



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Otimização da Clarificação Enzimática de Suco de Goiaba Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta

Cindy Elena Bustamante -Vargas<sup>1\*</sup>, Evelin Moresco<sup>2</sup>, Eloana Malvessi<sup>3</sup>, Ivana Correa Ramos Leal<sup>4</sup> Geciane Toniazco Backes<sup>1</sup> e Rogério Marcos Dallago<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (URI Erechim)

Caixa Postal 743 – 99709-910 Erechim – RS - E-mail\*: cindyelena506@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – Departamento de Ciências Exatas e da Terra  
Caixa Postal 743 – 99709-910 Erechim-RS

<sup>3</sup>Universidade de Caxias do Sul (UCS), Instituto de Biotecnologia  
95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Departamento de Produtos Naturas e Alimentos  
– 21941-902 Rio de Janeiro-RJ

#### RESUMO

*A metodologia de superfície de resposta foi empregada para otimizar o processo de clarificação enzimática do suco de goiaba utilizando a pectinase comercial Rohapect® DA6L. Foram avaliados os efeitos da temperatura (23 a 57 °C), o tempo (10 a 110 min) e as unidades de atividade pectinolítica (7 a 23 U) sobre a porcentagem de clarificação (PC) do suco tratado. Da análise das superfícies de resposta inferiu-se que os melhores valores de PC (>90 %) foram obtidos nas faixas de 40 a 57 °C, 15 a 23U e 60 a 110 minutos. As condições ótimas de clarificação foram determinadas a partir da primeira derivada do modelo empírico gerado para PC em função das variáveis independentes estudadas, obtendo-se a máxima PC (98,30 %) nos níveis +0,41, +0,70 e +0,96 correspondentes a 47,14 °C, 85 minutos e 22,68 U, respectivamente.*

Palavras-chave: pectinase comercial, tempo, temperatura, unidade de atividade.

#### INTRODUÇÃO

As substâncias pécicas constituem um dos polissacarídeos mais complexos encontrados na natureza (UENOJO e PASTORE, 2007). Sua degradação até as unidades monoméricas básicas é resultado da ação conjunta de um grupo complexo de enzimas conhecidas como pectinases (PEDROLLI *et al.*, 2009). A moderna tecnologia do processamento de frutas exige a degradação rápida e intensa desses polissacarídeos, os quais são responsáveis pelas propriedades coloidais, consistência e aparência dos sucos (ALKORT *et al.*, 1998).

Após o processo de extração a grande maioria dos sucos de frutas apresenta alta turbidez e viscosidade, devido à presença das substâncias pécicas mantidas em suspensão pela repulsão da sua carga superficial negativa (KLOBITZ, 2008). Durante os processos de clarificação, a adição de pectinases reduz a turbidez do suco, pela hidrólise e desestabilização eletrostática das partículas de pectina, permitindo a exposição do núcleo proteico (carregado positivamente), o que possibilita a atração deste com as partículas de pectina, formando-se aglomerados que precipitam e são facilmente removidos nas etapas de centrifugação e/ou filtração, obtendo-se desta forma um suco de frutas clarificado e incrementos, em muitos casos, do rendimento no processo industrial (PINELO *et al.*, 2010; KLOBITZ, 2008).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar, mediante a metodologia de superfície de resposta, o processo de clarificação enzimática do suco de goiaba empregando a pectinase comercial (Rohapect® DA6L) de *Aspergillus niger*.

### MATERIAL E MÉTODOS

O suco de goiaba utilizado neste estudo foi elaborado a partir da polpa comercial de goiaba da marca Mais Fruta® (mesmo lote) adquirida no comércio local. Para determinar a eficiência da pectinase comercial Rohapect® DA6L na clarificação enzimática do suco de goiaba (pH natural constante;  $3,93 \pm 0,03$ ), foi empregado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>) mostrado na Tabela 1, onde foi avaliado o efeito da temperatura (T; °C), o tempo (t; minutos) e as unidades de atividade pectinolítica (U) na porcentagem de clarificação (PC) do suco tratado.

Para cada experimento foram utilizados 20 mL de suco, os quais se adicionaram a um beaker de 50 mL que posteriormente foi colocado em um banho termostatizado (UNIQUE Ultrasonic Cleaner; modelo: USC-1800A) para o controle da temperatura. Após o suco atingir a temperatura desejada, a enzima {volume (mL) correspondente às unidades de atividade desejadas para 20 mL de suco} foi adicionada e aguardado o tempo reacional referente a cada ensaio (Tabela 1).

