

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS COM TANASE E COM GELATINA PARA CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)

SONIA COURI *

LUCIANE FERREIRA DE MENEZES **

GUSTAVO ADOLFO SAAVEDRA PINTO ***

MARIA DE LOURDES M. SOUZA ****

SUELY PEREIRA FREITAS *****

Comparou-se o tratamento da polpa do caju com tanase e com gelatina, visando à redução da turbidez e do teor de taninos. Os resultados indicaram que a redução das concentrações de taninos totais, hidrolisáveis, proantocianidinas e turbidez ficaram em 39%, 50%, 32% e 94% para sucos tratados com gelatina e 46%, 88%, 2% e 88% para a polpa tratada com tanase, respectivamente. Deste modo, o tratamento com gelatina foi eficiente para remoção de proantocianidinas, enquanto que o tratamento enzimático foi mais eficiente na redução de taninos hidrolisáveis. Os produtos obtidos não apresentaram diferenças visuais. Estudo comparativo de pré-viabilidade econômica mostrou que o investimento de capital para obtenção do suco de caju clarificado com enzima é menor que para o suco clarificado com gelatina. Entretanto, o custo de produção do suco de caju clarificado com gelatina é menor devido ao preço elevado da enzima tanase.

PALAVRAS-CHAVE: TANASE; TANINO; SUCO DE CAJU-CLARIFICAÇÃO.

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2000, as exportações de frutas frescas e seus derivados

* D.Sc. em Tecnologia de Processos Bioquímicos, Pesquisadora, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. (e-mail: scoury@ctaa.embrapa.br).

** Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, Rio de Janeiro, RJ.

*** Doutorando em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

**** M.Sc. em Farmácia, Técnica de Nível Superior, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

***** D.Sc. em Planejamento Energético, Pesquisadora Visitante, Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Rio de Janeiro, RJ.

totalizaram US\$ 6,3 bilhões, com perspectivas de aumento, devido ao crescimento do consumo de produtos naturais e tropicais (10). Alguns sucos de frutas e chás têm seu uso restrito por apresentarem algumas substâncias indesejáveis, como os taninos que formam complexos com moléculas de proteínas, ocasionando turbidez (14). O suco de caju, por exemplo, é rico em vitamina C, porém seu mercado de exportação é pequeno devido ao seu alto teor de taninos, que além da adstringência indesejável, causam instabilidade durante o armazenamento (13). O suco límpido e de boa qualidade pode servir de matéria-prima para a elaboração de suco concentrado, refrigerantes, vinhos e outros produtos, o que proporcionaria maior aproveitamento do pedúnculo desperdiçado (15).

A precipitação de taninos com gelatina tem sido utilizada com sucesso na clarificação principalmente dos sucos de caju e maçã. A precipitação ocorre devido à característica dos taninos de formar complexos insolúveis com proteínas (11). Outra alternativa é o tratamento de sucos e polpas com tanase (ou tanino-acil-hidrolase – E.C. 3.1.1.20). Essa enzima, ainda pouco explorada, tem sido usada pela indústria de alimentos para remover taninos de preparações para chás instantâneos (12, 16, 17) e para a produção de ésteres do ácido gálico, usados como agentes conservantes. A tanase catalisa a hidrólise das ligações éster e depsídica em taninos hidrolisáveis, liberando glicose e ácido gálico, quando o substrato, por exemplo, é o ácido tânico (12). A ação da tanase sobre os taninos poderá ocasionar redução na turbidez dos sucos de frutas e aumentar a sua estabilidade durante o armazenamento (6, 7).

O objetivo deste trabalho foi comparar o tratamento da polpa de caju com tanase e com gelatina na redução da turbidez e dos teores de taninos, bem como comparar os custos dos dois processos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL E REAGENTES

A polpa de caju congelada, da marca Maysa (Mossoró-RN), foi comprada no Ceasa do Rio de Janeiro, em um único lote de 50 kg. A enzima comercial contendo tanase, Biopectinase, foi cedida pela Quest International Ltd. (Irlanda). A gelatina marca Micron, em pó para uso enológico foi cedida pela Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves - RS). O sangue bovino foi cedido pelo Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os padrões utilizados na elaboração das curvas-padrão foram o ácido tânico p.a. (VETEC) e catequina p.a. (Sigma).

