

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA  
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**GIULIA FERRANDIN**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO  
DO FERMENTADO ALCOÓLICO A PARTIR DO BAGAÇO DE  
MAÇÃ**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO  
2014**

GIULIA FERRANDIN

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE FERMENTADO  
ALCOÓLICO A PARTIR DO BAGAÇO DA MAÇÃ**

Projeto referente ao Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso Bacharelado em Química – habilitação bacharelado da UTFPR – Câmpus Pato Branco.

Professor Orientador: Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

Coorientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Pato Branco, 2014

## TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO A PARTIR DO BAGAÇO DA MAÇÃ** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **2.7/2013-B.**

Fizeram parte da banca os professores:

Prof. Dra Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Profa. Dr. Mário Antonio Alves da Cunha

Profa. Dra. Marina Leite Mitterer Daltoé

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, pela oportunidade de cursar uma graduação que almejava, com muita iluminação e bênçãos.

Aos meus pais, Paulo e Edilaine, pelo apoio, amizade, carinho e amor incondicional concedido em todos os momentos de minha vida, principalmente nesta etapa da vida, onde atenção e paciência são necessárias.

À minha irmã, Rafaela, que sempre esteve ao meu lado com sua sincera amizade, companheirismo e alegria.

Ao meu namorado, Ricardo, pelo amor, ombro acolhedor e paciência me ajudando a alcançar meus objetivos, acreditando e confiando em meus sonhos.

Aos meus amigos e familiares que carinhosamente contribuíram para a realização desta graduação.

À minha amiga Jacqueline, por sua amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus amigos Otto e Mariely, que pacientemente me ajudaram e contribuíram na realização deste projeto.

À minha orientadora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, por me guiar e transmitir seus conhecimentos, com muita dedicação, carinho e amizade. Todos os seus ensinamentos foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, por sua orientação, atenção e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À professora Marina L. Mitterer Daltoé, pela gentileza e disponibilidade para ser banca deste trabalho.

A todos os meus professores do Departamento de Química, por transmitir seus conhecimentos e ensinamentos, tornando possível esta graduação.

A todos, o meu muito obrigada!

## EPÍGRAFE

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Abrindo Caminhos, Charles Chaplin.

## RESUMO

O Brasil possui uma economia fortemente baseada no agronegócio, que vem se expandindo para atender a crescente demanda populacional. Como consequência, a geração de resíduos agroindustriais tende a aumentar de quantidade, com uma aplicação não viável, sendo descartados no meio ambiente, incinerados ou usados como adubo ou ração animal, praticamente sem rentabilidade para as indústrias. Porém, muitos deles apresentam compostos bioativos, reconhecidos pelas suas aplicações tecnológicas e representando fontes naturais de substâncias antioxidantes e antimicrobianas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, atividade antioxidante utilizando três métodos distintos, sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e redução do ferro (FRAP), bem como produzir um fermentado alcoólico a partir do bagaço de maçã coletado em agroindústria processadora de maçã. O potencial antioxidante do fermentado alcoólico também foi avaliado, no intuito de produzir um produto com valor agregado. O extrato aquoso do bagaço de maçã mostrou um perfil de compostos fenólicos totais com média de  $177,2 \text{ mg EAG} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e os valores de atividade antioxidante foram de  $7,96 \text{ } \mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$  para sequestro do radical DPPH;  $28,16 \text{ } \mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$  para o sequestro do radical ABTS e  $14,54 \text{ } \mu\text{mol de Fe}^{+2} \text{ g}^{-1}$  para FRAP. O bagaço de maçã demonstrou potencial como substrato para a fermentação alcoólica sendo verificada produção final de  $64,3 \text{ g/L}$  de etanol, rendimento de  $0,504 \text{ g/g}$  e produtividade volumétrica em etanol de  $0,487 \text{ g/L} \cdot \text{h}^{-1}$ . Quanto à atividade antioxidante do fermentado alcoólico observou-se uma redução considerável do extrato aquoso para este, onde se apresentou os valores de  $55,58 \text{ mg EAG} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de teor de fenólicos totais,  $1,54 \text{ } \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $5,64 \text{ } \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $4,78 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$  para os métodos de sequestro de radicais DPPH, ABTS e método de redução do Ferro, respectivamente. Os resultados obtidos indicaram conteúdos apreciáveis de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante no extrato aquoso do bagaço da maçã, bem como uma elevada eficiência na produção do fermentado, demonstrando, portanto, um potencial subproduto para aplicação na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** resíduo industrial, atividade antioxidante, bagaço de maçã, fermentado alcoólico.

## ABSTRACT

Brazil has a strong economy based on agribusiness, which has been expanding to meet growing population demands. As a result, the generation of agro-industrial waste tends to increase in quantity, with a non-viable application being discarded in the environment, incinerated or used as fertilizer or animal feed, practically no profitability for industries. However, many of them have bioactive compounds, recognized for its technological applications and representing natural sources of antioxidants and antimicrobial substances. In this context, this work aimed to evaluate the content of phenolic compounds by the colorimetric method of Folin - Ciocauteau, antioxidant activity using three different methods, kidnapping of DPPH, ABTS radical capture and reduction of iron (FRAP) as well as produce an alcohol fermented from apple pomace collected in apple processing agroindustry. The antioxidant potential of the alcoholic fermentation was also evaluated in order to produce a product with added value. The aqueous extract of apple pomace showed a profile of phenolic compounds with an average of  $177.2 \text{ mg EAG} \cdot 100\text{g}^{-1}$  and the values of antioxidant activity were  $7.96 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  for the kidnapping of DPPH;  $28,16 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  for the kidnapping of radical ABTS and  $14,54 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{+2} \text{ g}^{-1}$  for FRAP. The apple pomace demonstrated potential as substrate for the fermentation production end being checked  $64,3 \text{ g / L ethanol}$ , yield  $0,378 \text{ g / g}$  and volumetric ethanol productivity of  $0,366 \text{ g/Lh}^{-1}$ . Regarding the antioxidant activity of the fermented alcoholic observed a considerable reduction of the aqueous extract for this, which presented values  $\text{EAG} \cdot 100\text{g}^{-1}$   $55.58 \text{ mg}^{-1}$  of total phenolic content,  $1.54 \text{ micromol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $5.64 \text{ micromol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$  and  $4.78 \text{ micromol Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$  for methods of kidnapping DPPH, ABTS and method of reducing iron, respectively radicals. The results indicated an appreciable content of phenolic compounds and antioxidant activity of apple pomace in the aqueous extract, as well as a high efficiency in the production of fermented, thus demonstrating a potential by-product for application in the food industry.

**Keywords:** industrial waste, antioxidant activity, apple pomace, fermented alcoholic.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvio padrão da composição centesimal do bagaço de maçã .	30
Tabela 2. Parâmetros Fermentativos da fermentação alcoólica.....	35
Tabela 3. Coeficiente de correlação das soluções padrões para cada composto e seu tempo de retenção.....	37
Tabela 4. Quantificação dos açúcares e etanol.....	38
Tabela 5. Médias e desvio padrão de fenólicos obtidos para o EAB e fermentado alcoólico .....	40
Tabela 6. Médias e desvio padrão para Atividade Antioxidante do EAB e fermentado alcoólico .....	41



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fermentação alcoólica em fermentador de bancada .....	31
Figura 2 – Curva de sólidos solúveis totais .....	32
Figura 3 – Comportamento do pH no decorrer da fermentação alcoólica .....	33
Figura 4 – Variação da acidez no decorrer da fermentação alcoólica.....	33
Figura 5 – Consumo de açúcares redutores totais e aumento da concentração de etanol .....	34
Figura 6 – Ensaio DNS ao longo das 132 h de fermentação alcoólica.....	34
Figura 7 – Fermentado alcoólico antes da centrifugação .....	36
Figura 8 – Fermentado alcoólico após centrifugação .....	36
Figura 9 – Comparação entre o antes e o depois da centrifugação .....	36
Figura 10 – Cromatograma obtido pela injeção do ponto $10 \text{ g.L}^{-1}$ da curva de calibração .....	38
Figura 11 – Cromatogramas sobrepostos das amostras $B_0$ e $B_{11}$ .....	39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 HISTÓRICO DA MAÇÃ.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 MAÇÃ E O DOCE DE MAÇÃ .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Fermentação alcoólica do bagaço da maçã .....	17
<b>3.4 ANTIOXIDANTES NATURAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4.1 Ação antioxidante dos compostos fenólicos .....</b>	<b>19</b>
3.4.1.1 Ácidos fenólicos .....	20
3.4.1.2 Flavonóides .....	20
3.4.1.3 Métodos para determinação da atividade antioxidante .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 BAGAÇO DE MAÇÃ.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MAÇÃ .....</b>	<b>23</b>
4.2.1 Umidade .....	23
4.2.2 Determinação de lipídios .....	23
4.2.3 Determinação de proteínas .....	23
4.2.4 Determinação de cinzas .....	24
4.2.6 Determinação de pH .....	24
4.2.7 Determinação da acidez titulável e acidez total.....	24
<b>4.3 FERMENTADO ALCOÓLICO DO BAGAÇO DE MAÇÃ.....</b>	<b>24</b>
4.3.1 Preparo de mosto .....	24
4.3.2 Preparo do inóculo para fermentação alcoólica .....	25
4.3.3 Fermentação Alcoólica .....	25
4.3.4 Determinação dos parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica .....	25
4.3.5 Métodos Analíticos .....	26
4.3.5.1 Açúcares Redutores Totais .....	27

4.3.5.2 Determinação de Açúcare, Etanol e Ácido Acético por CLAE.....	28
<b>4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO APARTIR DO BAGAÇO DE MAÇÃ.....</b>	<b>28</b>
4.4.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais.....	28
4.4.2 Determinação da Atividade Antioxidante.....	28
4.4.2.1 Método ABTS.....	28
4.4.2.2 Método DPPH.....	29
4.4.2.3 Redução do ferro – FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro).....	299
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MAÇÃ.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2 FERMENTADO ALCOÓLICO DO BAGAÇO DE MAÇÃ.....</b>	<b>31</b>
<b>5.3 DETERMINAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL POR CLAE.....</b>	<b>37</b>
<b>5.4 TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO EAB E FERMENTADO ALCOÓLICO.....</b>	<b>40</b>
5.4.1 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	40
5.4.2 Determinação da atividade antioxidante.....	25
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>24</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são fontes fundamentais para o desenvolvimento de novos princípios ativos e possuem um valor claramente reconhecido, permitindo a descoberta de biomoléculas com potencial aplicação em diversas áreas da ciência. Junto a isso, a crescente demanda social por produtos que forneçam melhoria da qualidade de vida, originários principalmente de fontes naturais, dão impulsos para o desenvolvimento de pesquisa nesta área.

