 15%.

A otimização do processo foi realizada indicando que o modelo encontra-se na região de ótimo da extração. As variáveis do processo estudadas (temperatura, relação massa/volume, velocidade de agitação e granulometria) foram todas significativas.

### **Sugestões para Trabalhos Futuros**

- ✓ Análise da concentração dos polissacarídeos do tipo manana e galactomanana durante o processo de amadurecimento do fruto da palmeira de açáí.
- ✓ Relação dos carboidratos comparados com outras espécies de açáí.

## REFERÊNCIAS

- ALBARICI, T. R.; FREITAS, D. M.; PESSOA, J. D. C. **Protocolos de Análises para Polpa de Açaí**: um guia prático de consulta. 1. ed., v. 1. 48 p., 2009
- ALENCAR, A.C.T **Processo de utilização de inulina e dos amidos de alta densidade para a fabricação de uma fibra solúvel oriunda de sementes de *euterpe oleracea***. Patente 0402181-9, 2007.
- ALTMAN, R.F.A. O caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Belém: **Instituto Agrônomo do Norte**, p.109–111. (IAN. Boletim de Pesquisa, 31), 1956.
- APPLIED TECHNOLOGY. Converting chicory - new sugar and fat substitutes from chicory- not just a cup of coffee. **Dairy Foods**, v.94, n.11, p112, 1993.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora da Unicamp, Campinas, 2001.
- BENTO. J. F. **Aspectos taxonômicos de polissacarídeos de endosperma de leguminosas**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Paraná. 2008.
- BUCKERIDGE.M.S., MARCO A. S. TINÉ.M.A.S.; SANTOS.H.P LIMA.D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 12(Edição Especial): 137-162, 2000.
- BUCKERIDGE.M.S.; SANTOS. H.P.; TINE. M.A.S.; Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, 38 (1/2), 141–156, 2000
- CATALDO, L.F.; SILVA, C.A.; MENDES. M.F; NOGUEIRA. R.I; FREITAS. S.P, Extração de inulina a partir da raiz de chicória (*Chicorium intybus* L.) usando dióxido de carbono supercrítico. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. 2001
- COVIELLO, T.; MATRICARDI.P.; MARIANECCI.M.; ALHAIQUE.F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5-24, 2007.
- CUNHA. P.L.R.; PAULA. R.C.M.; FEITOSA. J. P.A.; Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 649-660, 2009.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, London, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EDELMANN. A.; LENDL.B. Toward the Optical Tongue: Flow-Through Sensing of Tannin-Protein Interactions Based on FTIR Spectroscopy. **J. AM. CHEM. SOC**, 124, 14741-14747 2002.

FIGUEIRÓ, S. D.; GÓES, J. C.; MOREIRA, R. A.; SOMBRA, A. S. B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. **Carbohydrate Polymers**, 56, p. 313-320, 2004

GALANTE. R.M., **Extração de inulina do alho (*allium sativum* L.var. Chonan) e simulação dos processos em batelada e em leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina. 2008

GARCIA. F. **Suplementação alimentar com  $\beta$ -glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Aqüicultura) Universidade Estadual Paulista. 2008

GEORGE.S; BRAT.P. ALTER. P.; AMIOT.M.J.; Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **J. Agric. Food Chem**, Vol. 53, No. 5, 2005.

GORIN. P.A.J. Rationalization of Carbon-13 Magnetic resonance Spectra of Yeast Mannans and Structurally related Oligosaccharides. **Canadian Journal of Chemistry**, 51, 2375–2383. 1973

GOUVEA. D.D.S., **Caracterização anatômica e ultraestrutural de sementes de *Eutrope oleracea* Mart**. Dissertação (Mestrado Agronomia) Universidade Federal Rural da Amazônia. 2007

GRZYBOWSKI. A, **Hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para a obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Setor de ciências da saúde. Universidade federal do Paraná. 2008

GUHRA S. G.; SINGH, L. Structural studies of the D-galacto-D-mannan from the seeds of *Parkinsonia aculeata* Linn. **Carbohydrate Research**, v. 182, 1988

HAULY, M.C.O.; MOSCATTO, J.A, Inulina e oligofrutose: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos **Semina: Ciências exatas e tecnológicas** v.23, n 1, p. 105-118. 2002.