2.2 TRATAMENTO DA POLPA DE CAJU

2.2.1 Tratamento com tanase

Foram realizados testes de clarificação da polpa de caju, variando-se a concentração da enzima (0,1, 0,3 e 0,9% *v/v*) e o tempo de reação a 30°C. As amostragens foram feitas em triplicata, em intervalos de 1 hora até o tempo de 6 horas de tratamento. Na segunda etapa utilizou-se planejamento estatístico fatorial 2² incluindo ponto central em triplicata (Tabela 1).

TABELA 1 – NÍVEIS DOS FATORES ESCOLHIDOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL ADOTADO

Níveis	Fatores	
	Enzima (% <i>v/v</i>)	Tempo (horas)
- 1	0,8	3
0	0,9	4
+ 1	1,0	5

As amostras recolhidas foram levadas para banho termostático para inativação das enzimas (70°C/10 minutos), sendo em seguida centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. Nos sobrenadantes foram analisados, taninos totais e taninos condensados e turbidez .

2.2.2 Tratamento com gelatina

A determinação da concentração de gelatina adequada à remoção de taninos foi realizada em ensaio preliminar. Sobre 50 mL de suco de caju, resultantes da centrifugação da polpa foram adicionados de 0,5 a 5,0 mL de solução de gelatina 1% (p/v). Após 40 minutos, as suspensões foram filtradas em papel de filtro Whatman n° 42 e recolhidas duas amostras de

5 mL, nomeadas de A e B. Aos tubos A foram adicionados de cinco a dez gotas de solução de ácido tânico 1% pv e aos tubos B, de cinco a dez gotas de solução de gelatina. O aparecimento de turvação sinalizou o excesso de gelatina (tubos A) ou taninos (tubos B).

Para a concentração de gelatina de 30 g/hL, amostras foram retiradas após 40 minutos de reação e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido às análises de taninos totais, taninos condensados e turbidez.

2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.3.1 Taninos totais

O método utilizado baseou-se no uso da hemoglobina de sangue bovino fresco como agente na precipitação de taninos, conforme SCHULTZ et al. (18).

2.3.2 Proantocianidinas

Foi utilizado o método descrito por DESHPANDE e CHERYAN (8) e por BROADHURST e JONES (5). As leituras da absorvância foram feitas a 500 nm, após repouso de 20 minutos.

2.3.3 Turbidez

A determinação instrumental de turbidez foi realizada por transmitância em Colour Computer S&M, modelo SM-4-CH, no sistema Hunter com abertura de 30 mm de diâmetro. Cada amostra de 30 mL foi disposta em placa de Petri com 5 cm de diâmetro e 2 cm de altura, efetuando-se 4 repetições (1).

2.4 AVALIAÇÃO ECONÔMICA PARA PRODUÇÃO DO SUCO DE CAJU CLARIFICADO

Os dois processos foram avaliados quanto ao custo de área edificada, investimentos para construção das edificações, aquisição de equipamentos e os custos envolvidos na produção.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TRATAMENTO DA POLPA DE CAJU COM TANASE

Conforme apresentado na Tabela 2 não se observou redução na concentração de proantocianidinas. De acordo com a literatura (3, 12) a tanase atua sobre as ligações éster e depsídicas, ausentes neste tipo de tanino. Desta forma a redução na concentração de taninos totais ocorre somente em função da redução no teor de taninos hidrolisáveis presentes na polpa.

