

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

KELY PRISCILA DE LIMA

**PRODUÇÃO DE VINAGRE COMO ESTRATÉGIA DE
APROVEITAMENTO TECNOLÓGICO DA AMORA-PRETA:
AVALIAÇÃO DO PROCESSO SUBMERSO E DO PROCESSO LENTO**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2014

KELY PRISCILA DE LIMA

**PRODUÇÃO DE VINAGRE COMO ESTRATÉGIA DE APROVEITAMENTO
TECNOLÓGICO DA AMORA-PRETA:
AVALIAÇÃO DO PROCESSO SUBMERSO E DO PROCESSO LENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Carla Adriana Pizzarro Schmidt.

PATO BRANCO

2014

L732p Lima, Kely Priscila de

Produção de vinagre como estratégia de aproveitamento tecnológico da amora-preta: avaliação dos processos submerso e do processo lento. –Pato Branco: UTFPR, 2014.

117 f. il. 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Co-Orientador: Prof. Dra. Carla Adriana Pizarro Schimidt

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, 2014.

Bibliografia p. 96-113

1. Vinagre. 2. Amora-preta. 3. Fermentação. 4. Bioativos. 5. Antioxidantes. I. Cunha, Mário Antônio Alves da, orient. II. Schmidt, Carla Adriana Pizarro, Co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD 22^a ed. 540



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 10

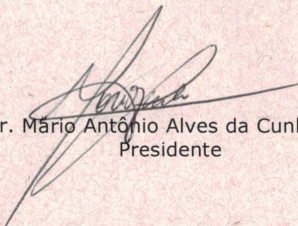
Título da Dissertação

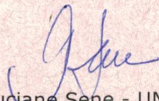
Produção de vinagre como estratégia de aproveitamento tecnológico da amora-preta: avaliação do processo submerso e do processo lento

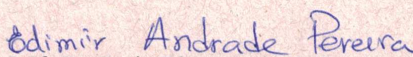
Autora

Kely Priscila de Lima

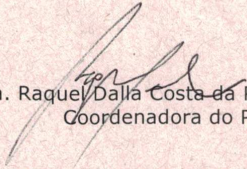
Esta dissertação foi apresentada às 13 horas e 30 minutos do dia 30 de janeiro de 2014, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Química Biotecnológica – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.


Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha – UTFPR
Presidente


Prof. Dra. Luciane Sene – UNIOESTE
Examinadora


Prof. Dr. Paulo Edimir Andrade Pereira – UTFPR
Examinador

Visto da Coordenação


Prof.ª Dra. Raquel Daila Costa da Rocha
Coordenadora do PPGTP

Prof.ª Dr.ª Raquel Daila Costa da Rocha
Coordenadora do Programa de Mestrado
em Tecnologia de Processos
Químicos e Bioquímicos
UTFPR – Câmpus Pato Branco

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas conquistas, dificuldades, desafios, alegrias, tristezas apresentados ao longo de minha caminhada. Agradeço por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho as quais agregam crescimento em minha vida.

Agradeço a minha família, especialmente minha mãe Iria Horn, uma guerreira; minha irmã Denise Aparecida de Lima e meu irmão Walter Marcelo de Lima os quais são minha base e meu alicerce. Obrigada por apoiarem minhas decisões e estarem ao meu lado em todos os momentos.

Gostaria também de agradecer meu namorado Diego Favero que está ao meu lado dando força e ajudando nos momentos em que necessito, assim como proporcionar muitos momentos de felicidade.

Agradeço meu orientador Dr. Mário Antônio Alves da Cunha que com enorme conhecimento, ética, paciência, dedicação, perseverança, fé e confiança conduziu-me da melhor maneira possível na construção deste trabalho. Trabalho no qual foram enfrentados muitos desafios. Obrigada professor pelos conhecimentos que a mim foram repassados, levarei para toda vida.

Agradeço a minha co-orientadora professora Dr.^a Carla Adriana Pizzarro Schmidt, uma professora muito querida, que me auxiliou em várias etapas deste processo, repassando seu conhecimento com dedicação e paciência.

Gostaria também de agradecer ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) e em especial a minha gerente Márcia Painim por ter me apoiado no decorrer de todo o caminho até esta conquista.

A Otto Heinz, meu especial agradecimento, pois pude contar com uma pessoa que sei que posso chamar de amigo. Pois mesmo sem nos conhecermos no início das atividades demonstrou grande comprometimento, dedicação, paciência e conhecimento. Destaco em especial as madrugadas que ele teve que ficar acordado para realizar as coletas de amostras dos vinhos e vinagres. Assim como ajuda aos

sábados, domingos e feriados que tínhamos que ficar no laboratório fazendo análises.

Agradeço a todos os professores que tive no Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, os quais com amor a profissão, além de dedicação repassaram novos conhecimentos, que serviram de base para este trabalho.

Agradeço à professora Tatiane Oldoni e a Cintia que auxiliaram nos protocolos junto ao HPLC.

Quero agradecer também a Roberta Roncati, Mariéli Karling, Daniele Reineri pelos auxílios e toda a equipe do Laqua que gentilmente cederam espaço para a realização dos ensaios laboratoriais.

Às minhas lindas e queridas amigas Regiane Lanzarin e Maira Casagrande pelos momentos de risadas, assim como de indignação e de trabalhos juntas.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma apoiaram, auxiliaram seja de forma direta ou indireta na execução e construção do presente trabalho.

RESUMO

LIMA, Kely Priscila de. Produção de Vinagre como Estratégia de Aproveitamento Tecnológico da Amora-Preta: Avaliação dos Processos Submerso e do Processo Lento. Ano de defesa: 2014. 120 folhas. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

A amora-preta (*Rubus* sp.) faz parte do grupo das chamadas “pequenas frutas” e apresenta propriedades nutricionais relevantes, como elevados conteúdos de sais minerais, vitaminas e compostos bioativos com atividades biológicas. Tais compostos podem auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, retinopatia diabética, doença fibrocística e desordens da visão entre outros males. No entanto, a fruta apresenta estrutura frágil e elevada atividade respiratória que resulta em vida de prateleira reduzida. Desta forma, é tecnicamente importante o desenvolvimento de produtos derivados que mantenham as propriedades nutricionais e compostos bioativos da fruta. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo o aproveitamento tecnológico da amora-preta no desenvolvimento de vinagres através dos processos submerso e lento com ciclos sucessivos de acetificação. Inicialmente foi produzido fermentado alcoólico em biorreator de bancada e na sequência foram produzidos fermentados acéticos em vinagreira de grábia e biorreator de bancada. Na fermentação alcoólica foi empregada cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* e na fermentação acética, cepas selvagens de bactérias ácido-acéticas isoladas de vinagre colonial no município de Pato Branco. No processo de fermentação alcoólica foram observados rendimento de 0,39 g/g, produtividade volumétrica em etanol de 1,77g/Lh e eficiência de 75,5%, bem como elevados conteúdos de polifenóis (983,35 mg GAE/100g e 1.702,52 mg GAE/100g). Nos ciclos sucessivos de acetificação conduzida em vinagreira foi obtida produção média de 51,6 g/L de ácido acético, rendimento em ácido acético de 72,2% e produtividade volumétrica de 0,4 g/Lh. Por outro lado, menores valores de produção média de ácido acético (42,26 g/L) e rendimento (70,2%) foram observados no processo de acetificação conduzido em biorreator de bancada. Elevados conteúdos de polifenólicos, antocianinas e elevada atividade antioxidante foram observados nos vinagres obtidos em ambos os processos de produção. Os vinagres produzidos a partir de amora-preta podem ser considerados vinagres do tipo gourmet que apresentam potencial funcional e a transformação da fruta em vinagre pode ser uma estratégia de agregação de valor a cadeia produtiva colaborando para disseminação da cultura no Brasil.

Palavras-chave: *Rubus* sp. Fermentado Acético. Bioativos. Antioxidantes. Fenólicos. Antocianinas. Vinho.

ABSTRACT

LIMA, Kely Priscila de. Production of vinegar as technological exploitation strategy of blackberry: Evaluation of the submerged and slow processes. Ano de defesa: 2014. 38 folhas. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

Blackberry (*Rubus* sp) is part of the so-called berries, presenting remarkable nutritional features, such as high content of mineral salts, vitamins and bioactive compounds with biological activity. Such compounds may aid in the prevention of cardiovascular diseases, cancer, diabetic retinopathy, fibrocystic and eye diseases, among others. Nevertheless, blackberry presents a fragile structure and a high respiratory activity, resulting in reduced shelf-life. In this way, it is important, from a technological viewpoint, to develop new products derived from blackberry which preserve the fruit original nutritional quality and bioactive compounds. Thus, the present work aimed at the technological utilization of blackberry for developing vinegar by means of the submerged and the slow processes with successive cycles of acetification. Initially, an alcoholic fermented product was obtained in stirred tank bioreactor. Subsequently, acetic fermented products were obtained either in a grapia (Brazilian ash) vinegar barrel or in a bench bioreactor. In the alcoholic fermentation, an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* was used. In the acetic fermentation, wild strain of acetic acid bacteria isolated from colonial vinegar from Pato Branco city was used. The alcoholic fermentation presented yield of 0.39 g/g, volumetric productivity of 1.77 g/Lh and efficiency of 75.5%, besides high polyphenol contents (983.35 mg GAE/100g and 1702.52 mg GAE/100g). In the successive acetification cycles performed in grapia barrel, average production of 51.6 g acetic acid/L, yield of 72.2% (as acetic acid) and volumetric productivity of 0.4 g/Lh were observed. On the other hand, the acidification performed in bench bioreactor presented lower values of average production (42.26 g acetic acid/L) and yield (70.2%). High polyphenols and anthocyanins content along with high antioxidant activity were observed in the vinegars obtained by both production processes. Vinegars produced from blackberry can be considered gourmet vinegars with high functional potential. The transformation of blackberry into vinegar might be a strategy of value addition to the production chain, contributing for spreading this culture in Brazil.

Keywords: *Rubus* sp. Acetic Fermented Product. Bioactive compounds. Antioxidant compounds. Phenolics. Anthocyanins. Wine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Amoreira-preta (<i>Rubus sp.</i>).....	16
Figura 2: Amora-preta (<i>Rubus sp.</i>)	17
Figura 3: Amora-verde (<i>Rubus erythroclados</i>)	17
Figura 4: Polpa congelada de amora-preta.	20
Figura 5: Geleia de Amora-preta.....	20
Figura 6: Néctar de amora-preta.....	20
Figura 7: Iogurte de amora-preta.....	20
Figura 8: Chá de amora-preta	20
Figura 9: Picolé de amora-preta.....	20
Figura 10: Vinho de amora-preta	20
Figura 11: Vinagre de amora-preta	20
Figura 12: Estruturas dos flavonoides.....	23
Figura 13: Barril utilizado para elaboração de vinagre	34
Figura 14: Acetificador do tipo <i>Frings</i> em aço inoxidável.	35
Figura 15: Biorreator de bancada Biostat B	40
Figura 16: Preparo do inóculo para a fermentação alcoólica	42
Figura 17: Preparo do inóculo para a fermentação acética.....	42
Figura 18: Processamento da amora-preta em multiprocessador	43
Figura 19: Mosto obtido da amora-preta na cuba do fermentador.	43
Figura 20: Vinagreira (barril acetificador) de madeira grápia.....	49
Figura 21: Fermentação acética em fermentador de bancada.....	50
Gráfico 1 A E 1 B: Crescimento microbiano versus consumo de açúcares e Parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica.....	68
Gráfico 2: Curvas de consumo etanol e produção de ácido acético na fermentação acética em barril acetificador realizada em três ciclos sucessivos.	77
Gráfico 3: Acompanhamento do pH e acidez durante fermentação acética em barril acetificador de grápia.....	80
Gráfico 4: Curva de consumo de etanol e produção de ácido acético na fermentação acética conduzida em biorreator (método submerso).....	87
Gráfico 5: Perfil da produção de ácido acético e mudança de pH no decorrer da fermentação acética em biorreator	89
Anexo A: Curva padrão de ácido gálico para determinação de compostos fenólicos totais	112

Anexo B: Curva padrão de DPPH para determinação de atividade antioxidante pelo método DPPH.....	113
Anexo C: Curva padrão de trolox para determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS	114
Anexo D: Curva padrão de glicose para determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do fermentado acético de fruta.....	31
Tabela 2: Composição proximal dos frutos de Amora-preta (<i>Rubus sp.</i>)	61
Tabela 3: Compostos bioativos na amora-preta	63
Tabela 4: Parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica.....	71
Tabela 5: Caracterização físico-química do fermentado alcoólico de amora-preta.	72
Tabela 6: Parâmetros fermentativos do fermentado acético de amora-preta produzido em vinagreira	79
Tabela 7: Caracterização físico-química do fermentado acético de amora-preta produzido em vinagreira.....	81
Tabela 8: Parâmetros fermentativos da fermentação acética em biorreator	90
Tabela 9: Caracterização físico-química vinagre de amora-preta produzido em biorreator.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico)
ART	Açúcares Redutores Totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIAN-3-GLIC	Cianidina-3-glicosídeo
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
GAE	Equivalente Ácido Gálico
GK	Gesammte Konzentration
GY	Glicose Yeast Malte
η	Eficiência
Q_p	Produtividade Volumétrica
TEAC	Atividade Antioxidante Equivalente Trolox
V	Vinho Amora-preta
VV1B	Vinagre Vinagreira Primeira Batelada
VV2B	Vinagre Vinagreira Segunda Batelada
VV3B	Vinagre Vinagreira Terceira Batelada
VB1B	Vinagre Biorreator Primeira Batelada
VB2B	Vinagre Biorreator Segunda Batelada
VB3B	Vinagre Biorreator Terceira Batelada
YPD	Yeast Peptone Dextrose
$Y_{P/S}$	Rendimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Amora preta	16
2.2 Compostos bioativos em amora preta: compostos fenólicos, antocianinas e compostos antioxidantes	21
2.3 Fermentação alcoólica.....	24
2.4 Vinagre	28
2.5 Processos de produção de vinagre: processo submerso e processo lento	32
2.6 Panorama socioeconômico da agricultura familiar na região Sudoeste do Paraná.....	35
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Matérias-primas	39
4.1.1 Amora-preta.....	39
4.1.2 Micro-organismos.....	39
4.1.3. Sais minerais e reagentes químicos.....	39
4.2 Descrição do biorreator utilizado na fermentação alcoólica	40
4.3 Procedimento experimental.....	40
4.3.1 Preparo do inóculo para as fermentações alcoólica e acética.....	40
4.4 Fermentação alcoólica.....	42
4.4.1 Preparo do Mosto e Fermentação	42
4.4.2 Cálculo do rendimento, produtividade e eficiência da fermentação alcoólica	45
4.5 Fermentação acética.....	47
4.5.1 Cálculo do rendimento e produtividade das fermentações acéticas.....	50
4.5.2 Tratamento final do vinagre	51
4.6 Determinações analíticas	51
4.6.1 Preparo dos extratos para determinações de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante	52
4.6.2 Compostos fenólicos.....	53
4.6.3 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH	53
4.6.4 Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical ABTS ^{•+}	54

4.6.5 Antocianinas	55
4.7 Caracterização química-bromatológica da amora-preta	55
4.7.1 Umidade.....	55
4.7.2 Lipídios ou extrato etéreo (extração por Soxhlet)	56
4.7.3 Proteínas Método Kjeldahl clássico.....	56
4.7.4 Resíduo mineral.....	57
4.7.5 Fibra bruta	57
4.7.6 pH.....	57
4.7.7 Acidez titulável	57
4.7.8 Acidez volátil.....	57
4.7.9 Sólidos Solúveis Totais (°Brix).....	58
4.7.10 Açúcares redutores totais	58
4.7.11 Determinação de glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético	59
4.7.12 Anidrido sulfuroso SO ₂ - Livre.....	59
4.7.13 Anidrido sulfuroso total – SO ₂ (Ripper).....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Caracterização físico-química da amora-preta	61
5.2 Determinação de compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante na fruta.....	63
6. Fermentação alcoólica	67
6.1 Acompanhamento da biomassa celular e consumo de substrato durante fermentação alcoólica	68
6.2 Caracterização físico-química do vinho de amora-preta	72
7. Fermentação acética conduzida em vinagreira de grábia.....	77
7.1 Perfil do pH e conteúdo de ácido acético no decorrer da fermentação acética	80
7.2 Caracterização físico-química do fermentado acético obtido em vinagreira.....	81
8. Fermentação acética conduzida em biorreator de bancada	87
8.1 Perfil pH e conteúdo de ácido acético no decorrer da fermentação acética (Submersa)	89
8.2 Caracterização físico-química do vinagre de amora-preta obtida em biorreator (método submerso).....	91
9. CONCLUSÃO	94
10. REFERÊNCIAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de pequenas frutas como amora-preta, mirtilo, framboesa, uvaia, assim como, espécies nativas como pitanga, araçá, goiaba podem ser uma excelente opção de cultivo e de rendimento econômico especialmente para propriedades rurais de base familiar devido à rusticidade do cultivo, às propriedades nutricionais e ao valor dos produtos agregados a esta produção.

A amora-preta faz parte do grupo das chamadas “pequenas frutas”, apresentando propriedades nutricionais relevantes, como elevados conteúdos de sais minerais e vitaminas, além de conterem quantidades apreciáveis de biomoléculas funcionais com alto potencial comercial. No entanto, assim como muitas frutas produzidas no Brasil, tem um período de vida pós-colheita bastante curto por apresentar elevada atividade respiratória.

Estudos relatam que o extrato de amora-preta auxilia no combate ao câncer de útero, cólon, boca, mama, próstata e pulmão. O extrato de amora-preta previne ainda a formação da metástase, ou seja, evita que o câncer se espalhe e se instale em outros órgãos, assim como é observado efeito anti-inflamatório, o que torna esta fruta bastante interessante, pois pesquisas indicam que o câncer está relacionado a um processo de inflamação crônica.

Existem poucos trabalhos na literatura direcionados ao aproveitamento da amora-preta como matéria-prima para produção de vinagres e igualmente não foram verificados no mercado consumidor brasileiro tal produto. Nesse sentido, é relevante a transformação da fruta em produtos derivados de maior valor agregado como, por exemplo, o vinagre visando o aproveitamento das propriedades funcionais da fruta.

Similarmente, também existem poucos trabalhos na literatura científica direcionados a caracterização e quantificação dos compostos bioativos presentes em vinhos de frutas e seus derivados, a fim de avaliar a capacidade antioxidante destes.

Em escala industrial, a maior parte do vinagre brasileiro é produzido a partir de vinhos de qualidade inferior ou álcool etílico, através do processo submerso, que tem como característica ser um processo rápido com elevadas produtividades. No entanto, os vinagres produzidos a partir de frutas e especialmente através do

processo lento comumente apresentam melhor qualidade e melhor aceitação sensorial. Dessa forma, no presente trabalho foi proposto o estudo da produção e caracterização de vinagre a partir da amora-preta através dos processos submerso conduzido em biorreator de bancada e lento em vinagreira de madeira de grápia usando bactérias ácido acéticas isoladas do município de Pato Branco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amora preta

A amora (*Rubus* sp.) pertence à família Rosaceae e ao gênero *Rubus*, e faz parte de um grupo diverso e bastante difundido, no qual existe em torno de 400 a 500 espécies, conhecidas como *berries*. O termo *berry* vem sendo usado comumente para descrever qualquer fruta pequena, de sabor adocicado e formato arredondado, incluindo framboesas e amoras-pretas cultivadas na América, Europa, África e Ásia (FERREIRA et al. 2010).

A amoreira-preta é uma planta que possui porte ereto ou rasteiro e forma arbustiva (Figura 1). As principais cultivares comerciais apresentam espinhos e produzem frutos de 4 a 7 gramas com coloração negra de sabor ácido-adocicado a ácido. Seu fruto verdadeiro é chamado de drupa, possui uma pequena semente (Figura 2), e são ricos em compostos funcionais, como ácido elágico e antocianinas (HIRSCH, 2011).



Figura 1 - Amoreira-preta (*Rubus* sp.)

Fonte: Autora (2011)



Figura 2: Amora-preta (*Rubus* sp)
Fonte: Autora (2011).



Figura 3: Amora-verde (*Rubus erythroclados*)
Fonte: Autora (2011)

Amoras são cultivadas em regiões com clima ameno (200 horas de frio/ano), a regiões com clima de frio extremo (mais de 1.000 horas com frio com temperaturas inferiores a 7,2 °C). A altitude também influencia a época de floração, sendo que o início da floração retarda de oito a dez dias a cada 300 m de aumento da altitude. Quanto aos solos, aqueles onde há boa drenagem, com boa capacidade de retenção de água e bom teor de matéria orgânica são os mais apropriados sendo que os solos ligeiramente ácidos com pH em torno de 5,5 e 6,0 são os melhores para a amoreira-preta (PAGOT et al. 2007).

No Brasil a amoreira é uma planta nativa, ocorrendo cinco espécies da mesma: *Rubus urticaefolius*, *Rubus erythroclados* (Figura 3), *Rubus brasiliensis*, *Rubus sellowii* e *Rubus imperi* as quais produzem frutos com as colorações branca, rosa, vermelha ou preta (JUNIOR, 2010). A introdução de variedades melhoradas foi iniciada a partir de 1972, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado, a partir de cultivares americanas, como *Brazos*, *Comanche* e *Cherokee* oriundos da Universidade de Arkansas, Estados Unidos (ARAÚJO, 2009; VIZZOTO; PEREIRA, 2011).

Atualmente a variedade mais conhecida é a Tupy e em menor escala a Guarany e a Brazos, quanto ao plantio este é realizado em algumas regiões do Brasil, como no estado do Rio Grande do Sul, Sul de Minas Gerais, em Jundiaí no estado de São Paulo, em Curitiba e em Palmas no estado do Paraná (FERREIRA, et al, 2010).

A cultivar Tupy corresponde a 70% do plantio da fruta no estado do Rio Grande do Sul, com produtividade podendo alcançar até 10.000 kg/ha/ano e sua florada inicia no final do mês de agosto até a segunda dezena do mês de setembro, enquanto que a colheita é realizada na terceira dezena de novembro à segunda de dezembro (RASEIRA; SANTOS, 2009 e SANTIAGO, 2010).

No estado do Paraná a produção da amora ainda é pequena, sendo observada maior produtividade com a cultivar Tupy (10 toneladas/hectare/ano) do que a cultivar Xavante (6 toneladas/hectare/ano), sendo, portanto a cultivar Tupy mais promissora para o estado do Paraná (OLIVEIRA, 2010).

A produção e o consumo de *berries* no contexto internacional apresenta um crescimento constante nos últimos quinze anos. A produção mundial das pequenas frutas representa quase sete milhões de toneladas ao ano, um número insignificante se comparado com a oferta global de frutas, no entanto, estas frutas se diferenciam das demais pelo valor agregado e pelo aumento da procura entre os consumidores de elevado poder aquisitivo que valorizam suas propriedades nutricionais. As pequenas frutas são consumidas principalmente na América do Norte onde o consumo tem aumentado de 4 a 5% anualmente (CAMINITI, 2008).

De acordo com Wu et al. (2010) a produção das pequenas frutas nos Estados Unidos no ano de 2005 foi de 35.099 toneladas, sendo o país que apresentou a maior produção mundial. Estes autores ainda citam que esta fruta apresenta extrema fragilidade e uma taxa respiratória pós-colheita alta fazendo com que se deteriore rapidamente e apresente vida de prateleira curta.

No Brasil a produção da amora-preta teve início na década de 70, onde foram introduzidas novas cultivares e atualmente com produção mais concentrada nos estados de Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais (HIRSCH et al. 2012; ANTUNES, 2002).

Programas de incentivo ao consumo das “berries” vêm sendo criados, um exemplo é o caso do mirtilo nos Estados Unidos, onde o consumo por habitante em 1997 era de 386 g e em 2006 passou para 681 g e foi estimado consumo de 1,3 kg para o ano de 2013. Outro exemplo é o Reino Unido que aumentou em 14% o consumo de *berries* e somente nos últimos sete anos duplicou suas vendas (CAMINITI, 2008).

A amora-preta *in natura* possui em sua composição: água (92%), proteínas (0,95%), fibras (0,28%), cinzas (1,66%), lipídeos (0,53%), carboidratos (4,30%) (LAMEIRO, et al. 2011; HIRSCH et al. 2012; HIRSCH, 2011; JACQUES. JAMBIAZI, 2011). Apresenta ainda conteúdos consideráveis de cálcio (32 mg/100 g); fósforo (21 mg/100 g); potássio (196 mg/100 g); magnésio (20 mg/100 g); ferro (0,57 mg/100 g); selênio (0,60 mg/100 g) e vitamina C (21 mg/100 g). Apresentando apenas 50 Kcal a 55 Kcal em 100 gramas (VIZZOTTO, 2011; JACQUES, JAMBIAZI, 2011). É um fruto extremamente perecível, em função de sua pele frágil e fina e sua elevada taxa respiratória. Desta forma, várias e rápidas mudanças físico-químicas ocorrem nas suas propriedades nutricionais e pode ocorrer crescimento de bolores durante o período pós-colheita. Alguns produtores costumam manter as amoras armazenadas sob refrigeração para manutenção da qualidade e maior rentabilidade. Existem outras tecnologias que podem ser utilizadas como a utilização de filmes e utilização de atmosfera modificada (JOO et al. 2011), no entanto estas podem se tornar inviáveis economicamente ao produtor.

Atualmente as amoras-pretas são transformadas em congelados, produtos enlatados ou processadas em compotas, geleias e sucos com o intuito de se prolongar o armazenamento e para atender os diferentes mercados e exigências dos consumidores (WU et al, 2010). No mercado brasileiro, europeu e americano são verificados diferentes produtos industrializados a partir da amora-preta como polpa congelada (Figura 4), geleias (Figura 5), sucos e néctar (Figura 6), iogurtes (Figura 7), chás (Figura 8), picolé (Figura 9), vinho (Figura 10) e vinagre (Figura 11).



Figura 4: Polpa congelada de amora-preta.
Fonte: <http://www.ricaeli.com.br/polpa-de-fruta-congelada-ricaeli.asp> (2014)



Figura 5: Geleia de Amora-preta.
Fonte: <http://www.paodeacucar.com.br/produto/9808> (2014)



Figura 6: Néctar de amora-preta.
Fonte: <http://heloizamuniznutri.blogspot.com.br/2011/11/receita-suco-omega-3.html>; <http://www.vidaagranel.com/sucos.php> (2014)



Figura 7: logurte de amora-preta.
Fonte: <http://www.distribuicaofoje.com/news.aspx?menuid=56&eid=8032>; <http://www.whatsgoodatarcherfarms.com/2013/01/archer-farms-blackberry-yogurt.html> (2014)



Figura 8: Chá de amora-preta
Fonte: <http://www.natgeoweb.com.br>; <http://tudoverde01.wordpress.com/> (2014)



Figura 9: Picolé de amora-preta
Fonte: <http://frutosdobrasil.com.br/pt/produto/picoles/amora>; http://www.sorvetesvizcaya.com.br/?page_id=19 (2014)



Figura 10: Vinho de amora-preta
Fonte: <http://www.elkcreekvineyards.com/sweet-blackberry-wine-p-468.html>; <http://godshillisleofwight.co.uk/isle-of-wight-cider/blackberry-wine-375cl-pi-83.html> (2014)



Figura 11: Vinagre de amora-preta
Fonte: <http://www.newtwistfoods.co.uk> (2014)

Apesar de ser uma espécie pouco cultivada no Brasil, pode ser uma ótima opção para a diversificação de pequenas propriedades rurais, por ter boa produção e ser rústica, e de acordo com Campagnolo e Pio (2012) seu retorno é rápido tendo como produção de 8.247,62 kg / ha no segundo ano após o plantio e no terceiro, 17.295,24 kg / ha com a cultivar Tupy, em condições subtropicais.