HINCHA, D.K., LIVINGSTON III, D.P., PREMAKUMAR, R., ZUTHER, E., OBEL, N., CACELA, C. & HEYER A.G.. Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. **Biochimica et Biophysica Acta** 1768: 1611-1619. 2007

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Produção da extração vegetal e da silvicultura**, v.22, 2007.

ITO, E.N.; MARCONCINI, J.M.; PESSOA, J.D.C.; RIOS, C.T.; MATTOSO, L.H.C.; HAGE JR, E. Caracterização de compósitos de poliolefinas recicladas com fibras de açaí. **Anais do 9o Congresso Brasileiro de Polímeros 2007**

KOBAYASHI.H.; WATANABE.M.; KOMIDO.M.; MATSUDA.K.; HASEBE.T.I.; SUZUKI.M, SHIBATA.N.; HISAMICHI.K.; SUZUKI.S. Assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of a D-mannan composed of α-(1 →2) and α-(1 →6) linkages obtained from *Candida kefyr* IFO 0586 Strain. **Carbohydrate Research** 267. 299-306. 1995

KUSKOSKI, E.M., Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287. 2006

LASSO, P.R.O. **Uma nova técnica para conservação de alimentos frescos baseada em instrumentação eletroeletrônica automatizada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. Ed Sarvier. 1991

LEONEL.M., Composição química e perfil de açúcares de tubérculos de alcachofra de Jerusalém submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Braz. J. Food Technol** v.9, n2, p109-113. 2006

LINGYUN.W.; JIANHUA.W.; XIAODONG.Z.; TENGDA.; YALIN.Y.; CHENGGANG. C.; TIANHUA.F; FAN.Z; Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p.1087–1093, 2007

LIMA.A.T.M, Avaliação do potencial antioxidante e antiinflamatório dos polissacarídeos do fungo *Tylopilus ballouii*. Dissertação (Mestrado em bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

LORENÇO, C.M., **Desenvolvimento de Processo Contínuo de Obtenção de Frutose a Partir de Sacarose**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 2000

LUCZYNSKI.M, **Estudo da viabilidade econômica para a utilização da semente da *Euterpe oleracea Mart.*(açaí) como recurso energético**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará. 2008

MATHESON, N.K. & SAINI, H.S. a-Larabinofuranosidases and b-D-galactosidases in germinating-lupin cotyledons. **Carbohydrate Research**, 57:103-116. 1977

MENEZES-NETO, M.A, **Caracterização anatomica e degradação de reservas em sementes e plântulas de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) durante a anaerobiose.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras. 2004.

MERCE.A.L.R., FERNANDES.E.; MANGRICH.A.S., SIERAKOWSKI.M.R., Fe(III) - Galactomannan Solid and Aqueous Complexes.Potentiometric, EPR Spectroscopy and Thermal Data. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 12, No. 6, 791-798, 2001.

NACZK.M.; SHAHIDI. F.; Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054 95–111. 2004

OKUDA, T., HATANO, T., YOSHIDA, T. New methods of analysing tannins. **J. Nat. Prod.** 52, 1–31. 1989

OLIVEIRA. R.A.; PARK.K.J.; CHIOTARO.M.; BRANDINI.K.J.; NOGUEIRA.R.I. Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, n.2, p.131-140, 2004.

PANSERA, MR.; SANTOS,A.C.A.; PAESE.; WASUN,R. ROSSATO,M. ROTA, L.D.; PAULETTI,G.F.; SERAFINI,L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de farmacognosia**, V13, n1 p 17-22 2003.

PANZA.V.; LÁINEZ.V.; MALDONADO.S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 145 , 445–453 2004

PAULA, J.E., Anatomy of *Euterpe oleracea* Mart.(Palmae da Amazônia), **Acta Amazonica** 5(3) : 265-278. 1975

PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 16, p. 237-245, 1999.