TABELA 2 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA TANASE E DO TEMPO DE REAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE TANINOS E NA TURBIDEZ, A PARTIR DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

Enzima (%v/v)	Tempo (h)	Taninos totais (mg/mL)	Proantocianidinas (mg/ mL)	Taninos hidrolisáveis ¹ (mg/mL)	Turbidez
0,1	0	0,290	0,150	0,140	56,50
	1	0,289	0,156	0,133	55,00
	2	0,278	0,158	0,120	56,50
	3	0,264	0,158	0,106	54,50
	4	0,263	0,156	0,107	55,00
	5	0,264	0,156	0,105	52,30
0,3	6	0,264	0,156	0,108	43,90
	0	0,310	0,158	0,152	56,00
	1	0,273	0,159	0,114	53,50
	2	0,269	0,159	0,110	45,90
	3	0,266	0,159	0,107	44,20
	4	0,264	0,159	0,105	39,00
0,9	5	0,264	0,159	0,105	31,00
	6	0,266	0,159	0,107	24,40
	0	0,310	0,158	0,152	55,50
	1	0,206	0,159	0,047	28,80
	2	0,207	0,158	0,049	17,00
	3	0,205	0,159	0,046	11,90
	4	0,206	0,159	0,047	7,00
	5	0,205	0,159	0,046	7,90
	6	0,204	0,159	0,045	6,90

¹ Calculado pela diferença entre taninos totais e proantocianidinas.

As concentrações de 0,1% e 0,3% v/v de tanase apresentaram redução

similar em função do tempo no teor de taninos hidrolisáveis, sendo estas muito inferiores à verificada para a concentração de 0,9% v/v. Nesta concentração observou-se, na primeira hora de reação, redução de 69% na concentração de taninos hidrolisáveis. Neste caso específico o tempo não foi o fator mais importante, pois após 6 horas a redução foi de 70%. A análise estatística dos efeitos por regressão múltipla mostrou que, individualmente, as variações do tempo de reação e da concentração de enzimas não afetaram de forma significativa a concentração de taninos hidrolisáveis. O efeito combinado das variáveis tempo e concentração de enzima, no entanto, foi significativo ao nível de 95%.

A turbidez do suco, parâmetro importante para a avaliação da reação, apresentou resultados mais significativos após quatro horas de reação com 0,9% de tanase. Neste caso a redução foi de aproximadamente 87%. Nas demais concentrações analisadas as diferenças alcançadas foram menores com tempo maior de reação.

A Tabela 3 mostra os resultados do planejamento fatorial adotado (Tabela 1) para a análise de taninos. A análise estatística dos dados mostrou que apenas o aumento da concentração de enzima apresentou resposta significativa, no nível de 95% de confiança, para a redução do teor de taninos (Figura 1). Devido ao elevado custo das preparações enzimáticas a utilização de volumes superiores a 1,0% v/v não se mostrou interessante, já que a redução de 0,151 mg/mL no teor de taninos hidrolisáveis significou a eliminação de 87,8% dos taninos (ou 44,5% dos taninos totais).

Observou-se redução significativa na turbidez das amostras tratadas com a enzima tanase (Tabela 4). A maior redução (84%) ocorreu quando se utilizou 1,0% de enzima. Para as concentrações de 0,8 e 0,9% a redução ficou em torno de 75%.

Verificou-se que a diferença na turbidez do produto depende apenas da concentração de enzima. Através da análise de regressão linear aplicada aos dados experimentais obteve-se a seguinte equação de ajuste (Eq. 1) para a redução de taninos hidrolisáveis:

$$Y = 0,064 - 0,036 X + \epsilon \quad (\text{Eq. 1})$$

na qual:

Y - taninos hidrolisáveis;

X - concentração de enzima;

ϵ - desvio do modelo.

TABELA 3 - RESULTADOS OBTIDOS NA REDUÇÃO DO TEOR DE TANINOS NA POLPA DE CAJU, A PARTIR DO PLANEJAMENTO FATORIAL ADOTADO EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS REAIS

Enzima (% v/v)	Tempo (h)	Redução (mg/mL)		
		Taninos totais	Proantociani- dinas	Taninos hidrolisáveis ¹
0,8	3	0,078	0	0,078
	5	0,086	0,004	0,082
0,9	4	0,096	0	0,108
	4	0,096	0	0,108
	4	0,096	0	0,108
1,0	3	0,151	0	0,151
	5	0,156	0,004	0,151

¹ Calculado pela diferença entre taninos totais e proantocianidinas.