Considerando que a mão-de-obra é essencialmente familiar e no cultivo orgânico, a maior parte dos insumos é gerada na propriedade (adubos e defensivos naturais), a família poderá ter uma renda acima da realidade atual dos minifúndios familiares, o que contribuiria para a manutenção desta no campo.

2.2 Compostos bioativos em amora preta: compostos fenólicos, antocianinas e compostos antioxidantes

Os radicais livres fazem parte da vida e consomem cerca de 3,5 kg de oxigênio por dia. Alguns não estão na forma completamente reduzida o que leva à formação de outros radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido, radical hidroxila, peróxido e alcóxido radical, bem como o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos. Portanto, vários quilogramas de peróxidos e ROS podem ser produzidos no nosso corpo a cada ano, sendo que muitas das doenças podem ser ocasionadas por ROS. Na maioria das vezes o organismo humano saudável neutraliza tais radicais e os ROS por mecanismos antioxidantes de defesa do corpo, incluindo a enzima superóxido dismutase e a biomolécula glutatona, entre outros. No entanto, os sistemas endógenos podem não proporcionar proteção suficiente, em indivíduos que sofrem de certas doenças, em tais casos, a ajuda de fontes dietéticas são importantes como o consumo de frutas e verduras (SHAHIDI,2003).

As pequenas frutas têm despertado a atenção por parte dos produtores e consumidores principalmente pelos benefícios que seus compostos bioativos proporcionam ao organismo humano e de acordo com Jacques et al (2010) “o consumo destas está associado a baixo risco de incidência e mortalidade por câncer

e doenças cardíacas, devido à presença destes compostos, especialmente flavonoides tais como as antocianinas”.

A proteção que frutas e legumes podem proporcionar contra doenças tem sido atribuídas aos vários compostos antioxidantes nelas contidas. Particularmente os polifenóis, os quais mostram efeitos protetores nos processos degenerativos do cérebro e tem ação anti-inflamatória, anticarcinogênica e cardioprotetora (CEREZO, et al. 2008; UBEDA et al. 2011).

De acordo com Machado et al. (2011) os extratos de amora-preta auxiliam na não mutação genética e nos efeitos carcinogênicos, assim como reduzem o colesterol do sangue e previnem doenças cardiovasculares e circulatórias, atuando também no mal de Alzheimer e no diabetes. Estes autores estudaram os compostos antioxidantes em frutas de amora-preta *in natura* logo após sua colheita e em frutas liofilizadas, sendo que estes compostos são bastante instáveis e para se manterem na fruta necessitam de refrigeração e congelamento, desta forma, constataram que a fruta *in natura* possui maiores quantidades de antioxidantes que a fruta liofilizada, sendo 2688 μmol . Trolox/100 g e 2010,02 μmol Trolox/100g, respectivamente

De acordo com Koca, Karadeniz (2009) as antocianinas são o maior grupo de compostos fenólicos na dieta humana, utilizados para vários fins terapêuticos, como tratamento de retinopatia diabética, doença fibrocística e desordens da visão.

Assim como, também têm potencial protetor conta radiação e agentes quimioprotetores, inibe a lipoproteína de baixa densidade humana (LDL), oxidação de lipossomas. Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, tornando os antioxidantes obtidos pela dieta indispensáveis para a defesa do organismo e manutenção da saúde (FERNANDES, et al 2009).

Os compostos fenólicos são compostos derivados do ácido chiquímico e fenilpropanoídica e encontram-se amplamente distribuídos nas plantas como metabólicos secundários, sendo que os principais compostos fenólicos consumidos pela dieta são os flavonóides, ácidos fenólicos e os polifenóis (GONÇALVES, 2008; SHAHIDI e NACZK, 2004).

Os compostos fenólicos são constituídos por um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, os quais conferem capacidade antioxidante tanto para os alimentos como

para o organismo. Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas (Figura 12), dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002).

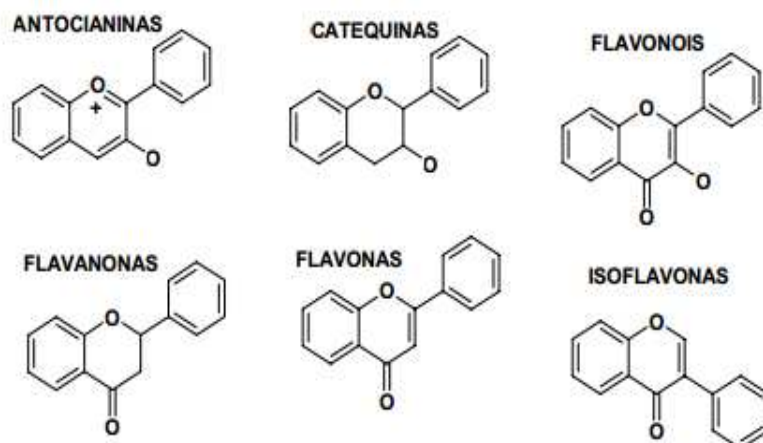


Figura 12: Estruturas dos flavonoides
Fonte: Fennema (2010)

Araújo et al. (2009) enfatizam sobre a funcionalidade dos compostos fenólicos, os quais, assim como os compostos antioxidantes estão ligados à função sequestrante de radicais livre, tornando possível diminuir o índice de doenças como cataratas, câncer, inflamações crônicas e aterosclerose.

O destaque dos compostos fenólicos são as antocianinas onde a cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo são as mais representativas, assim como, estão presentes flavonoides como a quercetina e kamempferol. No entanto a capacidade antioxidante da amora é atribuída aos flavonoides antociânicos, sequestrantes de radicais livres e inibidores enzimáticos (ARAÚJO, 2009).

De acordo com Gancel et al. (2011) as antocianinas são pigmentos coloridos naturais, responsáveis pela coloração azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho e ao mesmo tempo compostos bioativos com benefícios funcionais, tais como a proteção contra lesões do fígado, redução de pressão arterial, melhora da acuidade visual, atividade anti-inflamatória e antimicrobiana e supressão da proliferação de células cancerosas humanas. Estes autores realizaram estudos para quantificar compostos fenólicos, antioxidantes em sucos da amora-preta processada

e constataram que após o processo de branqueamento do suco, os valores de antocianinas cianidina-3-glucosídeo reduziram 52%, e a capacidade antioxidante reduziu quase 47% e relatam que o tempo de armazenamento também contribui para redução de compostos bioativos.

Os compostos antioxidantes são substâncias vitais que possuem a capacidade de proteger o corpo de danos causados por radicais livres induzidos pelo estresse oxidativo. Recentemente tem havido um grande esforço para encontrar potentes antioxidantes naturais que sejam seguros, como fontes inofensivas de antioxidantes naturais a partir de várias fontes vegetais. (ROHMAN et al. 2010).

2.3 Fermentação alcoólica

A biotecnologia produz bens e serviços em diversas áreas, como alimentos, meio ambiente, agropecuário, químico, veterinário, entre outros através do uso de células ou sistemas bioquímicos. As células que utilizamos são os micro-organismos, o quais produzem uma infinidade de enzimas para a catálise de suas reações metabólicas, sendo este potencial catalítico utilizado industrialmente não somente para os processos fermentativos, mas também na biotransformação em reações químicas de difícil ocorrência como os da indústria farmacêutica (MANDIGAN, et al, 2000).

Em se tratando de células microbianas que auxiliam nas biotransformações, as leveduras tem papel importante na produção principalmente de vinho e pães. Utilizadas desde o tempo dos Egípcios que deixavam uma mistura de água e farinha aquecida até a formação de bolhas para a produção de pão. Assim a contaminação natural da massa de pão, cevada e de uvas com a levedura *Sacharomyces cerevisiae* contribuiu para a origem do vinho e da cerveja produtos estes que fazem parte de nosso cotidiano (PEREIRA JR., 2008).

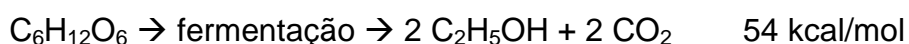
Na atualidade a maioria dos processos de produção do vinho utilizam cepas de *S. cerevisiae*, pois estas produzem fermentações mais rápidas e confiáveis, além de evitarem contaminações microbianas, desta forma, estas culturas são selecionadas tendo como base a característica de otimizar o processo e intensificar

a qualidade da matéria-prima tendo como consequência um produto de melhor qualidade e de boa aceitabilidade. Além disso, *S. cerevisiae* são produtoras superiores de etanol, mais tolerantes aos produtos da fermentação e mudanças de pH no decorrer do processo fermentativo (DUARTE et al. 2010)

Vários autores realizaram estudos em relação à fermentação alcoólica de mostos obtidos de frutas vermelhas empregando cepas de *S. cerevisiae*. Gozáles, et al (2011) realizaram a fermentação de framboesas vermelhas no estado sólido com *S. cerevisiae* IFI83 na concentração de 5×10^5 células/g de polpa. Hidalgo et al. (2013) avaliaram o efeito da inoculação na fermentação de morango utilizando estirpes nativas de leveduras e bactérias ácido-acéticas, onde *Saccharomyces cerevisiae* foram selecionadas e testadas como culturas iniciadoras, comparando-se assim os processos de fermentação em que as cepas foram inoculadas e os processos em que a fermentação foi espontânea, ou seja, através de estirpes nativas do fruto. No caso da fermentação alcoólica estes autores inocularam 2×10^6 células / mL de suco.

Dentre os micro-organismos que realizam a fermentação alcoólica são destacadas as leveduras *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Bettanomyces*, *Kloeckera*. A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* ocorre desde a década de 1980, sendo amplamente utilizada pela indústria e em processos caseiros de produção de bebidas (Duarte et al. 2010).

Em se tratando da fermentação alcoólica, ou seja, a transformação da sacarose em etanol e gás carbônico, esta envolve 12 reações em sequencias ordenadas (BORGES, 2008). De maneira geral, a reação de forma simplificada é apresentada a seguir:



Teoricamente, a partir de 100g de glicose, obtém-se 51,11 g de álcool ou 64 mL, no entanto, na prática as células reservam parte destes açúcares, em torno de 5%, para o crescimento celular e formação de subprodutos da fermentação como ácido succínico, glicerol, entre outros, e desta forma 100 g de glicose produz em torno de 48,5 g de etanol ou 61 mL de etanol (PACHECO, 2010).

De acordo com Alencar et al. (2009) a fermentação alcoólica consiste na transformação dos carboidratos em etanol e formação de gás carbônico em sistema anaeróbico. Com relação aos carboidratos fermentescíveis podem ser utilizados açúcar de cana, beterraba, mel, melaço e frutas ou outros materiais que contem amido como raízes, tubérculos, grãos, entre outros.

Para a produção de vinho normalmente as frutas não contêm naturalmente teores de açúcares necessários para obtenção final de teor alcoólico mínimo de 10% v/v de álcool exigido pela legislação brasileira. Desta forma, os mostos ou sucos devem ser chaptalizados, ou seja, deve ser realizada a correção da deficiência de açúcar, o qual não deve conferir substâncias estranhas ao vinho, sendo a sacarose o carboidrato mais indicado (RIZON; MIELE, 2005).

Tessaro et al. (2010) realizaram avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja, estes autores iniciaram a fermentação alcoólica com suco de laranja *in natura* (12,5 °Brix), com 18 °Brix e com 22 °Brix com a adição de açúcar e ao final constataram que os tratamentos com 18 °Brix e 22 °Brix foram os que mais produziram etanol, 12 % p/v e 13,45% p/v. respectivamente, assim como no tratamento com 18 °Brix restou em torno de 6,6°Brix, enquanto que no tratamento 22 °Brix restou 9,5 °Brix, esta sobra de acordo com os autores pode ter ocorrido pelo fato de que no sucos de laranja existem açúcares não fermentescíveis, tais como pentose, arabinose e xilose.

Além do adequado conteúdo de açúcares nos mostos a serem fermentados, outros parâmetros são importantes para a produção de vinho de qualidade e de acordo com a legislação, como o pH e a temperatura de condução do processo. A temperatura é possivelmente o parâmetro mais importante para a formação do etanol. Baixas temperaturas produzem vinhos com retenção de aromas porém contribuem para um crescimento lento das leveduras prolongando o processo e aumentando a concentração de ácidos voláteis indesejáveis. Temperaturas acima de 33°C podem favorecer o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis como a bactéria *acetobacter* (GÓES e ZANGIROLAMI, 2005).

Galanakis et al. (2012) ao estudarem o efeito da pressão (1 atm, 2 atm, 3 atm, 5 atm e 7 atm) e da temperatura (20 °C, 25 °C e 30 °C) sobre a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em *pellets* de C-albumina verificaram que a fermentação foi mais lenta com a diminuição da temperatura, bem

como ao final houve maior concentração de açúcar residual no fermentado e redução da produtividade de etanol. Pressões mais elevadas contribuíram negativamente para o processo, sendo que temperaturas em torno de 25 °C a 30 °C a pressões de 1 atm e 2 atm, promoveram a ativação das células e boa produtividade em etanol.

Bringhenti e Cabello (2005) relatam temperatura de 28 °C como adequada para a produção de etanol a partir de resíduos amiláceos da agro industrialização da mandioca, obtendo álcool com qualidade requerida para uso na indústria alimentícia.

Ainda com relação à temperatura de fermentação, Almeida (2006) ao realizarem a avaliação da cinética da produção do fermentado do fruto do Mandacaru, fruto típico da região semiárida do Nordeste brasileiro, utilizaram a temperatura de 30 °C ± 2 °C e produziram um vinho com rendimento e produtividade de 0,461 g/g (90,2%) e 1,75 g/L h respectivamente e dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira.

Comumente na fermentação alcoólica é necessário o uso do metabissulfito de sódio, este é largamente empregado na forma de sal ou como dióxido de enxofre. Tal composto possui como principal função a ação antioxidante, mas também possui atuação como bactericida (JUNIOR et al. 2010), ação anti-oxidásica, reguladora da temperatura e ação clarificantes (OLIVIER et al. 2008). Quanto a ação anti-oxidásica esta está relacionada a função de bloquear a ação das enzimas da possível podridão da fruta as quais podem acarretar na turvação do mosto e vinho, assim como a oxidação.

A adição do dióxido de enxofre em enologia como antioxidante é uma prática antiga, sendo o dióxido de enxofre a forma mais eficaz contra bactérias e leveduras menos resistentes, onde sua eficácia irá depender do pH do meio, quantidade de açúcares, acetaldeído e da temperatura (GUERRA et al. 2009).

Quanto a adição de metabissulfito de sódio a Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988 regulamenta que a adição de metabissulfito de sódio, potássio, entre outros deve ser na concentração de 0,035g/100mL, ou seja, 350 mg/L (BRASIL, 1988). Já Brasil (2013) determina que em vinhos o conteúdo residual deste composto como SO₂ total sozinhos ou em combinação deve ser de no máximo 0,02g / 100 mL.

2.4 Vinagre

O vinagre por muitos anos foi considerado um produto proveniente de uma reação espontânea e secundária do vinho e sem qualquer padrão de qualidade reconhecido. Hoje esta situação mudou completamente e alguns vinagres são considerados especialidades culinárias como o vinagre de Xerez e o tradicional vinagre balsâmico de Modena. A produção de vinagres de alta qualidade é controlada por diferentes regulamentos principalmente na Europa os tornando altamente valorizados pelos consumidores (MARRUFO-CURTIDO et al. 2012). A matéria prima utilizada, o processo de produção controlado e em alguns casos o processo de envelhecimento que pode variar de dois meses a três anos, com o emprego de diferentes tipos de madeira (carvalho, castanheiro, amora, ou zimbro) contribui para a agregação de valor ao vinagre (CALLEJÓN et al. 2010; CEREZO et al. 2008; MARRUFO-CURTIDO et al. 2012).

A palavra vinagre deriva de *vinaigre* do francês, substantivo que designa vinho azedo. Os povos antigos usavam o vinagre não só como condimento, mas também no preparo de bebidas, refrigerantes, na conservação de alimentos e até como medicamento e cosmético (PEDROSO, 2003).

De acordo com a legislação brasileira, vinagre pode ser obtido de álcool, frutas, cereais, vegetais, misto (obtido de duas ou mais matérias-primas como fruta, cereal e vegetal), de mel, composto (suco de fruta ou suco vegetal, de mel de abelha, em conjunto ou separadamente), condimentado, duplo e triplo. Quando adicionado corante caramelo, não poderá apresentar absorvância superior a 0,2 (dois décimos) de unidades de absorvância mensurada em espectrofotômetro UV / visível com comprimento de onda determinado em 420nm (BRASIL, 2012).

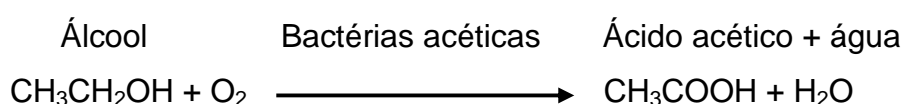
O conteúdo de solutos depende dos componentes da matéria-prima utilizados na fermentação. A densidade, ponto de ebulição, ponto de congelamento, tensão superficial e viscosidade do vinagre diferem um pouco da água pura dependendo da concentração de ácido acético e da matéria prima. O pH varia entre 2 e 3,5 (COSTA et al. 2006).

O Vinagre tem mais de dez mil anos de registro histórico. Atualmente existe uma variedade de vinagres amplamente utilizados em diferentes países, como o vinagre de cereais, na China e no Japão, o vinagre de vinho

na França, o vinagre de malte na Inglaterra, e os vinagres de caqui, abacaxi no sudeste da Ásia (XU et al. 2011). Pode apresentar várias classificações, de acordo com a origem da matéria-prima, sendo designados de fermentados acéticos ou vinagres, seguidos do nome da matéria-prima de origem (BRASIL, 2012).

Tem ação nutritiva e biorregulatória e, portanto é considerado um complemento para a alimentação humana (BORTOLINI et al. 2001). A utilização do vinagre nos alimentos torna-os mais digestivos, em especial os folhosos os quais são amaciados, o que melhora a digestão pelo suco gástrico. No organismo humano aumenta a atividade dos fermentos gástricos e ao mesmo tempo promove um efeito excitante da glândula pancreática e é considerado um produto superior em relação a outros alimentos ácidos pelo fato de conter o ácido acético que entre os ácidos orgânicos é o mais dissociável e favorável à digestão (BORTOLINI et al. 2001; HOFFMANN, 2006).

De acordo com Filho e Araújo (2007) a fermentação acética ou oxidação realizada em aerobiose é conseguida por um conjunto de bactérias do gênero *Acetobacter*, tais como *Acetobacter acetii*, *A. xylinoides*, *A. orleanense*, *A. acetigenum*, *A. schuetzenbachii*, *A. curvum* e *A. rances*. No entanto, normalmente utilizam-se culturas mistas, onde estas devem produzir concentrações razoáveis de ácido acético entre 25 °C e 30 °C e não possuem a propriedade de realizar a oxidação até anidrido carbônico e água. A fermentação acética é demonstrada na equação a seguir:



São observados na literatura diversos trabalhos que destacam as propriedades biológicas do vinagre e os benefícios à saúde que o produto pode proporcionar. Xu et al. (2011) verificaram atividade antioxidante e compostos de alto peso molecular (melanoidinas), formados a partir de reação de Maillard durante o processo de produção de vinagre aromático *Zhenjiang* concentrado.

Ubeda et al. (2012) produziram vinagre a partir de excedentes da produção de morangos produzidos na Espanha (segunda maior produtora de morangos), este processo foi realizado em dupla fermentação (alcoólica e acética) com a finalidade de estudar a evolução da atividade antioxidante, fenóis totais e antocianinas

monoméricas durante o processo de produção do vinagre (realizada em recipientes de vidro, barril de carvalho e barril de cerejeira). Os autores constataram que estes parâmetros aumentavam quando o dióxido de enxofre e enzimas pectolíticas foram adicionados aos substratos, assim como, a utilização de barris de madeira, particularmente de madeira de cerejeira. De acordo com os autores, de maneira geral, a fase de acetificação levou à perda elevada de compostos antioxidantes.

Segundo Budak e Guzel-Seydim (2010) a presença de compostos fenólicos em vinhos e vinagres tem efeito positivo para a saúde por possuírem efeito antioxidante. Estes autores estudaram a produção de vinagre de uva *Ulugbey Karasi* por dois processos, o lento ou de superfície e o industrial e avaliaram se o processo de produção poderia influenciar na atividade antioxidante e nos compostos fenólicos. Os autores constataram que o teor de compostos fenólicos no vinagre produzido de maneira industrial era maior do que no processo lento (2690 mg L⁻¹ e 2461 mg L⁻¹ GAE, respectivamente), em relação aos compostos antioxidantes, tais autores constataram que no vinagre produzido pelo método industrial (13,50 mmol L⁻¹) foi verificado um valor ligeiramente maior que no método lento (10,37 mmol L⁻¹).

Grande parte das frutas colhidas no Brasil todos os anos são descartadas por estarem fora dos padrões de qualidade, apresentando deformações, estágio avançado de amadurecimento, ou, em alguns casos pela superprodução, desta forma a fabricação de vinagre de frutas pode proporcionar ao agricultor e aos estabelecimentos industriais um meio de utilização de matérias-primas inaproveitáveis ou excedentes da produção (BORTOLINI et al. 2001; EVANGELISTA 2008; UBEDA et al. 2011).

Ainda em relação às frutas, Aquarone et al. (2001) destaca que os vinagres de frutas são considerados melhores no que se refere a qualidades sensoriais e nutritivas se comparados a outros tipos de vinagre, pois apresentam características como sabor e aroma próprios. Este possui vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos oriundos da fruta e da fermentação alcoólica.

Quando o vinagre for produzido a partir de frutas, a legislação brasileira preconiza que o produto deve ser designado como fermentado acético de fruta ou vinagre de fruta e nunca utilizar os dois, pois os mesmos são equivalentes e mutuamente excludentes. Quanto às características sensoriais e físico-químicas do fermentado acético deverão estar em consonância com a composição do produto.

Durante o processo de fermentação, poderá ser injetado no fermentado acético oxigênio ou ar industrialmente puro, assim como, poderá ser utilizado sal nutriente, açúcar, aminoácido e vitamina, desde que previstos em legislação específica, com o objetivo exclusivo de alimentar as bactérias acéticas, na quantidade mínima necessária à complementação do substrato da fermentação acética (BRASIL, 2012).

A instrução normativa nº 06 de 03 de abril de 2012 estabelece os Padrões de identidade e qualidade e a classificação dos fermentados acéticos, onde de acordo com a matéria-prima utilizada para a sua obtenção existem alguns parâmetros a serem seguidos como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do fermentado acético de fruta.

Parâmetro	Valor	
	Mínimo	Máximo
Acidez volátil em ácido acético (g/100ml)	4,00	-
Álcool (% v/v) a 20°C	-	1,00
Cinzas (g/L)	1,00	5,00
Extrato seco reduzido (g/L)	6,00	-
Sulfatos, expressos em g/L de sulfato de potássio	-	1,00
Aspecto	Ausência de elementos estranhos à sua natureza e composição	
Cheiro	Característico	
Sabor	Ácido	
Cor	De acordo com a matéria-prima de origem e composição	

Fonte: Brasil, 2012.

De acordo com BRASIL (2012), “atualmente no Brasil são consumidos em torno de 170 milhões de litros de vinagre, cerca de 80% corresponde ao vinagre de álcool. A região Sudeste responde por 53% do consumo do produto em território nacional, seguido pelas regiões Sul (23%), Norte-Nordeste (19%) e Centro-Oeste (5%). A região da Grande São Paulo é o maior polo produtor de vinagre, concentrando 37% da produção total nacional, enquanto o interior de São Paulo é o principal mercado, onde o consumo chega a 24% da produção nacional.”

De acordo com a Associação Nacional das Indústrias de Vinagre ANAV (2012) o faturamento anual do setor vinagreiro é de 200 milhões de reais, no entanto, o consumo deste produto é de 0,8 litro/habitante/ano, enquanto nos países da Europa o consumo é de 1,8 litro/habitante/ano, onde o vinho e as frutas são as principais matérias-primas, sendo que este é utilizado para outros fins como limpeza, desinfecção, avivamento de cores, para devolver brilho a metais e neutralizador de odores e não somente como tempero para saladas como comumente é consumido no Brasil. Tendo em vista este crescente mercado do vinagre, principalmente na utilização na culinária mais sofisticada, os empresários brasileiros começam a produzir vinagres *gourmets* ou de “grife”. Desta forma 90% das indústrias já fornecem vinagres especiais ao mercado, agregando assim valor ao produto e atendendo as expectativas de um consumidor cada vez mais exigente por qualidade.

2.5 Processos de produção de vinagre: processo submerso e processo lento

A produção do vinagre é realizada por dois processos bioquímicos conduzidos por microrganismos: primeiramente ocorre a conversão de matérias-primas açucaradas e amiláceas fermentescíveis a etanol por leveduras, comumente espécies de *Saccharomyces*, e posteriormente ocorre a oxidação do etanol por bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter* (TESFAYE et al. 2002; BROTOLOINI et al. 2001; MARQUES et al. 2010).

A fermentação alcoólica se caracteriza por um processo anaeróbico, onde as leveduras utilizam o açúcar para a transformação em etanol e gás carbônico, este processo é caracterizado por uma sequência de 12 reações ordenadas as quais são catalisadas por enzimas específicas (CAETANO e MADALENO, 2011).

O rendimento da fermentação alcoólica pode ser afetada pelo pH do meio, oxigenação, nutrientes, espécie e linhagem da levedura utilizada, temperatura, além disso contaminação de outras cepas que não sejam *Sacharomyces*. Quanto à temperatura desta fermentação o recomendado é de 25 °C a 36 °C, pois valores inferiores fazem com que a fermentação seja demorada e temperaturas superiores fazem com que o álcool evapore ou podem aparecer contaminações, assim como o

pH adequado está entre 4,0 e 5,0 (PACHECO, 2010; CAETANO e MADALENO, 2011).

Na fermentação acética as principais espécies de bactérias utilizadas são *Acetobacter*, estas possuem forma de cocos e bastonetes, assim como necessitam de oxigênio para realizar acetificação, por este motivo se multiplicam na superfície do vinho onde há a formação de um véu ou mãe do vinagre de aspecto gelatinoso. Quanto à temperatura, estas se desenvolvem melhor entre 25 °C e 30 °C, mas podem suportar temperatura mínima de 4 °C a 5 °C e máxima de 43 °C, sendo que a temperaturas de 15 °C e maiores que 35 °C tornam a fermentação acética mais lenta o que se tornaria inviável economicamente para produção de vinagre. Quanto ao teor alcoólico, estas suportam até 11,0% v/v (HOFFMANN, 2006).