PETKOWICZ, C. L. O., REICHER, F., CHANZY, H., TARAVEL, F. R., & VUONG, R.. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, 44, 107–112. 2001

PETKOWICZ, C. L. O., SCHAEFER. S.,REICHER, F.; The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. **Carbohydrate Polymers** 69 659–664. 2007

POMPEU.D.R.; SILVA.E.M.; ROGEZ.H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology** 100, 6076–6082, 2009

PRADO S.R.T.; GORIN P.A.J, STUELP. P.M.; HONDA N.K.; IACOMINI. An unusual juxtaposition of polysaccharide components of *Collema leptosporum*. **Carbohydrate Polymers** 40 271–276. 1999

QUEMENER B, THIBAUT JF & COUSSEMENT. P Determination of inulin and oligofructose in food products and integration in the AOAC method for the measurement of total dietary fibre. **Lebensm-Wiss Technol** 27, 125–132. 1994

RAO, C.V.N.; MUKHERJEE, A.K. Constitution of a mannan from the kernel of palmyra palm nut. **J. Indian Chem. Soc.**, v. 39, p. 711-716, 1962.

RIBEIRO, G.V. **Morfoanatomia do fruto de açaí em função do teor de água utilizando microscopia óptica e microtomografia de raios-X**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos. 2010

RICA.E. CALABRO.V., CURCIO.S. IORIO.G Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: A kinetic study and reaction mechanism. **Process Biochemistry** 44 466–470. 2009

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**, v.51, n.5, p.137-146, 1993.

ROBERFROID, M.B, Caloric value of inulin and oligofrutose **J. Nutr.** 129: 1436S–1437S. 1999

RODRIGUES, R.M; IEMMA,F.A , **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1 edição – Campinas, SP. 2005

RODRIGUES. R.B.; LICHTENTHALER.R.; ZIMMERMANN. B.F.; PAPAGIANNPOULOS. M.; FABRICIUS.H.; MARX. F.; Total Oxidant Scavenging Capacity of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) Seeds and Identification of Their Polyphenolic Compounds. **J. Agric. Food Chem.**, 54, 4162-4167, 2006

ROGEZ. H, **Açaí: preparo composição e melhoramento da conservação**. EDFPA, Belém, 2000.

SHINGEL. K.I. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and  $\gamma$ -irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research** 337 1445–1451. 2002

SILVA, R.F., Use of inulin as a natural texture modifier. **Cereal Foods World**. v.41, n.10, p.792-795. 1996.

SILVA,M .L. C; MARTINEZ, P.F ; IZELI,N.L IARA RIBEIRO SILVA,I.R; DALBERTO, A.F VASCONCELOS E CARDOSO,M.S. Caracterização química de glucanas fúngicas e sua caracterização biotecnológica. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 85-92, 2006

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 488p, 2007.

SODRE, J.B.; **Morfologia palmeiras como meio de identificação e uso paisagístico**. Monografia (Especialização em Plantas Ornamentais e Paisagismo) Universidade Federal de Lavras, 2005.

SOUSA.C.M.M.; SILVA.H.R.; VIEIRA-JR.G.M.; AYRES.M.C.C; COSTA. C.L.S.,; ARAÚJO.D.S.; CAVALCANTE.L.C.D.; BARROS.E.D.S.; ARAÚJO. P.B.M.; BRANDÃO.M.S.; CHAVES.M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007

TEÓFILO. R.F.; FERREIRA.M,M,C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 2, 338-350, 2006

TEXEIRA, L.B.; GERMANO, V. L.C.; OLIVEIRA, R.F.; FURLAN JR, J.; Processo de compostagem usando resíduos agroindústrias de açaí e de palmito de açaizeiro. **Circular técnica 41** 2005

TONELI, J. T. C. L., **Processos de separação física e secagem de inulina obtida a partir de raízes de chicória (*Cichorium intybus* L.)**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2006

TOWNSEND. C.R; COSTA.N.L; PEREIRA.R.G.A; SENGER.C.C.D. Características químico-bromatológica do caroço de açaí. CT/193, **EMBRAPA-CPAF** Rondônia, p.2-5, ago. 2001.

UEMURA, M. STEPONKUS, P.L. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant, Cell and Environment** 26: 1083-1096 2003.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; LEENHEER, L. de; HOEBREGS, H.; MITS,G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p.525-552, 1995.

ZUNIGA. U.F.R.; FARINAS.C.F.; BERTUCCI NETO.V.; LEMOS.V.; Produção de Complexos Lignocelulíticos em Substratos Derivados de Resíduos Agroindustriais por Fermentação semi sólida. **IV workshop de biocatálise e biotransformação** 2008.