FIGURA 1 - GRÁFICO DE PARETO DA ESTIMATIVA DOS EFEITOS DO PLANEJAMENTO ADOTADO, COM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%

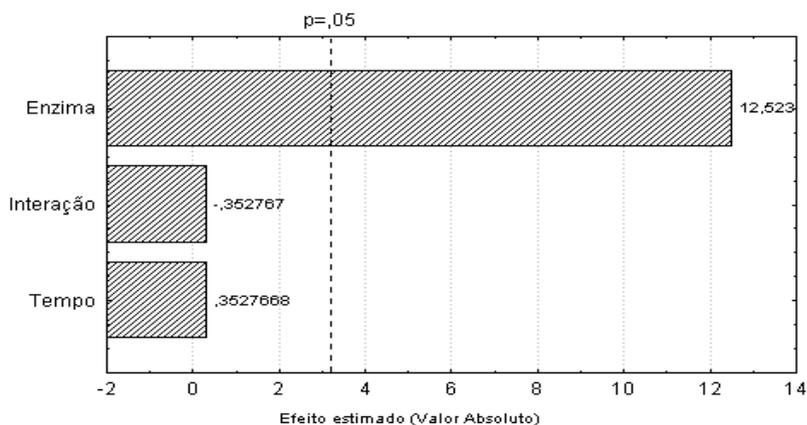


TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO DA TURBIDEZ DO SUCO TRATADO COM ENZIMA TANASE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

Tempo (horas)	Concentração de tanase (% w/v)		
	0,8	0,9	1,0
0	25,7	25,5	41,7
3	5,9	-	7,9
4	-	6,7	-
5	6,0	-	6,6

SANDERSON e COGGON (17) conseguiram eliminar praticamente todos os problemas de turbidez de chás submetidos a baixas temperaturas com 0,5% de tanase. Neste trabalho, os resultados obtidos com polpa do caju foram semelhantes, embora empregando o dobro da concentração de enzima.

3.2 TRATAMENTO COM GELATINA

A solução de gelatina foi adicionada ao suco (polpa centrifugada), uma vez que a adição direta na polpa impede a visualização da precipitação do complexo gelatina-tanino (4).

A determinação da concentração mais eficiente de gelatina para a clarificação do suco foi realizada pela adição de diferentes volumes de solução de gelatina 1% p/v ao suco de caju. Os resultados, mostrados na Tabela 5, apontam a concentração final de gelatina de 300 mg/L como a mais adequada. Nessa concentração observou-se a menor turbidez após o tratamento, bem como resultados negativos em ambos os testes de turvação, indicando a inexistência de excessos de taninos ou de gelatina no suco tratado.

A turbidez do produto, após o tratamento com gelatina, foi menor quando comparada à obtida com o tratamento enzimático, provavelmente, devido

à redução da quantidade de taninos condensados que são os principais responsáveis pela turbidez do suco (Tabela 6).

TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GELATINA ADEQUADA PARA O TRATAMENTO DO SUCO DE CAJU

Solução de gelatina (mL)	Amostra (mL)	Concentração de gelatina (mg/L)	Turbidez	Turvação	
				A	B
0		0	20,48	+	-
0,5		100	5,98	+	-
1,0		200	2,15	+	-
1,5		300	1,40	-	-
2,0	50	400	2,22	-	+
2,5		500	2,83	-	+
3,0		600	4,08	-	+
4,0		800	5,05	-	+
5,0		1000	17,83	-	+

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DO SUCO ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM GELATINA

Concentração de gelatina (mg/L)	Taninos totais (mg/mL)	Proantocianidinas (mg/mL)	Taninos hidrolisáveis ¹ (mg/mL)	Turbidez
0	0,330	0,201	0,129	28,93
30	0,200	0,136	0,064	1,83

¹ Calculado pela diferença entre taninos totais e proantocianidinas.

3.3 COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS

A redução da concentração de taninos totais, taninos hidrolisáveis, proantocianidinas e turbidez ficaram em 39%, 50%, 32% e 94% para sucos tratados com gelatina e 46%, 88%, 2% e 88% para a polpa tratada

com tanase, respectivamente. Esses resultados demonstraram que o tratamento com gelatina foi mais eficiente para a remoção de proantocianidinas, enquanto que o tratamento com enzima foi mais eficiente na redução de taninos hidrolisáveis (Tabela 7). Os produtos obtidos não apresentaram diferenças visuais.