Por conseguinte, estende-se à indústria de alimentos e aos centros de pesquisa o desafio de identificar novos compostos bioativos com potencial de aplicação e/ou substituição de compostos sintéticos e a preocupação de atender as exigências do mercado consumidor buscando novas tecnologias, visando a elaboração de produtos que proporcionem benefícios aos consumidores e, ao mesmo tempo, diminuam perdas econômicas. Desta maneira, há um progressivo aumento de pesquisas por novas substâncias naturais bioativas disseminando os seus diversos benefícios a saúde.

Entre essas substâncias bioativas, estão os antimicrobianos, inseticidas e destacam-se os antioxidantes, que possuem o poder de inibir o crescimento de microrganismos e insetos e, combater danos oxidativos causados por radicais livres. Esses constituintes possuem larga aplicação nos setores químico, cosmético, farmacêutico e de alimentos. Estão presentes em uma ampla gama de produtos naturais e produtos alimentares (LEE et al., 2003).

Contudo, a obtenção destes compostos não é só a partir de alimentos *in natura*, podemos obtê-los a partir de diversas matrizes, como por exemplo, subprodutos industriais. Subproduto pode ser definido como produto de um processo de produção conjunta com menos importância em relação ao faturamento, que é quase insignificante, mas é comercializado. No Brasil, com uma economia fortemente baseada no agronegócio, são geradas grandes quantidades de subprodutos que, ao contrário de serem descartados ao meio, podem servir como fontes ricas de diversos antioxidantes (MELO, 2010). Estudos têm sido realizados e demonstrado a presença de propriedades funcionais em subprodutos agroindustriais, devido principalmente a presença de compostos fenólicos, assim como, potencial de aplicação.

Os compostos fenólicos são uma classe de constituintes e fazem parte da composição química de uma variedade de frutas, vegetais e produtos industrializados e agem como antioxidantes. Esta ação está relacionada à habilidade de doar hidrogênio ou elétrons, também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, o que evita a oxidação de vários ingredientes do alimento (SILVA et al., 2010). Desta maneira, tendo em vista os benefícios à saúde, o consumo de frutos naturais é de grande importância, e dentre esses produtos naturais encontra-se a maçã, a qual apresenta muitos estudos avaliando sua atividade antioxidante e suas propriedades tecnológicas.

O aumento do consumo da maçã é atribuído à prevenção e proteção contra várias doenças degenerativas, principalmente por causa de seus antioxidantes que impedem danos por radicais livres. Os compostos fenólicos em maçãs são responsáveis pela maior parte da atividade antioxidante do fruto (Lee et al., 2003). Estes são encontrados na polpa e principalmente na casca da maçã (TSAU et al., 2005). No mercado, é possível encontrar muitos produtos derivados da maçã que sofrem processamento industrial, como o suco e o doce de maçã.

O resíduo industrial proveniente do processamento da maçã, o bagaço, é constituído pela mistura heterogênea de semente, casca, cálice, polpa e haste. Os compostos bioativos da fruta in natura, mesmo após o processo de produção do suco, permanecem na biomassa fresca (LU; FOO, 2000). Desta maneira, são importantes os estudos que avaliem estes materiais descartados pela indústria alimentícia, tendendo a conter além de outros constituintes, compostos com qualidades antioxidantes e propriedades biológicas.

Sendo assim, os problemas de geração de resíduos seriam reduzidos, contando que no Brasil a utilização do bagaço é limitada a ração animal e adubação. Uma forma de agregar valor aos subprodutos industriais seria utilizá-los de maneira mais nobre pela extração de substâncias com propriedades farmacológicas, aproveitando, assim o alimento como um todo.

A literatura descreve aplicações do bagaço que compreendem alimentação animal, modificação ou incorporação em alimentos, produção de etanol, aromas, gás natural, enzimas, cogumelos, extração de fibras, carvão vegetal e fermentação alcoólica, e neste último há necessidade de agregação mínima de água obtendo-se um extrato com o máximo de sólidos solúveis totais, o que não encarece o processo e mantém-no viável.

Sendo assim, é viável a utilização do bagaço da maçã em processos fermentativos com produção de álcool ou bebida alcoólica. Dessa forma, neste trabalho, propõe-se o processo de esgotamento de bagaço da maçã caracterizando-o física e quimicamente, avaliando sua atividade antioxidante e em relação aos teores de sólidos solúveis totais, visando a sua fermentação alcoólica e por consequência a proposição de um novo produto.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Produzir fermentado alcoólico a partir do bagaço de maçã e avaliar química e biologicamente o resíduo e produto após fermentação

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar o subproduto de maçã físico e quimicamente quanto aos parâmetros umidade, pH, acidez titulável, resíduo mineral (cinzas), proteínas e lipídeos;
- A partir do extrato aquoso produzir um fermentado alcoólico em sistema descontínuo conduzido em fermentador de bancada.
- Caracterizar o fermentado alcoólico quanto aos parâmetros: pH, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, açúcares redutores totais, etanol, ácido acético, teores de glicose, frutose e sacarose.
- Produzir extrato aquoso de bagaço de maçã (EAB) oriundo do processo de produção de doces e geleias de maçã.
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais do extrato aquoso;
- Avaliar a capacidade antioxidantes do extrato aquoso e do fermentado alcoólico utilizando três protocolos metodológicos: sequestro dos radicais DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazina), e ABTS (2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)) e redução do  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  (FRAP);
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante do fermentado alcoólico produzido.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 HISTÓRICO DA MAÇÃ

A maçã é, dentre as frutas de clima temperado cultivadas no Brasil, aquela que apresentou maior expansão em área plantada e em volume de produção nos últimos vinte anos (RIZZON et al., 2005). Embora a cultura da macieira em escala comercial tenha iniciado na década de 1970, são inúmeras as referências sobre a introdução de cultivares, iniciativas de plantio ou fomentos anteriores a esse período. Em um diagnóstico do ministério da agricultura sobre as condições de agricultura dos municípios de Santa Catarina, no ano de 1913, destacava-se que, no município de São Joaquim, foram encontradas árvores frutíferas de pessegueiro, macieira, ameixeira e figueira, produzindo boas frutas. (PETRI et al., 2011).

No país os primeiros investimentos em pomares comerciais surgiram na região de Fraiburgo, Santa Catarina, em 1969, atraídos pela Lei de Incentivos Fiscais para Reflorestamento, que inclui a macieira no programa. A firma Reflorestamento Fraiburgo, liderada pelo Sr. Willy Frey, implantou o primeiro pomar comercial de macieira (PETRI et al., 2011). Até então, havia apenas pomares domésticos, e toda maçã de qualidade ainda era importada (FERREIRA, 2008).

Desde 1994, a área cultivada com macieira no Brasil vem crescendo continuamente. Entre 1994 e 2003, houve um acréscimo de 5.300 hectares (AQUINO e BENITEZ, 2005). O estado de Santa Catarina incrementou com o maior número de hectares, sendo o maior produtor do país, com aproximadamente 51% do total da área plantada. Rio Grande do Sul vem atrás, com 42,4% da área cultivada com macieira no Brasil, acompanhado do Paraná com 5,1% da área, concentrando o cultivo dos pomares na região Sul do país (RIZZON et al., 2005).

Quanto às cultivares mais plantada, destacam-se a cultivar Gala e a cultivar Fuji. A primeira tem sua colheita no começo do ano, entre os meses de fevereiro a março, já a segunda é colhida nos meses de março e abril. Afora o período de colheita, as duas principais cultivares são diferentes no aspecto da armazenagem, sendo que a Fuji oferece melhor comportamento quanto a isto (KREUZ et al., 2005).

As exportações de maçã começaram em 1986, e em 1999 o Brasil teve o número de exportações superiores às importações pela primeira vez. A maçã já chegou a ser o segundo item da pauta agrícola de importações, atrás somente do trigo (FERREIRA, 2008). Além da perspectiva favorável para produção e exportação,

a maçã pode ser aproveitada também para a produção e exportação do suco concentrado, elaboração de sidra, vinagre, destilado e extração de pectina (RIZZON et al., 2005).

### 3.2 MAÇÃ E O DOCE DE MAÇÃ

A maçã, entre todos os frutos, está entre a mais popular e nutritiva, sendo fonte rica de compostos com elevada atividade antioxidante, como os ácidos fenólicos e flavonoides. Estes compostos podem desempenhar um papel importante para proteger o corpo humano de muitas doenças provenientes do estresse oxidativo (ABID et al., 2013).

Como todos os frutos, é uma excelente fonte de vitaminas, minerais e fibras, nutrientes essenciais ao bom funcionamento do organismo humano. Sabe-se que as perdas na agricultura são elevadas, tanto no ponto de vista da produção quando de consumo. Na maioria das vezes, esse desperdício deve-se ao não aproveitamento desta produção. Em uma safra, aproximadamente 30% da produção de maçã, vai para descarte proveniente da classificação comercial e do rigoroso processo de seleção utilizado para satisfazer as exigências do consumidor brasileiro (NOGUEIRA et al., 2005). Aquelas que não são consumidas *in natura* podem ser aproveitadas adequadamente como excelente matéria prima para doces ou como também conhecida, geléia.