A fermentação acética é a transformação do álcool em aerobiose em ácido acético, obtido por bactérias acéticas, as quais constituem um grupo de interesse pela sua função na produção do vinagre e nas alterações nos alimentos e bebidas. O rendimento da transformação do álcool em ácido acético envolve 46g de álcool para a formação de 60g de ácido acético, ou seja, 1g de álcool origina 1,3 g de ácido acético, na prática estima-se que para cada 1% v/v de álcool do vinho, forma-se 1% de ácido acético no vinagre. (EMBRAPA, 2002; HOFFMANN 2006).

De acordo com Budak e Guzel-Seydim (2010), o vinagre é obtido a partir de matérias-primas que contenham principalmente carboidratos que são fermentados a etanol e este é transformado em ácido acético. Destacam dois métodos de produção, o método lento em que a cultura de bactérias do ácido-acética permanece na superfície do fermentado alcoólico mantido em barril de madeira (método tradicional) e o processo submerso que envolve cultura submersa, onde a oxigenação do processo é melhorada (método industrial).

O processo de Orleans, também conhecido como lento, superficial ou estacionário é o método de produção mais antigo. Esse método inclui o uso de barris de madeira (Figura 13) e os vinagres obtidos são altamente valorizados pelas propriedades sensoriais (CEREZO et al. 2008). Nesse método as bactérias ácido acéticas permanecem em contato direto com o oxigênio atmosférico na interface ar-líquido, sendo este o método mais comumente empregado na produção de vinagres tradicionais (HOFMANN, 2006).

O processo Orleans de produção de vinagre gera um produto que possui aroma e sabor peculiar, pois durante este método existe a presença residual de álcool que favorece a formação de ésteres e outros compostos voláteis (EMBRAPA, 2002).

Este método produz um vinagre de excelente qualidade, límpido, dispensando clarificações e filtrações, se cuidadosamente conduzido. No entanto, é um processo que possui baixa produtividade e ocupa muito espaço, sendo inviável comercialmente, usado basicamente na produção em pequena escala, ou seja, praticamente de maneira doméstica (BACH, 2009), principalmente pelo agricultor familiar.

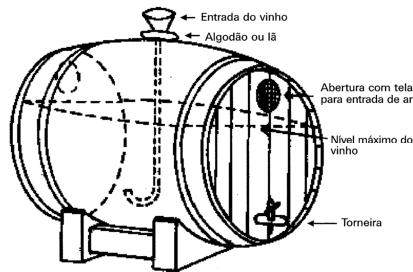


Figura 13: Barril utilizado para elaboração de vinagre
Fonte: Embrapa (2002)

Industrialmente, a maior parte do vinagre produzido no Brasil é obtido pelo processo submerso, datado de 1950, que utiliza cultura submersa através de forte aeração, com acetificadores do tipo *Frings* (Figura 14), o qual caracteriza-se como um processo mais rápido com elevadas produtividades, mas que comumente não apresenta a mesma qualidade observada em vinagres produzidos a partir de frutas por processo lento em barris de madeira (AQUARONE et al. 2001; PEDROSO, 2003). O processo submerso é empregado para elaboração de vinagres comerciais de maior consumo (HOFFMANN, 2006).

Neste processo as bactérias acéticas ficam submersas no vinho para acetificar em contato com o oxigênio do ar proveniente de intenso arejamento sendo que esta deve ser cuidadosamente aplicada, pois qualquer mudança pode acarretar na modificação do metabolismo bacteriano. O equipamento possui um recipiente de grande capacidade, na maioria das vezes de aço inoxidável, com uma turbina de ar na parte inferior e por ser um processo exotérmico, contém tubos por onde circula a

água para refrigeração que funciona automaticamente no controle da temperatura. Dentro do fermentador, o ar é disperso homogeneamente em todo o vinho. Quando o vinho do fermentador alcançar aproximadamente 0,2% v/v de álcool, o que acontece em intervalos de 30 a 40 horas, retiram-se aproximadamente de 40% a 45% do volume de vinagre que é substituído pelo mesmo volume de vinho a acetificar. O controle da temperatura nesse processo é feito mediante um sistema interno de refrigeração, que funciona automaticamente (AQUARONE et al. 1983; PEDROSO, 2003).



**Figura 14: Acetificador do tipo *Frings* em aço inoxidável.
Fonte: EMBRAPA (2006) por MECCA (1979).**

2.6 Panorama socioeconômico da agricultura familiar na região Sudoeste do Paraná

A agricultura no Sudoeste do Paraná é constituída predominantemente de pequenos proprietários rurais que conduzem as atividades com ajuda da família e eventualmente é contratada mão-de-obra externa. Destes, 94% são proprietários de terra e 6% correspondem a não proprietários. Os agricultores que exploram exclusivamente terras próprias somam cerca de 64% do total, indicando que pelo menos um terço deles faz uso de outras terras (ZANCHET, 2010).

A agricultura regional no âmbito econômico de geração de renda vem sofrendo declínio. Em 1970 as atividades agrícolas eram responsáveis por 70% do Produto Interno Bruto (PIB) e em 2003 este índice passou para 45,3% (SANTOS e BRAGA, 2009).

A economia rural sempre foi baseada em minifúndios, devido às características do relevo acidentado, e são uma característica da região as pequenas propriedades com mão de obra familiar. A prevalência de agricultura em pequena escala, típica da agricultura familiar, confere características próprias, no que se refere ao acesso à tecnologia. De maneira geral, a mecanização das tarefas nos estabelecimentos agropecuários exige aumento da área cultivada ou da escala de produção, fator que limita a incorporação de tecnologia pelas pequenas propriedades, em especial à mecanização. Os cultivos de milho e soja, predominantes na região, fazem uso da mecanização das etapas de plantio, tratos culturais e colheita, porém apenas 42% possuem trator e apenas 10% são proprietários de colheitadeira (ZANCHET, 2010).

As principais fontes de renda na agricultura desta região são a combinação das atividades agrícolas com produção animal, sendo que a diminuição do tamanho das famílias representa dificuldades na manutenção agropecuária diversificada, cerca de 78% dos agricultores combinam três atividades: leite, milho e soja, sendo complementadas pela produção de aves, fumo, suínos, gado de corte, trigo e feijão (ZANCHET, 2010).

Este modelo de diversificação da agricultura para proporcionar o sustento da família representa algo que aos poucos está em fase de declínio, pois as famílias estão cada vez menores, assim como jovens vão para as cidades com o intuito de melhores condições de vida, desta forma faz-se necessário a busca de outras atividades com geração de renda, alto valor agregado e compatível com a realidade atual.

Atualmente produtores e consumidores têm se preocupado crescentemente com a qualidade dos alimentos produzidos e consumidos, atentando para práticas mais limpas de produção e procurando por alimentos mais saudáveis que gerem benefícios ambientais em termos de sustentabilidade ao planeta (MACHADO E CORAZA, 2004).

De maneira geral faz-se necessário a implantação da agricultura de alto valor agregado, a qual pode ser conseguida através do desenvolvimento agrícola e da proteção ambiental, de forma que esta se torne competitiva e ao mesmo tempo sustentável, gerando empregos e diminuindo o êxodo rural (BANCO MUNDIAL, 2008).

Diante disso, a busca da agregação de valor na agricultura familiar pode ser realizada pela aplicação de novas tecnologias de cultivo com o emprego de máquinas, ou pelo cultivo de novas culturas como, por exemplo, a fruticultura a qual traz benefícios aos agricultores, pois pode ser realizada em pequenas extensões de terras.

Atualmente a amora-preta não é explorada comercialmente e não existem muitos dados publicados a seu respeito, assim é bastante relevante a realização de estudos que evidenciem as qualidades nutricionais do fruto, através da caracterização da fruta, bem como a exploração tecnológica da mesma com o desenvolvimento de produtos derivados com maior valor agregado que poderão trazer benefícios à agricultura familiar regional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Aproveitamento tecnológico da amora-preta Guarani (*Rubus* sp.) na produção de vinagre pelos processos lento e submerso.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características físico-químicas e compostos bioativos da amora-preta cultivada em propriedade rural do Sudoeste do Paraná;
- Elaborar fermentado alcoólico de amora-preta em sistema descontínuo em biorreator de tanque agitado (STR), realizando estudo cinético do processo e caracterizando o produto obtido (parâmetros físico-químicos e bioativos);
- Produzir fermentado acético (vinagre) de amora-preta através dos processos: submerso e lento e avaliar os parâmetros fermentativos dos cultivos;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos dos vinagres produzidos, correlacionando-os com a legislação brasileira;
- Quantificar compostos bioativos (fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante) nos fermentados acéticos obtidos em ambos os processos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais de fermentação, bem como a análise dos parâmetros físico-químicos foram desenvolvidos no Laboratório de Bioprocessos e na Central de Análise Multiusuário. Ambos os laboratórios estão localizados no Centro de Tecnologias Integradas (Politec) da UTFPR, campus Pato Branco.

4.1 Matérias-primas

4.1.1 Amora-preta

A amora-preta, cultivar Guarani (*Rubus* sp.), utilizada para a produção de vinagre foi obtida junto a produtor do município de Palmas na região Sudoeste do Paraná. Os frutos foram mantidos sob congelamento (-18°C) até o momento da caracterização físico-química e produção dos fermentados alcoólico e acético.

4.1.2 Micro-organismos

Na fermentação alcoólica foi empregado fermento comercial constituído de cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* (Fermol Perlage, AEB Bioquímica Latino Americana SA). Na fermentação acética foi empregada microflora mista de bactérias ácido-acéticas isoladas de vinagre de vinho não pasteurizado adquirido na Feira do Produtor no município de Pato Branco – Paraná.

4.1.3. Sais minerais e reagentes químicos

Os sais minerais empregados no preparo dos meios de cultivo e os reagentes utilizados no preparo de soluções usadas nas determinações químicas foram de grau analítico. Foi empregado ENOVIT[®] da AEB Bioquímica, na fermentação alcoólica como ativador de crescimento das leveduras na fase de fermentação acética o Acetozyn[®] que contém os nutrientes necessários para o crescimento das bactérias acéticas.

4.2 Descrição do biorreator utilizado na fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica foi conduzida em biorreator de bancada do tipo tanque agitado (STR) modelo Biostat B (B. Braun, Alemanha), conforme apresentado na Figura 15, equipado com eletrodos para o monitoramento de pH e oxigênio dissolvido, 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 frasco Erlenmeyer contendo água funcionou como um batoque, impedindo a entrada de ar no sistema ao mesmo tempo em que permitia a liberação do gás carbônico (CO₂) oriundo da fermentação.



Figura 15: Biorreator de bancada Biostat B
Fonte: Autora (2012)

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Preparo do inóculo para as fermentações alcoólica e acética

Na fermentação alcoólica, a levedura comercial liofilizada foi reidratada em meio extrato de malte (20g/L extrato de malte, 1g/L peptona e 20g/L de glicose), preparado em erlenmeyer de 250 mL. A pré-cultura foi cultivada em incubadora *shaker* por 24 h, 120 rpm e 28°C de temperatura (Figura 16). Após este período as células foram recuperadas por centrifugação (1500 x g, 30 minutos) e ressuspensas em solução salina esterilizada a 0,9% (m/m). A seguir foi realizada contagem celular em câmara de Neubauer e usado como inóculo uma população de $2,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ seguindo concentração celular descrita por Hidalgo et al. (2013).

Para a fermentação acética o inóculo foi preparado a partir de cultura selvagem de bactérias ácido-acéticas isoladas de vinagre não pasteurizado (vinagre forte). Utilizou-se seis frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo cada um 100mL de meio GY (glicose 10%, extrato de levedura 1% e natamicina 100mg/L) (SU, e CHIEN, 2007; HIDALGO, et al, 2013), em cada um destes foi adicionado volume de 10 mL de vinagre não pasteurizado (Figura 17). Os frascos foram colocados em incubadora orbital (*shaker*) por 2 h, 120 rpm a 30 °C, decorridas 48 horas procedeu-se a centrifugação (1500 x g, 30 min.) e ressuspensão das células em solução salina 0,9%.

Para a realização da fermentação acética em barril de madeira de grápia foram adicionados 25 mL do inóculo em 180mL de vinho de amora-preta (10% do volume total a ser fermentado), o qual estava contido em Erlenmeyer de 250 mL, permanecendo em incubadora orbital (*shaker*) por 24 h, 120 rpm a 30 °C para processo de adaptação e decorridas estas 24 horas, este volume foi então acrescentado ao restante do vinho de amora-preta no barril para a fermentação acética pelo método lento.

Para a realização da fermentação acética em biorreator, utilizou-se como inóculo o vinagre produzido pelo método lento.



Figura 16: Preparo do inóculo para a fermentação alcoólica
Fonte: Autora (2012)



Figura 17: Preparo do inóculo para a fermentação acética.
Fonte: Autora (2012).

4.4 Fermentação alcoólica

4.4.1 Preparo do Mosto e Fermentação

Os frutos foram descongelados lentamente em geladeira e foram submetidos a despulpamento em multiprocessador Philips-Walita (modelo RI 7633), Figura 18. A polpa foi passada em malha de pano morim para a separação das sementes e cascas. O teor de sólidos solúveis foi corrigido para 18 °Brix pela adição de sacarose comercial (BORTOLINI et al. 2001; TESSARO et al. 2010). Não houve necessidade de correção do pH do mosto visto que apresentou valor de 3,2.



Figura 18: Processamento da amora-preta em multiprocessador
Fonte: Autora (2012).



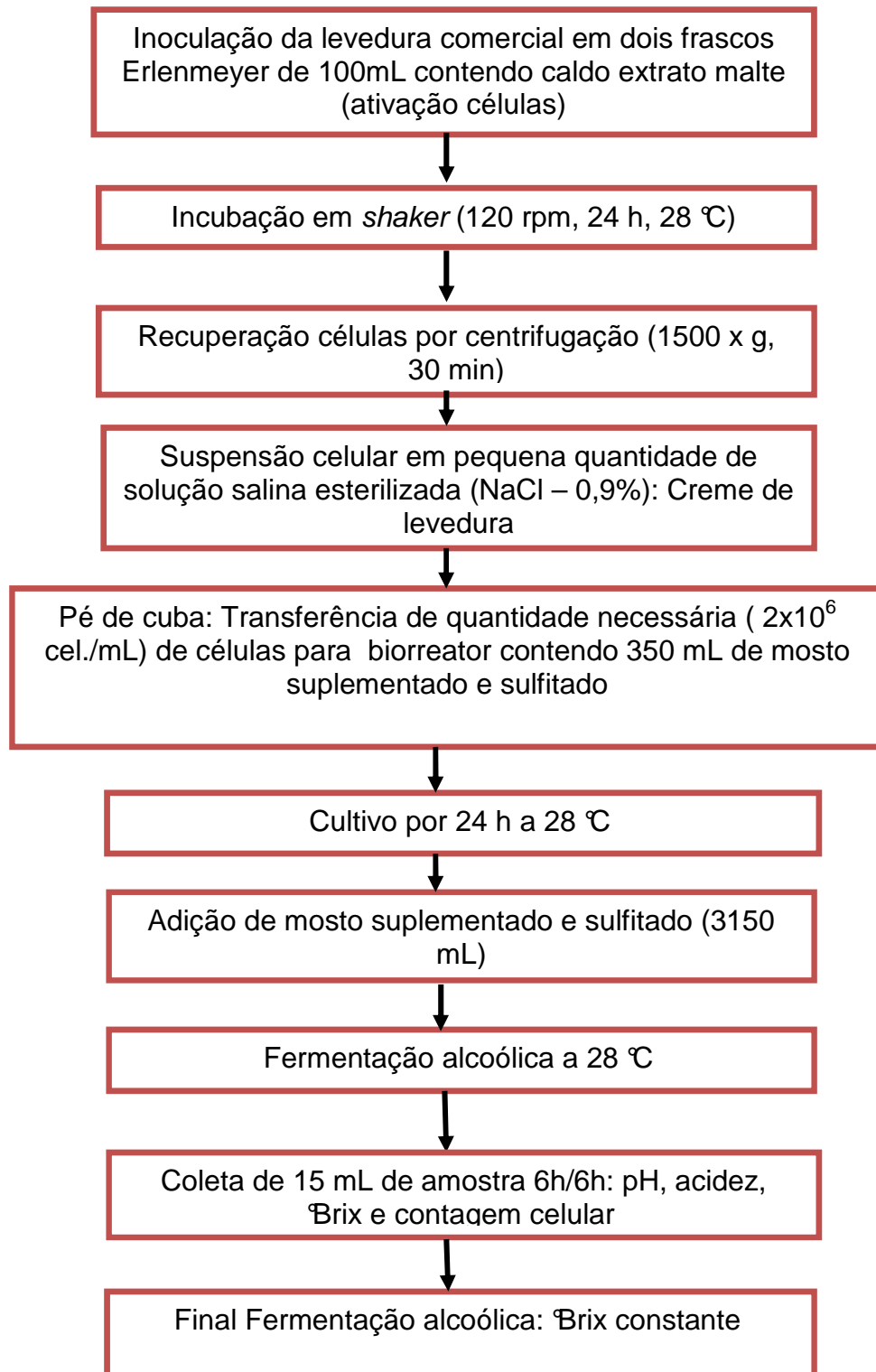
Figura 19: Mosto obtido da amora-preta na cuba do fermentador.
Fonte: Autora (2012).

O mosto (Figura 19) foi suplementado com ativador de crescimento de leveduras (ENOVIT[®], Pascal Biotech – Paris França) na dose recomendada pelo fabricante de 30 g / hL, sendo este composto de sulfato de amônio (70%), fosfato de amônio dibásico (19,8%), celulose quimicamente inerte (10%) e cloridrato de tiamina, vitamina B1 (0,20%). Metabissulfito de sódio na proporção de 50 mg/L (Olivier et al. 2008) foi empregado na etapa de sulfitagem.

O pé-de-cuba (inóculo no fermentador) foi preparado pela transferência da pré-cultura (células de *S. cerevisiae* ativadas em meio extrato de malte) preparada conforme item 4.3.1, para o fermentador contendo 10% (350 mL) do volume racional de mosto suplementado com minerais e sulfitado. As células do fermento foram cultivadas por 24 h a 28 °C.

Após 24 h de cultivo, com as leveduras já adaptadas e na fase de crescimento exponencial, procedeu-se a adição do restante do mosto (3.150 L), sendo então a fermentação em fermentador de bancada conforme descrito no item 4.2 a temperatura de 28 °C (BORTOLINI et al. 2001; HIDALGO et al. 2013). O processo de preparo de meio de cultura e preparo do mosto pode ser visto no Fluxograma 1.

A fermentação alcoólica foi acompanhada através do consumo dos açúcares via avaliação do teor de sólidos solúveis totais por refratômetro portátil e verificação da liberação de CO₂. Amostras foram retiradas ao longo do processo em intervalos de 6 horas. Foram realizadas análises de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol e biomassa celular (contagem de células em câmara de Neubauer). Após término da fermentação alcoólica, indicada quando o teor de sólidos solúveis (°Brix) permaneceu constante, o caldo fermentado foi separado das células por centrifugação (1500 x g, 20 minutos) e filtragem em pano de morim. No fermentado alcoólico obtido ao final do processo também foram determinados compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante.



Fluxograma 1: Adaptação do inóculo no mosto e fermentação alcoólica.

4.4.2 Cálculo do rendimento, produtividade e eficiência da fermentação alcoólica

O rendimento ($Y_{P/S}$) da fermentação alcoólica foi calculado correlacionando-se os valores de etanol produzido (m/v) com os teores de açúcares consumidos (m/v), segundo equação 1. Sendo, $Y_{P/S}$ o rendimento em produto (g/g), ΔP a variação da produção em etanol (g/L) e ΔS o consumo de substrato (g/L).

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

A produtividade (Q_P) foi determinada pela correlação entre etanol produzido (g/L) e o tempo da fermentação (h), segundo equação 2. Q_P corresponde à produtividade volumétrica em etanol (g/Lh), P a concentração final de etanol (g/L), P_0 a concentração de etanol no instante inicial (g/L) e t_f é o tempo de fermentação (h).

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t_f} \quad (2)$$

A eficiência da fermentação foi determinada pela relação entre o rendimento observado no processo ($Y_{P/S}$) e o rendimento teórico (0.511 g/g) da fermentação alcoólica, segundo equação 3.

$$n (\%) = \frac{Y_{P/S} \text{ observado}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \times 100 \quad (3)$$

A velocidade de consumo do substrato (Q_S) foi determinada pela correlação entre consumo de substrato (g/L) e o tempo da fermentação (h), segundo equação 4. Q_S corresponde taxa de consumo do substrato (g/Lh), S_0 a concentração de substrato no instante inicial (g/L), S a concentração final de substrato (g/L) e t_f é o tempo de fermentação (h).

$$Q_s = \frac{S_0 - S}{t_f} \quad (4)$$

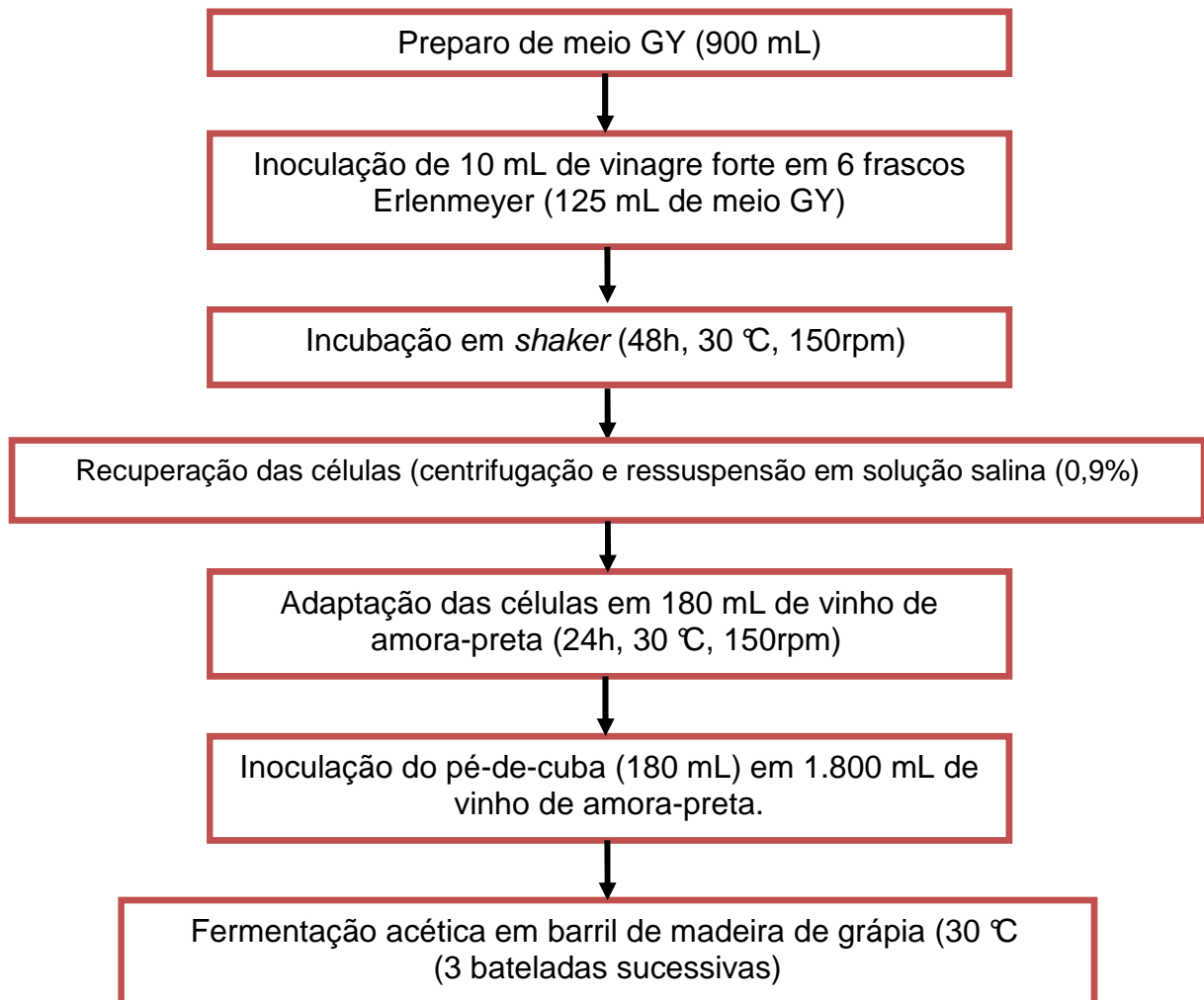
A velocidade máxima de crescimento foi calculada a partir do coeficiente angular da curva do logaritmo neperiano do conteúdo de biomassa na fase exponencial de crescimento com o tempo de acordo com a Equação 5. X corresponde à concentração de biomassa celular (g/L), X_0 corresponde à concentração inicial de biomassa celular (g/L), μ velocidade específica máxima de crescimento célula (h^{-1}) e t tempo de fermentação (h).

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t \quad (5)$$

4.5 Fermentação acética

Foram conduzidas fermentações acéticas em vinagreira de madeira grápia e em fermentador de bancada. Para a produção de vinagre foi utilizado o vinho obtido na fermentação alcoólica. O vinho foi suplementado com Acetozyn[®], composto de nutrientes auxiliares do crescimento das bactérias ácido-acéticas.

No Fluxograma 2 estão descritas as etapas envolvidas na fermentação acética conduzida em vinagreira (processo lento).



Fluxograma 2: Fermentação acética conduzida em vinagreira (processo lento).

Células de bactérias ácido-acéticas cultivadas em meio GY (isoladas de vinagre não pasteurizado de vinho colonial) foram transferidas para o mosto de vinho de amora-preta (180 mL) suplementado com Acetozyn[®]. O mosto foi incubado em incubadora shaker por 24h a 30 °C com agitação de 150 rpm para a obtenção do pé-de-cuba. Posteriormente o pé-de-cuba foi transferido para vinagreira de madeira grápia (Figura 20) contendo 1620 mL de vinho de amora-preta. A fermentação acética foi conduzida a 30 °C, sendo mantida a vinagreira em estufa bacteriológica para controle da temperatura. A vinagreira tinha volume total de 2500 mL. A fermentação acética foi acompanhada através de determinações de pH e acidez total a cada 24 h. Foram conduzidas 3 bateladas sucessivas de fermentações com cortes de 65 % do volume do fermentado quando a acidez do meio atingia valores

entre 4,0 % e 4,5 %, sendo o volume de trabalho completado com novo mosto (vinho suplementado e sulfitado). A proporção dos cortes foi realizada conforme descrito por Tesfaye et al. (2000).



Figura 20: Vinagreira (barril acetificador) de madeira grápia.
Fonte: Autora (2011)

Os vinagres obtidos na primeira, segunda e terceira batelada foram centrifugados e em seguida caracterizados quanto aos valores de pH, acidez em ácido acético, sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix), resíduo mineral (cinzas), extrato seco total, extrato seco reduzido, densidade, dióxido de enxofre livre e total teor de ácido acético, etanol, bem como compostos bioativos antocianinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante.