TABELA 7- CONCENTRAÇÃO DE TANINOS NO SUCO APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA POLPA COM 1,0% DE TANASE E 5 HORAS DE REAÇÃO E DO SUCO TRATADO COM GELATINA APÓS 40 MINUTOS DE REAÇÃO

	Taninos totais (mg/mL)	Proantocia- nidinas (mg/mL)	Taninos hidrolisáveis (mg/mL)
Tanase	0,183	0,162	0,021
Gelatina	0,200	0,136	0,064

3.4 AVALIAÇÃO ECONÔMICA DOS PROCESSOS DE CLARIFICAÇÃO POR GELATINA E POR ENZIMA

A área edificada foi estimada de modo a incluir as instalações físicas necessárias à unidade de processamento, controle de qualidade de matérias-primas e produtos, estocagem de matérias-primas e produtos e às atividades administrativas. O preço por metro quadrado foi obtido a partir de dados estatísticos (2). O Investimento fixo incluiu o estudo do anteprojeto, custo de construção do galpão, laboratório instalado, almoxarifado, instalações de escritório e área social, equipamentos de processamento e instalação. Os investimentos necessários para aquisição dos equipamentos foram estimados a partir de dados fornecidos por representantes de empresas do setor. Os custos de produção foram classificados em variáveis e fixos. Os custos variáveis, proporcionais à capacidade da planta, envolveram matérias-primas, ingredientes, mão-de-obra, utilidades, embalagens e suprimentos. Os custos fixos incluíram supervisão direta, administração, transporte, marketing, taxas, seguros e depreciação (9). A Tabela 8 compara os principais resultados obtidos na análise de pré-viabilidade econômica para os dois processos estudados.

O investimento inicial para obtenção do suco de caju clarificado com enzima é menor que para o suco clarificado com gelatina. Esse fato ocorre devido à necessidade da etapa adicional de filtração. Entretanto, o custo de produção do suco de caju clarificado com gelatina é menor (US\$1,41 por L) que o do suco clarificado com enzima (US\$ 1,55/L). Isso se deve a grande quantidade de enzima adicionada na etapa de clarificação e ao preço elevado das enzimas de grau alimentício. Sob o ponto de vista ambiental, o processo enzimático também apresenta vantagens sobre o convencional. No tratamento com enzimas há somente uma etapa de centrifugação com geração de resíduo sólido rico em taninos, porém devido à ação da tanase, significativa fração (44,5%) do teor de taninos totais foi solubilizada. No tratamento convencional existem duas etapas, a primeira para remoção de material particulado já presente e a segunda para a retirada do precipitado resultante da complexação da gelatina com os taninos. Dessa forma, o processo convencional apresenta maior nível de geração de um resíduo recalcitrante.

TABELA 8 - ESTUDO COMPARATIVO DE PRÉ-VIABILIDADE ECONÔMICA PARA PRODUÇÃO DE SUCO DE CAJU CLARIFICADO: PROCESSO ENZIMÁTICO VS PROCESSO CONVENCIONAL

	Processo	
	Enzimático	Convencional
Estudo do anteprojeto	5.000,00	5.000,00
Construção da área de processamento	182.200,00	182.200,00
Equipamentos para planta de produção do suco	145.212,00	195.212,00
Montagem e instalação	137.951,00	185.451,00
Investimento Fixo = (1+2+3+4)	470.363,00	567.863,00
Capital de giro	94.073,00	113.573,00
Partida	47.036,00	56.786,00
Investimento total = (5+6+7)	611.472,00	738.222,00
Custo de produção (US\$ por litro)	1,55	1,41

4 CONCLUSÃO

O uso de enzimas pelas indústrias de bebidas e alimentos evidencia perspectivas futuras promissoras devido às características inerentes as

enzimas que são compostos naturais, biodegradáveis, capazes de desempenhar reações específicas, sem produzir produtos secundários. A viabilidade econômica dos processos enzimáticos depende da redução nos custos das enzimas comerciais.