Geleia, segundo a legislação brasileira é:

[ ]...um produto obtido pela concentração da polpa ou suco de fruta com quantidades adequadas de açúcar, pectina e ácido até a concentração suficiente para que ocorra a geleificação durante o resfriamento (KROLOW, 2005).

O preparo de geleias e doces, em geral, é uma forma de conservação de frutas, pois além do uso do calor, o aumento de concentração do açúcar, com alteração da pressão osmótica e, com isso aumentando o tempo de vida útil do produto (KROLOW, 2005).



### 3.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica pode ser entendida como a oxidação anaeróbica, parcial, da glicose, por ação das leveduras, produzindo álcool etílico e gás carbônico, além de outros produtos secundários. É um bioprocessamento muito importante, onde é obtido todo o álcool industrial e todas as bebidas alcoólicas, tendo como produto secundário o gás carbônico (AQUARONE et al, 2001).

#### 3.3.1 Fermentação alcoólica do bagaço da maçã

Para atender o mercado doméstico altamente exigente na qualidade das maçãs, são descartadas aproximadamente 30% da produção proveniente da classificação comercial e do rigoroso processo de seleção para satisfazer as exigências do consumidor brasileiro. Deste rejeito, cerca de 10% correspondem a frutas de má qualidade, que são descartadas ou destinadas ao processamento de fermentados como a sidra, vinagre e destilados. O restante do rejeito é utilizado na fabricação de suco de maçã clarificado ou concentrado (NOGUEIRA, 2005).

No Brasil o bagaço é escoado no solo como adubo orgânico ou utilizado como ração animal. Porém, o bagaço constitui-se num ótimo substrato para finalidades biotecnológicas como produção de etanol, aromas, gás natural, ácido nítrico, pectinas e cogumelos, além de outras como extração de fibras e carvão vegetal.

Desta maneira a indústria de transformação poderia dar outro fim ao resíduo do processo de maçã. Este resíduo é constituído por 94,5% de cascas e polpas, 4,4% em semente e o restante, 1,1%, os centros. Este subproduto contém 80% de umidade, 5% de fibras (composta por 31% de celulose, 15% de lignina, 12% celulose e 9% de pectina insolúvel em água) e 14% de sólidos solúveis dos quais a maioria corresponde a açúcares invertidos, uma mistura de glucose, frutose e sacarose tornando susceptível à deterioração por microrganismo (PAGANINI et al., 2005).

Para aumentar o rendimento da extração da polpa de maçã e esgotar o bagaço, pelo processo de difusão, necessita-se clarificar, filtrar e concentrar este, tornando o custo elevado (NOGUEIRA, 2005). Em consequência ao esgotamento destes açúcares e no caso, o processo posterior é fermentação alcoólica, há necessidade de agregação mínima de água obtendo-se um extrato com o máximo de sólidos solúveis totais. Portanto o extrato do bagaço viabiliza a utilização dos

sólidos solúveis em processos fermentativos com produção de álcool ou bebida alcoólica (PAGANINI et al., 2005).

### 3.4 ANTIOXIDANTES NATURAIS

Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Desta maneira, no organismo o excesso de radicais livres é combatido por enzimas, substâncias antioxidantes produzidas pelo corpo ou provenientes da dieta (SIES; STAHL, 1995 apud BARROS, 2011). O grande interesse pelos antioxidantes deve-se aos efeitos destes sobre os radicais livres e o natural benefício ao organismo.

Os radicais livres podem ser definidos como:

[...] moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados. Esta configuração faz com que essas moléculas sejam altamente reativas e, em excesso, interfiram negativamente na manutenção de muitas funções fisiológicas normais do organismo (MELO, 2010).

Portanto, os radicais livres em excesso representam efeitos prejudiciais, sendo relacionados com várias patologias, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral.

Os antioxidantes podem ser divididos em sintéticos e naturais, e antes de serem utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos ou cosméticos, devem ter sua segurança para saúde comprovada. O ácido ascórbico, a vitamina E, os flavonoides, o  $\beta$ -caroteno e os compostos fenólicos são os que se destacam entre os antioxidantes naturais (MELO, 2010).

Os antioxidantes são divididos também de acordo com o mecanismo de ação, entre primários e secundários. Os primários são aqueles capazes de adiar ou bloquear as etapas de iniciação ou deter a propagação da auto-oxidação ao doarem átomos de hidrogênio, descontinuando a reação em cadeia. E os secundários são os sinergistas, os quais apresentam pouca ou nenhuma atividade antioxidante, mas se usados em combinação apropriada são capazes de acrescer a atividade dos antioxidantes primários. Englobam-se também os removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes ou mistos (OLIVEIRA, 2011).

Dentre os compostos naturais com uma atividade antioxidante evidente estão os compostos fenólicos e seus derivados, os flavonoides, tocoferóis, aminoácidos, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis. Uma substituição viável dos antioxidantes sintéticos em uso seria pelos antioxidantes naturais que retardam a peroxidação lipídica em alimentos prontos, aumentando sua vida útil (BARROS, 2011).

A respeito de frutas e os compostos antioxidantes, estas desempenham um importante papel na alimentação do homem desde épocas transcendentais. A princípio, apenas se conhecia suas propriedades nutritivas, porém hoje a manutenção da saúde e da qualidade de vida também se destaca entre suas propriedades. O consumo de frutas aumentou, não apenas no Brasil, mas no mundo todo. A sociedade despertou quanto à importância do consumo de fontes naturais de vitaminas e minerais e compostos essenciais a dieta regular equilibrada.

Existe uma grande diversidade de métodos para medir a atividade antioxidante dos alimentos ou amostras biológicas, seja *in vivo* ou *in vitro*. Trate-se de avaliar a eficiência dos antioxidantes no sentido de proteger os alimentos da oxidação, que está relacionada com a deterioração do alimento. Desta maneira, a atividade antioxidante de alimentos indica seu potencial como protetores da oxidação (ROCKENBACK, 2008).

A maioria dos métodos de determinação de atividade antioxidante *in vitro* aplicados atualmente tem como base a formação de radicais livres, os quais são capturados ao ser acionado o composto antioxidante, ou por inibir a formação de radicais livres, ou ainda do consumo de oxigênio por esta. Os radicais livres podem ser gerados por diversos tipos de compostos cromógenos como, por exemplo, o composto azo ABTS (2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) ou DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (ROCKENBACK, 2008). Há também o ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) e está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o  $Fe^{+3}$  em  $Fe^{+2}$ .

#### **3.4.1 Ação antioxidante dos compostos fenólicos**

Compostos fenólicos atuam como sequestrados de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo na etapa de iniciação e na propagação do processo oxidativo. Quimicamente são definidos como substâncias que possuem no mínimo um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas como

grupo funcionais. São substâncias produzidas naturalmente pelas plantas em resposta às variações ambientais. Possuem influência direta sobre parâmetros sensoriais, tais como cor e adstringência (MELO, 2010). As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja, além de outras frutas como maçã, pêra, mamão, uva e cereja (ROCKENBACK, 2008).

Os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se combinados com mono e polissacarídeos, através de um ou mais dos grupos fenólicos, ocorrendo também como derivados funcionais, como ésteres. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende de sua estrutura, especialmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos (OLIVEIRA, 2011).

Abrangem cerca de 8.000 compostos com diferentes estruturas químicas, divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos. Entre estas classes destacam-se o flavonoides e os ácidos fenólicos que se apresentam principalmente em plantas (MELO, 2010).

#### 3.4.1.1 Ácidos fenólicos

Quimicamente ácidos fenólicos são fenóis que possuem um ácido carboxílico funcional. São divididos em dois grupos com estruturas diferentes, os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Eles diferem apenas nos números e posições dos grupos hidroxila no anel aromático (STALIKAS, 2007).

Os ácidos hidroxibenzóicos apresentam uma estrutura básica  $C_6-C_1$ , caracterizando-se pela hidroxilação do carbono 4 do ácido benzoico. O mais comum é o ácido gálico.

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma estrutura básica  $C_6-C_3$ , caracterizando-se pela hidroxilação do carbono 4 do ácido cinâmico. Os mais representativos são os ácidos caféico, ferulico e sinápico.

#### 3.4.1.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas. São polifenóis que ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal. São responsáveis pela coloração das flores e frutos em plantas superiores, e são comuns em dietas no mundo inteiro. Existem estudos que descrevem sua presença

em fungos e algas (ROCKENBACK, 2008). Apresentam propriedades absorptivas de raios ultra-violeta, desta maneira protegem as plantas contra a radiação UV do sol. Além disso protegem células vegetais de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema de transporte de elétrons fotossintético (STALIKAS, 2007).

Estruturalmente, os flavonoides apresentam três anéis aromáticos fundidos como unidade estrutural básica. São caracterizados por possuir 15 átomos de carbono no esqueleto principal, do tipo  $C_6-C_3-C_6$ , no qual os dois anéis  $C_6$  são aromáticos.

Os flavonóides são separados em diversas classes, de acordo com suas características químicas e biossintéticas: as antocianinas, os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, as catequinas e os isoflavonoides (OLDONI, 2010).

Esta grande variedade estrutural e os prováveis benefícios à saúde originados pela dieta baseada em compostos fenólicos dependem de sua absorção e metabolismo, que são determinados pela estrutura química do composto juntamente com sua conjugação com outros fenólicos, grau de glicosilação, tamanho molecular, hidroxilação e metilação (OLDONI, 2010; MELO, 2010).

#### 3.4.1.3 Métodos para determinação da atividade antioxidante

Existem diferentes métodos analíticos para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (MELO, 2010).