Após o tratamento, a inativação da enzima foi realizada segundo Lee *et al.* (2006). Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, centrifugadas a 4000 g por 20 minutos a 5 °C e filtradas usando papel filtro Whatman no 1. O sobrenadante foi coletado para a realização da análise de PC conforme Sandri *et al.* (2014). O mesmo procedimento foi seguido para o suco controle, porém não foi adicionada a enzima.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do estudo de otimização da clarificação enzimática do suco de goiaba empregando a pectinase comercial Rohapect® DA6L estão listados na Tabela 1, correspondente à matriz do planejamento experimental com os valores codificados e reais das variáveis de estudo e a resposta em termos de PC do suco de goiaba tratado.

Ao analisar a Tabela 1, observa-se que os percentuais de clarificação estiveram na faixa de 64,04 a 96,04 %, obtendo-se a melhor clarificação (PC de 96,04 %) no ensaio 14, cujas variáveis foram: 40 °C, 60 minutos e 23 U.

A análise dos efeitos, após a exclusão dos que não foram significativos, mostrou que as variáveis que exerceram efeitos significativos positivos sobre a resposta foram a T (L), o t (L) e as U (L), indicando que seus aumentos proporcionam uma melhor clarificação do suco de goiaba. Porém, efeitos negativos foram observados para o t (Q), U (Q) e a interação t x T. A equação (1) apresenta o modelo matemático empírico gerado para a PC (%) do suco de goiaba, o qual foi validado pela análise de variância ( $p < 0,05$ ) com um coeficiente de correlação de 0,93 e valor de F calculado 3,5 maior que o tabelado.

$$PC (\%) = 92,85 + 2,90 T + 5,83 t - 2,93 t^2 + 5,9 U - 3,06 U^2 - 4,14 T \times t \quad (1)$$

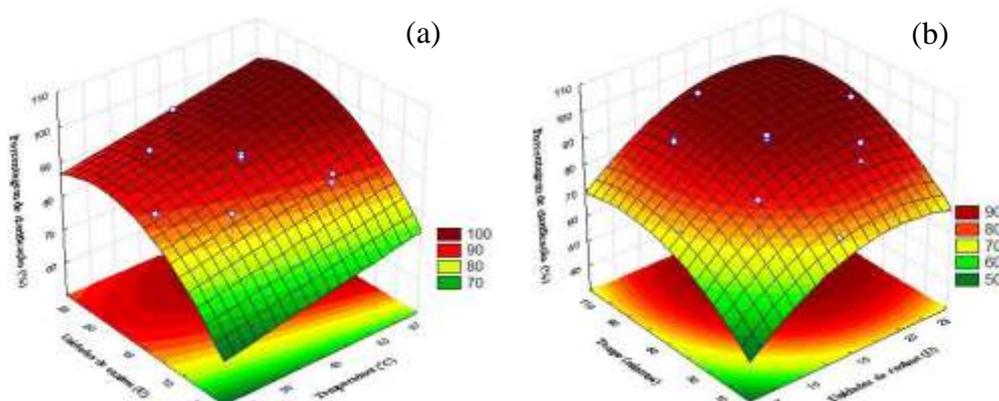
A validação do modelo possibilitou a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 1, as quais mostram a dependência da clarificação com relação às unidades de atividade e a temperatura (a), e as unidades de atividade e o tempo (b), respectivamente.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

**Tabela 1.** Matriz do planejamento experimental completo  $2^3$  com os valores codificados e reais e a resposta em termos de PC (%) do suco de goiaba tratado com a pectinase Rohapect® DA6L.

Ensaio	Variáveis independentes			Resposta
	T (°C)	t (min)	E (U)	PC (%)
1	-1 (30)	-1 (30)	-1 (10)	64,04
2	+1 (50)	-1 (30)	-1 (10)	87,58
3	-1 (30)	+1 (90)	-1 (10)	90,83
4	+1 (50)	+1 (90)	-1 (10)	90,30
5	-1 (30)	-1 (30)	+1 (20)	85,87
6	+1 (50)	-1 (30)	+1 (20)	93,13
7	-1 (30)	+1 (90)	+1 (20)	94,69
8	+1 (50)	+1 (90)	+1 (20)	95,59
9	-1,68 (23)	0 (60)	0 (15)	87,70
10	+1,68 (57)	0 (60)	0 (15)	92,72
11	0 (40)	-1,68 (10)	0 (15)	71,80
12	0 (40)	+1,68 (110)	0 (15)	94,86
13	0 (40)	0 (60)	-1,68 (7)	69,90
14	0 (40)	0 (60)	+1,68 (23)	96,04
15	0 (40)	0 (60)	0 (15)	94,11
16	0 (40)	0 (60)	0 (15)	93,66
17	0 (40)	0 (60)	0 (15)	94,02



**Figura 1.** Superfícies de resposta para a PC (%) do suco de goiaba obtida em função da temperatura e as unidades de atividade (a) e o tempo e as unidades de atividade (b).