Abstract

COMPARISON OF THE CASHEW APPLE (*Anacardium occidentale L.*) JUICE CLARIFICATION WITH TANNASE AND GELATIN

Tannase and gelatin were compared for treatment of cashew apple pulp aiming to reduce turbidity and tannin content. The results indicated that the decrease in concentrations of total tannin, hydrolysable tannin, proanthocyanidin, and turbidity was 39%, 50%, 32% and 94% for juices treated with gelatin and 46%, 88%, 2% and 88% for pulp treated with tannase, respectively. In this way the treatment with gelatin was more efficient to remove proanthocyanidin, whereas enzymatic ones was better for hydrolysable tannin decrease. The obtained products didn't present visual differences. The comparative economic analysis for the cashew-apple juice production showed that the capital investment for the enzymatic clarification is lower than for the conventional clarification process, using gelatin. Although, the cost of clarified cashew apple juice using gelatin is lower due to the high cost of the enzyme tannase.

KEY WORDS: TANNASE; TANNIN; CLARIFICATION-CASHEW APPLE JUICE.

REFERÊNCIAS

- 1 AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14th ed. Washington, 1995. Cap. 33, p. 10.
- 2 BAASEL, W. D. **Preliminary chemical engineering plant design**. 2nd. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990.
- 3 BHAT, T.K.; SINGH, B.; SHARMA, O.P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p.343-357, 1998.
- 4 BRASIL, I. M.; MAIA, G. A.; FIQUEIREDO, R. W. Produção de suco clarificado de goiaba com uso de enzima pectinolítica e agentes "fining". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 855-866, 1995.
- 5 BROADHURST, B. R.; JONES, W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of Science Food and**

- Agriculture**, v.29, p.788-794, 1978.
- 6 BUSSMAN, J. Tomorrow's technology: innovative application of enzymes in fruit processing. **Fruit Processing**, v.2, n.7, p.103-106, 1992.
 - 7 CANTARELLI, C. et al. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. **Food Biotechnology**, v.3, n.2, p.203-213, 1989.
 - 8 DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assay. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p.332-334, 1987.
 - 9 DOUGLAS, J. M. **Conceptual design of chemical processes**. New York: McGraw-Hill, 1988.
 - 10 FAO. Dados agrícolas de FAOSTAT. **Agriculture and food trade**. Disponível em: <<http://appo.fao.org>>. Acesso em: 5 de abril de 2002.
 - 11 HASLAM, E.; LILLEY, T.H. Natural astringency in foodstuffs: a molecular interpretation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.27, n.1, p.1-40, 1988.
 - 12 LEKHA, P.K; LONSANE, B.K. Production of tannin acyl hydrolase: State of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v.44, p.214-257. 1997.
 - 13 NAGARAJA, K.V.; NAMPOOTHIRI, V.M.K. Chemical characterization of high-yielding varieties of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Quality Plant Foods of Human Nutrition**, v. 36, p.201-206, 1986.
 - 14 NANJUDASWAMY, A.M; RADHARISHNIANS, G.; PATWARDHAN, M.V. Utilization of cashew apples for the development of processed products. In: NAGY, S.; SHAW, P.E; WARDOWSKY, W.F. **Fruit of tropical and subtropical origin**. Florida: FSS, 1990. p.66-87.
 - 15 PAULA, P.F.A.; SOUZA, L.; PIMENTEL, C.R.M. Situação atual e perspectiva da agroindústria do caju. In: ARAÚJO, JP.P; SILVA,

- V.V. **Cajucultura**: modernas técnicas de produção. Fortaleza: EMBRAPA- CNPAT, 1995. p.23-42.
- 16 PINTO, G.A.S.; LEITE, S.G.F.; TERZI, S.C.; COURI, S. Selection of tannase producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.24-26, 2001.
- 17 SANDERSON, G.W.; COGGON, P. **Green tea conversion**. United States Patent, 1974.
- 18 SCHULTZ, J.C; BALDWIN, I.T.; NOTHNAGLE, P.J. Hemoglobin as binding substrate in the quantitative analysis of plant tannins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.29, n.4, p.823-826, 1981.