Dentre os diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* destacam-se, o método de redução do ferro (FRAP), e os de sequestro dos radicais ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio) e DPPH

(2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Além destes, a determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais (ROCKENBACK, 2008).

O radical ABTS.+ (2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) pode ser gerado por enzimas como a peroxidase ou quimicamente, com dióxido de manganês ou persulfato de potássio (ROCKENBACK, 2008). Segundo Re et al. (1999) o radical ABTS.+ pode ser formado por uma reação química com persulfato de potássio incubados à temperatura de 25 °C no escuro, durante 12 – 16h, chegando a formar mais de 60% de radicais livres. Os resultados obtidos nas análises antioxidantes são comparados ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), antioxidante sintético, hidrossolúvel e similar à vitamina E, e são expressados em TEAC (quantidades equivalentes a Trolox).

O método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), desenvolvido por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), está baseado na descoloração de uma solução composta de radicais estáveis, possui cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio ou na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (ROCKENBACK, 2008).

Na forma de radical, o DPPH possui absorção característica a 517 nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante. Os resultados são expressos em TEAC ou mais comumente em IC50, ou seja, a quantidade necessária de antioxidante para reduzir em 50% a absorbância inicial do radical (MELO, 2010).

Para o método de redução de ferro (FRAP), o teste é baseado na habilidade de redução do Ferro. Em meio ácido o complexo férrico tripiridiltriazina é reduzido a sua forma ferrosa de intensa cor azul na presença de antioxidantes, causando um aumento na absorbância a 595 nm (OLDONI, 2010).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 BAGAÇO DE MAÇÃ**

Neste trabalho foram analisadas amostras de bagaço de maçã cv. Gala provenientes do processamento da maçã para produção de doce de maçã,

produzidos pela indústria Dos Alpes na cidade de Treze Tílias – SC, safra 2013. As amostras foram armazenadas em freezer até o momento das análises.

## 4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MAÇÃ

Para a caracterização do bagaço de maçã foram determinados os valores de umidade, lipídios, proteínas, resíduo mineral (cinzas), pH e acidez titulável. Para tanto foram empregadas metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

### 4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada pela perda da massa por dessecação segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz. Foram pesadas 2 g da amostra em cápsula de porcelana previamente tarada. Posteriormente, esta foi aquecida a 100 °C durante 3 horas. A amostra foi resfriada em dessecador até temperatura ambiente, é repetida a operação até peso constante.

Cálculo:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade por cento m/m} \quad (1)$$

N = nº de gramas de unidade (perda de massa em g) / P = nº de gramas da amostra

### 4.2.2 Determinação de lipídios

Para a determinação de lipídios foi empregado o método de extração por Soxhlet. Este método consiste na solubilização da fração lipídica utilizando-se de solvente orgânico (éter de petróleo ou éter etílico) e mantendo em refluxo durante 4 horas. Após este período foi retirado o éter e determinado a fração etérea por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### 4.2.3 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl. Este método se baseia na determinação de nitrogênio orgânico total considerando que as proteínas alimentares apresentam em média 16% de nitrogênio. O método consiste em digestões ácidas e básicas onde o nitrogênio é transformado em sal de amônia.

Em seguida, a amostra foi destilada e com indicador adequado a quantidade de nitrogênio presente foi quantificada por titulometria.

O conteúdo de nitrogênio obtido foi convertido em proteína por meio do fator de conversão 6,25, que é baseado na existência de 16% de nitrogênio, em média nas proteínas alimentares (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.2.4 Determinação de resíduo mineral (cinzas)

Para a determinação de cinzas a amostra foi previamente carbonizada e em seguida submetida à incineração completa em mufla a 550°C durante 1 hora. A quantidade de cinzas foi determinada através de gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.2.5 Determinação de pH

O pH dos fermentados alcoólico e acético foram medidos diretamente em pHmetro digital de bancada.

#### 4.2.6 Determinação da acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por titulação gravimétrica com hidróxido de sódio, até o ponto de viragem com o indicador fenolftaleína. Para a acidez total foi realizada pelo método de titulação volumétrica, usando solução de hidróxido de sódio 0,1 N e, como indicador, a solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### **4.3 FERMENTADO ALCOÓLICO DO BAGAÇO DE MAÇÃ**

#### 4.3.1 Preparo do mosto

O extrato aquoso obtido do bagaço, que no início apresentava um teor de sólidos solúveis totais de 4,5 °Brix, foi chaptalizado com açúcar comercial para atingir o teor de sólidos solúveis de 18 °Brix e o pH foi corrigido para 3,8 - 4,0 através da adição de solução 5 M de ácido cítrico. O extrato chaptalizado foi suplementado (30 g/hL) com mistura ativadora de crescimento de leveduras



constituído de: sulfato de amônio, fosfato de amônio dibásico, celulose quimicamente inerte e cloridrato de tiamina (vitamina B1).

#### 4.3.2 Preparo do inóculo para fermentação alcoólica

O inóculo foi preparado pela transferência de pequena porção do fermento liofilizado (*S. cerevisiae* r. f. *bayanus*) para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio Caldo Extrato de Malte e cultivado em incubadora orbital (shaker) por 24 horas a 28 °C, 150 rpm. As células foram recuperadas por centrifugação a 1350 x g por 15 minutos, lavadas e resuspendidas em água destilada esterilizada. Como inóculo foi empregada um volume de suspensão celular necessário para obter uma concentração inicial de 1 g/L quantificada a partir de curva de biomassa celular.

#### 4.3.3 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica foi conduzida em fermentador de bancada do tipo tanque agitado (STR) modelo Biostat B (B. Braun, Alemanha), equipado com eletrodos para o monitoramento de pH e termopar para controle da temperatura (28°C) e com cuba encamisada de 5 litros.

Na saída de ar da cuba do fermentador foi conectada mangueira de silicone cuja extremidade foi mantida submersa em água destilada em frasco Erlenmeyer de 500 mL, o qual funcionou como um batoque, impedindo a entrada de ar no sistema ao mesmo tempo em que permite a liberação do gás carbônico (CO<sub>2</sub>) oriundo da fermentação.

A fermentação foi acompanhada através do consumo dos açúcares via avaliação do teor de sólidos solúveis totais por refratômetro portátil, e produção de CO<sub>2</sub>. Amostras foram retiradas ao longo do processo fermentativo em intervalos de 12 horas. Foram realizadas análises de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, etanol e açúcares totais.

No final do processo o fermentado alcoólico foi separado das células por centrifugação (1500 x g por 20 minutos) engarrafado em garrafas de vidro de 250 mL e pasteurizado a 60 °C por 30 minutos e submetido posteriormente a caracterizado físico-química.

#### 4.3.4 Determinação dos parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica

O rendimento ( $Y_{P/S}$ ) da fermentação alcoólica foi determinado correlacionando-se a concentração final de etanol no caldo fermentado com o substrato consumido (açúcares redutores totais) no processo de fermentação, conforme equação 1. As concentrações de substrato foram consideradas como o conteúdo de sacarose estimado a partir da correlação com os teores de redutores totais, expresso em °Brix, segundo a equação 1 (TORRES NETO *et al.*, 2006).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (1)$$

Onde:  $Y_{P/S}$  = Rendimento do processo ( $\text{g.g}^{-1}$ );  $\Delta P$  = Variação da concentração de etanol (g);  $\Delta S$  = Variação do consumo de substrato (g)

A produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) da fermentação alcoólica foi determinada de acordo com a equação 2.

$$Q_p = \frac{Q_{\text{exp}}}{t} \quad (2)$$

Onde:  $Q_p$  = Produtividade volumétrica ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );  $Q_{\text{exp}}$  = Concentração de etanol experimental;  $t$  = Tempo de fermentação (horas)

A eficiência ( $\eta$ ) do processo de fermentação alcoólica foi calculada pela razão entre o rendimento prático e o rendimento teórico da fermentação conforme equação 3. O rendimento teórico da fermentação alcoólica é  $0.511 \text{ g.g}^{-1}$  (LIMA *et al.*, 2001).

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S(\text{teórico})}} \quad (3)$$

Onde:  $\eta$  = eficiência do processo (%);  $Y_{P/S}$  = Rendimento do processo ( $\text{g.g}^{-1}$ );

$Y_{P/S(\text{teórico})}$  = Rendimento teórico do processo ( $\text{g.g}^{-1}$ )

#### 4.3.5 Caracterização físico química do fermentado alcoólico

O fermentado alcoólico obtido foi caracterizado quanto aos parâmetros: pH, sólidos solúveis (°Brix), acidez total, teor alcoólico, seguindo metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), açúcares redutores totais e quantificação de glicose, sacarose, frutose, etanol e ácido acético.

Além disso, foram determinados do mesmo modo, a atividade antioxidante e os fenólicos totais do fermentado alcoólico do bagaço de maçã com as metodologias especificadas nos itens **4.4.1** a **4.4.2**.

#### 4.3.5.1 Açúcares Redutores Totais

Esta análise foi realizada pelo método DNS conforme descrito por Miller, et al (1959). Inicialmente 1,0 mL de amostra foi hidrolisada com 1,0 mL de HCl 2 Mol/L, sob aquecimento em banho-maria fervente por 5 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo, seguida de neutralização com 1,0 mL de NaOH 2 Mol/L.

Para a quantificação dos açúcares redutores, 0,5 mL da mistura hidrolisada foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 1,5 mL de solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). A mistura foi aquecida por 5 minutos em banho-maria em ebulição e após resfriamento foram adicionados 8 mL de água destilada e realizadas leituras em espectrofotômetro a 540 nm. Como branco foi utilizada mistura de 1 mL de água e 3 mL de solução de DNS e após resfriamento adição de 16mL de água. Os resultados foram calculados através de correlação com curva padrão de glicose (0,01mg/L, 0,02mg/L, 0,04mg/L, 0,06mg/L, 0,08mg/L, 0,1mg/L).