A fermentação acética conduzida pelo processo submerso foi realizada em fermentador de bancada (Biostat B, B. Braun) (Figura 21) com cuba de 2 litros, sendo utilizado volume de trabalho de 1,5 litros. Para esta fermentação foi empregado volume de pé-de-cuba de 50% de vinagre forte não pasteurizado obtido a partir da vinagreira, tal proporção utilizada foi seguida conforme descrito por Tesfaye et al. (2000). A temperatura foi mantida em 30 °C de acordo com Cerezo et al (2010) e Hidalgo (2013), fluxo de ar de 0,05 vvm (volume de ar / volume de mosto / minuto), agitação de 500 rpm (duas turbinas de Rushton) (BORTOLINI et al. 2001). Ao longo da fermentação acética foram coletadas amostras em intervalos de 6 (seis) horas, para análises de pH, acidez, teor alcoólico, teor de ácido acético. Foram conduzidas 3 bateladas sucessivas de fermentação, sendo retirada a proporção de 65% do volume total e completado com o mesmo volume conforme descrito por

Tesfaye et al. (2000). O final de cada batelada era determinada através da quantificação da acidez (valores entre 4,0% e 4,5%). Nos vinagres obtidos em cada uma das bateladas foram determinados além dos valores de pH, acidez, teor de etanol e ácido acético, os conteúdos de compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante.

Foram determinados os parâmetros cinéticos das fermentações acéticas em ambos os processos: rendimento da fermentação e produtividade volumétrica em ácido acético.



Figura 21: Fermentação acética em fermentador de bancada

4.5.1 Cálculo do rendimento e produtividade das fermentações acéticas

O rendimento da fermentação acética foi determinado e expresso de duas formas, pela relação entre a produção observada de ácido acético em relação ao rendimento teórico ($Y_{P/S}$) e rendimento GK (*Gesammte Konzentration*). O rendimento teórico é calculado a partir da reação de conversão do etanol a ácido acético, onde 1,0 g de etanol rende 1,304 g de ácido acético (TORRES et al., 2001).

O rendimento GK (*Gesammte Konzentration*) é um parâmetro largamente utilizado pela indústria de vinagre, que expressa a eficiência da fermentação como a soma das concentrações de ácido acético (% m/v) e etanol (%v/v) no início e final

das fermentações. Esta relação foi aplicada para o cálculo da eficiência da conversão de etanol em ácido acético: Rendimento GK = (GK final / GK inicial) x 100 (BORTOLINI et al. 2010; ILHA et al. 2009).

A produtividade volumétrica da fermentação acética foi calculada através da equação 6, sendo Q_P a produtividade volumétrica em ácido acético, V_t corresponde ao volume final de vinagre, $C_{ác}$ é a concentração final de ácido acético, V_i é o volume inicial da fermentação acética, $C_{ác\ inicial}$ é concentração inicial de ácido acético, t é o tempo final de fermentação em horas (equação 6).

$$Q_P = \frac{V_t \times C_{ác} - V_i \times C_{ác.inicial}}{t \times V_t} \quad (6)$$

4.5.2 Tratamento final do vinagre

Os vinagres produzidos foram tratados com bentonita (0,05% m/v) por 8 (oito) horas para sedimentação. Posteriormente os vinagres foram centrifugados (1350 x g, por 30 minutos), filtrados em papel filtro e engarrafados e após realização das análises físico-químicas e dos compostos bioativos foram pasteurizados em banho-maria a 65 °C, 20 minutos.

4.6 Determinações analíticas

Foram empregados protocolos analíticos descritos pelo IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) e Manual e Métodos de Análise de Alimentos (CECCHI, 2007). Foram determinados os teores de açúcares glicose, frutose e sacarose, etanol e ácido acético por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Foram analisados, também, os teores de antocianinas através de leituras espectrofotométricas em diferentes pHs (LEE et al. 2005), compostos fenólicos totais de acordo com o método de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como padrão (SINGLETON, 1965; SINGLETON 1999; BUDAK , GUZEL-SEYDIM, 2010), atividade antioxidante através de medida da atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-

difenil-1-picrilhidrazida) (BRAND-WILLIAMS, et al, 1995) e atividade antioxidante através da captura do radical livre ABTS⁺ (Ácido 2,2 azinobis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic) (RE, et al, 1999; SEERAM E HENNING, 2005; RUFINO, et al, 2007; BUDAK, GUZEL-SEYDIM, 2010).

O fermentado alcoólico foi caracterizado quanto aos parâmetros pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) e etanol (determinado por CLAE).

Os fermentados acéticos foram caracterizados quanto aos valores de pH, acidez volátil, etanol, resíduo mineral (cinzas), extrato seco reduzido, sulfatos, sólidos solúveis totais, acidez total, densidade (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), bem como etanol e ácido acético por CLAE.

Foram avaliados na fruta, suco, nos fermentados alcoólico e acético os teores de antocianinas totais (LEE et al. 2005), compostos fenólicos totais (SINGLETON, 1965; SINGLETON 1999; BUDAK, GUZEL-SEYDIM, 2010) e atividade antioxidante por captura do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS et al. 1995), assim como pela captura do radical livre ABTS⁺ (RE et al. 1999; SEERAM E HENNING, 2005; RUFINO et al. 2007; BUDAK, GUZEL-SEYDIM, 2010).

4.6.1 Preparo dos extratos para determinações de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante

Os extratos de amora-preta foram preparados de acordo com Vizzotto e Pereira (2011). Os frutos previamente descongelados sob refrigeração a 4 °C foram triturados e homogeneizados em multiprocessador. Os extratos foram obtidos por extração com etanol absoluto, sendo empregada a proporção de 20 mL de etanol absoluto para 5 g de frutos triturados e homogeneizados. A extração foi conduzida a temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 5 minutos. Posteriormente os extratos foram separados da biomassa da fruta por centrifugação (3.500 rpm por 30 minutos).

Também foram obtidos extratos empregando acetona como solvente extrator, seguindo o mesmo protocolo apenas mudando o solvente.

Para a avaliação da capacidade antioxidantes (DPPH e ABTS), compostos fenólicos e antocianinas previamente realizou-se a extração com a utilização de

diferentes solventes, visto que vários fatores podem influenciar na extração, como por exemplo o tipo de solvente, tempo de extração, temperatura, pH, entre outros.

4.6.2 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência.

Foram adicionados em tubo de ensaio 0,2 mL de extrato (extração com etanol e acetona), 1,8mL de água destilada, 10mL de Folin Cioalteu a 10% e 8mL de Na_2CO_3 a 7,5%. A mistura foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 2 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV / visível U- 2800 Digilab a 765nm. O branco foi conduzido nas mesmas condições, porém, com a solução extratora substituindo o extrato. Foi construída uma curva padrão de ácido gálico nas seguintes concentrações: 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm e 100 ppm de ácido gálico diluídos em água destilada. Os resultados foram obtidos por regressão linear da curva analítica ($R^2=0,999$) e expressos em mg GAE/g de amostra no caso das frutas e mg GAE/L quando trata-se do vinho e vinagres obtidos (GAE: equivalente em ácido gálico) (SINGLETON et al. 1999).

4.6.3 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH

O método de DPPH utilizado para determinar a capacidade sequestrante deste radical em cada amostra foi baseado em Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995); Ubeda et al. (2011). Foram misturados em tubo de ensaio 0,1 mL de amostra apropriadamente diluída e 3,9 mL de solução de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazina) (0,025 g / L em metanol). A absorvância da mistura foi medida a 515 nm em espectrofotômetro UV / visível U- 2800 Digilab e como branco foi utilizado metanol. Leituras foram tomadas no tempo inicial (t_0) e no tempo 60 minutos (t_{60}), quando a reação atingiu o estado estacionário. Seis concentrações diferentes de Trolox (0,02 mM, 0,06mM, 0,1mM, 0,14mM, 0,18mM e 0,22mM) foram preparadas nas mesmas condições da amostra, sendo, portanto, misturados 0,1 mL de cada concentração de

solução de Trolox e 3,9mL de solução DPPH (0,025g/L) e utilizadas para construção da uma curva de calibração com leituras no tempo zero . Os valores finais foram expressos em mmol Equivalentes de Trolox (TE) /g de amostra. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.6.4 Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline)-6-sulfônico foi realizada conforme descrito por Re et al. 1999; Seeram e Henning, 2005; Rufino, et al, 2007; Budak, Guzel-Seydim, 2010. Inicialmente foram preparadas soluções de ABTS (7mM) e persulfato de potássio (140 mM). O radical ABTS^{•+} foi obtido a partir da reação de 5 mL da solução de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio mantida ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 16 horas. 1 mL desta mistura foi diluída em álcool etílico absoluto até obtenção de absorvância de 0,700 nm ± 0,05 nm a 734 nm de comprimento de onda, sendo utilizada somente no dia da análise.

Em tubo de ensaio foram adicionados 30µL da amostra e 3 mL da solução de ABTS^{•+}, após agitação em vortex os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 6 minutos. As leituras foram realizadas a 734 nm em triplicata e os resultados obtidos por correlação com a curva padrão. Etanol absoluto foi utilizado como branco para a leitura das amostras de amora-preta utilizando extração com etanol, para o vinho e o vinagre, no entanto, quando as amostras analisadas foram as procedentes da extração com acetona o branco utilizado foi acetona. O mesmo procedimento reacional foi utilizado para a construção de curva padrão, sendo preparadas diferentes concentrações de trolox (100 µM, 500 µM, 1000 µM, 1500 µM e 2000 µM). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol trolox / g amora-preta e µmol/mL para vinho e vinagre.

4.6.5 Antocianinas

As antocianinas foram quantificadas conforme descrito por Lee et al. (2005). Foram preparadas soluções tampão pH 1,0 (cloreto de potássio, 0,025 M) e pH 4,5 (acetato de sódio, 0,4 M). Foram transferidos 10mL de amostra para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com solução tampão pH 1,0, sendo o mesmo procedimento realizado com o tampão de pH 4,5. Procederam-se as leituras a 520 nm e 700 nm em pH 1,0 e 4,5. Foi realizado cálculo (Equação 7) da concentração do pigmento e expressa em equivalente de cianidina-3-glicosídeo.

Antocianina pigmento (equivalente cianidina-3-glicosídeo, mg/L) =

$$A \times MW \times DF \times 10^3 / \epsilon \times 1 \quad (7)$$

Sendo que:

A = (Absorbância a 520 nm, - Absorbância a 700 nm) pH 1,0 – (Absorbância a 520 nm – Absorbância a 700 nm) pH 4,5

MW (massa molecular): 449,2 g/mol de cianidina-3-glicosídeo (cyd-3-gli)

DF: Fator de diluição

ϵ (coeficiente de extinção molar): 26900 em L.mol⁻¹.cm⁻¹, para cyn-3-gli e 10³ = fator de conversão de g para mg.

4.7 Caracterização química-bromatológica da amora-preta

A amora-preta foi caracterizada quanto aos parâmetros físico-químicos abaixo:

4.7.1 Umidade

A umidade das amostras foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico, no qual 5 g de cada amostra foi submetida a secagem em estufa com circulação de ar a 105 °C até massa constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008)

4.7.2 Lipídios ou extrato etéreo (extração por Soxhlet)

Esta determinação foi realizada com extrator do tipo Soxhlet, onde a amostra permanece de 8 a 16 h em processo de extração com posterior destilação do éter transferência do balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105 °C até peso constante (ADOLFO LUTZ, 2008).

4.7.3 Proteínas Método Kjeldahl clássico

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl, o qual consiste na determinação do teor de nitrogênio total e posterior conversão para proteínas por fator de correção (6,25). A análise foi realizada em três principais etapas consecutivas: digestão, destilação e titulação. A digestão foi realizada em bloco digestor (450 °C) sendo usado 0,2 g de amostra, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (P.A) e catalisador (mistura catalítica: dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). Na etapa de destilação, foram adicionados 20 mL de solução de hidróxido de sódio (40% m / v) e, com ação do aquecimento do destilador, a amônia foi destilada sobre 10 mL de uma solução de ácido bórico (3%) na presença de indicador, formando borato de amônia. Na etapa de titulação, o borato de amônia formado foi titulado com uma solução padronizada de ácido clorídrico (0,1 mol / L), e o teor de proteínas foi determinado pela equação a seguir:

$$\text{Proteína total (\%)} = V \times M \times 0,014 \times 6,25 \times 100 \quad (8)$$

Em que:

V = volume gasto de HCl

M = molaridade do HCl = 0,1M

0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio

6,25 = fator de conversão geral do nitrogênio em proteína

4.7.4 Resíduo mineral

O resíduo mineral fixo foi determinado gravimetricamente após incineração das amostras em forno mufla a 550 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.7.5 Fibra bruta

Para a determinação de fibra bruta, as amostras foram submetidas à digestão ácida e alcalina, e após filtragem em cadinho de Gocch, as frações de fibra bruta foram determinadas por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.7.6 pH

Foram pesados 10g de amostra de amora-preta e diluídas com 100mL de água em um Becker e o pH foi determinado após agitação em pHmetro previamente calibrado (ADOLFO LUTZ, 2008).

No caso do vinho e do vinagre procedeu-se a retirada de alíquota de 10 mL, sendo realizadas leituras diretamente nas amostras.

4.7.7 Acidez titulável

O método baseia-se na titulação com hidróxido de sódio 0,1 Mol/L. Como se trata de uma fruta que apresenta coloração escura, o ponto de viragem foi verificado com potenciômetro em pH 8,3 (ADOLFO LUTZ, 2008).

4.7.8 Acidez volátil

Para determinação da acidez volátil foram transferidos 5 mL da amostra para bécker e adicionado 50 mL de água destilada. A mistura foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 Mol/L potenciométricamente.

Posteriormente foi realizado o cálculo conforme equação 9.

$$\text{Acidez (\%)} = V \times M \times f \times MM / V \times 10 \times n. \quad (9)$$

Onde:

V: volume gasto de solução de NaOH na titulação (mL).

M: Molaridade da solução de hidróxido de sódio.

MM: massa molecular do ácido correspondente em g (n=192g para ácido cítrico e n=60g para ácido acético).

n: número de hidrogênios ionizáveis (n=3 para ácido cítrico e n=1 para ácido acético).

V: volume de amostra em mL.

f: fator de correção da solução de hidróxido de sódio.

4.7.9 Sólidos Solúveis Totais (°Brix)

A determinação de sólidos solúveis foi realizada em refratômetro manual (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.7.10 Açúcares redutores totais

Esta análise foi realizada pelo método DNS conforme descrito por Miller et al. (1959). A solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) foi preparada através da diluição de 10,6 g de ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada. Posteriormente a esta solução foram adicionados 306,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6mL de fenol sob aquecimento a 50°C até completa dissolução.

Inicialmente 1,0 mL de amostra foi hidrolisada com 1,0 mL de HCl 2 Mol/L, sob aquecimento em banho-maria fervente por 10 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, 1 mL da mistura hidrolisada foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 3mL 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 16mL 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).

4.7.11 Determinação de glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético

Os açúcares glicose, frutose e sacarose foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo VARIAN 920 LC, equipado detector de índice de refração e coluna HPX-87-H (Bio-Rad, Hercules, CA) a 45°C, usando solução de ácido sulfúrico (0,005 M) como eluente, taxa de fluxo de 0.6 mL / min. e volume de amostra de 20 µL. As amostras foram adequadamente diluídas passadas em filtro CHOMAFIX 45 µm e posteriormente em SEP PACK C18. Os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção com padrões autênticos de glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético.

4.7.12 Anidrido sulfuroso SO₂ - Livre

Em frasco Erlenmeyer de 250 mL foram colocados 50 mL de amostra, 2 mL de ácido sulfuroso a 60% (m/v) e 2 mL de solução de amido 1% (m/v). A seguir foi procedida titulação com solução de iodo 0,02 Mol/L até o aparecimento da cor azulada persistente (RIZZON, 2010).

Esta análise foi realizada no vinho e vinagre de amora-preta e calculada conforme a equação 10.

Anidrido sulfuroso livre (mg/L)=

$$\frac{v \times N \times 32 \times 1000}{V} \quad (10)$$

Sendo que:

V: volume de solução de iodo gasto na titulação em mL.

M: normalidade de solução de iodo.

V: volume da amostra de vinho em mL.

4.7.13 Anidrido sulfuroso total – SO₂ (Ripper)

Volume de 50 mL de amostra foram transferidos para Erlenmeyer de 250 mL, e adicionados 25 mL de solução de hidróxido de potássio 1 Mol/L, com posterior agitação e repouso por 15 minutos. A seguir foram adicionados 15 mL de solução de ácido sulfúrico a 20 % (m/v) e 2 mL de solução de amido a 1 % (m/v). Titulação com solução de iodo 0,02 Mol/L foi procedida até o aparecimento da coloração azulada persistente. O volume gasto foi anotado e em seguida procedeu-se o cálculo conforme equação 11 (RIZZON, 2010).

Cálculo do resultado:

Anidrido sulfuroso total (mg.L⁻¹) =

$$\frac{v \times N \times 32 \times 1000}{V} \quad (11)$$

Sendo que:

v: volume de solução de iodo gasto na titulação em mL.

N: normalidade da solução de iodo.

V: volume da amostra de vinho em mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química da amora-preta

Na Tabela 2 estão descritos os valores obtidos referente a caracterização físico-química da amora-preta.

Tabela 2: Composição proximal dos frutos de Amora-preta (*Rubus sp.*)

Parâmetros analisados	Resultados	Desvio padrão
Lipídeo (%)	0,210	0,030
Proteína Bruta (%)	7,47	0,489
Resíduo Mineral (cinzas) (%)	2,17	0,108
Fibra bruta (%)	14,33	1,528
Umidade (%)	58,05	0,701
°Brix	9,00	0,00
pH	3,22	0,0018
Acidez titulável (%)	18,5	0,001
Acidez (% ácido cítrico)	1,25	0,002
Açúcares Redutores (g/L)	98,07	0,00

Os valores de pH, acidez em ácido cítrico e sólidos solúveis totais encontrados na amostra de amora-preta empregada no presente trabalho são similares aos encontrados por Mota (2006) em polpa de amora-preta das variedades Guarani e Comanche. O autor relata valores de pH de $3,03 \pm 0,006$, $9,23 \pm 0,15$ °Brix, $1,47 \pm 0,03\%$ de acidez em ácido cítrico na variedade Guarani e valores de $3,27 \pm 0,007$ de pH, $9,15 \pm 0,63$ °Brix de sólidos solúveis totais e acidez em ácido cítrico de $1,50 \pm 0,02\%$ nas amostras da variedade Comanche. Por outro lado, o referido autor encontrou valores superiores de umidade de $90,47 \pm 0,26\%$ e $91,77 \pm 0,25\%$ nas variedades Guarani e Comanche respectivamente.

O menor conteúdo de umidade encontrado na amostra empregada no presente trabalho pode estar relacionado ao fato de que a fruta foi caracterizada de forma integral, ou seja com sementes e cascas. Já Mota (2006) caracterizou a polpa da fruta após trituração da amostra em liquidificador e remoção das sementes e

cascas por peneiramento. Outro ponto a ser considerado é que as amostras foram obtidas já congeladas e permaneceram congeladas por período de aproximadamente 3 meses até caracterização em função da época de produção. Nesse sentido, pode ter ocorrido perda de certa quantidade de água por sublimação durante o período de estocagem. Assim como, o processo de congelamento em freezer convencional (-18°C), por ser relativamente lento, pode ter acarretado na formação de cristais de gelo com maiores dimensões que podem promover rupturas do tecido vegetal e contribuir para perda de água durante o processo de descongelamento.

Hirsch et al. (2012) descrevem valores pH de $2,83 \pm 0,11$ para variedade Guarani e valores de pH de $2,78 \pm 0,16$ e $3,08 \pm 0,16$ para as variedades Cherokee e Tupy, respectivamente cultivadas no município de Pelotas, Rio Grande do Sul. Com relação aos teores de sólidos solúveis os autores encontraram valores que variaram de $7,3 \pm 0,5$ °Brix (Sel 03/001) a $10,2 \pm 0,4$ °Brix (cultivar Guarani) e elevados conteúdos de umidade ($84,8 \pm 2,0\%$ - Sel 02/96 e $90,3 \pm 1,8\%$ - variedade Cherokee). Os teores de proteínas verificados pelos autores variaram de 0,09% (variedades Tupy e Sel 02/96) a $0,14 \pm 0,02\%$ (cultivar Sel 03/001), enquanto os conteúdos de fibra alimentar variaram entre 5,5% (Cherokee e Sel 02/96) a $5,8 \pm 0,1\%$ (Sel 07/001). Quanto aos teores de resíduo mineral estes autores encontraram valores entre as diferentes cultivares os quais variaram entre 0,27% a 0,49%. Já Clerici e Carvalho Silva (2011) descreveram maiores conteúdos de resíduo mineral em amora-preta brasileiras (3,5%), similar ao encontrado no presente estudo.

Quanto ao teor de lipídeos, pode-se observar que o valor obtido foi de 0,21%, valores semelhantes foram encontrados por Hirsch et al. (2012) nas cultivares Guarani (0,22%), Cherokee (0,24%) e Tupy (0,15%) e nas seleções 02/96 (0,30%), 03/001 (0,16%) e 07/001 (0,21%). Já Lameiro et al. (2011) descrevem valores superiores de lipídeos (0,53%) em frutos de amora-preta (*Rubus fruticosus*) também produzidos em Pelotas, Rio Grande do Sul. Tais autores descrevem valores de sólidos solúveis totais de 8 °Brix, 92,43% de umidade, 0,95% de proteínas, 1,66% de cinzas, 0,28% de fibra bruta e 0,53% de extrato etéreo ou lipídeos.

5.2 Determinação de compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante na fruta

No presente trabalho foram utilizados o etanol e a acetona como solventes para a extração dos compostos bioativos da amora-preta. De maneira geral a acetona proporcionou melhor extração dos compostos antioxidantes. Vizotto e Pereira (2011) em estudo que buscou otimizar o processo de extração de compostos fenólicos e determinação de atividade antioxidante em amora-preta (*Rubus sp.*) descreveram a acetona como melhor solvente.

Tabela 3: Compostos bioativos na amora-preta

Solvente extrator	Compostos fenólicos totais (mg GAE/100g)	Antocianinas (mg cian.-3-glicosídeo/100g)	Atividade antioxidante (DPPH) ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	Atividade antioxidante (ABTS ⁺) ($\mu\text{mol TEAC/g}$)
Acetona	1.702,52 \pm 7,27 ^a	511,65 \pm 0,00 ^a	38,48 \pm 0,47 ^a	9,43 \pm 0,14 ^a
Etanol	983,35 \pm 5,21 ^b	399,4 \pm 0,00 ^b	36,01 \pm 0,51 ^b	9,16 \pm 0,11 ^a

Médias na mesma coluna com letras diferentes diferem estatisticamente ao nível de 5% ($p < 0,05$) de significância de acordo com o Teste t student.

Conforme pode ser verificado na Tabela 3, em relação ao conteúdo de compostos fenólicos, observa-se que ao ser empregada acetona como agente extrator, esta apresentou melhor capacidade extrativa, sendo verificado maior conteúdo de fenólicos (1.702,52 mg GAE/100g).

Valores inferiores de compostos fenólicos totais (241,7 mg GAE/100g) foram relatados por Ferreira et al. (2010) em amostras de amora preta (*Rubus sp.*) empregando etanol e água na proporção 8:2 como solução extratora

Por outro lado, Vizoto e Pereira (2011) ao analisarem amostras de amora-preta (*Rubus sp.*) encontraram valores mais próximos (692 mg GAE / 100g), mas ainda menores que os verificados do presente trabalho (711 mg GAE/100g de fruta) quando empregado etanol na extração. Quando foi empregada acetona no processo de extração foram observados valores superiores aos encontrados com etanol e bastante similares aos verificados no presente trabalho (1.702 mg GAE/100g),

De fato a solução extratora tem grande influência sobre a extração e, portanto sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais determinados na amostra. De acordo com Vizzotto e Pereira (2011) e Liu et al. (2000) solventes com elevada polaridade como a água ou apolares ou com polaridades muito baixas como hexano ou diclorometano não apresentam-se como bons agentes de extração. O trabalho de Vizzotto e Pereira (2011) indica a acetona como melhor solvente para extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) em amostras de amora-preta, seguido pelos solventes metanol e etanol, sendo que tais autores relatam não haver diferença significativa em relação a capacidade extratora destes solventes. Segundo os autores os compostos fenólicos encontrados na amora-preta apresentam moderada polaridade. Outra possibilidade de uso como solvente extrator é a combinação de água com solventes orgânicos o que proporciona um meio moderadamente polar que favorece a extração de polifenóis (LAPORNIK et al., 2005; LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2005; VIZZOTTO e PEREIRA, 2011). No entanto, o uso de água pura resulta em extratos com elevada quantidade de impurezas como ácidos orgânicos, açúcares e proteínas solúveis, o que pode interferir na quantificação destes compostos (CHIRINOS et al. 2007; VIZZOTTO e PEREIRA, 2011).

Jacques et al. (2010) realizaram análise dos compostos fenólicos em polpa congelada de amora-preta cultivar Tupy (*Rubus fruticosus*) produzida no município de Morro Redondo, Rio Grande do Sul. As polpas foram congeladas em diferentes temperaturas (-10, -18 e -80 °C) por período de seis meses e foi empregado metanol como extrator para determinação do fenólicos totais. Os autores descreveram que a temperatura de -80 °C proporcionou menor redução no conteúdo de compostos fenólicos, o quais apresentaram valores de 1938,54 mg GAE/100g, 1921,62 mg GAE/100 e 1780,02 mg GAE/100 após 2 meses, 4 meses e 6 meses, respectivamente. Quando empregado temperatura de -10 °C houve maior redução do conteúdo de polifenólicos (1938,70 mg GAE / 100g de fruta, 1938,7 mg ác. Gálico / 100g de fruta, 1920,89 mg GAE / 100g de fruta e 1490,05 mg GAE / 100g de fruta). Por outro lado, em temperatura de -18 °C, ou seja temperatura de congelamento de freezers comerciais, houve redução moderada no conteúdo de polifenólicos após 6 meses (1930,35 mg GAE / 100g) de armazenamento mas, não houve redução significativa após 2 meses (1936,54 mg GAE / 100g) e 4 meses (1505,02 mg GAE /

100g). Os valores descritos por tais autores em temperaturas de -18 °C são semelhantes aos encontrados no presente estudo

Koka e Karadeniz (2009) analisaram 10 cultivares selvagens de amora-preta da região da Turquia quanto aos seus compostos fenólicos empregando etanol como agente extrator. Os autores verificaram conteúdos de 3,05 mg GAE/g na cultivar Cherokee, 2,25 mg GAE/g na Chester, 2,39 mg GAE / g na Jumbo e 2,10 mg GAE/g na Navalho, ou seja valores inferiores ao presente trabalho (9,83 mg GAE/g). Cabe salientar que vários fatores como período de chuvas, clima, solo, colheita e armazenamento podem influenciar significativamente nos resultados.