Na Figura 1(a), verificaram-se incrementos na PC à medida que a temperatura e unidades de atividade aumentaram, conseguindo-se a melhor clarificação na faixa de 40 a 57 °C e de 15 a 23 U a tempo constante. Um comportamento similar foi observado quando houve aumentos nas unidades de atividade fornecidas e no tempo do tratamento enzimático (Figura 1 b), nesse caso, foi verificado que as unidades de atividade têm um efeito linear positivo maior ao observado em relação ao tempo do tratamento, obtendo-se assim um suco mais clarificado com o incremento das unidades pectinolíticas. Segundo Dey *et al.*, (2014) essa tendência pode ser atribuída à degradação das moléculas de pectina pela ação das pectinases, em especial da poligalacturonase, permitindo a formação de aglomerados de proteína e pectina que facilitam, após a remoção por filtração ou centrifugação dessas partes



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

coloidais, a produção de um sobrenadante límpido (suco clarificado). De forma geral, a temperatura constante, o tempo requerido para o processo de clarificação será inversamente proporcional às unidades de enzima empregada (RAI *et al.*, 2004).

Os valores ótimos das variáveis independentes foram calculados igualando a zero a primeira derivada do modelo de porcentagem de clarificação (Equação 1) como uma função da temperatura, o tempo e as unidades de atividade. A máxima porcentagem de clarificação (98,30 %) foi obtida nos níveis +0,41, +0,70 e +0,96 de temperatura, tempo e unidade de atividade (U), respectivamente, os quais correspondem a 47,14 °C, 85 minutos e 22,68 U. Esses valores ótimos encontram-se dentro das faixas de maximização da resposta determinadas a partir dos dados experimentais para as variáveis de estudo.

### CONCLUSÕES

Foi realizado com sucesso um estudo sistemático empregando um DCCR 2<sup>3</sup> para avaliar o efeito das variáveis operacionais (T, t e U) sobre a PC do suco de goiaba. O modelo empírico gerado foi validado e a análise das superfícies de resposta permitiu determinar as faixas das variáveis nas quais se obtiveram a maximização da resposta (PC > 90 %). Foi observado que incrementos na temperatura e nas unidades de atividade pectinolítica conduzem a aumentos na PC do suco de goiaba e que o tempo de reação teve um efeito menos acentuado sobre a resposta. Baseado nas derivadas parciais do modelo empírico foi possível calcular os valores ótimos das variáveis independentes estudadas, sob esta condição, foi previsto uma PC de 98,30 % se empregada uma temperatura de 47,14 °C, 85 minutos e 22,68 U. Esses valores são muito promissores e indicam a alta eficiência do processo de clarificação quando empregada a pectinase comercial Rohapect® DA6L.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPERGS, a CAPES, ao CNPq e a URI Erechim pelo suporte financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkorta I, Garb C, Llama M, Juan L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem* 33:21-28.
- Dey TB, Adak S, Bhattacharya P, Banerjee R. 2014. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. *LWT - Food Scie and Technol* 59: 591-595.
- Klobitz M. 2008. *Bioquímica de Alimentos - Teoria e Aplicações Práticas*. Primeira edição. Brasil: Editorial Guanabara Koogan, pp. 39-55.
- Lee WC, Yusof S, Hamid NSA, Baharin BS. 2006. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *J Food Eng* 73:55-63.
- Pedrolli D, Monteiro A, Gomes E, Carmona E. 2009. Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnol. J* 3:9-18.
- Pinelo M, Zeuner, B, Meyer A. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food Bioprod Process*, 8(8): 259-265.
- Rai P, Majumdar GC, Dasgupta S, De S. 2004. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *J Food Eng* 64:397-403.
- Sandri I, Piemolini-Barreto L, Fontana R, Da Silveira M. 2014. Application of enzymatic preparations to produce araçá pulp and juice. *Food Sci Technol* 34(4):657-662.
- Uenojo M, Pastore G. 2007. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas, *Quim Nova*, 30(2): 388-394.