#### 4.3.5.2 Determinação de Açúcares, Etanol e Ácido Acético por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Antes das injeções, as amostras foram adequadamente diluídas e filtradas em filtros de PTFE com 45 µm de poro e na sequencia passadas em cartucho CHROMAFIX C<sub>18</sub> para remoção de interferentes, em especial compostos fenólicos. Os compostos glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi injetado volume de 10 uL do fermentado purificado em cromatógrafo VARIAN 920 LC equipado detector de refração; coluna HPX-87-H (Bio-Rad, Hercules, CA) a 45°C, usando como fase móvel água acidificada com ácido sulfúrico na concentração de 0,005 M com fluxo de 0.6 mL/ min em modo isocrático. Os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção com padrões autênticos de glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético.

## 4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO A PARTIR DO BAGAÇO DE MAÇÃ

Após caracterização físico-química, foi produzido o extrato aquoso a partir do bagaço da maçã (EAB), e na sequência o fermentado alcoólico. Tanto o extrato aquoso quanto o fermentado, foram caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Para a produção do EAB seguiu-se a proporção de 2 gramas do bagaço homogêneo e 20 mL de água destilada, aquecendo em banho-maria a 60 °C por 30 min, realizado em triplicata.

### 4.4.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A análise de compostos fenólicos totais do EAB foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão.

[ ]...O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Este reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W (MELO, 2010).

A amostra foi diluída e uma alíquota de 0,5 mL do extrato diluído 10 vezes e foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10. A mistura foi deixada de 3 a 8 minutos em descanso. Em seguida foi adicionado 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4%. A absorbância foi medida a 740 nm, depois de duas horas de incubação no escuro a temperatura ambiente. Os resultados do teor dos compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/L).

### 4.4.2 Determinação da Atividade Antioxidante

#### 4.4.2.1 Método ABTS

O radical ABTS foi formado pela reação de 5 mL de ABTS 7 mM com 8,8 µL de persulfato de potássio 140 mM, incubados em temperatura ambiente por 16 horas na ausência de luz. Após a incubação, a solução foi diluída em Etanol P.A até obter uma absorvância na faixa de  $0,700 \pm 0,200$  à 734 nm. O método consistiu na adição de 30 µL do EAB diluído cinco vezes e 3 mL do radical formado, tendo como branco etanol P.A..

A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro à 734 nm após 6 minutos de reação. Para a quantificação foi construída uma curva de calibração analítica utilizando o antioxidante Trolox como padrão, o resultado foi expresso em µmol de Trolox por g de amostra ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ).

#### 4.4.2.2 Método DPPH

A metodologia escrita por Brand-Williams et al. (1995) propõe a mistura da reação pela adição de 0,5 mL do EAB diluído dez vezes, 3,0 mL de etanol 50% (v/v) e 0,3 mL do radical DPPH em solução de etanol (0,5 mM) e incubada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A estabilidade foi monitorada, até que se atinja a estabilidade da reação – aproximadamente 45 minutos - por espectrofotometria em 517 nm, absorção característica do DPPH, a qual vai desaparecendo após a redução com o hidrogênio extraído de um composto antioxidante. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de metanol.

Foi preparada uma curva padrão com uma solução de Trolox nas concentrações 15 - 100µM de Trolox. Com o auxílio desta curva foi determinada a capacidade antioxidante das amostras por este método, que serão expressas em mmol de Trolox por mL da amostra.

#### 4.4.2.3 Redução do ferro – FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

Esta metodologia seguiu o proposto por Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado por meio da mistura 25 mL de uma solução de tampão acetato (300mM, pH 3,6), 2,5 mL da solução TPTZ (10mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl<sub>3</sub> (20mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL do EAB diluído dez vezes foi adicionado a 3 mL do reagente FRAP e

incubada a 37°C em banho-maria por 30 minutos. A absorbância foi medida após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso nas concentrações 100 - 2000µM, e os resultados foram expressos em mmol de Fe<sup>2+</sup> por mL da amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DA MAÇÃ

Após ser coletado, o bagaço de maçã foi armazenado em sacos plásticos no congelador até ser submetido à caracterização física e química com o principal objetivo de determinar os componentes deste para posterior utilização na produção de fermentado alcoólico. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados de caracterização centesimal apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão para composição centesimal do bagaço da maçã.

pH	Acidez total titulável (%)	Ac. Titulável Ác. Málico (%)	Umidade (%)	Resíduo mineral (cinzas) (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Aw
4,49 ± 0,05	2,68 ± 0,15	0,17 ± 0,01	73,07 ± 0,68	0,38 ± 0,06	0,745 ± 0,02	0,47 ± 0,04	0,97 ± 0,0005

n= 3 repetições

Albuquerque (2003) caracterizou o bagaço de maçã com o intuito de produzir proteína microbiana e obteve resultados semelhantes aos deste estudo, sendo a principal diferença obtida para os parâmetros resíduo mineral (3,51%) proteínas solúveis (5,93%). Isso possivelmente deve-se a forma de extração do suco da maçã, gerando diferentes propriedades ao bagaço.

Na caracterização do bagaço reportada por Joshi e Sandhu (1996) a proteína solúvel apresentou concentração de 3,14%, valor maior ao encontrado nesse estudo, de 0,74%, e um pH de 4,2 demonstrando-se próximo ao 4,4 encontrado nesta pesquisa. Verificaram-se em outro trabalho (ZHENG E SHETTY, 1998), teor

de umidade de 80,7% e atividade de água de 0,981, o que está de acordo com os valores obtidos para o bagaço de maçã em estudo.

Na caracterização proximal do bagaço de maçã seco conduzida por Sato et al (2010), foi observado um teor de resíduo mineral com média de 0,18%, teor de lipídios de 0,153%, um valor de 0,274% de proteínas e 0,109% de acidez titulável em ácido málico, valores inferiores ao observados nessa pesquisa, que pode ser explicado pelo fato de que no estudo de Sato et al, (2010) o bagaço da maçã foi lavado e passou por um processo de secagem antes de ser caracterizado.

## 5.2 FERMENTADO ALCOÓLICO DO BAGAÇO DE MAÇÃ

### 5.2.1 Aspectos da fermentação alcoólica

Na figura 1 está demonstrada a fermentação alcoólica conduzida em fermentador de bancada.



Figura 1. Fermentação alcoólica em fermentador de bancada.

Após 30 minutos da inoculação do mosto com a levedura *S. cerevisiae* foi observado início de desprendimento de bolhas de gás carbônico, indicando que a levedura utilizada apresentava uma atividade metabólica boa e que o inóculo foi preparado adequadamente.

Após 1 hora de cultivo foi verificada intenso desprendimento de bolhas indicando fase turbulenta da fermentação. Verifica-se através da Figura 2 que o

tempo de fermentação foi de 132 h e que houve consumo linear do substrato. Após 132 h de fermentação o conteúdo de sólidos solúveis verificado foi de 5,5 °Brix e não houve mais desprendimento de CO<sub>2</sub> bem como foi verificado precipitação do material suspenso (biomassa celular e borra) no caldo fermentado. Tal condição indicou a finalização do processo fermentativo.

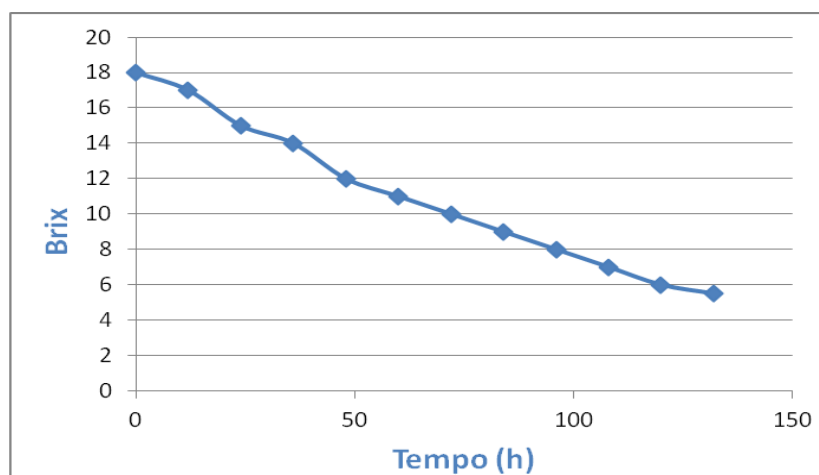


Figura 2. Curva de sólidos solúveis totais

Na literatura são descritos diferentes tempos de fermentação alcoólica em fermentações de extrato de maçã. No estudo de Nogueira et al. (2005), o extrato do bagaço de maçã foi corrigido com 12,5 °Brix até chegar e a fermentação foi finalizada após 132 h quando foi verificado conteúdo de SST de 2 °Brix. Diferenças nas durações de fermentação alcoólica podem estar relacionadas a diferentes aspectos do processo de produção, tais como características do bagaço da fruta, formas e condições de condução do processo fermentativo, bem como características fisiológicas, idade e tamanho do inóculo empregado no cultivo. (XAVIER, et al, 2011).

Na Figura 3 observa-se que durante a fermentação alcoólica houve pouca variação nos valores de pH. Nas primeiras 36 horas de cultivo, verifica-se certa redução do pH, iniciando com 4,0 e atingindo valor de 2,91, finalizando a fermentação com pH de 2,89. Estes valores confirmam com a variação da acidez titulável (Figura 4), indicando que não houve contaminação do mosto por microrganismos produtores de ácido, como bactérias acéticas, butíricas, propiônicas, etc. Pouca variação de pH e acidez titulável também é verificada por Nogueira et al. (2005).