Semelhante ao presente trabalho, UBEDA et al. (2013) ao analisarem compostos fenólicos de morangos através da extração com etanol e acetona, encontraram valores de 2000 mg GAE/kg de amostra em extrato realizado com acetona e 1700 mg GAE/ kg com etanol, indicando que a acetona possui maior poder de extração.

Considerando que as antocianinas fazem parte dos flavonoides e, portanto, são compostos fenólicos, o solvente empregado para extração deste pigmento tem grande influencia em sua determinação. São relatados na literatura o uso de diferentes solventes extratores, como metanol e água (FERREIRA et al. 2010), metanol acidificado (MOTA, 2006), etanol (FLOIRENDO, 2014), etanol acidificado (PERGOLA, et al. 2006; DAI, et al. 2009) e acetona (FERRARI e AGUIRRE, 2012. FLOIRENDO, 2014),

No presente trabalho foi verificado maiores conteúdos de antocianinas quando empregado acetona no protocolo de extração, sendo observado conteúdo de 511,65 mg-cianidina-3-glicosídeo/100g. Tal conteúdo foi 28,13% superior ao obtido com extração em etanol (399,3mg cianidina-3-glicosídeo/100g).

De acordo com Siriwoharn e Wrolstad (2004) os teores de antocianinas, em especial a cianidina-3-glicosídeo, pigmento majoritário na amora-preta varia bastante com o estágio de maturação das frutas. Estes autores descrevem conteúdos superiores de cianidina-3-glicosídeo/100g em frutos maduros (317 mg cianidina-3-glicosídeo/100g de fruta).

Motta (2006) descreve valores inferiores de antocianinas em polpas de amora-preta cultivar Guarani (194,59 mg cianidina-3-glicosídeo/100g), porém usando metanol acidificado como solvente.

Koka e Karadeniz (2009) ao avaliarem cultivares de amora selvagens, verificaram conteúdos de 95 mg cianidina-3-glicosídeo/100g para a variedade Bursa 2 e 158 mg cianidina-3-glicosídeo/100g para a variedade Ness. Silva et al. (2011) descreveram conteúdos de 120,9 mg cianidina-3-glicosídeo/100g em cultivar Caingangue, 120,7 mg cianidina-3-glicosídeo/100g na cultivar Comanche, 158,2 mg cianidina-3-glicosídeo/100g na Guarani, 104,9 mg cianidina-3-glicosídeo/100g na Tupy, 146,7 mg cianidina-3-glicosídeo/100g na Brazos e 130,2 mg cianidina-3-glicosídeo/100g na Xavante.

Ferreira et al. (2010) descreve valores de 104,1 mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de fruta em amostras de amora-preta *Rubus* sp. Jacques et al. (2010) ao estudarem o efeito da temperatura e tempo de estocagem sobre o decaimento sobre o conteúdo de antocianinas constataram que menores temperaturas (-80°C) contribuíram para a melhor estabilidade das antocianinas. Foram encontrados conteúdos de 140,73 mg/100 (tempo zero), 102,16 mg/100g (tempo 2 meses), 95,25 mg/100g (4 meses) e 97,47 mg/100g (6 meses).

Os valores superiores de antocianinas-3-glicosídeo (511,65 mg cianidina-3-glicosídeo/100g) encontrados no presente estudo podem estar associados a diferenças específicas da fruta em função da região de produção, condições climáticas e estágio de maturação. Outro fator a ser considerado é o menor conteúdo de umidade verificado nas amostras estudadas, o que pode ter contribuído para uma maior concentração de pigmentos de amostras.

Para a determinação da atividade antioxidante dos frutos de amora-preta foram empregados protocolos baseados na captura dos radicais orgânicos DPPH e ABTS com curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em μmol Trolox/g e neste sentido cabe salientar que são verificadas na literatura científica diferentes unidades para expressar a capacidade antioxidante, o que, de certa forma, dificulta a comparação dos resultados.

Similarmente ao observado com conteúdo de fenólicos totais o tipo de solvente empregado no processo de extração influenciou nos valores da atividade antioxidante em ambos os métodos de determinação da capacidade de captura de radicais livres (DPPH e ABTS).

Foram verificados valores de 38,48 μmol Trolox / g de fruta quando realizados extração com acetona e 36,01 μmol Trolox / g de Fruta com extração em etanol. Tais

valores diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), indicando que acetona promoveu melhor extração de substâncias com atividade antioxidante mensuradas pelo método DPPH. Em relação à atividade antioxidante determinada pelo método de captura do radical ABTS não foi observada diferença significativa nos valores obtidos em ambos os solventes extratores (9,43 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ de fruta, em acetona e 9,16 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ de fruta em etanol) utilizados. Este resultado sugere que ambos os solventes (etanol e acetona) apresentam capacidade similar de extração de compostos antioxidantes mensurados através da captura do radical ABTS.

Machado et al. (2011) relatam valores inferiores de atividade antioxidante (DPPH) em amostra liofilizada de amora-preta produzida na região de Pelotas, RS, sendo descritos valores de 2688 $\mu\text{mol TEAC} / 100\text{g}$ (26,88 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$), com extração etanol. Ferreira et al. (2010) após avaliarem diferentes tipos de solventes de extração obtiveram valores que variaram de 946,5 mM TEAC / 100g (0,947 $\mu\text{mol TEAC} / 100\text{g}$) quando empregado metanol acidificado na extração a 2209,7 mM TEAC / 100g (2,21 $\mu\text{mol TEAC} / 100\text{g}$) com extração por metanol:água). Valores de 1455,1 mM TEAC / 100g (1,46 $\mu\text{mol TEAC} / 100\text{g}$) foram observados com extração com etanol acidificado.

Gancel et al. (2011) ao avaliarem os compostos antioxidantes (DPPH) em amora-preta (*Rubus Adenotrichus*) em produtos de diferentes etapas do processamento da fruta verificaram conteúdos de 42,6 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ em extratos etanólicos.

Com relação ao ensaio analítico baseado na capacidade de captura do radical ABTS, Silva et al. (2011) descrevem valores similares em amostras de amora-preta cultivadas em Pelotas, RS. Os autores encontraram 7,89 $\mu\text{mol/g}$ na cultivar Camino Real, 7,80 $\mu\text{mol/g}$ na cultivar Ventana, 10,43 $\mu\text{mol/g}$ na cultivar Diamante e 6,79 $\mu\text{mol/g}$ na cultivar Camarosa.

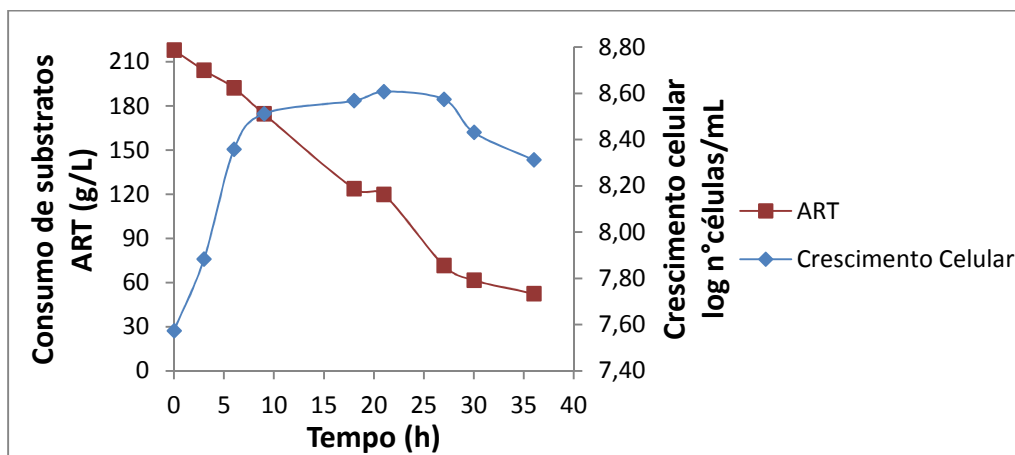
Sellappan, Casimir e Krewer (2002) obtiveram valores de 18,04 $\mu\text{mol} / \text{g}$ na variedade Choctaw e de 2,65 $\mu\text{mol} / \text{g}$ na variedade Kiwa em amostras de amora-preta submetidas a extração com metanol acidificado com HCl.

6. Fermentação alcoólica

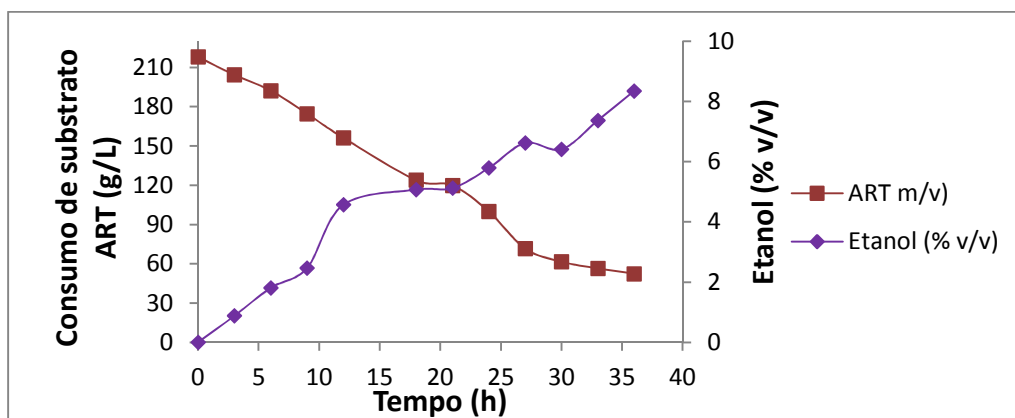
6.1 Acompanhamento da biomassa celular e consumo de substrato durante fermentação alcoólica

No gráfico 1A, está demonstrada a variação de biomassa celular e de açúcares redutores totais ao longo da fermentação alcoólica do mosto obtido a partir da polpa de amora-preta.

Avaliando-se a curva de biomassa celular é verificado ausência de fase LAG durante fermentação alcoólica, sendo observado crescimento celular de forma linear até 10 horas de cultivo (fase exponencial), acompanhado de redução linear no conteúdo de substrato (consumo de 20%). Considerando que no início do cultivo (0 horas) o meio continha uma população de 2×10^6 células/mL e após 10 horas de processo passou para uma população da ordem de $3,25 \times 10^8$ células/mL, ficou demonstrado que a levedura apresentava intensa atividade metabólica e encontrava-se na fase exponencial de crescimento durante o referido período de cultivo ($\mu_{\text{máx}} = 0,24 \text{ h}^{-1}$, Tabela 3).



A



B

Gráfico 1 A E 1 B: Crescimento microbiano versus consumo de açúcares e Parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica.

Semelhante ao estudo realizado com amora-preta, Hidalgo et al. (2013) ao conduzirem fermentação alcoólica de morangos com culturas selvagens de *S. cerevisiae* isoladas da fruta com concentração de inóculo da ordem de 2×10^6 células/mL, verificaram na metade do processo uma população microbiana na ordem de $2,02 \times 10^7$ células/mL e ao final população de $5,38 \times 10^7$ células/mL.

Em cultivos industriais a ausência da fase LAG, ou seja, período em que o micro-organismo está adaptando o seu metabolismo as condições nutricionais e operacionais é indesejada, uma vez que, implica no aumento de tempos mortos e conseqüentemente no aumento do custo operacional do processo. De fato, o processo de adaptação da levedura *S. cerevisiae* r.f. *bayanus* ao mosto constituído de polpa da fruta contribuiu para supressão da fase LAG. O pé de cuba (inóculo do fermentador) foi obtido a partir do cultivo por 24 horas, nas mesmas condições operacionais da fermentação alcoólica, de um volume correspondente a 10% do volume reacional de mosto suplementado e sulfitado. Este período de cultivo contribuiu para ativação dos sistemas enzimáticos da leveduras, em especial das enzimas envolvidas no processo de fermentação alcoólica.

Foi observado logo no início do processo intenso desprendimento de bolhas de gás carbônico (CO_2) indicando a fase tumultuosa da fermentação. Paralelamente ao desprendimento de CO_2 foi verificado decréscimo linear de substrato nas primeiras 18 horas de cultivo (consumo de 43,2%). Tais condições indicam que a levedura empregada apresentou boa atividade metabólica e que o inóculo foi adequadamente preparado.

Entre 10 e 27 horas de cultivo pode ser verificado a fase estacionária, sendo observado decréscimo do conteúdo de biomassa celular após 27 horas de cultivo bem como similaridade no perfil da curva de consumo de substrato e crescimento celular entre 27 e 36 horas.

Após 27 horas de fermentação houve redução na intensidade do desprendimento das bolhas de gás carbônico, havendo completa interrupção na liberação de CO_2 em 36 horas de cultivo. Associado a interrupção da produção de gás carbônico houve precipitação da biomassa (células e partículas suspensas), indicando a finalização do processo fermentativo. Na literatura são verificados

trabalhos que descrevem diferentes tempos de fermentação alcoólica de sucos de frutas.

Valores similares ao verificado no presente trabalho são descritos por Bortolini et al. (2001) em fermentações alcoólicas de sucos de kiwi (18 e 22 °Brix) submetidos a diferentes tratamentos, nas quais o tempo de fermentação foi de 48 horas. O mesmo tempo de fermentação é relatado por Tessaro et al. (2010), em fermentações alcoólicas de suco de laranja.

Duarte et al. (2010) descreve tempo de 48 h de fermentação em estudo de microvinificação de framboesa, partindo de um mosto contendo 16 °Brix com cepa de *S. cerevisiae*. Diferenças nos tempos de fermentação alcoólica podem estar relacionadas a diferentes aspectos do processo de produção, tais como, características inerentes ao suco 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).

Com relação à produção de etanol verifica-se no gráfico 1 B que a levedura foi hábil em produzir etanol ao longo do cultivo, especialmente nas primeiras 18 h de cultivo ($Q_P = 2,23$ g/Lh). Paralelamente, foi observada redução linear do conteúdo de açúcares redutores totais (ART) com elevada velocidade global de consumo de substrato ($Q_S = 5,23$ g/Lh) nas primeiras 18 horas de cultivo. Entre 18 h e 36 h foi verificado certa redução na taxa global de consumo de substrato ($Q_S = 3,97$ g/Lh), sendo observado conteúdo residual de ART no final do processo (36h) de 52,4 g/L, o que correspondeu a uma assimilação de 76% (Y_C) do conteúdo original do substrato (Tabela 4).

O consumo incompleto dos açúcares presentes no mosto pode estar associado ao acúmulo de etanol no meio (63,9 g/L), que tornou-se tóxico as células microbianas inibindo a atividade metabólica destas. Outro aspecto que pode ter contribuído para o residual de açúcares não utilizados pela levedura pode ser estar relacionado a possível redução ou falta de nutrientes (minerais e fonte de nitrogênio) a partir de 27 horas de fermentação. Tal condição poderia ter sido contornada por suplementação do meio com nutrientes ao longo do processo fermentativo, através de adições parciais de ENOVIT®. Estudos posteriores de otimização das condições de fermentação alcoólica de mosto formulado com polpa de amora-preta podem contribuir para a intensificação do consumo de substrato e melhor desempenho da

fermentação alcoólica. No entanto, cabe ressaltar que o conteúdo de etanol produzido pela levedura (8,09% v/v) foi suficiente para a boa produção de ácido acético nas fermentações acéticas. Graduações alcoólicas do mosto inferiores a 5 °GL podem comprometer a qualidade final do vinagre pois resulta em vinagres fracos e susceptíveis a contaminações (RIZZON, 2004; XAVIER et al. 2011).

De acordo com Pedroso (2003) os vinhos a serem acetificados devem conter teor de álcool de 7 °GL a 9 °GL, pois teores muito elevados, em torno de 10 °GL ocasionam a supressão do desenvolvimento das bactérias ácido acéticas, assim como teores menores de 7 °GL ocasionam vinagres fracos favorecendo contaminações.

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros da fermentação alcoólica.

Tabela 4: Parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica

Parâmetros Fermentativos	Valores Observados
Produção Final (P_F)	63,9g/L \pm 0,14
Rendimento em etanol ($Y_{P/S}$)	0,39 g/g \pm 0,01
Produtividade Volumétrica em etanol (Q_P)	1,78 g/Lh \pm 0,00
Taxa global do consumo do substrato (Q_S)	4,6 g/Lh \pm 0,00
Eficiência da fermentação alcoólica (η)	76% \pm 2,32
Percentual global de consumo do substrato (Y_C)	76%
Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$)	0,24 h ⁻¹

Almeida et al. (2006) obtiveram em fermentação alcoólica do fruto de mandacaru conduzida em fermentador de bancada produtividade em etanol ($Q_P = 1,75$ g/Lh) semelhante a observada no presente estudo ($Q_P = 1,78$ g/Lh). No entanto os autores descrevem valores superiores de rendimento ($Y_{P/S} = 0,461$ g/g) e eficiência ($\eta = 90,2\%$).

Em fermentações de mostos obtidos do fruto da Palma forrageira, Lopes et al. (2012) encontraram valores semelhantes de rendimento ($Y_{P/S} = 0,39$ g/g), eficiência ($\eta = 73,09\%$) e produtividade em etanol ($Q_P = 2,6$ g/Lh).

Por outro lado, Silva et al. (2007) descrevem valores inferiores de produtividade ($Q_P = 0,78$ g/Lh), rendimento ($Y_{P/S} = 0,3$ g/g) e eficiência ($\eta = 57,78\%$) em fermentação alcoólica de suco de caju.

Bortolini et al. (2001) ao avaliarem o rendimento, eficiência e produtividade em vinho de kiwi produzidos em condições semelhantes de fermentação, encontraram valores de 43,50% de rendimento, 83,14% de eficiência e 1,40 g/Lh de produtividade volumétrica.

Tessaro et al. (2010) ao elaborarem fermentado alcoólico de laranja obtiveram rendimento de 70,48% a partir de mosto com 18 °Brix e 71,75% em mosto com 22 °Brix e produtividade de 0,25 e 0,28 g/Lh com 18 ° Brix e 22 °Brix, respectivamente.

6.2 Caracterização físico-química do vinho de amora-preta

Na Tabela 5 estão descritos os parâmetros físico-químicos do vinho de amora obtido na fermentação alcoólica.

Tabela 5: Caracterização físico-química do fermentado alcoólico de amora-preta.

Parâmetros Físico-químicos	Valores Observados (Média ±Desvio Padrão)
pH	3,18
Acidez titulável (em ácido acético) %	0,92 ± 0,004
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	6
Etanol (g/L)	63,9 ± 3,04
Açúcar redutores totais (g/L), dentre os quais:	52,4 ± 0,002
Glicose (g/L)	8,5 ± 0,00
Frutose (g/L)	39,6 ± 0,00
Sacarose (g/L)	1,6 ± 0,00
Densidade (g/L)	1052,8 ± 0,00
Anidrido sulfuroso livre - SO ₂ (mg/L)	15,32 ± 0,002
Anidrido sulfuroso total - SO ₂ (mg/L)	40,96 ± 0,004
Ácido acético (g/L)	nd*
Compostos fenólicos totais (mg GAE/L)	199,25 ± 2,19
Antocianinas (mg/L)	51,93 ± 0,53
Atividade antioxidante - método DPPH (µmol TEAC/mL)	139,52 ± 7,07
Atividade antioxidante - método ABTS (mM)	21,24 ± 1,24

*nd: não detectado

O fermentado alcoólico de amora-preta apresentou pH de 3,18, acidez em ácido acético de 0,92 g/100mL (correspondendo a 1,54% de acidez total) e teor de sólidos solúveis totais (SST) de 6 °Brix. De acordo com Fracasso et al. (2009) os ácidos no vinho são provenientes da própria matéria-prima utilizada, sendo que estes podem provir da casca, pele, caroço, sementes as quais sofrem ação da enzima glicose-oxidase. O teor de sólidos solúveis corresponde a açúcares solúveis (fermentescíveis e não-fermentescíveis) bem como ácidos orgânicos dissolvidos no meio.

Valores relativamente próximos de pH, acidez e SST aos encontrados no presente trabalho são relatados por Tessaro et al. (2010) em fermentado alcoólico de laranja (mosto com 18 °Brix). Os autores verificaram valores da acidez de 1,75%, pH de 3,56 e 6,65 °Brix.

Almeida et al. (2006) obtiveram fermentado alcoólico de mandacaru com acidez total em ácido acético inferior (0,24%) ao comparado com o presente trabalho, entretanto o valor de pH relatado no fermentado final foi um pouco superior (3,91).

Hernández-Gómez, Úbeda e Briones (2003) descrevem valores de pH de 4,8, acidez 0,54% e 10 °Brix em fermentado alcoólico oriundo de suco de melão.

Oliveira et al. (2011b) ao elaborarem fermentado alcoólico de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) observaram valores de pH de 3,28, 5,77 °Brix, 44,3 meq/L e 94,94 g/L de etanol.

Com relação ao conteúdo de etanol em fermentados alcoólicos de fruta é verificado na literatura diferentes conteúdos. Isto é devido a diferenças inerentes ao processo fermentativo como diferenças no conteúdo inicial de substrato, capacidade fermentativa da levedura alcoólica, diferenças de temperatura de processo, disponibilidade de nutrientes, modo de condução do processo, entre outros.

No presente estudo foi verificado conteúdo final de etanol na ordem de 63,9 g/L (8,1% v/v). Oliveira et al. (2011a) elaboraram fermentado alcoólico do fruto do mandacaru e obtiveram vinho com 5,2 °GL a partir de suco contendo 105,17 g/L de açúcares. Oliveira et al. (2011b) descrevem conteúdo de 94,94g/L (12 °GL) em fermentado alcoólico de cagaita partindo de um mosto de contendo 20 °Brix.

Carmo et al. (2012) em fermentações obtidas a partir de polpa de umbu com 10 °Brix de SST obtiveram fermentado alcoólico com 46,6 g/L de etanol (6 °GL).

O fermentado alcoólico obtido apresentou uma densidade de 1052,8 g/L. A densidade varia de acordo com a quantidade de açúcares e álcool presentes no fermentado alcoólico. O conteúdo de açúcar tem grande influência em tal parâmetro físico-químico, sendo a densidade diretamente proporcional à quantidade de açúcares do meio. Neste sentido, vinhos cujos açúcares foram totalmente convertidos em etanol a densidade pode ser inferior a 1, com densidade variando entre 0,9975 g/L a 0,9925 g/L (FILHO et al. 2002). De fato, o fermentado alcoólico obtido de amora-preta apresentou maiores conteúdos de açúcares (52,4 g/L) o que refletiu no seu valor de densidade.

Silva et al. (2010) ao elaborarem fermentado alcoólico de abacaxi com graduação alcoólica de 7,3% v/v e teor de açúcares de 3,0 g/L encontraram uma densidade de 0,994g/L. Fracasso et al. (2009) ao avaliarem os aspectos físico-químicos de vinhos de uva da região de Concórdia Santa Catarina, encontraram valores de densidade que variaram de 0,996 g/L a 1,050 g/L, os quais possuíam graduação alcoólica de 10,5% (v/v) e 10,97% (v/v) respectivamente. Já Filho et al. (2002) ao elaborar vinho de caju com 8 °GL e 13 Br ix obtiveram vinho com densidade de 1,020 g/L.

Quanto ao dióxido de enxofre livre o valor encontrado foi de 15,32 mg/L e dióxido de enxofre total foi de 40,96 mg/L. Olivier et al. (2008) ao realizarem a fermentação alcoólica de uva Niágara com adição de 50mg/L de metabissulfito de sódio encontraram valores que variaram desde 25,60mg / L a 34,03 mg / L para dióxido de enxofre livre e 38,65mg / L a 82,42mg / L para dióxido de enxofre total, valores estes superiores ao encontrados no presente trabalho.

Conforme relatado anteriormente a legislação preconiza a adição de até 350 mg/L de metabissulfito de sódio em mosto destinado à fermentação alcoólica (BRASIL,1988). No presente trabalho foi empregado uma quantidade de 50 mg/L de metabissulfito de sódio na etapa de sulfitação. Desta forma, a partir dos resultados obtidos conclui-se que o fermentado obtido encontra-se dentro dos limites preconizados pela legislação brasileira, que é de 200 mg/L de SO₂ total (BRASIL, 2013).

Por fim, conforme descrito na Tabela 5 não foi detectado ácido acético no fermentado alcoólico, indicando que a fermentação alcoólica ocorreu adequadamente, sem contaminações ou desvios de rota.

Em relação aos compostos fenólicos totais foram encontrados conteúdos de 199,25 mg GAE / L. Verifica-se redução na concentração de compostos fenólicos presentes no vinho em relação à fruta bruta. O conteúdo de fenólicos no vinho foi 20% inferior ao verificado na amostra de fruta bruta submetida a extração com acetona (933,35 mg GAE / 100g que corresponde a 245,83 mg GAE / L) e cerca de 53% inferior em se tratando da extração realizada com acetona (1702,52 mg GAE / 100 g de fruta correspondendo a 425,63 mg GAE / L).

A redução do conteúdo de fenólicos totais do fermentado alcoólico em relação à matéria-prima pode estar relacionado ao fato do mosto ter sido formulado com a polpa da fruta, ou seja, sem cascas e sem sementes. De fato maiores conteúdos de polifenóis são encontrados nas cascas e nas sementes das frutas.

Os resultados do presente estudo foram comparados com fermentados alcoólicos de outras frutas, pelo fato de que existem poucos trabalhos na literatura científica quantificando compostos bioativos de vinho de amora-preta, assim como diferem em relação as metodologias utilizadas.

Semelhante ao conteúdo de fenólicos observado no vinho de amora-preta, Mena et al. (2012) ao elaborarem vinho de romã a partir do suco de romã da variedade *Mollar de Elche* proveniente de Alicante, Espanha descreveram conteúdo de 158 mg GAE / L de vinho. Budak e Guzel-Seydim (2010) ao avaliarem a conteúdo de compostos fenólicos totais em vinhos de uvas *Ulugbey Karasi* produzidas na Turquia encontraram valores bastante inferiores (21,33 mg GAE / L). Por outro lado, Ubeda et al. (2013) ao analisarem os compostos fenólicos em vinho de morango encontraram valores superiores, na ordem de 868 mg GAE/L.

Su e Chien (2007) descrevem conteúdos de 85,8 mg GAE / 100mL (858 mg GAE/L) em vinhos de mirtilo fermentados sem casca e de 115 mg GAE/100mL (1000 mg GAE/L) em vinhos fermentados com casca. Os resultados descritos por SU e Chien (2007) sugerem que a presença de cascas no mosto durante fermentação pode contribuir para maior conteúdo de compostos fenólicos totais no fermentado alcoólico.

Similarmente ao observado com o conteúdo de polifenóis, ocorreu decréscimo no conteúdo de antocianina (cianidina-3-glicosídeo) no vinho de amora-preta (51,93 mg cianidina-3-glicosídeo / L) em relação à fruta, independentemente do tipo de solvente usado para extração na fruta (88 mg cianidina-3-glicosídeo / L em extrato

etanólico e 99,85 mg cianidina-3-glicosídeo / L em extrato obtido com acetona), correspondendo a valores 41% e 48% menores respectivamente. Mena et al. (2012) relataram conteúdos entre 1360 mg cianidina-3-glicosídeo / L e 230 mg cianidina-3-glicosídeo / L em suco de romã da variedade *Wonderful* e *Mollar de Elche* respectivamente, no entanto, ao realizarem a vinificação tais compostos reduziram 46% e 61%.