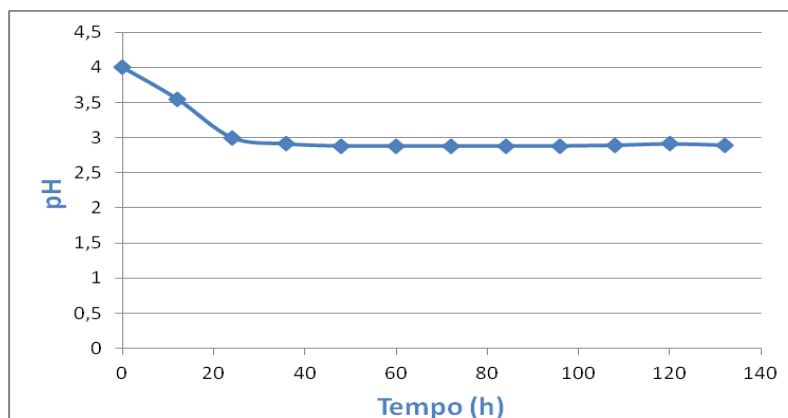


Figura 3. Comportamento do pH no decorrer da fermentação alcoólica.

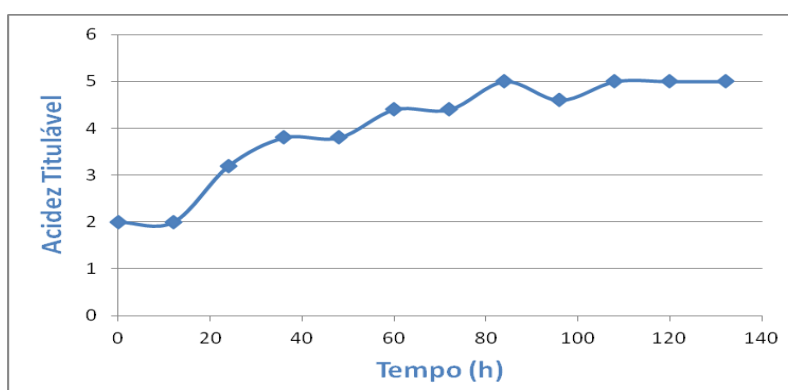


Figura 4. Variação da acidez titulável no decorrer da fermentação alcoólica

O monitoramento diário do fermentado permitiu observar e analisar o consumo de açúcares redutores totais e o avanço do grau alcoólico cujos valores estão apresentados na Figura 5. A realização desses ensaios permitiu calcular os parâmetros fermentativos, estes de grande importância pós-produção do fermentado alcoólico permitindo comparação e averiguação do produto final.

Analisando a Figura 5 é possível verificar que a levedura foi apta em produzir etanol ao longo do cultivo, sendo verificado aumento linear de sua concentração e paralelamente sendo verificado consumo linear do substrato. Após 132 h de cultivo ainda foi verificado conteúdo residual de substrato (22,4 g/L Açúcares Redutores Totais). O consumo incompleto dos açúcares presentes no mosto pode estar associado ao acúmulo de etanol no meio (64,3 g/L ou 8,15 °GL), que possivelmente tornou-se tóxico as células microbianas impedindo suas reações metabólicas.

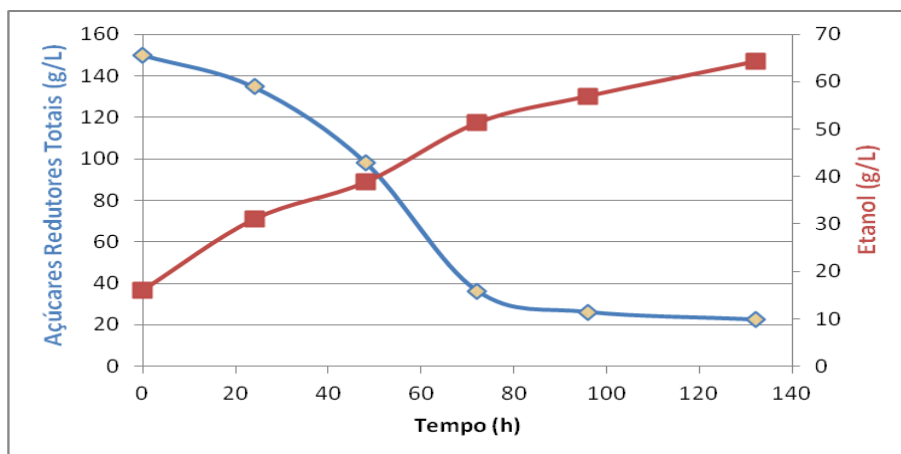


Figura 5. Consumo de açúcares redutores totais e aumento da concentração de etanol.

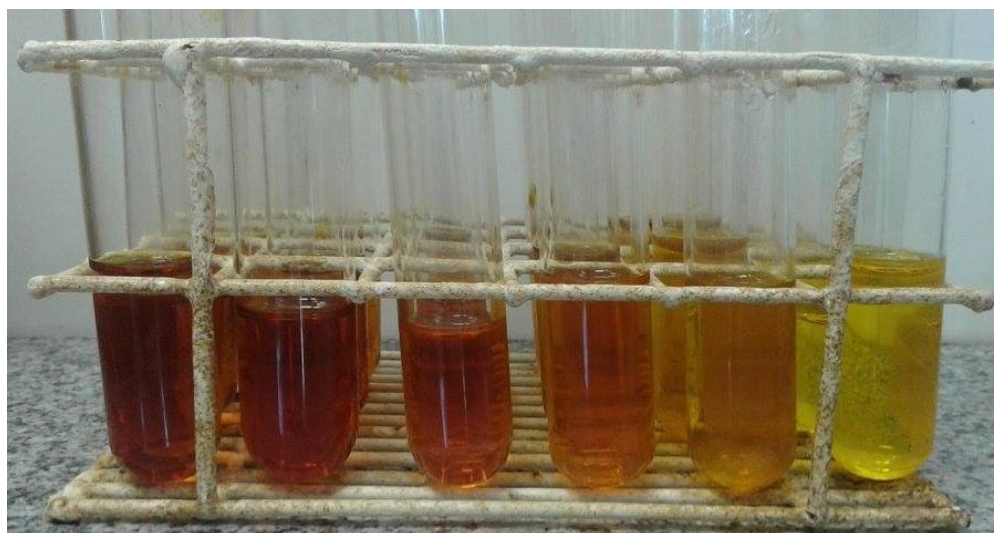


Figura 6. Ensaio DNS ao longo das 132 h de fermentação alcoólica.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados dos parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica.

Tabela 2. Parâmetros Fermentativos da fermentação alcoólica.

Parâmetros Fermentativos	Valores Observados
Produção Final ( $P_F$ )	64,3 g.L <sup>-1</sup>
Rendimento ( $Y_{P/S}$ )	0,504 g / g
Produtividade Volumétrica ( $Q_P$ )	0,487 g / L.h
Eficiência ( $\eta$ )	98,6 %

Por intermédio dos resultados de açúcares redutores totais consumidos durante a fermentação (Figura 6), juntamente com os resultados observados nos cromatogramas realizados nas alíquotas retiradas durante a fermentação, estes relatados no item 5.3, foi possível chegar aos resultados descritos na tabela 2. Como verificável na tabela, a produção final de etanol foi de 64,3 g.L<sup>-1</sup>, sendo determinado rendimento de 0,504 g de etanol por grama de substrato consumido, o que correspondeu a uma eficiência de 98,6%. Estes resultados são considerados bem eficientes, relacionados a uma boa atividade do inóculo, uma vez que o microrganismo foi adequadamente ativado antes do cultivo, fato verificado através do bom crescimento celular observado na etapa de preparo do inóculo.

Na literatura não foi possível encontrar estudos com fermentação alcoólica envolvendo EAB onde foram calculados os parâmetros fermentativos para comparação com os resultados encontrados.

Ao final da fermentação alcoólica foi feita a centrifugação do mosto, para a separação do bagaço fermentado e biomassa celular, sendo obtido um produto com coloração laranja-roseado, com odor agradável e adocicado, característico da maçã. Na Figura 7 está demonstrado o fermentado antes da centrifugação, e na Figura 8 observa-se o mesmo depois da centrifugação. E por fim na Figura 9 a comparação entre os dois.

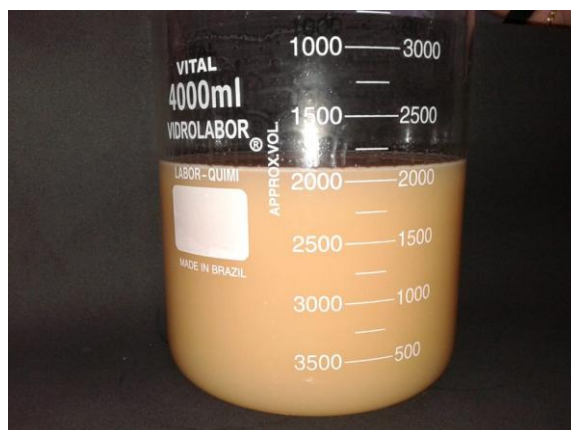


Figura 7. Fermentado alcoólico antes da centrifugação.

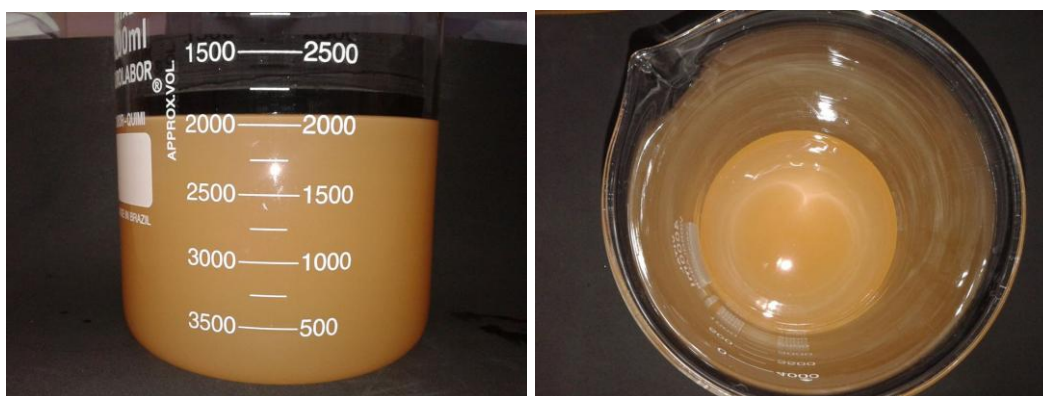


Figura 8. Fermentado alcoólico após centrifugação.