Muleiro, Pardo e Zafrilla (2010) descrevem conteúdos 5,7 vezes superiores em vinhos de uva tradicional (296,6 mg cianidina-3-glicosídeo / L) e 6,7 vezes superiores em vinhos de uva orgânica (344,7 mg cianidina-3-glicosídeo/L).

Su e Chien (2007) descrevem valores similares de antocianinas em fermentado alcoólico de mirtilo obtidos com mostos fermentados com casca (56 mg cianidina-3-glicosídeo / L) e maiores com mosto fermentado sem casca (99,6mg cianidina-3-glicosídeo / L).

A pesquisa de atividade antioxidante através dos métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS mostrou que vinho de amora-preta apresenta atividade antioxidante. Possivelmente a atividade antioxidante do produto está associada a presença de compostos polifenólicos, flavonoides e antocianinas, entre outros oriundos da matéria-prima.

O vinho de amora-preta apresentou atividade antioxidante de 139,52 $\mu\text{mol TEAC} / \text{mL}$ pelo método DPPH e de 21,24 mM pelo método ABTS.

Budak e Guzel-Seydim (2010) verificaram valores inferiores em vinhos de uvas (*Ulugbey Karasi*) ao quantificar antioxidantes pelo método ABTS. Tais autores descrevem valores de 11,20 mM. Da mesma forma, Muleiro, Pardo e Zafrilla (2010) ao avaliarem a atividade antioxidante (método ABTS) de vinhos de uva tradicional e orgânica encontraram atividade de 6,78 mM em vinho de uvas orgânicas e 6,02 mM no vinho de uvas tradicionais.

Igualmente, Villaño et al. (2004) ao avaliarem a capacidade antioxidante de vinhos brancos e vinhos bordôs, descrevem valores inferiores aos observados no presente trabalho. Tais autores relatam conteúdos de 0,26 mM em vinhos brancos e 5,01 mM em vinhos de uvas bordôs.

Com relação ao vinho Ubeda et al. (2011) ao realizarem a avaliação da atividade antioxidante de vinhos de morango pelo método DPPH, descrevem valores de 1758 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1838 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1870 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, obtidos em

fermentações conduzidas de forma espontânea com leveduras selvagens nativas (sem inoculação) e 1421 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1649 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1699 $\mu\text{mol TEAC/kg}$ conduzidas em fermentações alcoólicas inoculadas.

7. Fermentação acética conduzida em vinagreira de grábia

No Gráfico 2 estão descritas as curvas relativas a produção média de ácido acético e consumo médio de etanol no decorrer de cada uma das três bateladas sucessivas de fermentação acética conduzida em vinagreira (barril acetificador).

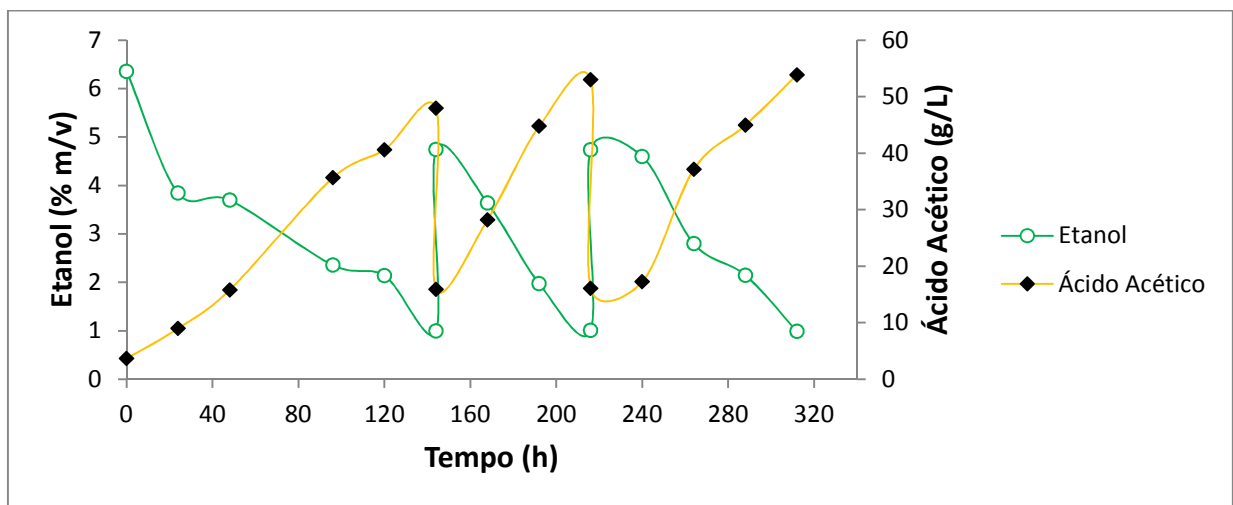


Gráfico 2: Curvas de consumo etanol e produção de ácido acético na fermentação acética em barril acetificador realizada em três ciclos sucessivos.

O inóculo constituído por bactérias ácido-acéticas isoladas de vinagre colonial de uva (vinagre não pasteurizado) produzido no município de Pato Branco, Paraná demonstraram boa habilidade na conversão de etanol a ácido-acético no mosto formulado com vinho de amora-preta. Foi verificado bom desempenho microbiano ao longo das três bateladas sucessivas de fermentação acética.

Pode ser verificado que a primeira batelada teve duração de 144 h quando foi verificado consumo de 85% do conteúdo de etanol presente no fermentado alcoólico e produção de 47,95 g/L de ácido acético (Gráfico 2, Tabela 6). Já na batelada sucessiva (segunda batelada) foi observado redução no tempo de fermentação passando de 144 h (primeira batelada) para 72 h (segunda batelada) quando foi observado produção de 52,99 g / L de ácido acético e consumo de substrato 78,8%.

A redução do tempo de fermentação em 50% na segunda batelada em relação à primeira pode estar associada a maior quantidade de bactérias ácido-acéticas no interior da vinagreira. De fato, no segundo ciclo de fermentação já havia completa formação da película superficial conhecida como mãe do vinagre. Tal película é constituída de polissacarídeos e permite o contato das bactérias ácido-acéticas com o oxigênio superficial. Possivelmente no primeiro ciclo de fermentação a ausência inicial de tal película (formada ao longo do processo) contribuiu para menor eficiência da oxidação acética (conversão do etanol em ácido acético) pelas bactérias.

No entanto, verifica-se aumento do tempo de fermentação acética no terceiro ciclo (96 h) em relação ao segundo (72 h). Neste terceiro ciclo de fermentação foi verificada produção de 53,84 g/L de ácido acético em 96 h acompanhado de um consumo de 79,1% do substrato de etanol (Gráfico 2, Tabela 6). Possivelmente o aumento do tempo da conversão acética no terceiro ciclo (em relação ao segundo) pode estar associado ao acúmulo de biomassa (exopolissacarídeos e células microbianas) na camada gelatinosa superficial (mãe do vinagre) o que pode ter dificultado a absorção de oxigênio pelas bactérias ácido-acéticas tendo como consequência redução na atividade de conversão oxidativa de etanol em ácido acético. De acordo com Aquarone e Zancanaro (1983) e Tesfaye (2002) esta diminuição pode estar associada ao fato da existência de cepas bacterianas da subespécie *Acetobacter xylinum* que produzem material gelatinoso conhecido como zooglea que causa a obstrução e troca de ar, reduzindo a cinética do processo fermentativo. Na produção de vinagre a disponibilidade de oxigênio é fator limitante no processo de acetificação (QI et al. 2013).

QI et al. (2013) menciona que a ativação das bactérias acéticas é observada quando a acidez é inferior a 20g/L de ácido acético, desta forma, a acidez do meio pode influenciar o crescimento bacteriano e metabolismo, sendo que concentrações superiores a 40g/L podem diminuir o desenvolvimento bacteriano e por conseguinte a produção de ácido acético.

Tabela 6: Parâmetros fermentativos do fermentado acético de amora-preta produzido em vinagreira

Parâmetros do Processo	Primeiro Ciclo	Segundo Ciclo	Terceiro Ciclo
	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3
Produção Final (g/L)	47,95 ± 5,02 ^a	52,99 ± 1,82 ^a	53,84 ± 0,31 ^a
Consumo Global de etanol (%)	85 ± 1,86 ^a	78,8 ± 5,28 ^a	79,8 ± 2,42 ^a
Rendimento em ácido acético (%)	63,3 ^c ± 0,05	76,2 ^b ± 0,02	77,3 ^a ± 0,08
Rendimento GK (Gesmmnt Konzentration) (%)	72,07 ± 0,03 ^c	86,56 ± 0,00 ^b	87,35 ± 0,00 ^a
Produtividade volumétrica (Q_p) (g/Lh)	0,31 ^c ± 0,00	0,5 ^a ± 0,00	0,381 ^b ± 0,00

*GK: *Gesammte Konzentration*. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem estatisticamente ao nível de 5% ($p < 0,05$) de significância de acordo com o Teste t student.

Conforme pode ser verificado na Tabela 6, houve aumento no rendimento em ácido acético na segunda batelada (76,2%), o qual permaneceu constante na terceira batelada (79,8%). Assim como, verifica-se diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) entre as bateladas sucessivas. Tais rendimentos são inferiores aos descritos por Bortolini et al. (2001) que obtiveram rendimento de 94,33% ao elaborarem fermentado acético a partir de vinho de kiwi. No entanto, a produtividade encontrada por tais autores foi inferior (0,83 g/Lh). Ilha et al. (2009) elaboraram fermentado acético a partir de hidromel com 5 ciclos sucessivos (batelada repetidas) e descrevem rendimentos variando de 91,2% a 92,17%.

Já analisando os valores de rendimento GK verifica-se mudança do valor do mesmo na segunda batelada em relação à primeira batelada o qual permaneceu constante na batelada seguinte. Alguns autores (Bortoli et al. 2001; Ilha et al. 2000) usam o GK para calcular o rendimento da fermentação acética. Em um processo eficiente de acetificação 1 mL de etanol rende 1,034 g de ácido acético. Sem perdas resultantes de evaporação ou sobreoxidação, a concentração total ou GK (conteúdo de etanol v/v + concentração de ácido acético m/v) permanece constante durante o período de acetificação.

A variação no valor do GK da primeira para a segunda batelada pode estar associada a possível perda de etanol e/ou ácido acético por evaporação ou sobreoxidação do etanol devido ao maior tempo de processo fermentativo (144 h).

Já na segunda e terceira bateladas verifica-se manutenção dos valores de GK indicando que não houve perdas por evaporação ou sobreoxidação. No entanto, este valor não difere estatisticamente entre as três bateladas ao nível de 5%.

Bortolini et al. (2001) encontraram valor de rendimento GK entre 98,07% a 100,21%, valores estes superiores aos encontrados no presente trabalho. Ilha et al. (2009) obtiveram rendimento GK que variaram entre 98,73% a 100% em vinagre de hidromel.

7.1 Perfil do pH e conteúdo de ácido acético no decorrer da fermentação acética

No Gráfico 3 são apresentadas as variações de pH e ácido acético durante os ciclos sucessivos da fermentação acética (três bateladas).

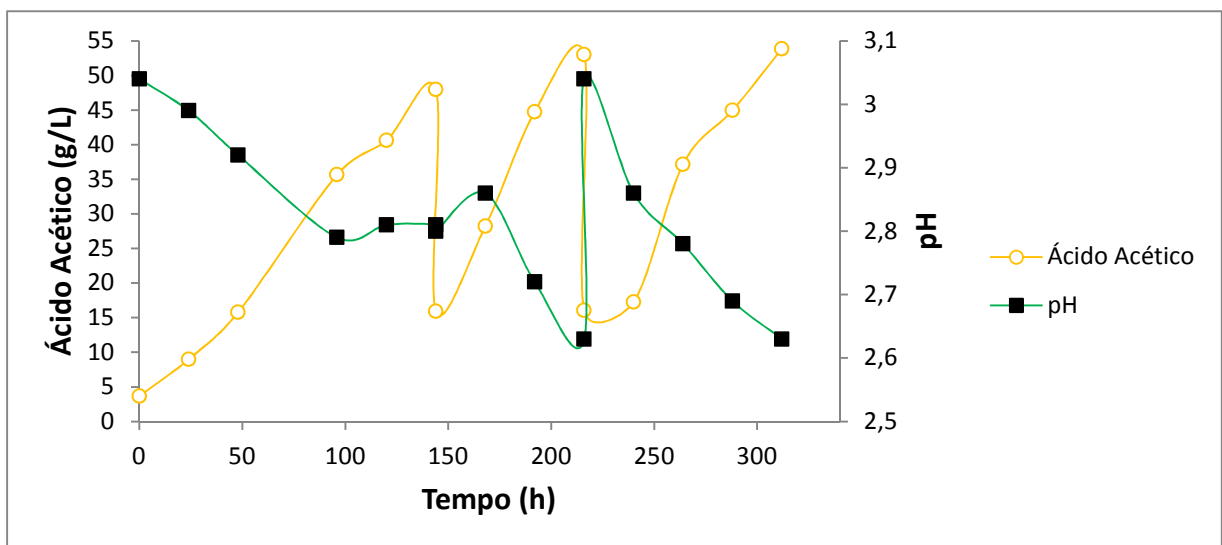


Gráfico 3: Acompanhamento do pH e acidez durante fermentação acética em barril acetificador de grapia

Pode-se constatar que houve pouca variação de pH ao longo dos sucessivos ciclos de acetificação. Foram verificadas variações de 3,04 a 2,62 no pH da primeira batelada, passando para 2,8 o pH inicial na segunda batelada a qual foi finalizada em 2,63. Já na terceira batelada o pH inicial foi de 3,04 e final de 2,69. Referente ao pH, Rizzon (2006), descreve que para vinagres de vinhos brancos o pH pode estar

situado entre 2,69 e 2,83, enquanto que para vinagres de vinho tinto este é de 2,72 a 2,81, sendo em média 2,79.

Em contrapartida a formação de ácido acético foi crescente ao longo de cada ciclo de acetificação com variações de acidez de 47,95 g/L, no primeiro ciclo, passando para 53 g/L na segunda batelada e finalmente 53,84 g/L na terceira batelada.

O pH e a acidez influenciam decisivamente na qualidade e aceitabilidade sensorial dos vinagres, pois tais parâmetros estão relacionados a percepção sensorial. Em vinagres com acidez de 5% o pH apresenta-se em intervalos de 2,46 a 3,18, entretanto, tais características podem variar de acordo com a matéria-prima utilizada como frutas (uvas, maçã, laranja, entre outros), assim como, se são provenientes de destilados (Marques et al. 2010).

7.2 Caracterização físico-química do fermentado acético obtido em vinagreira

Os parâmetros de caracterização físico-químicas estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Caracterização físico-química do fermentado acético de amora-preta produzido em vinagreira

Parâmetros Analisados	Valores Observados		
	1 ^a Batelada*	2 ^a Batelada*	3 ^a Batelada*
pH	2,62 ^b ± 0,00	2,63 ^b ± 0,00	2,69 ^a ± 0,01
Acidez total titulável (g/100mL)	4,91 ^a ± 0,41	4,09 ^c ± 0,08	4,53 ^b ± 0,02
Sólidos Solúveis (°Brix)	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Resíduo mineral (g/L)	3,73 ^b ± 0,00	3,9 ^a ± 0,05	3,74 ^b ± 0,00
Extrato Seco Total (g/L)	44,32 ^a ± 0,04	33,31 ^b ± 0,05	32,02 ^c ± 0,21
Extrato Seco Reduzido (g/L)	15,68 ^c ± 0,06	26,69 ^b ± 0,06	26,98 ^a ± 0,01
Densidade (g/L)	1077,3 ^a ± 0,11	1077,8 ^a ± 0,05	1077,7 ^a ± 0,05
Sulfatos	0,0256 ^a ± 0,00	0,0256 ^a ± 0,00	0,0256 ^a ± 0,00
Etanol (g/L)	0,995 ^b ± 0,84	1,005 ^a ± 1,20	0,99 ^c ± 0,49
Compostos fenólicos Totais (mg GAE / L)	138,95 ^b	151,8 ^b	165,2 ^a
Antocianinas (mg/L)	26,05 ^c	34,23 ^b	62,78 ^a

Tabela 7: Caracterização físico-química do fermentado acético de amora-preta produzido em vinagreira

	(conclusão)		
Atividade antioxidante - método DPPH ($\mu\text{mol TEAC/mL}$)	103,5 ^a	107,35 ^a	107,73 ^a
Atividade antioxidante - método ABTS (mM)	15,63 ^c	17,36 ^b	19,03 ^a

* Ciclo de fermentação acética. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância de acordo com o Teste Tukey.

Conforme pode ser verificado na Tabela 7 não houve variação do pH nas bateladas sucessivas. Quanto a este parâmetro a legislação vigente não estabelece limites ou valores a serem seguidos.

A variação do pH entre diferentes vinagres está ligado a matéria-prima utilizada. Na literatura científica são relatados estudos referente a verificação do pH em fermentações acéticas. Marques et al. (2010) descrevem valores semelhantes analisados em vinagres comerciais provenientes de frutas tais como vinagre de manga (2,65), vinagre de vinho tinto (2,69) e valores levemente superiores em vinagres de vegetais como milho (3,05) e arroz (2,89). Em fermentação acética a partir de vinho de laranja com 18°Brix, Tessaro et al. (2010) observaram valores superiores de pH (3,56).

A acidez total titulável em ácido acético corresponde ao teor de ácido acético presente no vinagre, sendo este elemento mais importante. Vários estudos são relatados na literatura científica quanto a acidez final dos vinagres, a qual está relacionada a graduação alcoólica do vinho empregado como matéria-prima. Entretanto esta não deve ser elevada em função da aceitabilidade sensorial.

Brasil (2013) preconiza que vinagres obtidos de frutas devem conter acidez titulável de no mínimo 4,00 g /100mL. Tal parâmetro foi fixado no presente trabalho como valor mínimo para determinar a finalização em cada uma das bateladas sucessivas. Já Hidalgo et al. (2010) ao elaborarem vinagre de vinho tinto estabeleceram como critério de finalização da oxidação acética o conteúdo de 6 g / 100 mL de ácido acético. Budak e Guzel-Seydim (2010) descrevem valores superiores em vinagre elaborado a partir de vinho de uvas *Ulugbey Karasi* (8,515 g/

100mL). Vinagres comerciais de vinho de arroz foram avaliados por Zhang et al. (2006). Tais autores descreveram valores de 4 g / 100mL e 4,4 g / 100 mL. Saha e Banerje (2013) obtiveram vinagre de banana contendo 4,67 g / 100 mL de ácido acético.

Com relação aos sólidos solúveis observou-se que este permaneceu constante no final de cada uma das bateladas de fermentação acética (5 °Brix). Observa-se que houve pequena queda no valor de SST em relação ao verificado no vinho de amora-preta (6 °Brix). Tal redução no teor de sólidos solúveis pode estar relacionado a possível consumo de açúcares presentes no fermentado alcoólico durante a oxidação acética.

O resíduo mineral fixo em cada uma das três bateladas não diferiu estatisticamente ao nível de 5%. Tais valores identificados foram 3,73 g / L na primeira batelada, 3,9 na segunda batelada e de 3,74 na terceira batelada. Em relação à legislação vigente, esta estabelece que vinagres de frutas devem conter no mínimo 1 g / L e máximo de 5g/L. Rizzon (2006) descreve as principais características de vinagre de vinho branco e de vinho tinto, os quais contêm entre 1,36 g / L e 1,34 g / L em vinagres de vinho branco e de 1,23 g / L e 1,70 g / L. Valores superiores ao do presente trabalho foram identificados por Marques et al. (2010) em vinagres de laranja com mel (5,15 g / L), assim como valores próximos em vinagre de laranja (3,65 g / L) e de tangerina (3,46 g / L). Características inerentes a amora-preta bem como a etapa de filtração para obtenção da polpa para a fermentação alcoólica pode ter contribuído para os teores de cinzas identificados no presente trabalho.

Referente ao extrato seco total, não há limites estabelecidos pela legislação brasileira para tal parâmetro (BRASIL, 2012). Este parâmetro demonstra o conteúdo de minerais e materiais orgânicos que permanecem após a evaporação da água e de substâncias voláteis do vinagre. Quando são relatados valores muito baixos podem indicar fraudes. Tal parâmetro diferiu estatisticamente entre as bateladas com valores de 44,32 g/L na primeira batelada, 33,31 g/L na segunda e 32,02 na terceira batelada. Valores semelhantes são observados por Marques et al. (2010) em vinagres de laranja com mel (48,8 g / L) e de laranja (38,3 g / L). Xavier et al. (2011) observaram valores superiores em vinagres de fisalis (59,4 g/L). A utilização

de barril acetificador pode ter influenciado em tais valores, pois este pode contribuir para maiores valores de extrato seco total.

O extrato seco reduzido em vinagres de frutas é verificado para avaliar se foram realmente elaborados a partir do vinho proveniente da matéria-prima em questão (INMETRO, 1997). Esta afirmação enfatiza que vinagre de vinho tinto deve conter como matéria-prima o vinho de uvas tintas. Desta forma a legislação brasileira estabelece que vinagres de frutas devem conter no mínimo 6 g / L. No presente trabalho foram descritos valores de 15,68 g / L, 26,69 g / L e 26,98 g/L na primeira, segunda e terceira batelada respectivamente. Tais valores apresentaram diferença significativa ao nível de 5%.

Em relação à densidade, a legislação em vigor não relata qual deve ser o valor mínimo ou máximo, no entanto, Rizzon (2006) indica que em vinhos tintos a densidade situa-se entre 1009,8 a 1010,7 g/L. No presente trabalho as densidades descritas ficaram entre 1077,3 g / L, 1077,8 g / L e a 1077,8 g / L. Tais valores não apresentaram diferença significativa entre as três bateladas executadas. Valores inferiores são relatados por Marques et al. (2010) ao analisarem vinagres comerciais vinagre de laranja com mel (1.020,6 g/L) e em vinagre de cana-de-açúcar com milho (1007,7 g / L).

Araújo et al. (2012) ao produzirem vinagre de laranja lima encontraram teores de extrato seco de 6,18 g/L; 5,07g/L e 6,97 g/L em vinagres obtidos na primeira, segunda e terceira batelada, e teores de cinzas de 1,63 g/100mL; 3,30 g/100mL e 3,43 g/100mL na primeira, segunda e terceira batelada respectivamente. Em relação ao pH tais autores descrevem valor similar (2,41) ao observado no presente trabalho. Com relação a acidez estes encontraram 4,30 g/100mL, 5,05 g/100mL e 5,23 g/100mL após envelhecimento dos mesmos por 8 meses.

Com relação ao conteúdo de sulfatos, os vinagres de fruta devem conter no máximo 1g/L (BRASIL, 2012). Os valores encontrados nas três bateladas foram de 0,0256 g/L estando, portanto dentro do limite estabelecido pela legislação.

A legislação brasileira preconiza que vinagres de frutas não devem exceder 1% (v/v) em álcool. De acordo com os dados apresentados na Tabela 7 os valores obtidos nas três bateladas em vinagreira estavam em consonância com a legislação vigente (0,995%, 1,00% e 0,99%, respectivamente). Bortolini et al. (2001) elaborou vinagre de kiwi obtendo um vinagre com 1% de etanol.

Rizzon e Meneguzo (2006) relatam que no processo lento de produção de vinagre a presença de residual alcoólico beneficia o desenvolvimento de ésteres e outros compostos voláteis que atribuem aroma e sabor peculiar aos vinagres elaborados por este método. Assim como tal composto é importante para que os micro-organismos presentes não degradem o ácido acético produzido.

Quanto aos compostos bioativos presentes em vinagres são ressaltados em especial os compostos fenólicos totais, os quais estão diretamente associados à matéria-prima utilizada, bem como as quantidades de frutas empregadas no início da fermentação alcoólica. Foram verificadas quantidades apreciáveis de tais compostos no presente trabalho. De acordo com os dados da Tabela 7 verifica-se conteúdo de: 138,95 mg GAE/L na primeira batelada, 151,8 mg GAE/L na segunda batelada e 165,2 mg GAE/L, não havendo diferença significativa entre a primeira e segunda batelada. Valores inferiores foram relatados em estudos realizados por Cerezo et al. (2008). Tais autores realizaram as fermentações em diferentes tipos de barris e constataram que não houve alteração nas diferentes acetificações em barris de acácia (28,51mg GAE / L), cerejeira (85,9 mg GAE / L), castanheira (77,90 mg GAE / L) e em barril de carvalho (30,25 mg GAE/L). No entanto Marques et al. (2010) descreveram valores superiores em vinagres comerciais de vinho tinto (318,6 mg GAE/L) e em vinagre de laranja (288,3 mg GAE/L). Valores inferiores são descritos por Sakanaka e Ishihara (2008) os quais encontraram 799 µg GAE/mL em vinagres de caqui da variedade Saijyo.

Ubeda et al. (2013), descrevem que o aumento no conteúdo de polifenólicos em vinagres armazenados em barris de madeira são devidos a extrações de compostos da própria madeira, extração de compostos fenólicos do vinho durante o processo de acetificação e ainda salienta que a troca limitada de oxigênio durante a acetificação contribui para menor perda de tais compostos por oxidação em relação a processos com injeção de ar.

As antocianinas contribuem para a coloração característica da amora-preta, coloração esta que permaneceu nos vinhos e vinagres obtidos. Em relação a esta fruta o composto antociânico majoritário é a cianidina-3-glicosídeo, desta forma os resultados de quantificação das antocianinas foram expressos em cianidina-3-glicosídeo / L. Já Ubeda et al. (2013) quantificou antocianinas em vinagre de morango como perlagonidina-3-glucosídeo. Cerezo et al. (2008) ao avaliarem

antocianinas em vinagre balsâmico e de cereja, expressaram os resultados em malvidina-3-glicosídeo. No presente trabalho as antocianinas diferiram estatisticamente ao nível de 5% entre si nas três bateladas com valores de 26,05 mg cianidina-3-glicosídeo/ L na primeira batelada, 34,23 mg cianidina-3-glicosídeo na segunda batelada e 62,78 mg cianidina-3-glicosídeo na terceira batelada. Valores inferiores (entre 1,20mg cianidina-3-glicosídeo/ L e 0,45 mg cianidina-3-glicosídeo/ L) foram observados por Cerezo et al. (2008) em vinagres de uvas vermelhas elaborado em barril de carvalho. Su e Chien (2007) descreveram conteúdos inferiores em fermentados acéticos de mirtilo (*Vaccinium ashei*) oriundos de vinhos sem casca (9,7 mg cianidina-3-glicosídeo/L em vinagres provenientes de vinhos fermentados e de vinagres de vinho fermentados com casca (32,2 mg cianidina-3-glicosídeo/L). Por outro lado, Ubeda et al. (2013) descreveram valores de 10,6 mg perlagonidina-3-glucosídeo/kg em vinagres de morango (*Fragaria ananassa var. camarosa*).

Diversos estudos verificando atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS são relatados na literatura científica, em diferentes tipos de frutas. No entanto, há poucos relatos descrevendo atividade antioxidante em vinagres de frutas. Outro ponto a ser ressaltado é a dificuldade de comparação de resultados em função da diversidade de unidades em que a atividade antioxidante é expressa.