Figura 9. Comparação entre o antes e depois da centrifugação

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ETANOL POR CLAE NO FERMENTADO ALCOÓLICO DO BAGAÇO DE MAÇÃ

A utilização da técnica analítica CLAE, visou a identificação e quantificação de três açúcares (sacarose, glicose e frutose), do ácido acético e do etanol. Para tanto, foram realizadas injeções da mistura dos referidos compostos em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup>), sendo a curva plotada relacionando as respectivas concentrações com a área do pico

A identificação dos compostos na amostra foi realizada pela comparação do tempo de retenção com os padrões autênticos. Na tabela 3 estão descritos os compostos analisados com seus respectivos tempo de retenção e coeficientes de correlação.

Tabela 3. Coeficiente de correlação das soluções padrões para cada composto e seu tempo de retenção

Compostos	R <sup>2</sup>	Tempo de retenção (média)
Glicose	0,9808	8,64 min
Etanol	0,8922	21,42 min
Sacarose	0,9737	7,26 min
Frutose	0,9743	9,41 min
Ácido acético	0,9994	14,90 min

Analisando o cromatograma gerado a partir do detector índice de refração (IR) (Figura 10) na separação dos analitos na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> é possível concluir que houve boa resolução e seletividade para os compostos analisados.

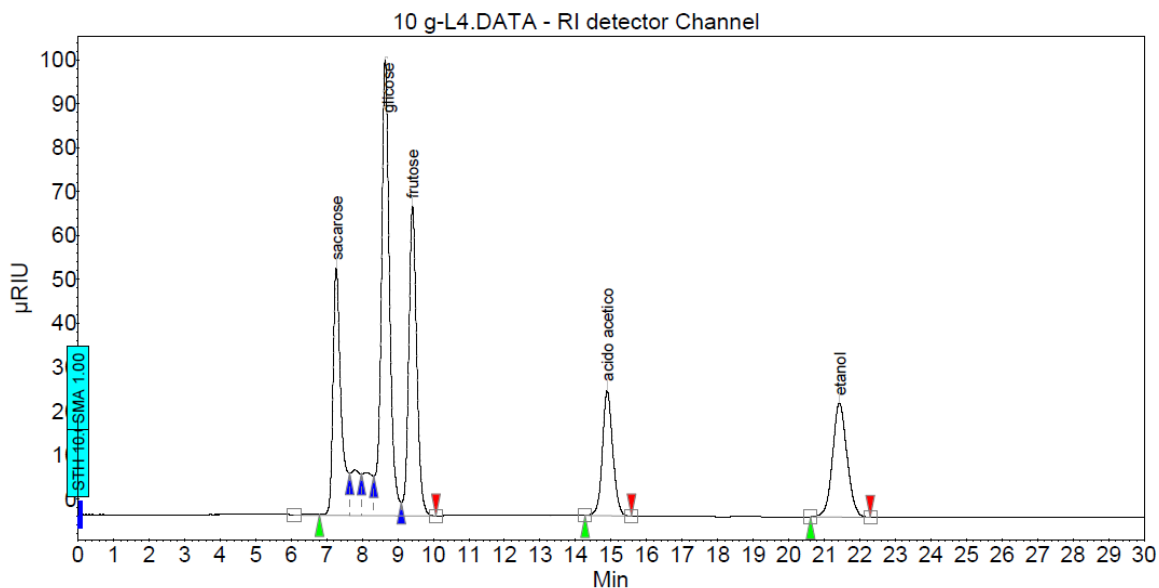


Figura 10. Cromatograma obtido pela injeção do ponto  $10 \text{ g.L}^{-1}$  da curva de calibração.

Para acompanhar o consumo de substrato e a formação de etanol no fermentado alcoólico, recolheram-se alíquotas do mesmo nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 132 horas nomeando-os  $B_0$ ,  $B_2$ ,  $B_4$ ,  $B_6$ ,  $B_8$  e  $B_{11}$  respectivamente. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Quantificação de açúcares e do etanol.

	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol (g/L)
$B_0$	176,60	22,60	26,30	16,00
$B_2$	24,50	80,80	127,0	31,00
$B_4$	23,80	34,60	83,80	38,80
$B_6$	23,20	30,50	74,10	51,30
$B_8$	24,70	17,60	58,70	57,00
$B_{11}$	24,40	9,70	35,40	64,30

É possível concluir que há um aumento considerável dos teores de frutose e glicose e diminuição do teor da sacarose nas primeiras 24 horas do processo fermentativo. Isso acontece, pois a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é produtora da enzima invertase, e esta é responsável por transformar a sacarose em açúcar invertido, composto de glicose e frutose. Sendo assim, durante a fermentação

alcoólica é aceitável a redução do conteúdo de sacarose e relativo aumento dos conteúdos de frutose e glicose.

Os cromatogramas obtidos quando foram analisados os tempos 0 e 132 horas apresentaram-se visualmente diferentes (Figura 11). É possível afirmar apenas observando os cromatogramas que a sacarose é o açúcar majoritário no início da fermentação alcoólica e que ao final do processo de fermentação, a sacarose foi consumida, observando-se redução de 86,2%, e os teores de glicose e frutose aumentaram.

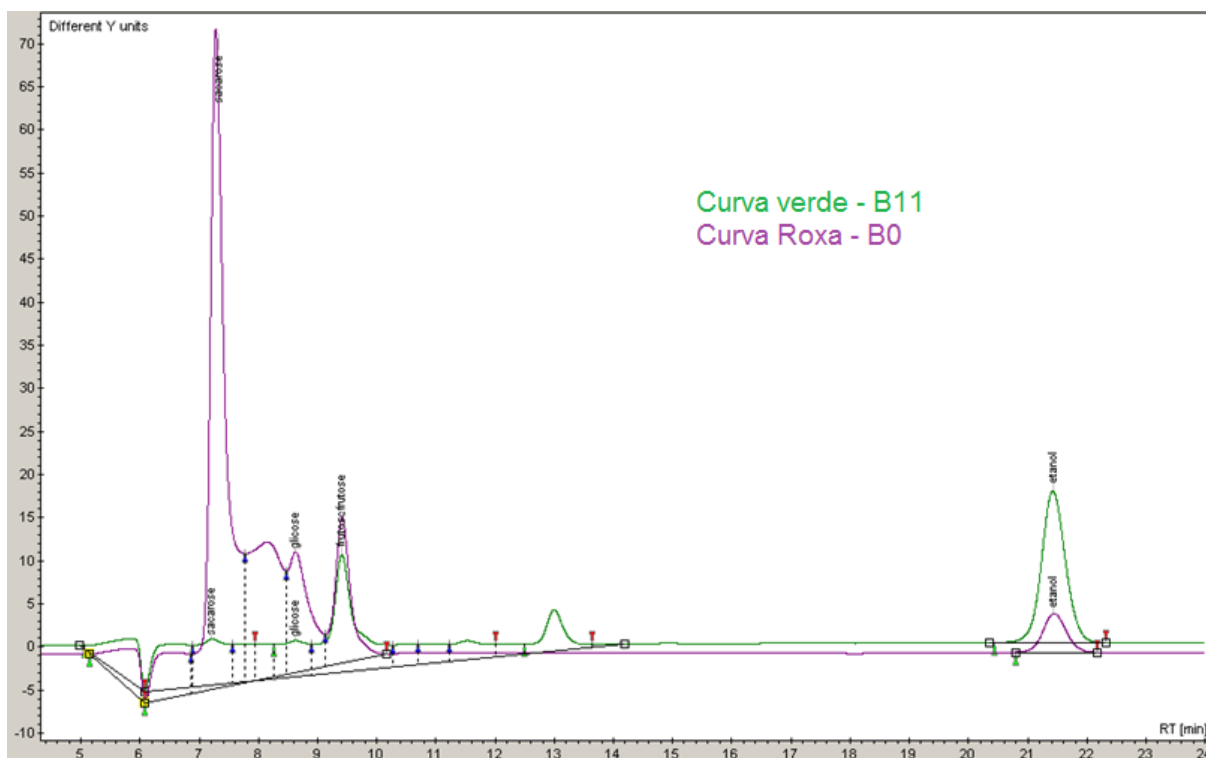


Figura 11. Cromatogramas sobrepostos das amostras B<sub>0</sub> e B<sub>11</sub>

Como visto na Figura 11 e apresentado na Tabela 4, o ácido acético não foi identificado. Esse fato demonstra que não houve contaminação do mosto por microrganismos produtores de ácido, bem como não houve desvio da fermentação alcoólica. Observa-se também que no tempo 0, ou seja, no momento que a levedura é inoculada no mosto, há uma concentração de 16 g/L de etanol, isto pode ser explicado de duas formas, ou durante o tempo que o bagaço de maçã ficou armazenado ele começou a fermentar, ou havia etanol retido de outras análises na coluna do CLAE.

Estudando os cromatogramas e principalmente a comparação destes entre o início e o fim do processo, é possível afirmar que houve uma fermentação alcoólica, ocorrendo todos os mecanismos da fermentação.

#### 5.4 TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO EXTRATO AQUOSO DE BAGAÇO DA MAÇÃ E FERMENTADO ALCOÓLICO

##### 5.4.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais obtidos para o EAB foi de 177,2 mg EAG.100g<sup>-1</sup>, indicando que o conteúdo de compostos fenólicos que permanece no bagaço da maçã é significativo quando comparado com outros frutos e bagas. Segundo Sun et al. (2002), na maçã fresca, o conteúdo de fenólicos totais é em média de 296,3 mg EAG.100 g<sup>-1</sup>, enquanto que Kim, Jeong e Lee (2003) encontraram valores de 118,0 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> (base seca) em maçã cv. Gala.

Em estudo realizado por Soares, et al (2008) foi determinado um teor de 120,0 mg EAG.100g<sup>-1</sup> em extrato aquoso de bagaço de maçã obtidos em condições similares de extração.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão para fenólicos totais obtidos para o EAB e fermentado alcoólico.

Amostras	mg EAG.100g <sup>-1</sup>
Extrato aquoso	177,2 ± 7,55
Fermentado alcoólico	55,58

n=3

Melo (2010) realizou a determinação de compostos fenólicos em alguns resíduos industriais, e observou teor de 56 ± 0,01 mg EAG.100g<sup>-1</sup> e 188 ± 0,06 mg EAG.100g<sup>-1</sup> para os extratos aquosos de malte e bagaço de goiaba respectivamente, resultados semelhantes aos obtidos neste estudo.



Entretanto, é possível afirmar que extrair os fenólicos totais com água demonstra-se menos eficiente do que usar um sistema extrator utilizando alcoóis ou acetona. Ainda no trabalho de Melo (2010) são analisados os bagaços de malte e goiaba usando o solvente etanol 80% para extração dos fenólicos totais, e a pesquisadora encontrou valores de  $135 \pm 0,12 \text{ mg EAG.100g}^{-1}$  para o malte e  $341,0 \pm 0,09 \text{ mg EAG.100g}^{-1}$  para o bagaço de goiaba. No estudo relatado por Soares et al (2008), a extração com acetona na concentração de 100% do resíduo seco do bagaço apresentou conteúdo de fenólicos de  $522,74 \text{ mg EAG.100g}^{-1}$ .

O teor de compostos fenólicos obtidos para o fermentado alcoólico foi de  $55,58 \text{ mg EAG.100g}^{-1}$ , inferior ao encontrado para o extrato aquoso do bagaço de maçã. Uma das causas para essa redução de teores de compostos fenólicos pode ser explicado através da degradação destes compostos pela atividade microbiana.

#### 5.4.2 Determinação da Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, foram utilizados três métodos distintos de análise, utilizando métodos de sequestro dos radicais  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  e  $\text{DPPH}^{\cdot}$  e pela redução do ferro (FRAP) (Tabela 6).

Tabela 6. Médias e desvio padrão para Atividade Antioxidante do EAB e fermentado alcoólico

<b>Amostras</b>	<b>DPPH <math>\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}</math></b>	<b>ABTS <math>\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}</math></b>	<b>FRAP <math>\mu\text{mol Fe}^{+2}.\text{g}^{-1}</math></b>
Extrato Aquoso	$7,96 \pm 0,94$	$28,16 \pm 3,18$	$14,54 \pm 1,69$
Fermentado alcoólico	1,54	5,64	4,78

n=3

De acordo com o método de sequestro do radical  $\text{DPPH}^{\cdot}$  o valor TEAC foi de  $7,96 \pm 0,94 \mu\text{mol.g}^{-1}$  corroborando com o resultado apresentado por Soares et al (2008), que encontrou um valor de  $7,43 \pm 0,43 \mu\text{mol.g}^{-1}$  em extrato produzido a partir do bagaço de maçã seco em estufa a  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}/2\text{min}$ , com o objetivo de inativar enzimas, e utilizando como sistema extrator acetona:água 75:25.

A atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  para o bagaço de maçã gerou uma média de  $28,16 \pm 3,18 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ . SOARES et al,

(2008) encontraram valor de  $4,83 \pm 0,30 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$  obtido com extrato do bagaço de maçã produzido com sistema extrator acetona:água 75:25. As diferenças podem ser explicadas pela utilização de metodologias de extração distintas.

Para a atividade antioxidante avaliada pelo método de redução do ferro (FRAP) não foram encontrados estudos na literatura, justificando assim a importância da realização deste estudo. Para a atividade antioxidante do fermentado alcoólico é visível que seus valores são menores à capacidade antioxidante do bagaço de maçã com uma média de 74,2% inferior para os três métodos distintos de sequestro dos radicais, e baseando-se na explicação relatada anteriormente para os compostos fenólicos, sugere-se que houve deterioração dos compostos antioxidantes pela atividade microbiana, igualmente.

É possível concluir que o EAB apresenta boa atividade antioxidante enquanto que o fermentado alcoólico apresentou menor bioatividade em relação a compostos fenólicos e atividade antioxidante, sendo que o bagaço da maçã é fonte de compostos bioativos.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o subproduto do processamento da maçã, o bagaço de maçã, apresenta um valor considerável de atividade antioxidante e de compostos fenólicos totais. Ao realizar a fermentação alcoólica, obteve-se um bom rendimento de produção de etanol por substrato consumido, podendo ser considerado o aproveitamento do fermentado alcoólico para posterior produção de fermentado acético (vinagre). Ao comparar os resultados da atividade antioxidante entre o bagaço de maçã e o fermentado alcoólico, percebeu-se uma redução dos teores de capacidade antioxidante do primeiro para o segundo, demonstrando que a atividade microbiológica gera degradação nesses compostos. Todos os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando que o resíduo agroindustrial analisado, obtém um valor considerável de compostos bioativos, por conseguinte potenciais fontes alternativas para aplicação na indústria de alimentos.

## 7 REFERÊNCIAS

ABID, M.; JABBAR, S.; WU, T.; HASHIM, M.; LEI, B.; ZHANG, X. ZENG, X. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonic Sonochemistry*, v. 20, p. 1182–1187, 2013.

AQUINO, F.; BENITEZ, R. Cadera produtiva da maçã. Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. Porto Alegre. 2005.

BARROS, Z. Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidantes para enriquecimento de suco pronto. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2011.

ALBUQUERQUE, P. Estudo da produção da proteína microbiana a partir do bagaço da maçã. Dissertação (Pós-graduação) – Programa de Pós-graduação de Engenharia de Alimentos – UFRGS. Florianópolis, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – food Science and Technology**. London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

COLLIN, C. BRAGA, G. BONATO, P. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

FERREIRA, P. Yes, nós temos maçã. *Inovação Em Pauta. Agronegócio*, v. 5, p. 43-47, 2005.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. *Publicado UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Edição IV. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JOSHI, V. K.; SANDHU, D. K. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology*, v.56, n.2-3, p.251-255, 1996.

KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 321-326, 2003.

KREUZ, C.; SOUZA, A.; PETRI, J.; CARVALHO, L. Análise da rentabilidade da cultura da macieira em duas cultivares e duas densidades de plantio. *Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural*, XLIII Congresso da Sober, Ribeirão Preto, 2005.

KROLOW, A. C. Preparo artesanal de geleias e geleiadas. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, 2005.

LEE, K.W., KIM, Y.J., KIM, D., LEE, H.J., LEE, C.Y., 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 51,6516–6520.

LOMMEN, A. et al. Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel. *Analytical Chemistry*, v. 72, p. 1793-1797, 2000.

LU, Y.; FOO, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, v. 59, p. 187-197, 1997.

MELO, P. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. Dissertação (Mestrado). Ciências e tecnologia de alimentos. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

MELO, E. MACIEL, M. LIMA, V. NASCIMENTO, R. Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*. v. 44, n. 2, 2008.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 26, n. 2, p. 187-194, 2005.

OLDONI, T. Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais. Tese (Doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, S. Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; CHIQUETTO, N.; WOSIACKI, G. Aproveitamento de bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 29, n. 6, p. 1231-1238, 2005.

PETRI, J.; LEITE, G.; COUTO, M.; FRANCESCATTO, P. Avanços na cultura macieira do Brasil. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. Especial, p. 048-056, 2011.

RIZZON, L.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características Analíticas dos Sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 25(4), p. 750-756, 2005.

ROCKENBACK, I. Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

SATO, M. F.; VIEIRA, R.; ZARDO, D.; FALCÃO, L.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI G.; Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. *Universidade Estadual de Ponta Gross*, v. 32, p. 29-35, 2010.

SILVA, M.; COSTA, R.; SANTANA, A.; KOBLITZ, M. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SINGLETON, Vernon. L.; ORTHOFER, Rudolf.; LAMUELA, Rosa. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, M. WELTER, L. GONZAGA, L. LIMA, A. FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 28, p. 727-732, 2008.

SOARES, M. WELTER, L. GONZAGA, L. LIMA, A. FETT, R. Composição do conteúdo de ácidos fenólicos no bagaço da maçã. *Ciencias Agrárias, Londrina*, v. 29, p. 339-348, 2008.

STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation e detection methods for phenolic acid and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v. 30, n. 18, p. 3268 - 3295, december, 2007.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

TEXEIRA, F. SILVEIRA, E. BEIRA, F. PINO, F. BRAGANHOL, E. VIZZOTO M. Compostos antioxidantes de extrato de maçã, cv. Gala, promovem diminuição da viabilidade de melanoma em cultura e induzem morte celular via processo de necrose. XIV ENPOS - Encontro de Pós-Graduação UFPEL, 2012.

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H.. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). *Química nova*. v.29. n.3. p. 489-492. 2006.

XAVIER, Daniela; IVANOV, Raphael, C. ;CUNHA Mário A.A.; Pereira, EDIMIR A. Produção e caracterização de vinagre de fisalis. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*. Campo Mourão, v.2, n.2, p. 27-32, 2011.

VILLEN, R. A. Mauá: Biotecnologia – Histórico e Tendências. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila, 2009. Disponível em: <http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid-state production of beneficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.783-787, 1998b.