Conforme verificado na Tabela 7, constata-se que o fermentado acético de amora-preta apresentou atividade antioxidante frente a captura dos radicais DPPH e ABTS. Com relação ao método DPPH, foram verificados valores similares de atividade antioxidante nos vinagres obtidos nas sucessivas bateladas de fermentação (103,5 µmol TEAC/mL, 107,35 µmol TEAC/mL e 107,73 µmol TEAC/mL na primeira, segunda e terceiras bateladas respectivamente). Tais valores são superiores aos descritos por Budak, Guzel-Seydim (2010) em vinagre de uva (13,50 µmol TEAC/mL). Já Ubeda et al. (2013), descreveram valores entre 3227 µmol TEAC/ kg a 3388 µmol TEAC/ kg em vinagres de morango.

Similarmente ao observado com a metodologia DPPH, a atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS foi semelhante em ambas as bateladas. Foram verificadas atividades de 15,63 mM na primeira batelada, 17,36 mM na segunda batelada e de 19,03 mM na terceira batelada. Valores superiores foram relatados por Echavarría et al. (2012) em fermentados acéticos de bambu as quais

variaram de 500 mM a 950 mM. Por outro lado, Ubeda et al. (2013) ao avaliarem vinagres de morango obtidos através de fermentação espontânea descreveram valores de 11,06 $\mu\text{mol Trolox/kg}$ e oriundos de fermentação inoculada valores de 10,13 $\mu\text{mol Trolox/kg}$.

8. Fermentação acética conduzida em biorreator de bancada

No processo de acetificação do vinho de amora-preta pelo processo submerso em fermentador de bancada foi utilizado como inóculo o vinagre (não pasteurizado) de amora-preta produzido na vinagreira. A quantidade de inóculo utilizada no processo submerso (50% v/v) foi bastante superior (5 vezes superior) a utilizada no processo lento (10%). Tal proporção foi empregada no fermentador em função de estudos realizados previamente, os quais evidenciaram que as bactérias ácido-acéticas não demonstraram boa habilidade na conversão de etanol em ácido acético em ambiente com maior aeração e agitação mecânica. Menores quantidades de inóculo (10% e 20%) mostraram-se ineficientes para o processo de acetificação no fermentador, levando a prolongados tempos de fermentação que acarretaram perdas de etanol e ácido acético.

Conforme pode ser verificado no Gráfico 4, o emprego de 50% (v/v) de inóculo no início da fermentação foi responsável pela detecção de maior quantidade de ácido acético (27 g / L) no início da fermentação (primeira batelada).

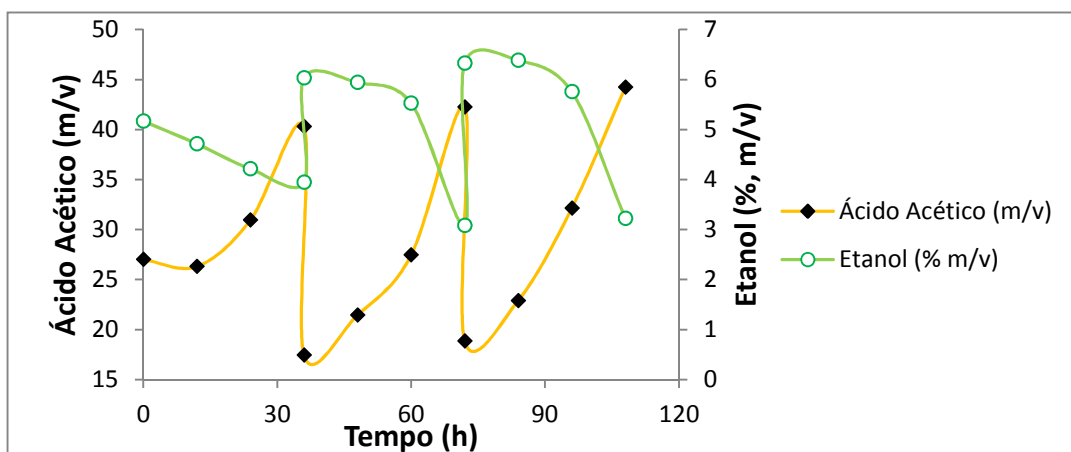


Gráfico 4: Curva de consumo de etanol e produção de ácido acético na fermentação acética conduzida em biorreator (método submerso).

Menores períodos de acetificação, em ambas as bateladas, foram verificadas nas fermentações acéticas conduzidas em fermentador em relação às fermentações conduzidas em vinagreira. A primeira batelada no fermentador foi conduzida em um período de 36 h, correspondendo a um tempo 75% inferior ao verificado na vinagreira (144 h). Similarmente nas bateladas seguintes do processo submerso os vinagres foram produzidos em 36 h, correspondendo a uma redução de 50% e 62,5% na segunda e terceira batelada, respectivamente em relação ao processo lento.

Os menores tempos verificados em ambos os ciclos de fermentação acética produzidos no fermentador em relação às fermentações realizadas em vinagreira, podem estar relacionados a maior quantidade de inóculo empregado no processo, inóculo adaptado e adequadas condições de disponibilidade de oxigênio.

Diferente do observado na acetificação conduzida em vinagreira verificou-se um menor consumo do substrato (etanol) na acetificação conduzida em fermentador nas três bateladas. No final da primeira batelada da fermentação acética em fermentador foi verificada produção de 40,3 g / L de ácido acético e um residual 5^oGL (consumo de 23,0%). No final da segunda batelada no fermentador foi verificado produção de 42,1 g / L de ácido acético e um residual 3,9 ^oGL (consumo de 48,76%). No final da terceira batelada da fermentação acética em fermentador foi verificado produção de 44,24 g / L de ácido acético e um residual 4,08 ^oGL (consumo de 49,09%).

Tais resultados sugerem a possibilidade de ter acontecido uma sobreoxidação de etanol em ácido acético, visto que, em menores espaços de tempo quantidades apreciáveis de ácido acético foram acumulados no meio, nas fermentações em fermentador. Possivelmente uma maior disponibilidade de oxigênio no fermentador contribuiu para maior eficiência na oxidação etanol/ácido acético. Esta sobreoxidação levou a interrupção das fermentações acética ainda havendo elevados conteúdos de etanol no meio fermentativo, uma vez que já havia sido atingido o conteúdo de ácido acético mínimo exigido pela legislação (4,0 g / 100 mL) e dentro de limites sensorialmente adequados.

Desta forma, foram verificadas concentrações de etanol nos fermentados acéticos finais superiores aos preconizados pela legislação brasileira (1% v/v). Possivelmente o uso de fermentado alcoólico (vinho) com menor graduação

alcoólica associada a condições otimizadas de oxidação acética no fermentador contribuiriam para melhor assimilação do substrato (etanol) e menor conteúdo residual deste.

8.1 Perfil pH e conteúdo de ácido acético no decorrer da fermentação acética (Submersa)

No Gráfico 5 estão representados o perfil do pH e conteúdo de ácido acético no decorrer da fermentação acética em biorreator de bancada.

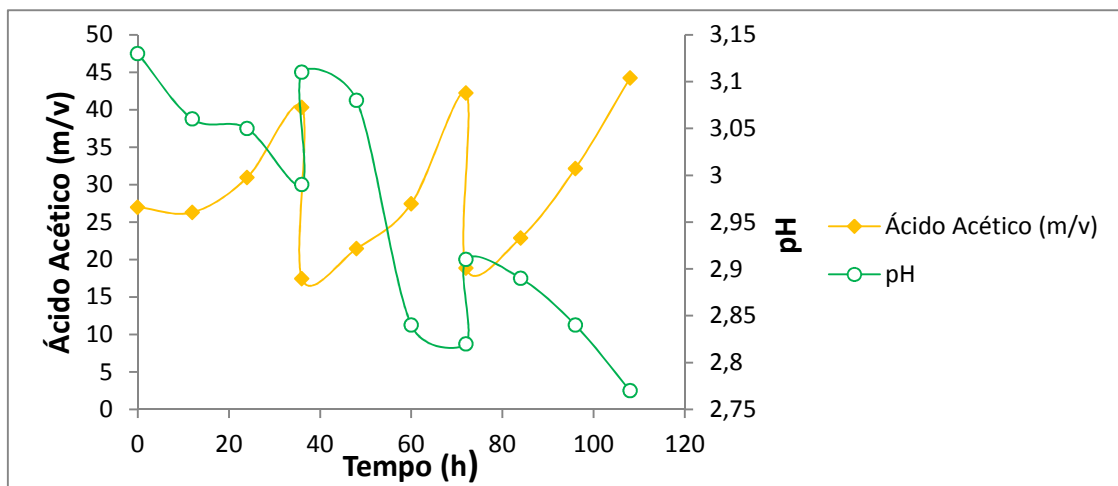


Gráfico 5: Perfil da produção de ácido acético e mudança de pH no decorrer da fermentação acética em biorreator

O comportamento do pH e conteúdo de ácido acético foi similar em ambos os processos (lento e submerso). Pode-se constatar que houve pouca variação de pH ao longo dos sucessivos ciclos da fermentação acética em biorreator. Foi verificada variação de 3,13 a 2,99 no pH na primeira batelada. Na segunda batelada foi verificado valor de pH de 3,11 no início do processo e de 2,82 no final. Já na terceira batelada o pH variou de 2,91 a 2,77.

A produção de ácido acético foi crescente ao longo de cada ciclo de acetificação com variações de ácido acético de 40,30 g / L (Gráfico 5 e Tabela 8), no primeiro ciclo, passando para 42,25 g / L na segunda batelada (Gráfico 5 e Tabela 8) e finalmente 44,24 g / L na terceira batelada (Gráfico5 e Tabela 8).

Na tabela 8 estão demonstrados os parâmetros fermentativos da fermentação acética realizada em biorreator.

Tabela 8: Parâmetros fermentativos da fermentação acética em biorreator

Parâmetros do Processo	Primeiro Ciclo	Segundo Ciclo	Terceiro Ciclo
	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3
Produção Final (g/L)	40,30 ± 0,05 ^c	42,25 ± 1,12 ^b	44,24 ± 0,02 ^a
Consumo Global de etanol (%)	23,8 ± 0,01 ^a	48,76 ± 0,01 ^c	49,09 ± 0,01 ^b
Rendimento em ácido acético (%)	83,5 ± 0,05 ^a	64,4 ± 0,02 ^b	62,7% ± 0,08 ^c
Rendimento GK (Gesmmnt Konzentration) (%)	97,62 ± 0,00 ^a	86,58 ± 0,00 ^b	86,03 ± 0,01 ^c
Produtividade volumétrica (Q_P) (g/Lh)	0,32 ^b ± 0,00	0,66 ± 0,00 ^a	0,67 ^a ± 0,00

Conforme pode ser verificado na Tabela 8, foram observados valores superiores de rendimento em ácido acético no processo submerso na primeira batelada (83,5%) e rendimentos inferiores na segunda (64,4%) e terceira batelada (62,7%) em relação ao processo lento.

Tais rendimentos podem ser considerados baixos, comparados a alguns trabalhos descritos na literatura. Bortolini (2001) descreve rendimentos variando entre 81% a 98,34% em vinagres de kiwi elaborados em fermentador de bancada. Ilha et al. (2009) descreveram rendimentos entre 91,20% a 97,17% em vinagres de mel. E Qi et al. (2013) entre 91,03% a 91,84% em vinagres elaborados em biorreator.

Foram observadas produtividades volumétricas de 0,32 g/ Lh na primeira batelada, 0,66 g / Lh na segunda batelada e de 0,67 g / Lh na terceira batelada. Valores intermediários (0,55g / Lh) foram descritos por Silva et al. (2007) em vinagre de caju. Já produtividades inferiores (0,437 g / Lh) são observados por Torres Neto et al. (2005) em vinagre de palma forrageira. No entanto, Qi et al. (2013) descreveram valores superiores de produtividades volumétricas (1,65 g/Lh e 1,82 g/Lh) em vinagres obtidos em biorreator. Já Silva et al. (2007) descreveram valores semelhantes de produtividade volumétrica (0,78 g / L h) em vinagres de vinho de caju produzidos em reator.

Analisando o rendimento GK, observa-se que houve diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) entre as bateladas sucessivas. Verifica-se diferença na primeira batelada (97,62%) em relação a segunda batelada (86,5%), assim como em relação à terceira batelada (86,3%). Os valores de GK permanecem constantes entre o segundo e terceiro ciclos de fermentação, indicando que não houve perdas por evaporação ou sobreoxidação.

8.2 Caracterização físico-química do vinagre de amora-preta obtida em biorreator (método submerso)

Na Tabela 9 estão demonstrados os parâmetros físico-químicos avaliados nos vinagres obtidos em cada uma das três bateladas realizadas em fermentador de bancada.

Tabela 9: Caracterização físico-química vinagre de amora-preta produzido em biorreator

Parâmetros analisados	Resultados Observados		
	1 ^a Batelada	2 ^a Batelada	3 ^a Batelada
pH	2,99 ± 0,00 ^a	2,82 ± 0,00 ^b	2,77 ± 0,00 ^c
Acidez volátil (g/100mL)	4,11 ± 0,00 ^c	4,26 ± 0,00 ^b	4,59 ± 0,00 ^a
Sólidos Solúveis (°Brix)	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Resíduo mineral (g/L)	3,17 ± 0,00 ^b	3,47 ± 0,00 ^a	3,13 ± 0,00 ^c
Extrato Seco Total (g/L)	45,64 ± 0,20 ^a	36,93 ± 0,04 ^b	35,21 ± 0,45 ^c
Extrato Seco Reduzido	14,36 ± 0,02 ^c	23,07 ± 0,01 ^b	24,79 ± 0,00 ^a
Densidade (g/L)	1075,8 ± 0,05 ^a	1072,3 ± 0,05 ^b	1071,5 ± 0,11 ^c
Sulfatos (g/L)	0,025 ± 0,00 ^a	0,025 ± 0,00 ^a	0,025 ± 0,00 ^a
Etanol (% v/v)	3,95 ± 0,00 ^c	3,70 ± 0,00 ^a	4,08 ± 0,00 ^b
Compostos fenólicos Totais (mg GAe/L)	160,5 ± 1,48 ^c	159,5 ± 7,28 ^c	173,9 ± 11,66 ^b
Antocianinas (mg/L)	45,92 ± 0,53 ^a	59,11 ± 0,06 ^a	56,27 ± 0,15 ^b
Atividade antioxidante - método DPPH (µmol TEAC/mL)	107,5 ± 2,82 ^a	107,21 ± 13,05 ^a	106,7 ± 2,35 ^a
Atividade antioxidante - método ABTS (mM)	16,01 ± 5,24 ^a	13,76 ± 6,54 ^a	21,38 ± 8,4 ^a

Médias seguidas por letras diferentes na horizontal diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância de acordo com o Teste Tukey.

Em relação ao pH são observados valores próximos entre as bateladas, os quais situaram-se entre 2,99 (primeira batelada), 2,82 (segunda batelada) e 2,77 (terceira batelada). Valores estes que diferem estatisticamente ao nível de 5%. Foram relatados por Massino et al. (2008) valores inferiores em vinagres balsâmicos do tipo *Orange label* (2,49), 2,48 em vinagre balsâmico denominados como *silver label* e 2,40 em vinagres balsâmicos denominados *gold label*, esta denominação é utilizada por conterem maiores quantidades de açúcares, resíduo seco e menores quantidades de ácido acético.

Os valores de acidez titulável em ácido acético observados nos vinagres obtidos nas três bateladas (Tabela 9) demonstram que a acidez em ácido acético dos vinagres obtidos estão em consonância com a legislação brasileira. Silva et al. (2007) em fermentados acéticos de caju descreveram valores de 4,0 g / 100 mL de ácido acético, a partir de vinhos contendo etanol entre 4,8% e 6,0%. Já Masino et al. (2008) relataram valores inferiores em vinagres balsâmicos *Orange label* (2,65 g / 100 mL). Marques et al. (2010) relataram valores semelhantes de acidez em vinagre de maçã (4,17 g / 100 mL), assim como valores superiores em vinagre de vinho tinto (5,0 g / 100 mL).

Quanto ao resíduo mineral os valores observados no presente trabalho atenderam a legislação vigente, uma vez que a mesma estabelece como padrões para vinagres valor mínimo de 1 g / L e máximo de 5 g / L. Estudos realizados por Marques et al. (2010) relataram valores semelhantes em vinagre de tangerina com milho (3,54 g / L), assim como valores superiores em vinagre de laranja com mel (5,14 g / L) e inferiores em vinagre de manga (2,25 g / L).

Em relação ao extrato seco total os valores encontrados foram de 45,64g / L, de 36,93 g / L e 35,21 g/L para a primeira, segunda e terceira batelada respectivamente. Tais valores tiveram diferença significativa ao nível de 5%. Valores semelhantes foram descritos por Marques et al. (2010) em vinagre de laranja e mel (48,8g / L) e em vinagre de laranja (38,3g / L).

O extrato seco reduzido apresentou diferença significativa, ao nível de 5%, entre as bateladas. A legislação determina que os vinagres devem ter no mínimo 6g / L, desta forma, o vinagre de amora-preta realizado em biorreator atendeu a legislação. No entanto, Rizzon (2006) descreve que vinagres de vinhos tintos

apresentam em média 8,86 g / L de extrato seco reduzido, enquanto que em vinagre de vinho este valor reduz para 8,22 g / L.

As densidades dos vinagres obtidos foram semelhantes aos valores obtidos na vinagreira os quais situaram-se entre 1071,5 e 1075,8 g/L. Tais valores obtidos são superiores aos descritos por Pedroso (2003) em vinagre de maçã a qual variou de 1011 a 1013 g/L. Já Filho e Araújo (2007) ao elaborarem vinagre a partir de cana-de-açúcar obtiveram densidade de 1019 g/L.

Em relação ao conteúdo de sulfatos os valores encontrados (0,025 g / L nas três bateladas) estão consonância com a legislação.

Valores similares de compostos fenólicos totais são observados em ambos os processos de acetificação. Foram observados conteúdos de 160,5 mg GAE / L na primeira batelada, 159,5 mg GAE / L na segunda batelada e de 173,9 mg GAE / L na terceira batelada. Valores inferiores são demonstrados por Sakanaka e Ishihara (2008) ao quantificarem os compostos fenólicos totais em vinagres comercializados no Japão. Tais autores relataram quantidades de 452 µg GAE / mL em vinagres de caqui da variedade Hiratanenaschi e de 733 µg GAE/mL em vinagres de arroz. Alonso et al. (2004) obtiveram valores superiores em vinagre obtidos de vinhos Jerez (600mg GAE/L). Já Ubeda et al. (2013) descrevem valores de compostos fenólicos em vinagres de morango na ordem de 1605 mg GAE / kg. Wang et al. (2012) demonstraram valores de 269,7 mg GAE/g em vinagres tipo Shanxi (fermentado acético da China cozido a uma temperatura de 85 °C por seis dias e envelhecido, o qual é obtido a partir de vinho contendo como matérias-primas trigo tipo mourisco, aveia, farelo de trigo e ervilha e posteriormente durante fermentação acética). Ubeda et al. (2011) descreveram em fermentados acéticos de caqui compostos fenólicos totais de 317,5 mg AG / kg. Por outro lado Xu, Tao e Ao (2007) ao avaliarem vinagres aromáticos da China obtiveram valores de 53,7 µg GAE/ mg.

Foram observados conteúdos de 45,92 mg de cianidina-3-glicosídeo/L, 59,11 mg de cianidina-3-glicosídeo/L e 56,27 mg de cianidina-3-glicosídeo na primeira, segunda e terceira bateladas, respectivamente. Os conteúdos de antocianinas verificados na primeira e na segunda batelada são 76,3% e 72,7% superiores aos verificados na fermentação em vinagreira. Já na terceira batelada foi verificada pouca diferença no conteúdo de antocianinas entre os processos de acetificação (62,78 mg de cianidina-3-glicosídeo/L e 56,27 mg de cianidina-3-glicosídeo / L).

Su e Silva (2006) ao avaliarem fermentações acéticas de mirtilo obtiveram 2,3 mg de cianidina-3-glicosídeo / g. Já Ubeda et al. (2013) descreveram valores de ,8 mg de perlagonidina-3-glicosídeo / kg em vinagres obtidos a partir de vinho de morango inoculados com cepas de *S. cerevisiae* RP1. Cerezo et al. (2010) ao identificarem compostos antociânicos em vinagres de Carbenet Sauvignon obtiveram valores de 53, 04 mg de malvinina-3-glicosídeo / L.

Com relação aos compostos antioxidantes determinados pela metodologia DPPH, foram observados valores de 107,5 $\mu\text{mol TEAC} / \text{mL}$, 107,21 $\mu\text{mol TEAC} / \text{mL}$ e 106,7 $\text{TEAC } \mu\text{mol} / \text{mL}$ na primeira, segunda e terceira bateladas, respectivamente. Tais valores são bastante similares aos verificados na acetificação em vinagreira. Cerezo et al. (2010) ao avaliarem a atividade antioxidante obtiveram 10,3 $\text{mmol TEAC} / \text{g}$ em vinagres de Cabernet Sauvignon. Já Ubeda et al. (2013) 3210 $\mu\text{mol TEAC} / \text{kg}$ em vinagres de morango.

Da mesma forma em relação a atividade antioxidante determinada pela metodologia ABTS, os vinagres obtidos pelo processo submerso e pelo processo lento apresentaram valores similares. Foram observados valores de 16,01 mM na primeira batelada, 13,76mM na segunda batelada e de 21,38mM na terceira batelada. Resultados inferiores são descritos por Alonso et al. (2004) em vinagres de Jerez (4 mM a 6 mM).

9. CONCLUSÃO

Os frutos de amora-preta cultivados região Sudoeste do Paraná apresentaram características físico-químicas similares a frutos cultivados em outras regiões brasileiras descritas na literatura científica. Quantidades apreciáveis de compostos fenólicos totais, bem como antocianinas expressas em cianidina-3-glicosídeo foram verificadas bem como elevada atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* mostrou ser eficiente na fermentação alcoólica de mosto de amora-preta, sendo produzido vinho de amora-preta com aroma e sabor agradáveis. Foram verificados rendimento de fermentação

alcoólica de 0,39 g/g, produtividade volumétrica em etanol de 1,77 g / L h e eficiência de 75,5%. O vinho de amora-preta apresentou elevados conteúdos de compostos fenólicos totais e antocianinas, bem como elevada atividade antioxidante.

O inóculo isolado de vinagre colonial de uva produzido no município de Pato Branco foi eficiente na fermentação acética conduzida tanto em vinagreira de grápia como em biorreator de bancada. Foram obtidos vinagres com agradável sabor e aroma. Os parâmetros físico-químicos de qualidade de ambos os vinagres apresentaram-se dentro dos padrões de qualidade exigidos pela legislação brasileira, exceto com relação aos teores de etanol residual nos vinagres produzidos pelo método submerso. Assim como observado no vinho de amora-preta, os fermentados acéticos apresentaram conteúdos apreciáveis de compostos fenólicos totais e antocianinas, bem como elevada atividade antioxidante.

A realização da fermentação acética de vinagre de amora-preta mostrou-se viável no que se refere ao aproveitamento de uma matéria-prima sazonal e de alta perecibilidade. Os vinagres produzidos podem ser considerados vinagres do tipo *gourmet*, podendo ser uma estratégia de agregação de valor a cadeia produtiva de amora-preta, colaborando para disseminação da cultura no Brasil.

A produção de vinagre de amora-preta pelo processo lento em vinagreira pode ser uma opção de renda a ser explorada por produtores familiares considerando a rusticidade do cultivo da fruta e simplicidade do processo de produção do vinagre em vinagreira.

10. REFERÊNCIAS

ALENCAR, E. M. B.; SOUZA-MOTTA, C. M. S.; WALTER B. S.; SANTOS R. M. P.; MARQUES O.; QUEIROZ L. A.; Fermentation capacity of *saccharomyces cerevisiae* cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, v. 52, n. 4, jul. p.819-824, ag. 2009.

ALMEIDA, M. Cinética da Produção do Fermentado do Fruto do Mandacaru, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 1, p.35-42, jun. 2006.

ALONSO, Á. M.; CASTRO, R.; RODRÍGUEZ X.; GUILLÉN D. A.; BARROSO C. G., Study of the antioxidante power of brandies and vinegars derived from Sherry and correlation with their contents in polyphenols, **Food Research International**, v.37, n. 7, p. 715-721. Mar. 2004.

ANAV, Associação Nacional das Indústrias de Vinagre. Disponível em:<http://www.anav.com.br/clipping_interna.php?id=25>. Acesso em 26 Ag. 2012.

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: Nova opção de Cultivo no Brasil, **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, maio 2002.

ARAÚJO, P.. F. de. **Atividade Antioxidante de Néctar de Amora-preta (*Rubus* spp.) e sua Influência sobre os Lipídios Séricos, Glicose Sanguínea e a Peroxidação Lipídica em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Hipercolesterolêmicos**, 2009, 122 f, (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia), Universidade Federal de Pelotas, Agroindustrial, Pelotas, 2009.

ARAÚJO, P. F. de, et al. Influência do Congelamento sobre as Características físico-químicas e o potencial antioxidante de amora-preta, **Boletim CEPPA**, v. 27, n. 2, p.199-206, jul./dez. 2009.

ARAÚJO L. T., SILVA C. E. F., ABUD A. K. S., Produção de vinagre de laranja “Lima” em vinagreira artesanal, **Scientia Plena**, v. 8, n. 12, p.1-7, Dez. 2012.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A. de, BORZANI, W.; **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**, São Paulo: Edgard Blücher, 1983.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A. de; BORZANI, W.; SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

BACH, F.; **Obtenção de Fermentado Acético a Partir do Soro de Leite**, 2009. 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Superior em Engenharia de Alimentos. Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2009.

Relatório sobre o Desenvolvimento Mundial de 2008, Agricultura para o Desenvolvimento **BANCO MUNDIAL**, Washington: jan. 2007. Banco Internacional de Reconstrução e Desenvolvimento / Banco Mundial.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**, 2008, 162 f. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BORTOLINI, F.; SANT'ANNA E. S.; TORRES R. C.; Comportamento das Fermentações Alcoólica e Acética de Sucos de Kiwi (*Actinidia deliciosa*); Composição dos Mostos e Métodos de Fermentação Acética, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p.236-243, maio-ago. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 6, de 3 de abril de 2012. Estabelece os padrões de identidade e qualidade e a classificação dos fermentados acéticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 de abril de 2012, Seção 1, p. 16.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Rdc nº 5, de 4 de fevereiro de 2013. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 de janeiro de 2013, Seção 1, p.43.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNS/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de dezembro de 1988. Seção 1.

BRASIL, Resolução n. 04, 24 de novembro de 1988. Aditivos Intencionais. Diário Oficial da União República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 dez. 1988.

BRINGHENTI Lizandra. CABELLO Claudio, Análise da Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agro industrialização da mandioca, **Raízes e Amidos Tropicais**, Paranaíba, v. 3, n. 4, p.36-52, 2005.

BUDAK, Havva N. GUZEL-SEYDIM, Zeynep B. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques, **Journal Science Food Agriculture**, New York, n.90 v. 12, p.2021-2026, jun. 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **Food Science and Technology**, França, v.28, n.01, p.25-30, Jun.1995.

CAETANO Alessandra Carolina. G.; MADALENO, Leonardo Lucas. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais, **Ciência e Tecnologia**, Jaboticabal, v.2, n.1, p.27-37, jan. 2011.

CALLEJÓN, R.M., TORIJA M.J., MAS, A., M.L. MORALES, TRONCOSO , A.M., Changes of volatile compounds in wine vinegars during their elaboration in barrels made from different woods, **Food Chemistry**, Espanha, v. 120, n.15, p. 561-571, Mai. 2010.

CAMINITI, Aníbal. Producción y mercados de berries, perspectivas para el mercosur. In: IV SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO III ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 4, 2008, Pelotas. Anais Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008, p. 12-14.

CAMPAGNOLO, Marcelo, A., PIO, Rafael, Produção da amoreira-preta 'Tupy' sob diferentes épocas de poda, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p.1-7, Fev. 2012.

CARMO, Shirlene K. S.; SÁ, Susan K. C. V. L. e; ALMEIDA, Mercia M. de; SWARNAKAR, W., Produção e Caracterização de Fermentado de Umbu a partir de sua polpa comercial, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.14, n.1, p.15-20, Jul. 2012.

CECCHI Heloisa. M.; Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos: Editora Unicamp. 2007.

CEREZO, Ana B. CUEVAS, Elyana, WINTERHAKTER, Peter, GARCIA-PARRILLA, Carmen M. TRONCOSO, Ana M. Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification, **Food Research International**, v. 43, n.6, p. 1577-1584, Jul.2010.

CEREZO, A. B., TESHAYE, W., TORIJA, M. ., MATEO, E., GARCÍA-PARRILLA, M. C., TRONCOSO, A. M., The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods, **Food Chemistry**, Espanha, v.109, n.3, p.606-615, Ago. 2008

CLERICI Maria, T. P. S., CARVALHO-SILVA, Luciano, Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil, **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, Ago. 2011.

COSTA, C. M., TAKAHASHI, J. S., VILLAMONTE, M. R., Produção de Vinagre, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Engenharia Bioquímica e de Alimentos, v.1, n.06, p.50-68, Mai. 2006.

CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) Tubers. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 55, p. 217-225, Jun. 2007.

DAI J.; GUPTA A.; GATES L.; MUMPER R. J.; A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected brackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties, **Food and Chemical Toxicology**, USA, n.47, p. 837-847, jan. 2009.

DUARTE, W.; DRAGONE, G. DIAS, D.; OLIVEIRA, J.; TEIXEIRA, J.; ALMEIDA E SILVA, J.; SCHWAN, R.; Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.), **International Journal of Food Microbiology**, n.143, v.3, p. 173-182, Ago.2010.

ECHAVARRÍA, C. A.; YEPES, F. J.; TORRES, H. P.; Determinación del potencial antioxidante em extractos de vinagre *Guadua angustifolis* Kunth para aplicaciones alimenticias, **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 4, n. 17, Out. 2012.

EMBRAPA, Elaboração de vinagre, Bento Gonçalves, RS, Embrapa Uva e Vinho, v. 3, n; 36, p. 9-31, Set. 2002. ISSN 1678-8761.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008.

FENNEMA, O.; PARKIN, K.; DAMODARAN, S.; **Química de Alimentos de Fennema**, Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERNANDES, A.; L.; PEREIRA, T.; VIDAL, F.; CONSTANT, P. B. L; Antioxidantes Alimentares: importância química e biológica, **Nutrire Revista Sociedade Brasileira Alimentação e Nutrição**. São Paulo, v.34, n.3, p. 231-247, dez. 2009.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; Compostos Bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32 n.3, p.664-667, Set. 2010.

FILHO L. L.; ARAÚJO, J. H. B.; Vinagre obtido a partir do Caldo de Cana-de-açúcar. In: VI Sinaferm, XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos,1, 2007, Curitiba. Anais Curitiba 2007, p.1-4.

FILHO, V. E. M., SANTOS, A. A. dos; FILHO, J. E. M., NASCIMENTO, A. R., MARINHO, S. C.; MENDES, J. C., LOPES, N., A., JÚNIOR, A. do, V. G., MARTINS, A. G. L.; Produção, Processamento e Análise Bromatológica do Vinho Obtido de Caju, v.13, n.1, p. 46-59, Jan. Jun. 2002.

FLOIRENDO, F. P.; RAKESH S. K.; KERR W. L.; PEGG R. B.; KONG, F.; Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during *in vitro* digestion, **Food Chemistry**, USA, n.153, p. 272-278. Jan. 2014.

FRACASSO, D.; FUENTEFRIA, A. M.; TEIXEIRA, M. L.; Avaliação toxicológica e quantificação de agentes Antioxidantes em vinhos tintos comercializados no município de Concórdia, Santa Catarina **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n. 2, p.181-189, Out. 2009.

GALANAKIS, C. M.; KORDULIS C.; KANELLAKI M.; KOUTINAS A. A., BEKATOROU, A.; LYCOURGHOTIS A.; Effect of pressure and temperature on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on γ -alumina pellets, **Bioresource Technology**, Cyprus, n.114, p. 492-498, Mar. 2012.

GOÉS, Fernando José de; ZANGIROLAMI, Teresa Cristina. Optimization of the Fermentation Conditions for Wine Produced from the “Italia” Grape Variety In: 2 nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005, Rio de Janeiro. Anais 2005, p.20.

GANCEL, A. L.; FENEUIL, A.; ACOSTA, O.; PÉREZ, A. M.; VAILLANT, F.; Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*), **Food Reserach International**, Costa Rica, v.44, n. 7, Ago. 2011.

GONÇALVES, Any. E. S. S., **Avalização da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**, 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONZÁLEZ, E. A.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. M. P.; FERNÁNDEZ, I. O.; GUERRA, N. P.; Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo*, L.) and characterization of their distillates, **Food Research Internacional**, Espanha, v. 44 n.5, Jun.2011.

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A.; **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. EMBRAPA Uva e Vinho. Bento Gonçalves. 69f. 2009. ISSN 1516-8107.

HERNÁNDEZ-GOMEZ L. F., ÚBEDA J. BRIONES A., Melon fruit distillates: comparasion of different distillation methods, **Food Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 539-543, Set. 2003.

HIDALGO, C., TORIJA, M. J., MAS, A., MATEO E., Effect of inoculation on strawberry fermentation and acetification processes using native strains of yeast and acetic acid bacteria, **Food Microbiology**, n.34, v.1, Mai. 2013.

HIRSCH, Gabriela E.; **Valor Nutricional e Capacidade Antioxidante de Diferentes Genótipos de Amoreira-Preta (*Rubus sp.*)**, 2011. 100 f. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

HIRSCH, G. E.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D. B.; VIZOTTO, M.; EMANUELLI, T.; Caracterização físico-química de variedade de amora-preta da região sul do Brasil, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42 , n.5 , p. 942-947, mai. 2012.

HOFFMANN, A., **Sistema de Produção de Vinagre**, Embrapa Uva e Vinho, Sistemas de Produção, Pelotas. 10f. 2006. ISSN 1678-8761.

ILHA, E. C.; SANT'ANNA, E. S.; TÔRRES, R. C. O.; PORTO, A. C. S.; MEINERT, E. M.; Utilization of Bee (*Apis mellífera*) Honey for Vinegar Production, **Acta Science Venez.** Curitiba, v.18, n. 1, p. 39-50, Jan/Jun. 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

IV CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2009, Belém. **Anais Eletrônicos**, Belém, 2009. Disponível em: < http://connepi2009.ifpa.edu.br/connepi-anais/artigos/60_2532_1271.pdf>. Acesso em: 25 Dez. 2013.

JACQUES, Andressa C.; PERTUZATTI, Paula B.; BARCIA, Milene T.; ZAMBIAZI, Rui C.; CHIM, Josiane F.; Estabilidade de Compostos Bioativos em Polpa Congelada de Amora-Preta (*Rubus fruticosus*), **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, Ago.2010.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C.; Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* sp), **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 245-260. Jan. Mar. 2011.

JOO, M.; LEWANDOWSKI, N.; AURAS, R.; HARTE, J.; ALMENAR, E.; Comparative study of blackberry fruit in bio-based and petroleum-based containers under retail storage conditions, **Food Chemistry**, v.26 n.4, p. 1734-1740. Jan. 2011.

JUNIOR, H S.; FREITAS, G R. S.; PEREIRA, F. R. S.; FARIAS, R. F., PEREIRA, C.; Determinação Colorimétrica de metabissulfito, **Eclética Química**, São Paulo, v. 35, n. 3, p.. 133-139, Set.2010.

KOCA, I.; KARADENIZ, B.; Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey, **Scientia Horticulture**, Turkey, n. 21, p. 447-450. Març. 2009.

LAMEIRO, Magna;, MACHADO, Maria I.; HELBIG, Elizabete; ZAMBIAZI, Rui; Características Físico-Químicas das Polpas de Amora-Preta (*Rubus* spp.) e de Mirtilo (*Vaccinium Ashei* Reade). In: XVIII ENPOS, Pelotas, 2011.

LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; WONDRA, A. G.; Comparison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, London, v. 71, p. 214-501, Nov. 2005.

LEE, J; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E.; Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal AOAC International**, Oregon, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F.; Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, Washington, v. 93, p. 47-56, Nov.2005.

MACHADO, F.; CORAZZA, R., Desafios Tecnológicos, organizacionais e financeiros da agricultura orgânica no Brasil, **Rede de Revistas Científicas de América Latina**, México, v.9, n.26. p.21-40.Mai-Ag. 2004.

MACHADO, Maria I. R.; LAMEIRO, Magna. G. S.; BORGES, Lucia R.; BUENO Francine M.; VOSS, Glenize B.; RUTZ, Josiane K.; ZAMBIAZI, Rui; Atividade Antioxidante de Amora-preta (*Rubus* spp.) Liofilizada,. In: **XVIII CIC, XI ENPOS, I Mostra Científica**, Pelotas 2011.

MADIGAN, Michael. T.; MARTINKO, John. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 9. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2000.

MARRUFO-CURTIDO, A., CEJUDO-BASTANTE, M. J., DURÁN-GUERRERO, E., CASTRO-MEJÍAS, R., NATERA-MARÍN, R., CHINNICI, F., GARCÍA-BARROSO, C., Characterization and differentiation an of high quality vinegars by stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS), **Food Science and Technology**, Bologna, n.2, p.10. 24 jan. 2012.

MARQUES, F. P. P.; SPINOSA W.; FERNANDES, K. F.; CASTRO, C. F. S.; CALIARI, M.; Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos

comerciais de frutas e vegetais, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 1, n.30, p. 7. Mai. 2010.

MASINO F. CHINNICI F. BENDINI A. MONTEVECCHI G., ANTONELLI A. A study on relationships among chemical, physical, and qualitative assessment in traditional balsamic vinegar, **Food Chemistry**, v. 2, n. 106, p. 90-95, Mai. 2008.

MENA P. GIRONÉS-VILAPLANA A. MARTÍ N. GARCÍA-VIGUERA C.; Pomegranate varietal wines: Phytochemical composition and quality parameters, **Food Chemistry**, v. 2, n.133, p. 108-115, Jan. 2012.

MILLER, G. L.; Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, n.3, v.31, p.426-428, Mar.1959.

MOTA, R. V.; Caracterização de suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 303-308. Abr. Jun.2006.

MULERO, J., PARDO F., ZAFRILLA P., Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines, **Journal of Food Composition and Analysis**, Espanha, v. 23, p. 569-574, Set. 2010.

OLIVEIRA, Dalany M., **Influência de Revestimentos Comestíveis e Refrigeração na Conservação da Amora-Preta**, 2010. f.85. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá. 2010.

OLIVEIRA, A.; et al. Produção de Fermentado Alcoólico do Fruto de Mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru*), **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n.3,p.271-277, Dez. 2011a.

OLIVEIRA, M. S.; PANTOJA L.; DUARTE, W. F.; COLLELA C. F.; VALARELLI, L. T.; SCHWAN R. F.; DIAS D. R.; Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilized yeast cell fermentation, **Food Research International**, Brazil, n. 44, p. 2391-2400. Fev. 2011b.

OLIVIER, M. N., CERUTTI, E. C., TOMIM, G. C., FREITAS, M. B., ROTILI, M. C. C., GREGÓRIO, N. P., Aplicação da Enzima Pectinase na Vinificação, **Ciência e Saúde da Unipar**, v. 12, n. 2, p. 133-138, maio/ago, 2008.

PACHECO, Thályta. F., **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**, 2010. 107 f. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PAGOT, E.; SCHNEIDER, E. P.; NACHTIGAL, J. C.; CAMARGO, D. A.; **Cultivo da Amora-preta**, EMBRAPA, Bento Gonçalves, 12f. 2007. ISSN 1808-6810.

PEDROSO, Paula R. F., **Produção de Vinagre de Maçã em Biorreator *Airlift***, 85f. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PEREIRA JR. Nei, BON, Pinto S., FERRARA, Maria A., **Tecnologia de Bioprocessos**, 1 ed. Rio de Janeiro: Escola de Química /UFRJ. 2008.

PERGOLA, C.; ROSSI, A. DUGO P.; CUZZOCREA S.; SAUTEBIN Lidia, Inhibition of nitric oxide biosynthesis by fraction of blackberry extract, **Nutritional Oxide**, v. 15, n.1, p. 30-39, Ago 2006.

QI, Z., YANG, H., XIA, X., XIN, Y., ZHANG, L., WANG, W., YU, X., A Protocol for Optimization Vinegar Fermentation According to the Ratio of Oxygen Consumption Versus Acid Yield, **Journal of Food Engineering**, China, v. 116, p. 304-309, 2013.

RASEIRA, Maria C.B.; SANTOS, A.M. dos; MADAIL, J.C.M. **Amora -preta: cultivo e utilização**, EMBRAPA , Pelotas n.75 v.20 p. 1-11, 2009.

RE R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS C.; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicinal**, n. 26, v10. p. 1231-1237, 1999.

RIZZON, L. A., MENEGUZZO, J., **Sistema de Produção de Vinagre**, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves. 10f. 2006. ISSN 1678-8761.

RIZZON, Luiz, A.; MIELE, Alberto; Correção do mosto da uva Isabel com diferentes produtos na Serra Gaúcha, **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 450-454, Santa Maria, Mar-Ab.2005.

RIZZON, Luiz, A. **Metodologia para Análise de Vinho**. Brasília: Embrapa, 2010.

RIZZON, Luiz A.; MENEGUZZO, Júlio; MANFROI, Luciano. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: Processamento de Uva – Vinho tinto, grapa e vinagre / Embrapa Uva e Vinho, Serviço Brasileiro de Apoio às micro e pequenas empresas**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

ROHMAN, A; RIYANTO, S., YUNIARTI, N., SAPUTRA, W., UTAMI, R., MULATSIH, W., Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam), **International Food Research Journal**, Indonesia. n. 17, p 97-106, 2010.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D., Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+, EMBRAPA, Comunicado Técnico, on line Fortaleza, 2007.

SAHA, P.; BANERJEE S.; Optimization of process parameter for vinegar production using banana fermentation, **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 2, n. 09,p.501-514. Set. 2013.

SAKANAKA, S., ISHIHARA, Y.; Comparison of antioxidante properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates, **Food Chemistry**. v. 107, p. 739-744. Mar. 2008

SANTIAGO, Manuela C. P A., **Avaliação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do efeito da microfiltração do suco da amora-preta (*Rubus spp.*)**

sobre a composição de suas antocianinas. 2010. 92 f. (Mestrado em Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, R. A., BRAGA, L. C., **A Agricultura Familiar no Sudoeste do Paraná e a interface campo-cidade**, UNIOESTE, Francisco Beltrão 2009,. Disponível em: <<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal12/Geografiasocioeconomica/Geografiaagricola/48.pdf>>. Acesso em: Ag.2011.

SEERAM, N. ADAMS L.HENNING S., In vitro antiproliferative apoptotic and antioxidant activities of punicalagins, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal Nutrition Biochemical**, v.6. n. 16, p. 360-367, Jun. 2005.

SELLAPPAN, S.; CASIMIR, A. C.; KREWER G.; Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Georgia, v.50, n.8,p. 2432-2438. Març.2002.

SHAHIDI, Fereidoon; NACZK, Marian. Phenolics in food and nutraceuticals. Editora: CRC Press, Boca Raton. 2003.

SHAHIDI, Fereidoon; Nutraceuticals and Functional Foods in Health Promotion and Disease Risk Reduction. In: IUFoST Conference help in conjunction with FI Asia/China, 2007, Shangai, Anais Shangai: IUFoST conference - Natural and Safe Food Ingredients - Fi Asia/China, Shanghai. 2007.

SILVA, M. E.; TORRES, N. A. B.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; Cashew Wine Vinegar Production: Alcoholic and Acetic Fermentation, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Campina Grande, v. 24, n. 02, p. 163-169, Ab.-Jun. 2007.

SILVA, R.; VENDRUSCOLO J.; L., TORALLES R. P.; Avaliação da Capacidade Antioxidante em Frutas Produzidas na Região Sul do RS, **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3-4, p. 392-400, Jul-Set. 2011.

SILVA J. L. A., DANTAS D. L. L.; GASPARETO O. C. P., FILHO R. S. F., Utilização de Abacaxi para Elaboração de Vinhos: Avaliação Físico-Química e Aceitabilidade, **Holos**, n. 26. v. 3, p. 108-118, 2010.

SINGLETON V.L.; ROSSI J.A.; Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am Journal Enology and Viticulture**. v.16, n. 3 p.144–158. 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, **Revista de Nutrição**, San Diego, v. 299, n.15, p. 152-178, 1999.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E. Polyphenolic composition of marion and evergreen blackberries. **Food Chemistry and Toxicology**, Davis, v. 69, n. 4, p. 233-240, Abr.2004.

SOARES, S. E.; Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, Jan. 2002.

SU, M.-S.; CHIEN, J.; Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. **Food Chemistry**, n.104, p.182-187, Jun.2007.

SU, M.-S.; SILVA, J. L; Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vacciniun ashei*) by-products as affected by fermentation, **Food Chemistry**, n. 97, p. 447-451, Mai. 2006.

TESFAYE, W.; GARCÍA-PARRILLA C.; TRONCOSO A. M.; Set Up and Optimization of a Laboratory Scale Fermenter for the Production of Wine Vinegar, **Journal of The Institute of Brewing**, Spain, v. 106, n.4, p. 215-219, 2000.

TESFAYE, W.; MORALES, M. L.; GARCÍA-PARRILLA C.; TRONCOSO A. M.; Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation, **Trends in Food Science & Technology**, n. 13, v. 2, p. 12-21, 2002.

TESSARO, D.; LARSDEN, A. C.; DALLAGO, R. C.; DAMASCENO, S. G.; SENE, L., COELHO, S. R. M., Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja, **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, n. 2, p. 201-205, Maringá, 2010.

UBEDA, C., HIDALGO, C., TORIJA, M. J., MAS, A., TRONCOSO, A.M., MORALES, M. L., Evaluation of antioxidante activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by deferent processes, **Food Science and Technology**, Spain, n. 44. p. 1591-1596. Mac. 2011.

_____, C., CALLEJÓN, R. M., HIDALGO, C., TORIJA, M. J., TRONCOSO, A. M., MORALES, M. L., Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effects on antioxidante activity, total phenols and monomeric anthocyanins, **Food Science and Technology**, Spain, n.52, p. 139-145. Abr. 2012.

TESFAYE, W.; MORALES, G.-P.; TRONCOSO, A. M.; Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 12-21, 2002.

TESFAYE, W., MORALES M. L.; GACRCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO A. M.; Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. **Trends in Food Science & Technology**, Espanha, v.13, p. 12-21. Jan. 2002.

VIZZOTO, M.; PEREIRA, M. C.; Blackberry (*Rubus sp.*): Extraction Process Optimization and Determination of Phenolic Compounds Antioxidants, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, Dez. 2011.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; The antioxidante activity of wines determined by the ABTS⁺ method: influence of sample dilution and time, **Talanta**, Espanha, v. 64, p. 501-509, 2004.

WU, R.; BALZ, F.; KENNEDY, J. A.; YANYUN, Z.; Effects of refrigerated storage and processing technologies on de bioactive compounds and antioxidant capacities of 'Marion' and 'Evergreen' blackberries, **Food Science and Technology**, USA, v.09, v.43, p.1253-1264. Abr. 2010.

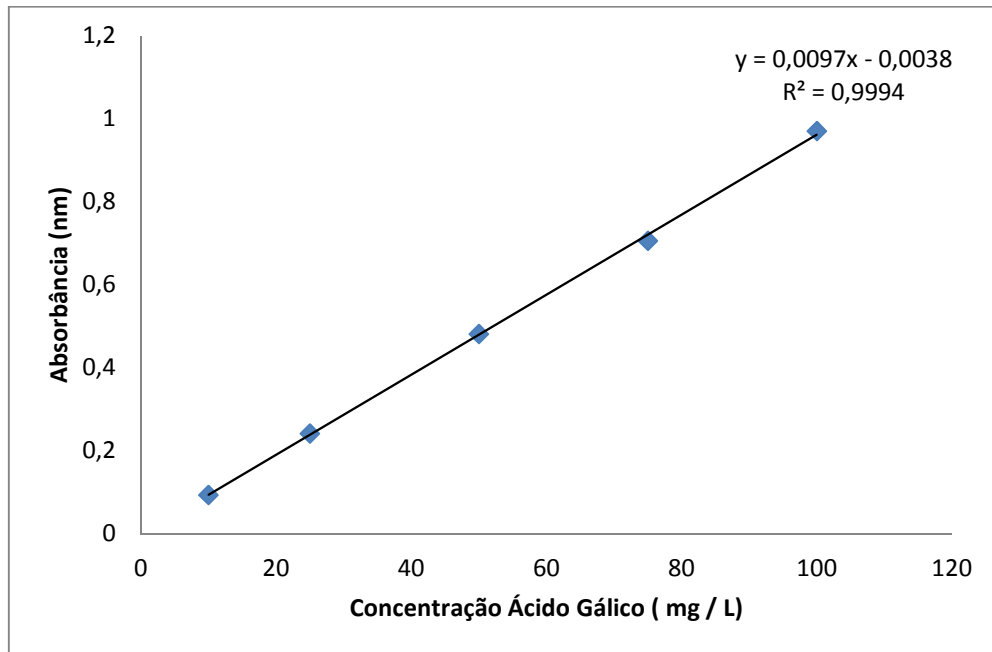
XAVIER, Daniella; IVANOV, Raphael C.; CUNHA, Mário, A. A.; PEREIRA, Edimir, A.; Produção e Caracterização de Vinagre de Fisalis, **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v. 2, n. 1, p. 27-32, jan. jun. 2011.

XU, W.; HUANG, Z.; ZHANG, X.; LI, Q.; LU, Z., SHI, J.; XU, Z.; Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentations of Zhenjiang aromatic vinegar, **Food Microbiology**, China, n.6, v.2815, p. 1175-1181. Abr. 2011.

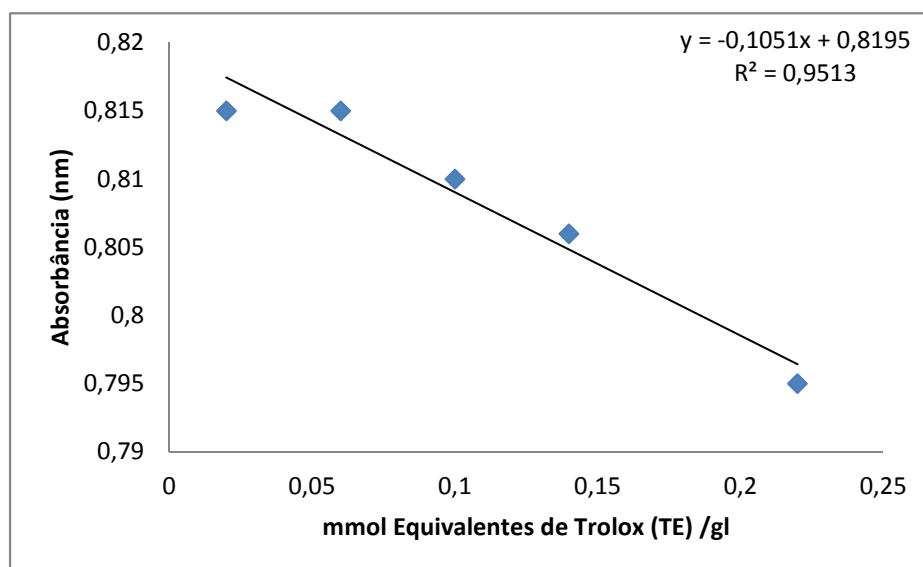
XU, Q.; TAO W.; ZONGHUA, A.; Antioxidant activity of vinegar melanoidins, **Food Chemistry**, n.102, p.841-849, Jun. 2006.

ZANCHET, M. S.; **A Terceirização das Atividades Agrícolas no Sudoeste Paranaense, IPARDES, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social**, Curitiba, p. 18-20, 2010.

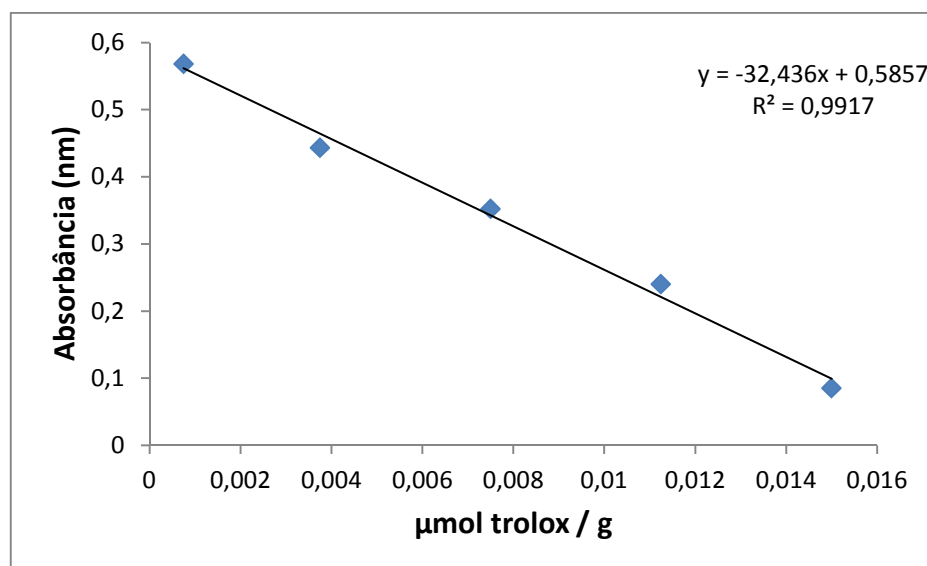
ANEXO A: Curva padrão de ácido gálico para determinação de compostos fenólicos totais



ANEXO B: Curva padrão de DPPH para determinação de atividade antioxidante pelo método DPPH



ANEXO C: Curva padrão de trolox para determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS



ANEXO D: Curva padrão de glicose para determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS

