



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

TESE DE DOUTORADO

ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DO MANDACARU (*Cereus
jamacaru* P. DC.) PARA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS

ORIENTANDA: MÉRCIA MELO DE ALMEIDA

ORIENTADORES: Prof. Dr. FLÁVIO LUIZ HONORATO DA SILVA

Prof. Dra. LÍBIA DE SOUSA CONRADO OLIVEIRA

Campina Grande-PB
Setembro/2007

ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DO MANDACARU (*Cereus jamacaru* P. DC.) PARA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS

Mércia Melo de Almeida

Tese de Doutorado apresentada à
Coordenação do Curso de Doutorado em
Engenharia de Processos da Universidade
Federal de Campina Grande – UFCG,
como parte dos requisitos necessários para
a obtenção do Grau de Doutora em
Engenharia de Processos.

Área de concentração: Processos Químicos

Orientadores:

Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Campina Grande, PB.

Setembro de 2007.



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

A447e

2007 Almeida, Mércia Melo de.

Estudo da bioconversão do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) para produção de bioprodutos/Mércia Melo de Almeida. — Campina Grande: 2007. 145f.: il

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

Referências.

Orientadores: Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva e Dr^a. Líbia de Sousa Conrado Oliveira.

1. Cactácea. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. *Aspergillus niger*. 4. Enriquecimento Protéico. 5. Bebida Fermentada. 6. Vinagre. I. Título.

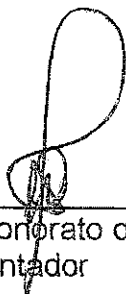
CDU 633.3 (043)

**Estudo da Bioconversão do Mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.)
para Produção de Bioprodutos**

Mércia Melo de Almeida

Tese aprovada em 11 de setembro de 2007.

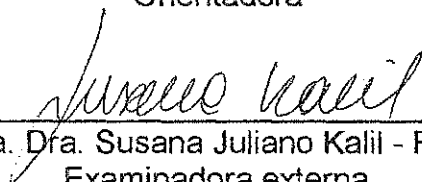
Banca Examinadora:



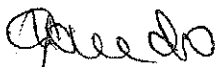
Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva - UFCG
Orientador



Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira - UFCG
Orientadora



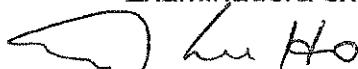
Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG
Examinadora externa



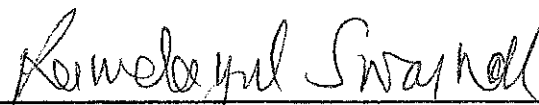
Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo - UFRN
Examinadora externa



Profa. Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueirêdo - UFCG
Examinadora externa



Prof. Dr. Egídio Luiz Furlanetto - UFCG
Examinador externo

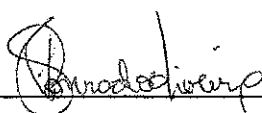


Prof. Dr. Ramdayal Swarnakar - UFCG
Examinador interno

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia de Processos, defendida por Mércia Melo de Almeida e aprovada pela banca examinadora em 11 de setembro de 2007.



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva



Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Airton (*in memoriam*) e Maria Raimunda e as minhas irmãs Mônica e Magna

Ao meu marido Carlos e a minha querida filha Ana Luiza

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar equilíbrio em todos os momentos difíceis da vida, mostrando que sempre há uma luz no fim do túnel.

A minha família, especialmente meus pais Airton (*in memoriam*) e Maria e minhas irmãs Mônica e Magna e sobrinhos Gustavo, Rodolfo, Yanna e Julia, pela compreensão, apoio e incentivo que sempre me deram.

Ao meu esposo Carlos e minha filha Ana Luiza, pelo companheirismo, amor e apoio.

Aos professores Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva e Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela orientação, compreensão, paciência e amizade.

Ao pessoal do Laboratório da EMBRAPA/Algodão, em especial a pesquisadora Rosa, Diva, Menezes, Fábila, seu Chico, a prima Socorro, enfim obrigada por tudo.

Aos funcionários dos Laboratórios de Engenharia Bioquímica e Processos Químicos da UAEQ, seu Jardes, seu Lopes e Nogueira pela grande colaboração.

A Coordenação de Pós Graduação em Engenharia de Processos.

A família de Alberes Trovão de Melo por me ajudar no fornecimento do fruto do mandacaru, em especial Dilma e Socorro.

A família de Dino Anacleto pelo fornecimento da planta, em especial Lurdinha e Yeda.

A Fátima e dona Rita, pela atenção e boa vontade durante todo o período de doutorado.

A todos os amigos do laboratório, pelo companheirismo e contribuição para realização desse trabalho, Bia, Daniela, Shirlene, Rosane, Sharline, Siumara, Bruno.

A Capes pelo apoio a pesquisa e incentivo financeiro.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal utilizar o mandacaru de forma integral (cladódio e fruto) na elaboração de bioprodutos (enriquecido nutricional, bebida fermentada e vinagre) visando à valorização desta cultura. O processo de enriquecimento protéico do cladódio foi realizado por fermentação semi-sólida e a elaboração da bebida fermentada e vinagre do fruto do mandacaru por fermentação submersa. O mandacaru foi utilizado como substrato no enriquecimento protéico por dois microrganismos diferentes. Inicialmente, estudou-se o enriquecimento protéico do mandacaru com o *Aspergillus niger* por fermentação semi-sólida, e avaliou-se a influência da espessura da camada (1, 3 e 5 cm) e da temperatura (30, 34 e 38°C) onde foram realizados sete experimentos, sendo três no ponto central, de acordo com o planejamento fatorial 2². Avaliou-se o teor de proteína bruta e o aumento protéico, cujos resultados foram submetidos à análise de variância. O maior aumento protéico ocorreu após 72 horas de fermentação a uma temperatura de 30°C, com uma espessura da camada de 1 cm. Posteriormente, estudou-se o enriquecimento protéico do mandacaru com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em tambor rotativo com uma concentração de inóculo de 5% e temperatura ambiente de 25°C, avaliando o teor de proteína e açúcares ao longo de 26 horas de fermentação. O teor protéico máximo de 23% foi observado após 10 horas de fermentação. O enriquecido protéico obtido neste estudo apresentou teores de proteína bruta em torno de 23%, que estão de acordo com as normas de alimentação animal (NRC, 1989), e pode ser usado como suplemento protéico para animais na época de escassez de alimentos na região semi-árida. No estudo das isotermas de adsorção do mandacaru, o modelo de Henderson modificado apresentou melhor ajuste aos dados experimentais nas temperaturas de 25, 35 e 40°C, com exceção da temperatura de 30°C que teve melhor ajuste com o modelo de GAB. A segunda parte do trabalho consistiu em fazer a caracterização física e físico-química dos frutos do mandacaru, e estudar a cinética da fermentação alcoólica e acética na elaboração da bebida fermentada e vinagre do fruto do mandacaru utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias acéticas, respectivamente. O aproveitamento do fruto na produção de fermentado e vinagre é viável pelo elevado teor de sólidos solúveis totais (11°Brix) e açúcares redutores

totais (9,82%) presentes nos frutos. A fermentação alcoólica foi conduzida, em bioreator, em sistema de batelada, à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Avaliou-se a concentração celular (X), concentração de substrato (ART), concentração de produto (etanol), sólidos solúveis totais, pH e acidez total, ao longo de 47 horas de fermentação. Os parâmetros cinéticos obtidos foram: $Y_{X/S}=0,075$; $Y_{P/S}=0,469$; $\mu_{\text{máx}}=0,082 \text{ h}^{-1}$; %Conversão e produtividade de 91,82% e 3,04g/L.h, respectivamente. A fermentação acética foi conduzida em biorreator, em batelada, à temperatura ambiente de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram monitoradas as concentrações de acidez total, volátil e fixa e concentração de etanol a cada 24 horas. Os maiores percentuais de rendimento (67,4%) e produtividades (0,29g/L.h) na produção de vinagre foram obtidos para as concentrações iniciais de etanol e acidez volátil de 6°GL e 2% ácido acético, respectivamente. A bebida fermentada de mandacaru apresentou uma concentração de etanol (10,4°GL) dentro das especificações exigidas pela legislação brasileira. O vinagre de mandacaru obtido está dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira, com acidez volátil acima de 4%. A produção de bebida fermentada e vinagre é uma alternativa promissora no aproveitamento dos frutos do mandacaru.

Palavras-chave: Cactácea, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, enriquecimento protéico, bebida fermentada, vinagre.

ABSTRACT

This research had as its main objective the use of whole *Cereus jamacaru* (plant and fruit) in the manufacturing of bioproducts (nutritional enrichment, wine and vinegar) aiming to value this crop. The protein enrichment process of the plant was performed by semi-solid fermentation and the elaboration of wine and vinegar of the *Cereus jamacaru* fruit was made by submersed fermentation. *Cereus jamacaru* was used as a substrate in protein enrichment by two different microorganisms. Initially, protein enrichment of *Cereus jamacaru* with *Aspergillus niger* by semi-solid fermentation was studied, and the influence of the thickness of the layer (1.3 and 5 cm.) and the temperature (30, 34 and 38°C) were evaluated, where seven experiments were performed, three of them being on the central point, according to the 2² factorial planning. The crude protein content and the protein increase were assessed, and the results submitted to variance analysis. The greatest protein increase occurred after 72 hours of fermentation at a temperature of 30°C and with a layer of 1 cm thick. Later, *Cereus jamacaru* protein enrichment with *Saccharomyces cerevisia* yeast in rotational drums, with a concentration of inoculums at 5% and room temperature of 25°C, was studied, evaluating the protein and sugar content throughout 26 hours of fermentation. A maximum protein content of 23% was observed after 10 hours of fermentation. The protein enrichment obtained in this study presented contents of crude protein around 23%, which agrees with the NCR animal food norms (1989), and can be used as a protein supplement for animals during food scarcity in the semi-arid region. In the study of *Cereus jamacaru* adsorption isotherms, the Henderon model presented the best adjustments to the experimental data at temperatures of 25, 35 and 40°C, with the exception of the temperature at 30°C, which had a better adjustment to the GAB model. The second part of the study consisted in making a physical and physical-chemical characterization of the *Cereus jamacaru* fruit, and studying the kinetics of alcoholic and acetic fermentation in the manufacturing of *Cereus jamacaru* wine and vinegar using *Saccharomyces cerevisiae* yeast and acetic bacteria, respectively. The utilization of the fruit in the production of wine and vinegar is viable because of the high content of total soluble solids (11°Brix) and total reducing sugars (9.82%) present in the fruit. Alcoholic fermentation was conducted in a bioreactor, in a loading system, at a temperature of 30°C ± 2°C.

The cellular concentration, the substrate concentration, product concentration, total soluble solids, pH and total acidity were assessed throughout 48 hours of fermentation. The kinetic parameters obtained were: $Y_{X/S}=0.075$; $Y_{P/S}=0.469$; $\mu_{\max}=0.082 \text{ h}^{-1}$; % Conversion and productivity of 91.82% e 3.04g/L.h, respectively. Acetic fermentation was conducted in a bioreactor, in loads, at a room temperature of $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Concentrations of total, volatile, and fixed acidity, and that of ethanol were monitored every 24 hours. The greatest yield (67.4%) and productivity (0.29g/L.h) percentiles in the production of vinegar were obtained for the initial concentrations of ethanol and volatile acidity of 6°GL and 2% acetic acid, respectively. *Cereus jamacaru* wine presented an ethanol concentration (10.4°GL) within the specifications required by Brazilian legislation. The obtained *Cereus jamacaru* vinegar is within standards required by Brazilian legislation, with a volatile acidity over 4%. The production of wine and vinegar is a promising alternative in the utilization of *Cereus jamacaru* fruit.

Key words: Cactus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, protein enrichment, wine, vinegar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Mandacaru sem espinhos	08
Figura 2.2	Fruto do mandacaru	12
Figura 2.3	Diferentes formas do fruto do mandacaru	12
Figura 3.1	Etapas do enriquecimento nutricional do mandacaru	38
Figura 3.2	Etapas da produção de fermentado do fruto do mandacaru	39
Figura 3.3	Etapas da metodologia de produção do vinagre de fermentado do fruto do mandacaru	40
Figura 3.4	Fermentação em bandeja	49
Figura 3.5	Fermentação em tambor rotativo	50
Figura 3.6	Cascas do fruto do mandacaru	52
Figura 3.7	Polpa e semente do fruto do mandacaru	52
Figura 3.8	Polpa e semente do fruto do mandacaru separada	53
Figura 3.9	Polpas do fruto embaladas em sacos plásticos	55
Figura 3.10	Suco do fruto do mandacaru	56
Figura 3.11	Biorreator utilizado na fermentação	58
Figura 3.12	Bebida fermentada engarrafada	59
Figura 3.13	Pasteurização da bebida fermentada de mandacaru	59
Figura 3.14	Bioreatores utilizados na fermentação acética do vinagre	64
Figura 3.15	Vinagre engarrafado	64
Figuras 4.1	Isotermas de adsorção de umidade dos cladódios do mandacaru (seco) nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C	71
Figuras 4.2	Isotermas de adsorção de umidade do mandacaru (seco) nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, ajustadas pelo modelo de GAB	73
Figuras 4.3	Isotermas de adsorção do mandacaru (seco) nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, ajustadas pelo modelo de Henderson	73
Figura 4.4	Histerese das isotermas de dessorção e adsorção de umidade do mandacaru, ajustadas pelos modelos de GAB e Henderson modificado, respectivamente, nas temperaturas de 30, 35 e 40°C	75

Figura 4.5	Cinética do aumento de proteína do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 1 cm e Temperatura = 30°C	76
Figura 4.6	Cinética do aumento de proteína do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 5 cm e Temperatura = 30°C	77
Figura 4.7	Cinética do aumento de proteína do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 1 cm e Temperatura = 38 °C	77
Figura 4.8	Cinética do aumento de proteína do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 5 cm e Temperatura = 38°C	78
Figura 4.9	Cinética do aumento de proteína bruta do mandacaru sem espinhos nos quatro experimentos da matriz de planejamento	78
Figura 4.10	Cinética do aumento de proteína do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 3 cm e Temperatura = 34°C	79
Figura 4.11	Teores de açúcares redutores e proteína bruta durante a fermentação semi-sólida com <i>Aspergillus niger</i>	80
Figura 4.12	Gráfico de Pareto para o aumento protéico após 32h de fermentação	84
Figura 4.13	Gráfico de Pareto para o teor de proteína bruta após 32h de fermentação	84
Figura 4.14	Gráfico de Pareto para o teor de proteína bruta após 48h de fermentação	85
Figura 4.15	Gráfico de Pareto para o teor de proteína bruta após 72h de fermentação	85
Figura 4.16	Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre o aumento protéico após 32h de fermentação	86
Figura 4.17	Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre a proteína bruta após 32h de	

	fermentação	87
Figura 4.18	Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre a proteína bruta após 48h de fermentação	88
Figura 4.19	Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre a proteína bruta após 72h de fermentação	89
Figura 4.20	Comportamento dos teores de proteína bruta e açúcares redutores totais durante a fermentação semi-sólida utilizando a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
Figura 5.1	Curva de crescimento celular durante a fermentação alcoólica	98
Figura 5.2	Comportamento do substrato (ART) durante a fermentação alcoólica	99
Figura 5.3	Comportamento do produto (etanol) durante a fermentação alcoólica	99
Figura 5.4	Comportamento dos valores médios de crescimento celular durante a fermentação alcoólica	100
Figura 5.5	Comportamento dos teores médios do substrato durante a fermentação alcoólica	100
Figura 5.6	Comportamento dos valores médios do substrato durante a fermentação alcoólica	101
Figura 5.7	Cinética do processo de fermentação alcoólica para a produção de fermentado do fruto do mandacaru	101
Figura 5.8	Variação do pH e da concentração de acidez volátil (g/100mL de ácido acético) em função do tempo de fermentação	104
Figura 5.9	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 1)	110
Figura 5.10	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 2)	111
Figura 5.11	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimentos 1 e 2)	111

Figura 5.12	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Valor médio - Experimentos 1 e 2)	112
Figura 5.13	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 3)	112
Figura 5.14	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 4)	113
Figura 5.15	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimentos 3 e 4)	113
Figura 5.16	Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Valor médio - Experimentos 3 e 4)	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição química dos artigos novos do mandacaru	10
Tabela 2.2	Composição química do mandacaru	10
Tabela 2.3	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e a digestibilidade da matéria orgânica do mandacaru	11
Tabela 2.4	Composição química bromatológica do mandacaru	11
Tabela 2.5	Caracterização do fruto do mandacaru	13
Tabela 2.6	Modelos para ajuste de isotermas de sorção	17
Tabela 3.1	Composição do meio básico	45
Tabela 3.2	Valores codificados e reais das variáveis de entrada	48
Tabela 3.3	Matriz de planejamento fatorial completo 2 ²	48
Tabela 4.1	Caracterização química dos cladódios do mandacaru sem espinhos	68
Tabela 4.2	Valores dos parâmetros de ajuste dos modelos e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e desvios percentuais médios (P).	71
Tabela 4.3	Valores de proteína bruta inicial e após 32, 48 e 72 horas de fermentação para os sete experimentos realizados.	76
Tabela 4.4	Modelos da regressão linear codificado para a variável resposta de aumento protéico (AP) após 32, 48 e 72 horas de fermentação	82
Tabela 4.5	Modelos da regressão linear codificado para a variável resposta de proteína bruta (PB) após 32, 48 e 72 horas de fermentação	82
Tabela 4.6	Modelos com curvatura para a variável resposta de aumento protéico (AP) após 32, 48 e 72 horas de fermentação	83
Tabela 4.7	Modelos com curvatura para a variável resposta de proteína bruta (PB) após 32, 48 e 72 horas de fermentação	83
Tabela 5.1	Caracterização física do fruto do mandacaru	94
Tabela 5.2	Dados referentes às pesagens e rendimentos dos frutos do mandacaru utilizados na produção de bebida frentada	95

Tabela 5.3	Caracterização físico-química e química da polpa do fruto do mandacaru	96
Tabela 5.4	Resultados do % conversão, produtividade e parâmetros cinéticos do processo fermentativo	105
Tabela 5.5	Resultados das análises físico-químicas da bebida fermentada	106
Tabela 5.6	Resultados da análise cromatográfica da bebida fermentada expressos em mg/L	108
Tabela 5.7	Condições iniciais usadas nos experimentos da fermentação acética	109
Tabela 5.8	Resultados das análises físico-químicas do vinagre	116

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

- AR – Açúcares redutores
ART – Açúcares redutores totais
AP – Aumento protéico
 a_w – Atividade de água
b.s. – base seca
b.u. – base úmida
 C_{GAB} – Constante de GAB
CNPAT – Centro Nacional de Pesquisa da Agroindústria Tropical
CCT – Centro de Ciências e Tecnologia
DIVMS - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca
EB - Energia bruta
EE - Extrato etéreo
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa do Algodão
ENN - Extrato não nitrogenado
FB - Fibra bruta
FDA - Fibra em detergente ácido
FDN - Fibra em detergente neutro
FSS - Fermentação semi-sólida
GAB - Guggenheim, Anderson e de Bøer
°GL - graus Gay-Lussac
HC - Hemicelulose
K – Constantes dos modelos utilizados
LAPI – Laboratório de Produção Industrial
MS - Matéria seca
MM - Matéria mineral
MO - Matéria orgânica
NRC – National Research Council
P – Concentração final de produto (g/L)
P – Produtividade (g/L.h)
PB - Proteína bruta
PV - Proteína verdadeira
 Q_p - Quantidade de álcool produzida (p/v)
RVP – Relação entre o volume da bebida e a massa da polpa

S – Concentração final em substrato (g/L)
S₀ – Concentração em substrato inicial (g/L)
SST – Sólidos solúveis totais (°Brix)
T – Temperatura (°C)
t – Tempo (h)
UAEQ – Unidade Acadêmica de Engenharia Química
UFMG – Universidade Federal de Campina Grande
X_{eq} – Conteúdo de umidade de equilíbrio
X_m – Conteúdo de umidade na monocamada molecular
X – Concentração final de biomassa (g/L)
X₀ – Concentração inicial de biomassa (g/L)
Y_{P/S} – Rendimento do produto (etanol)
Y_{X/S} – Rendimento de biomassa
ρ_{Álcool} - Densidade específica do etanol (g/L)
μ_{máx} – Velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo (h⁻¹)

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS	xiii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	01
1.1. Justificativa	03
1.2. Objetivo Geral	05
1.3. Objetivos Específicos	05
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
2.1. Mandacaru (<i>Cereus jamacaru</i> P. DC.)	08
2.1.1. Fruto do mandacaru	11
2.2. Enriquecimento protéico	14
2.2.1. Fermentação semi-sólida (FSS)	14
2.2.2. Biorreatores utilizados	15
2.2.3. Fatores que influenciam o processo de fermentação semi-sólida	15
2.2.3.1. Umidade e atividade de água	15
2.2.3.2. pH	17
2.2.3.3. Temperatura	18
2.2.3.4. Inóculo	18
2.2.3.5. Espessura da camada	19
2.2.3.6. Fontes de nitrogênio e carbono	20
2.2.3.7. Pré –tratamento	20
2.2.4. Microrganismos	21
2.2.4.1. Fungos (<i>Aspergillus niger</i>)	21
2.2.5. Trabalhos de enriquecimento protéico utilizando cactáceas e resíduos agroindustriais (Estado da arte)	22
2.3. Fermentado de fruto	23
2.3.1. Microbiologia do vinho ou do fermentado	25
2.3.1.1. Leveduras	25
2.3.2. Fermentação alcoólica	25

2.3.3. Compostos produzidos na fermentação alcoólica	27
2.3.3.1. Etanol	27
2.3.3.2. Álcoois superiores	27
2.3.3.3. Acetaldeído	28
2.3.3.4. Ésteres	28
2.3.3.5. Metanol	29
2.3.4. Trabalhos sobre fermentado de fruta (<i>Estado da arte</i>)	29
2.4. Fermentado acético (vinagre)	31
2.4.1. Microbiologia do vinagre	32
2.4.1.1. Bactérias acéticas	32
2.4.2. Fermentação acética	33
2.4.3. Preparo do meio a acetificar	34
2.4.3.1. Concentração alcoólica	34
2.4.3.2. Acidez inicial	34
2.4.3.3. Controle da oxigenação	35
2.4.3.4. Controle do teor residual de álcool	34
2.4.3.5. Controle da temperatura	35
2.4.4. Trabalhos sobre vinagre (<i>Estado da arte</i>)	35
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Enriquecimento nutricional da cactácea	41
3.1.1. Materiais	41
3.1.2. Microrganismo	41
3.1.3. Metodologias	41
3.1.3.1. Caracterização química dos cladódios do mandacaru	41
3.1.3.1.1. Proteína bruta e Nitrogênio	41
3.1.3.1.2. Potássio	42
3.1.3.1.3. Fósforo	42
3.1.3.1.4. Extrato etéreo	42
3.1.3.1.5. Açúcares redutores totais	42
3.1.3.1.6. Teor de umidade	42
3.1.3.1.7. Cinzas	42
3.1.3.1.8. Matéria seca	43
3.1.3.1.9. Fibra bruta	43

3.1.3.2. Isotermas de adsorção de umidade	43
3.1.3.3. Obtenção do enriquecido protéico	44
3.1.3.3.4. Análises químicas	50
3.2. Produção de fermentado do fruto do mandacaru	51
3.2.1. Materiais	51
3.2.2. Microrganismo	51
3.2.3. Metodologias	51
3.2.3.1. Caracterização física e físico-química dos frutos utilizados na produção de bebida fermentada do fruto do mandacaru	51
3.2.3.1.1. Açúcares redutores totais	54
3.2.3.1.2. Teor de umidade	54
3.2.3.1.3. Cinzas	54
3.2.3.1.4. Sólidos solúveis totais (°Brix)	54
3.2.3.1.5. Acidez total titulável	54
3.2.3.1.6. Fibra bruta	54
3.2.3.1.7. pH	54
3.2.3.1.8. Matéria seca	54
3.2.3.1.9. Proteína bruta e percentual de nitrogênio	55
3.2.3.1.10. Potássio	55
3.2.3.1.11. Fósforo	55
3.2.3.1.12. Pectina	55
3.2.3.2. Análises realizadas durante a fermentação alcoólica	59
3.2.3.2.1. Sólidos solúveis totais (°Brix)	59
3.2.3.2.2. Concentração de biomassa	60
3.2.3.2.3. Acidez total	60
3.2.3.2.4. pH	60
3.2.3.2.5. Concentração de etanol (teor alcoólico)	60
3.2.3.2.6. Açúcares redutores totais (ART)	61
3.2.3.2.7. Análises cromatográficas da bebida fermentada	61
3.3. Vinagre de fermentado do fruto do mandacaru	62
3.3.1. Materiais	62
3.3.2. Microrganismo	62
3.3.3. Metodologias	62

3.3.3.1. Preparação da matéria-prima (fermentado de mandacaru)	63
3.3.3.2. Inoculação do microrganismo (<i>Acetobacter</i>)	63
3.3.3.3. Fermentação acética	63
3.3.3.4. Filtração	64
3.3.3.5. Engarrafamento e pasteurização	64
3.3.3.6. Armazenamento	65
3.3.3.7. Análises realizadas durante a fermentação acética	65
3.3.3.7.1. Acidez total, acidez fixa e acidez volátil	65
3.3.3.7.2. Concentração de etanol (teor alcoólico)	65
3.3.3.8. Análise físico-química e microbiológica do vinagre	65
3.3.3.8.1. pH	65
3.3.3.8.2. Acidez volátil	65
3.3.3.8.3. Extrato seco	65
3.3.3.8.4. Cinzas	65
3.3.3.9. Cálculo do rendimento e produtividade do processo de fermentação acética	66
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES DO ENRIQUECIMENTO PROTÉICO	67
4.1. Caracterização química dos cladódios do mandacaru	68
4.1.1. Isotermas de adsorção de umidade dos cladódios do mandacaru	70
4.1.2. Estudo da histerese	74
4.2. Estudo cinético da fermentação semi-sólida do enriquecimento protéico dos cladódios do mandacaru utilizando o microrganismo <i>Aspergillus niger</i>	75
4.2.1. Proteína bruta	75
4.2.2. Teor de açúcares redutores totais	80
4.3. Estudo da influência das variáveis espessura da camada e temperatura sobre o processo fermentativo com o <i>Aspergillus niger</i>	81
4.3.1. Análise da superfície de resposta para a variável proteína bruta (PB) e aumento protéico (AP)	86
4.4. Estudo do enriquecimento protéico do mandacaru em tambor rotativo utilizando-se o microrganismo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO DO FERMENTADO E VINAGRE DO FRUTO DO MANDACARU	93

5.1. Fermentado de mandacaru	94
5.1.1. Caracterização física e físico-química dos frutos de mandacaru	94
5.1.2. Estudo cinético da produção do fermentado de mandacaru	98
5.1.3. Caracterização físico-química e cromatográfica da bebida fermentada de mandacaru	106
5.2. Vinagre de mandacaru	109
5.2.1. Estudo cinético da produção de vinagre	110
5.2.2. Análise do vinagre produzido	116
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES	117
CAPÍTULO 7 - PERSPECTIVAS	120
CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
APÊNDICE A	136

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1

1. Introdução

A região Semi-Árida do Nordeste tem uma baixa pluviosidade, sendo caracterizada pelo cultivo de cactáceas, destacando-se, entre outras, o mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), planta bastante resistente, que consegue crescer em solos pobres e sobrevive sob pluviosidade mínima. O mandacaru é uma planta nativa desta região, que pode atingir de 3 a 4 m ou mais de altura, com cladódios (caules) eretos, estreitando-se para o ápice, armado de espinhos pequenos só nas quinas para o mandacaru sem espinhos, e para a espécie com espinhos, os mesmos apresentam numerosos espinhos grandes (Barbosa, 1998). O fruto do mandacaru é uma baga oblonga, comestível, de casca vermelha, polpa branca e pequenas sementes pretas. Os cladódios do mandacaru são utilizados como forragem animal na época de escassez de alimento e os frutos são desperdiçados no período de safra, pois não há relatos de seu aproveitamento, sendo utilizado quando muito na fabricação de doces e geléias.

O aproveitamento integral dessa cactácea em processos biotecnológicos, utilizando desde o cladódio até o fruto, pode trazer para a região Nordeste benefícios para a agroindústria e para o homem do campo, e conseqüentemente agregar valores a essa planta.

Nesta região, os animais estão sujeitos a sérios problemas quanto a disponibilidade de alimentos, que são agravados pelos longos períodos de seca, onde as pastagens nativas, sua principal fonte de alimento, apresentam baixas produtividades e baixos valores nutritivos, interferindo negativamente na produção de carne e leite. Em decorrência, os produtores da região utilizam-se de concentrados comerciais para a suplementação protéica da dieta dos animais, aumentando os custos de produção (Araújo et al., 2005). Perazzo Neto (1999) relata que as proteínas desempenham papel importante no desenvolvimento animal e ainda afirma que a sua carência resulta em crescimento lento, perda do apetite, queda na produção de carne e leite e diminuição da fertilidade do animal. Recentemente, tem surgido o interesse por parte dos pesquisadores em estudos com o propósito de aproveitar e incrementar o teor protéico de diversas matérias-primas (vegetais e resíduos agroindustriais) visando agregar valores às mesmas

(Canoilas, 1991; Holanda et al., 1998; Suhet, 1999; Moraes, 1999; Oliveira et al., 2001; Campos, 2003; Correia et al., 2007). Neste contexto, o presente trabalho de tese estudou uma forma de aumentar o teor protéico do mandacaru, utilizando como substrato o cladódio desse vegetal, através do enriquecimento nutricional desta cactácea por fermentação semi-sólida.

Com relação às perdas dos frutos do mandacaru descritas anteriormente, esta tese também estudou uma das possíveis formas de aproveitamento desses frutos, que foi a elaboração de bebida fermentada por fermentação alcoólica e vinagre por fermentação acética, podendo desta forma possibilitar o cultivo intensivo do mandacaru e fornecer uma nova alternativa da utilização do fruto na agroindústria. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutos, incluindo os frutos tropicais. No entanto, as perdas de algumas culturas são intensas e geram conseqüentemente prejuízos econômicos, sendo necessário buscar alternativas e o emprego de novas tecnologias que venham minimizar essas perdas e conseqüentemente gerar lucros.

Com base no que foi relatado anteriormente, percebe-se que essa cactácea apresenta grande potencial de aproveitamento em processos biotecnológicos na elaboração de bioprodutos (enriquecido nutricional, bebida fermentada e vinagre) utilizando uma matéria-prima que é abundante na região Nordeste do Brasil, que compreende a região da caatinga. Desta forma, este trabalho teve como meta principal apresentar estudos de processos fermentativos que permitam aproveitar integralmente (cladódio e fruto) o mandacaru na elaboração de bioprodutos (enriquecido protéico, fermentado e vinagre), buscando otimizar os seus processos e obter produtos de maior valor agregado.

1.1. Justificativa

A região Nordeste do Brasil tem a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação adaptada às condições de poucas chuvas e altas temperaturas, denominada caatinga. Geograficamente, a caatinga ocupa cerca de 11% do território nacional, apresentando predominantemente uma vegetação xerófila, como é o caso das cactáceas.

O mandacaru, dentre outras cactáceas presentes na região, apresenta resistência à seca e tem grande capacidade de reter água. Os cladódios desta

planta são utilizados como forragens na alimentação animal por produtores da região (Aragão et al., 2000). O fruto desta cactácea é subaproveitado e não há relatos na literatura de um aproveitamento racional deste fruto, gerando desperdícios desses frutos. Pesquisas realizadas por Oliveira et al. (2004) e Almeida et al. (2005) constataram que os frutos do mandacaru apresentam teores relativamente elevados de açúcares redutores totais (em torno de 10%), e tem grande potencial de aproveitamento em processos biotecnológicos, quer seja na produção de bebida fermentada, aguardente e/ou vinagre.

No contexto sócio-econômico é muito importante lembrar que regiões menos favorecidas, como é o caso da região Semi-Árida do Nordeste, que enfrenta longos períodos de estiagem necessitam de tecnologias que possam minimizar as dificuldades econômicas enfrentadas por grandes contingentes da região, gerando a possibilidade de promover em suas comunidades o desenvolvimento sustentável.

Neste sentido, surgiu o interesse pelo enriquecimento nutricional desta forragem, utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* CCT 0916 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de fontes protéicas não convencionais, uma vez que o baixo valor nutritivo das forragens causa ao animal, perda de peso, baixa produção de carne e leite, infertilidade ou até a morte do animal. E também a utilização do fruto do mandacaru na elaboração de bebida fermentada e vinagre que são produtos de valor comercial e maior vida útil.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da UAEQ/CCT/UFMG vem nos últimos anos, desenvolvendo pesquisas que visam um melhor aproveitamento de culturas regionais, tais como a palma forrageira, mandacaru e o caju. Essas pesquisas deram origem ao trabalho de doutorado, que estudou, em escala de bancada, o enriquecimento protéico da palma e do mandacaru sem espinhos utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* (Araújo, 2004); duas dissertações de mestrado, nas quais realizaram o estudo cinético da produção de bebida fermentada a partir do fruto da palma (Lopes, 2005) e o estudo cinético da produção de bebida fermentada e vinagre de caju (Silva, 2004). Mais recentemente, estão sendo desenvolvidas pesquisas por alunos de mestrado com a palma forrageira (vegetal e fruto) na elaboração de etanol (biocombustível e aguardente). Todos esses estudos buscam a valorização de culturas nativas da região com o propósito de obter produtos de alto valor agregado, bem como

melhorar a condição econômica e social da população da região Nordeste, filosofia esta proposta pelo grupo de pesquisa do LEB.

1.2. Objetivo Geral

Estudar o enriquecimento nutricional dos cladódios do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por fermentação semi-sólida em bandeja e tambor rotativo, respectivamente, bem como, estudar as cinéticas de fermentação alcoólica da bebida fermentada e da fermentação acética na elaboração do vinagre do fruto do mandacaru visando à valorização integral desta cultura.

1.3. Objetivos Específicos

Enriquecimento nutricional do mandacaru

- ✓ Caracterizar a matéria seca do mandacaru *in natura* antes do enriquecimento nutricional pelo fungo *Aspergillus niger* CCT 0916 por meio de fermentação semi-sólida;
- ✓ Levantamento das isotermas de adsorção de umidade do mandacaru (seco) antes do processo de enriquecimento nutricional, nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C;
- ✓ Estudo da histerese nas isotermas de sorção do mandacaru nas temperaturas de 30, 35 e 40°C;
- ✓ Estudar a cinética do crescimento do *Aspergillus niger* CCT 0916 na fermentação semi-sólida em bandejas observando o aumento protéico;
- ✓ Verificar os efeitos das variáveis de entrada (temperatura e espessura da camada) sobre as respostas (proteína bruta, açúcares redutores totais, aumento do teor de proteína) no processo fermentativo em bandejas com o fungo *Aspergillus niger* CCT 0916;
- ✓ Estudar a cinética do processo de enriquecimento protéico do mandacaru com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em tambor rotativo.

Elaboração de bebida fermentada do fruto do mandacaru

- ✓ Caracterizar física e físico-quimicamente os frutos utilizados na elaboração da bebida fermentada;
- ✓ Produzir a bebida fermentada do fruto do mandacaru utilizando a levedura *Sacharomyces cerevisiae*;
- ✓ Estudar a cinética do processo fermentativo, verificando os efeitos das variáveis de entrada (concentração inicial de açúcares redutores e concentração inicial de levedura) sobre as respostas (eficiência do processo - rendimento e produtividade);
- ✓ Avaliar os parâmetros cinéticos do processo de fermentação alcoólica, na produção da bebida fermentada: $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, rendimento e produtividade;
- ✓ Analisar no fermentado produzido: concentrações de etanol, substâncias voláteis (acetaldeídos, ésteres, acetona), metanol e álcoois superiores (n-propanol, isobutanol, n-butanol, isoamílico).

Elaboração de vinagre de bebida fermentada do fruto do mandacaru

- ✓ Produzir o vinagre do fermentado do fruto do mandacaru utilizando bactérias acéticas;
- ✓ Estudar a cinética da produção do vinagre, verificando o efeito das variáveis de entrada (concentração inicial de etanol no fermentado e acidez inicial) sobre % ácido acético e rendimento da produção;
- ✓ Analisar no vinagre produzido: acidez volátil, acidez total, acidez fixa, cinzas, extrato seco total e pH.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Capítulo 2

Este capítulo tem o intuito de apresentar uma revisão sobre os três processos fermentativos utilizados na produção do enriquecido protéico, bebida fermentada e vinagre. Traz informações relevantes sobre os microrganismos e substratos utilizados, e os parâmetros avaliados no controle do processo de fermentação semi-sólida e na fermentação submersa (alcoólica e acética).

2.1. Mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.)

O mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P. DC.) é uma espécie típica da vegetação da caatinga, crescendo em vários tipos de solos (piçarrentos e pedregosos), e junto a outras espécies de cactáceas formam a paisagem típica do sertão. É encontrado nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e norte de Minas Gerais. A planta é utilizada na ornamentação de avenidas, ruas, parques, jardins e ainda servem para compor cercas vivas.



Figura 2.1 - Mandacaru sem espinhos

O mandacaru, apresentado na Figura 2.1, resiste a longos períodos de seca, mas sempre cresce e frutifica. Seus ramos são irregulares dispostos em ângulo agudo, com o eixo principal levemente curvado, dando a planta um aspecto de um candelabro, e exatamente por essa forma que pertence ao gênero *Cereus*, palavra de origem latina que significa círio, vela. Rocha & Agra (2002) relatam que a floração do mandacaru ocorre de janeiro a agosto, com frutificação de fevereiro a setembro.

Dentre os nomes vulgares mais comuns estão: mandacaru, mandacaru-de-boi, manacaru, nhamandacaru, cardeiro, cardeiro-rajado, arumbeva e tuna. Do tupi “iamandaka-ru” – feixe de espinhos ou espinheiro (Scheinvar, 1985).

Esta planta perde pouca água para a atmosfera devido à forma do seu cladódio (grosso e elipsóide) e por ser desprovido de folhas, o que reduz a superfície de evaporação do vegetal. Devido à presença de uma espessa cutícula interna que reveste os cladódios, ela pode absorver e armazenar grande quantidade de água. As raízes também têm relevante importância no aproveitamento da água do ambiente, já que absorvem com facilidade todo o recurso hídrico a sua volta. Por isso, na estiagem, quando todas as plantas secam e perdem as folhas, o mandacaru mantém-se verde, contrastando com a paisagem (Andrade-Lima, 1966).

A raiz e o cladódio desta cactácea também são utilizados nas afecções do aparelho respiratório (como exemplos: bronquites e tosses), problemas cardíacos e pressão alta. Estudos com o propósito de avaliar o potencial medicinal do mandacaru foram realizados por Davet (2005).

A classificação botânica do mandacaru sem espinhos segundo Concretes (1968) é:

Divisão: Magnoliopyita

Classe: Magnoliopcida

Sub-classe: Caryophyllidae

Ordem: Caryophyllales

Família: Cactácea

Gênero: *Cereus*

Espécie: *Cereus jamacaru*

Os cladódios do mandacaru, verde-azulados, depois de queimados servem de alimento para o gado, caracterizando-se como uma forragem alternativa (Braga, 1960; Aragão et al. 2000). O Instituto de Química Agrícola do Ministério da Agricultura (Braga, 1960) apresentou a composição química dos artigos, conforme Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição química dos artigos novos do mandacaru

Parâmetros	Resultados
Umidade (b.u.) (%)	84,16
Matéria seca (%)	15,84
Proteína bruta (%)	10,72
Extrato etéreo (%)	1,04
Extratos não nitrogenados (%)	45,52
Fibra bruta (%)	16,22
Minerais (%)	10,66
Fósforo (%)	0,22
Cálcio (%)	5,61

Fonte: Braga (1960)

Araújo (1994) estudando a composição química e a digestibilidade *in vitro* de alimentos utilizados pelos animais no cariri da Paraíba, determinou o teor de proteína bruta e digestibilidade *in vitro* da matéria seca do mandacaru que foi 7,22% e 70,20% na forma *in natura*, respectivamente.

Barbosa (1998) pesquisando a composição química de alimentos do estado da Paraíba no setor pecuário determinou os teores nutritivos na matéria seca do mandacaru (Tabela 2.2) e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e a digestibilidade da matéria orgânica (Tabela 2.3).

Tabela 2.2 – Composição química do mandacaru

Nutrientes							Minerais		
MS (g/kg)	MO (%)	PB (%)	FB (%)	EE (%)	ENN (%)	CINZAS (%)	Ca (%)	P (%)	N (%)
1000	760,9	72,1	153,5	12,9	522,4	239,1	38,04	0,92	11,54
129,1	97,3	9,3	19,7	1,6	67,3	30,7	4,75	0,12	1,49

Fonte: Barbosa (1998)

Valores em negrito: expressos na matéria seca

Valores normais: expressos na matéria natural

Tabela 2.3 - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e a digestibilidade da matéria orgânica do mandacaru

Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (%)	Digestibilidade da matéria orgânica (%)
73,54	73,91

Fonte: Barbosa (1998)

Germano et al. (1991) pesquisando a composição química e mineral de seis cactáceas, no semi-árido paraibano, constataram que o mandacaru com 10,18% e o facheiro com 9,23% apresentaram os maiores teores de proteínas.

Araújo (2003) determinou a composição química bromatológica e a digestibilidade *in vitro* do mandacaru sem espinhos na forma *in natura*, conforme Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Composição química bromatológica do mandacaru

MO (%)	MS (%)	PB (%)	FB (%)	EE (%)	MM (%)	ENN (%)	EB (cal/g)	DIVMS (%)
90,2	19,0	7,5	14,0	1,2	10,0	68,2	3176,5	78,7

Fonte: Araújo (2003)

2.1.1. Fruto do mandacaru

O fruto desta cactácea, Figura 2.2, apresenta diferentes formas e tamanhos, conforme Figura 2.3. De acordo com Rocha & Agra (2002), o tamanho do fruto do mandacaru varia de 10-13 x 5-9 cm, ovóide, sucosa; epicarpo glabro, róseo a vermelho; polpa funicular, mucilaginosa, branca; sementes variando de 1,5 – 2,5 mm de comprimento. O aproveitamento do fruto do mandacaru em processos biotecnológicos é uma forma alternativa de obter produtos de maior valor agregado e conseqüentemente gerar lucro.

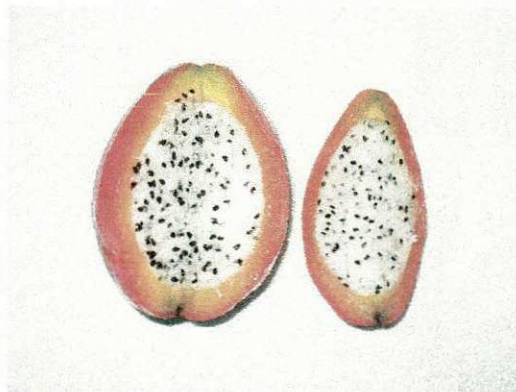


Figura 2.2 – Fruto do mandacaru



Figura 2.3 – Diferentes formas do fruto do mandacaru

A cultura do mandacaru tem pouca importância econômica na região, e não é explorada comercialmente, uma vez que esta cultura se apresenta de forma extensiva, ocorrendo conseqüentemente grandes desperdícios destes frutos. De acordo com Araújo & Silva (1995), os índices de perdas pós-colheita são preocupantes e refletem negativamente na economia de algumas regiões do Brasil, e ainda acrescentam que cerca de 50% da produção de frutos tropicais não são aproveitados. Poucos são os estudos com este fruto, e não se encontram na literatura dados sobre a produção brasileira deste fruto. Em contrapartida, a elaboração de uma bebida fermentada e vinagre utilizando-se o fruto, é uma forma alternativa de aproveitamento e incentivo ao cultivo dessa cultura, de forma intensiva, propiciando um meio lucrativo para o produtor dessa cultura, uma vez que esses produtos têm valor comercial e maior vida útil. Oliveira et al. (2004)

caracterizaram a casca e polpa do fruto do mandacaru, como é mostrado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Caracterização do fruto do mandacaru

Características	Médias
Massa total	137,0316 ± 53,6603 g
Diâmetro transversal	58,06 ± 7,58 cm
Diâmetro longitudinal	82,73 ± 16,96 cm
pH (polpa)	4,52±0,01
pH (casca)	4,33±0,01
Ácido ascórbico (polpa)	1,48±0,21 mg/100g
Umidade (polpa)	93,77%
Umidade (casca)	87,54%
Sólidos solúveis totais (polpa)	12,17°Brix
Sólidos solúveis totais (casca)	6,23°Brix
Cinzas (polpa)	0,2651%
Cinzas (casca)	0,4853%
Acidez total titulável (polpa)	0,2110% ácido cítrico
Acidez total titulável (casca)	0,4623% ácido cítrico
Açúcares redutores (polpa)	9,54% glicose
Açúcares redutores (casca)	2,79% glicose

Fonte: Oliveira et al. (2004)

Almeida et al. (2005) estudaram as características físicas e físico-químicas dos frutos do mandacaru provenientes de duas cidades da Paraíba, Queimadas e Lagoa Seca, e observaram diferenças significativas no tamanho e peso dos frutos avaliados. Constataram ainda, que os frutos de Queimadas apresentaram maior tamanho e peso, e que o teor de ART nos frutos variou de 9,92 a 10,40%.

2.2. Enriquecimento protéico

2.2.1. Fermentação semi-sólida (FSS)

O termo fermentação semi-sólida, ou em estado sólido, ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se aos processos que há crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde a quantidade de líquido (água ou outro líquido) apresenta um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e metabolismo dos microrganismos, mas não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (Pinto et al., 2006). O teor de água presente no meio está na forma complexada ou absorvida na matriz sólida (Cannell & Young, 1980).

De acordo com Pinto et al. (2006) a FSS também apresenta as seguintes características:

- a fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas;
- o ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração de partículas individuais;
- o crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas aos dos habitats naturais;
- o meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

As principais vantagens apresentadas pela fermentação semi-sólida é o pequeno espaço ocupado pelo equipamento, uma vez que é pequena a quantidade de água requerida no processo, e a inexistência de problemas relativos à contaminação bacteriana, devido à baixa umidade do meio de cultivo. No entanto, Hennies (1996), Gutierrez et al. (1992) e Del Bianchi et al. (2001) relatam as desvantagens do processo de fermentação semi-sólida como: o difícil controle do processo, relativos à transferência de massa e os poucos conhecimentos técnicos, fisiológicos e bioquímicos; necessidade de grande quantidade de esporos; os pré-tratamentos requeridos pelos substratos; intenso trabalho quanto à ampliação de escala do processo; e os problemas relacionados à utilização de substratos sólidos que são: necessidade de produzir inóculo em

grandes quantidades, os níveis de umidade do meio semi-sólido que devem ser determinados para cada espécie microbiana a ser utilizada.

2.2.2. Biorreatores utilizados

Correia (2004) cita vários tipos de biorreatores utilizados em escala de laboratório, tais como: Erlenmeyers, béqueres, frascos de Fernbach, garrafas de cultura, bandejas não perfuradas, tanques, placas de Petri, além de sacos feitos de filme microporoso. No entanto, alguns estudos utilizam bandejas perfuradas, escolhidas por proporcionarem boa aeração durante o processo fermentativo. Mordocco & Noprahtna (2004) mostraram outros tipos de biorreatores empregados em FSS, tais como: biorreator em bandeja, em leito fixo, leito fluidizado ar-sólido, tambor rotativo, tambor agitado horizontalmente e biorreator agitado verticalmente.

2.2.3. Fatores que influenciam o processo de fermentação semi-sólida

2.2.3.1. Umidade e atividade de água

Na fermentação semi-sólida, a água está envolvida no desenvolvimento de biomassa e reações metabólicas, nas atividades enzimáticas e no transporte de gás, nutrientes e metabólitos extra-celulares.

De acordo com Del Bianchi et al. (2001), os principais fatores que determinam o grau de umidade do substrato no início e ao longo da fermentação são: a natureza do substrato, as necessidades dos microrganismos utilizados e o tipo do produto final desejado. Para Murthy et al. (1993), o teor de umidade inicial é um dos fatores que mais afetam o crescimento microbiano e a formação de produto, pelo fato de determinar a quantidade de água inicial disponível para o microrganismo e por fazer com que o substrato se dilate, facilitando assim, a penetração do micélio para a utilização do substrato.

A atividade de água (a_w), quantidade de água não ligada e que está à disposição dos microrganismos, é definida de acordo com a expressão (1), como a relação existente entre a pressão de vapor da água contida na solução ou no alimento (P) e a pressão de vapor da água pura (P_0), a uma dada temperatura (Ordóñez, 2005).

$$a_w = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

A atividade de água influencia o desenvolvimento microbiano e os processos bioquímicos, tendo por isso, cada microrganismo um nível de atividade de água mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas. De acordo com Ramana et al. (1993) os fungos filamentosos necessitam de um meio com uma atividade de água mínima de aproximadamente 0,7, as leveduras o valor situa-se em 0,8 e para as bactérias 0,9. Santin (1996) comenta que a atividade de água indica a disponibilidade de água para o crescimento de microrganismos (deteriorantes ou não) e para a ocorrência de reações deteriorantes tais como: o escurecimento, a oxidação e a hidrólise.

A atividade de água é uma das variáveis que mais afetam o processo fermentativo (enriquecimento nutricional) e também o armazenamento do material enriquecido. O estudo da atividade de água pode ser feito através de isotermas de sorção (dessorção e adsorção), que de acordo com Araújo (2004), permitem a determinação do valor da monocamada de água ligada no substrato. Estudos realizados por pesquisadores afirmam que não se deve retirar água em quantidade inferior a monocamada, por este ser o limite abaixo do qual se inicia uma série de reações químicas indesejáveis no substrato (Santin, 1996; Gouveia, 1999; Isse et al., 1993).

As isotermas de sorção são definidas por Fennema (1996) como a representação gráfica que relaciona o conteúdo de água (expresso em massa de água por unidade de massa de matéria seca) com sua atividade de água a temperatura constante. As isotermas podem ser de adsorção, onde o material passa pelo processo de umedecimento, ou de dessorção, processo pelo qual ocorre a secagem do material.

Com o objetivo de prever o comportamento das isotermas, foram propostos por vários autores diversos modelos de ajuste de isotermas de sorção, que são úteis no conhecimento das características do produto. Para o ajuste dos dados experimentais das isotermas de sorção, é necessário utilizar modelos matemáticos e fazer a correspondência entre o teor de umidade do produto analisado (X_{eq}) e a atividade de água (a_w).

Existem vários modelos matemáticos para o ajuste dos dados, dentre eles os mais utilizados são: GAB, BET e Henderson modificado, apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Modelos para ajuste de isotermas de sorção

Nome dos modelos	Equações
GAB (Guggenheim, Anderson e de Boer)	$X_{eq} = \frac{X_m \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)}$
Henderson modificado	$X_{eq} = \left(\frac{\log(1 - a_w)}{-a \cdot (t + b)} \right)^{1/c}$
BET	$\frac{X_{eq}}{X_m} = \frac{C a_w}{1 - a_w} \left\{ \frac{1 - (n+1)a_w^n + n a_w^{n+1}}{1 - (1-C)a_w - C a_w^{n+1}} \right\}$

Onde:

X_{eq} – umidade de equilíbrio;

X_m – umidade na monocamada molecular;

a_w – atividade de água;

C, n, a, b, c, t – parâmetros dos modelos.

2.2.3.2. pH

O pH é um fator importante em qualquer processo biológico, havendo valores mínimo, ótimo e máximo de pH para o desenvolvimento de cada microrganismo (Perazzo Neto, 1999). De acordo com Franco et al. (1996), o pH em torno da neutralidade (entre 6,5 e 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos. Ainda comenta que os bolores e leveduras apresentam maior tolerância ao pH, sendo que os bolores podem se multiplicar em valores de pH mais baixos que as leveduras, sendo estas mais tolerantes que as bactérias a valores baixos de pH, onde os valores de pH ótimo para a multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* é entre 4 e 5, e para o *Aspergillus niger* é entre 3 e 6.

Holanda et al. (1998) estudando o enriquecimento protéico do pedúnculo do caju por meio de leveduras, constataram que se deve observar o pH das massas de caju, uma vez que em $\text{pH} < 3,5$ pode ocorrer uma redução na eficiência

de conversão protéica da levedura, embora o elevado índice de acidez evite a contaminação de microrganismos no meio, tais como bactérias.

2.2.3.3. Temperatura

A temperatura tem grande influência no crescimento microbiano, havendo uma temperatura mínima, abaixo da qual o microrganismo não se desenvolve; uma temperatura ótima na qual o crescimento microbiano é máximo; e uma temperatura máxima, acima da qual não há crescimento microbiano sendo necessário observar a temperatura para não comprometer o processo fermentativo. Franco et al. (1996) relata que os microrganismos mesófilos têm uma temperatura ótima de multiplicação variando entre 25°C e 40°C, e corresponde a grande maioria dos microrganismos. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento, formação de produtos e esporulação (Pinto et al., 2006).

Del Bianchi et al. (2001) estudando a taxa de produção de proteínas de *Aspergillus niger* em relação à temperatura empregada no processo, observaram os maiores resultados na produção de proteína à temperatura de 35°C, e que apresentou perda sensível na eficiência do processo quando submetidas a 45°C.

2.2.3.4. Inóculo

Mudgett citado por Perazzo Neto (1999) comenta que é necessário otimizar a concentração de inóculo nas fermentações em substrato sólido, uma vez que uma baixa concentração de inóculo pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e formar pouca biomassa. Por outro lado, um inóculo com elevada concentração de esporos pode exaurir o meio para a formação de biomassa, reduzindo a quantidade de produto desejado. O autor ainda relata que, caso se deseje a produção de biomassa é recomendado o emprego de inóculo elevado para evitar contaminantes, no entanto, deve-se ter cuidado para não elevar muito o custo de produção com a preparação de inóculo.

Del Bianchi et al. (2001) estudando a produção de ácido cítrico por fermentação semi-sólida com o *Aspergillus niger*, inoculou uma suspensão na

concentração de 2×10^6 esporos/g substrato, e verificaram que após 4 a 6 dias houve uma conversão de 80%.

Perazzo Neto (1999) estudando o enriquecimento protéico da algaroba (*Prosopis juliflora*) e da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) utilizou uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* IA-UFPE 2003 em água destilada, proporcionando uma concentração de $\pm 10^5$ esporos/mL. Para cada quilo de substrato triturado foi inoculado 300mL da suspensão de esporos, correspondendo a $\pm 10^7$ esporos/kg de substrato.

2.2.3.5. Espessura da camada

Del Bianchi et al. (2001) comenta que existem diferentes formas de se obter uma movimentação interna do ar no substrato, proporcionando uma melhor transferência de oxigênio, utilizando-se material poroso mediamente granulado ou fibroso e pelo uso de uma pequena camada de substrato. Afirmam ainda, que a quantidade de ar estéril a ser introduzido no processo fermentativo depende da natureza dos microrganismos bem como da espessura da camada de substrato, dentre outros parâmetros.

Perazzo Neto (1999) estudou o enriquecimento protéico, por fermentação semi-sólida, das raquetes da palma e vagens de algaroba utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, e utilizou 1 kg de cada substrato por bandeja de modo a obter camadas de 0,7; 0,75 e 1,0 cm. Observou que para os dois substratos utilizados, a camada de 0,75 cm proporcionou um maior teor de proteína verdadeira, em torno de 12%.

Suhet (1997) estudando o enriquecimento protéico do resíduo da industrialização do abacaxi por meio de fermentação semi-sólida, com o fungo *Rhizopus oligosporus*, utilizou camada de 1,5 cm por bandeja.

Araújo (2004) utilizou camadas de 2, 4 e 6 cm de substrato, no estudo do enriquecimento protéico das cactáceas mandacaru sem espinhos e palma forrageira, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e observou que a espessura da camada não teve influência no processo fermentativo.

2.2.3.6. Fontes de nitrogênio e carbono

Para Perazzo Neto (1999) a capacidade de utilização das fontes de carbono e nitrogênio, está ligada ao conjunto enzimático, que é específico de cada espécie microbiana. Assim, existem microrganismos capazes de utilizar compostos complexos, como amido e proteínas, e outros que só utilizam substâncias simples como açúcar e uréia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Pelczar et al. (1981) afirmam que o carbono é um dos elementos químicos mais importantes no crescimento microbiano, pois compõem determinados nutrientes orgânicos (carboidratos, lipídeos e proteínas) que fornecem energia para o crescimento da célula e servem como unidade básica do material celular. Os fungos utilizam outras fontes de carbono como álcool, hidrocarbonetos e amido. Também utilizam nitrogênio na forma de amônia, embora quase todos utilizem nitrato.

2.2.3.7. Pré-tratamento

De acordo com Del Bianchi et al. (2001), o substrato necessita de um pré-tratamento para se adequar às condições requeridas para o crescimento e metabolismo dos microrganismos, e facilitar a atuação dos microrganismos sobre o meio, tais como:

- 1) Esmagamento, quebra, moagem e peneiramento visando obter uma granulometria mais adequada ao processo;
- 2) Suplementação de nutrientes e correção de pH, para suprir a deficiência de algum nutriente ou adequar às condições de crescimento microbiano;
- 3) Hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico, buscando favorecer a atuação enzimática;
- 4) Embebição, para regular o teor de umidade inicial do processo;
- 5) Vaporização ou aquecimento, visando a gelatinização ou inchamento do substrato;
- 6) Adição de agente sequestrante, com o objetivo de remover íons metálicos, que podem reduzir o rendimento do processo;

- 7) Processo de esterilização, buscando reduzir ou eliminar possíveis contaminações.

2.2.4. Microrganismos

Os microrganismos podem ser utilizados nos processos fermentativos em meio sólido, em seu estado natural, como na forma de culturas puras individuais, ou mais raramente, na forma de culturas mistas (Gutierrez et al., 1992; Pandey, 1992). Para que haja um bom desempenho do processo fermentativo, a escolha da linhagem do microrganismo deve levar em consideração o meio de cultura e as condições ambientais da fermentação (temperatura e umidade do sistema), uma vez que a FSS tem obtido com sucesso vários tipos de transformação, seja ela realizada por fungos ou bactérias.

Raghavarao et al. (2003) comenta que vários microrganismos têm a capacidade de crescer em substrato sólido. Bactérias e leveduras crescem em substrato sólido com um teor de umidade entre 40-70%, como na compostagem ou na ensilagem aeróbica ou anaeróbica, mas o crescimento e propagação das células ricas em proteínas sempre necessitam de água livre.

No processo de enriquecimento nutricional, podem ser citados, dentre muitos outros, o uso de outras culturas como *Rhizopus* (Suhet, 1997; Moraes, 1999; Albuquerque et al., 2003), *Candida* (Canoilas, 1991), *Aspergillus* (Moraes, 1999; Oliveira et al. 2001) e *Saccharomyces* (Holanda et al., 1998; Araújo et al., 2005; Campos, 2003; Correia et al., 2007).

2.2.4.1. Fungos (*Aspergillus niger*)

Perazzo Neto (1999) comenta que o *Aspergillus niger* encontra-se facilmente na natureza, sendo as suas espécies capazes de crescer em diversos substratos. Algumas espécies se envolvem na deterioração dos alimentos, outras são empregadas em fermentações industriais, na produção de ácido cítrico e glucônico.

De acordo com Castilho (1997), os fungos filamentosos, em especial do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus wentii*) possuem corpos de frutificação com conidióforos contendo vesículas terminais

arredondadas, recobertos de esporos nas extremidades das hifas e, no caso do *Aspergillus niger*, a cor dos esporos é negra.

2.2.5. Trabalhos de enriquecimento protéico utilizando cactáceas e resíduos agroindustriais (Estado da arte)

Correia et al. (2007) utilizaram resíduos de abacaxi como substrato no estudo do enriquecimento protéico por fermentação semi-sólida, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e suplementação de nitrogênio. Após 48 horas de fermentação verificaram que o teor de proteína aumentou de 6,4% para 16,1% (base seca).

Araújo et al. (2005) estudaram o enriquecimento protéico da palma forrageira, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e observaram que os maiores crescimentos do microrganismo na síntese de proteína foram obtidos com o tempo de 48 horas, proporcionando um aumento de quatro vezes no teor protéico do fermentado em relação a palma *in natura*.

Campos (2003) estudou o processo de enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju com a *Saccharomyces cerevisiae*, através de fermentação semi-sólida, e observou que com uma concentração de 12% de levedura e temperatura de fermentação de 33°C, o aumento protéico foi de 3,6 vezes. O melhor tempo de fermentação que proporcionou maior teor de proteína no fermentado foi entre 24 e 32 horas.

Albuquerque et al. (2003) utilizaram o fungo *Rhizopus oligosporus* para promover o enriquecimento protéico do bagaço de maçã, resíduo da indústria de suco, empregando a fermentação semi-sólida, que foi realizada em reatores de leite empacotado, durante 72 horas, a 30°C. Os autores conseguiram um aumento de cinco vezes no teor de proteína solúvel do bagaço.

Suhet (1997) realizou o estudo do enriquecimento protéico do resíduo da industrialização do abacaxi por fermentação semi-sólida a 30°C. As fermentações foram realizadas em bandeja perfurada, com o fungo *Rhizopus oligosporus* e em sacos plásticos, com o fungo *Rhizopus oligosporus* e também com o *Aspergillus niger*. Foi observado que o máximo teor protéico bruto encontrado para as fermentações em bandeja foi após 65 horas de fermentação, utilizando como

inóculo o *Rhizopus oligosporus* e em sacos com *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger*, em 96 e 75 horas de fermentação, respectivamente. Prolongado o tempo do processo, foi observada uma redução do teor protéico no curso das fermentações.

Moraes (1999) estudou o enriquecimento protéico do farelo de arroz desengordurado, subproduto da indústria de extração de óleo de arroz, por fermentação semi-sólida na temperatura de 30°C. As fermentações foram realizadas em biorreatores de coluna com leito fixo, aerados pela parte inferior e encamisados, por onde ocorria a circulação de água. O autor comparou a taxa de crescimento de cinco diferentes microrganismos, *Aspergillus niger* NRRL 3122, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* CCT 3940, *Aspergillus awamori* CCT 3941 e *Rhizopus* sp, obtendo um aumento de 20,12% no teor de proteína total utilizando o *Rhizopus* sp.

Holanda et al. (1998) avaliaram a proporção de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* e o tempo de fermentação necessário para se enriquecer a pasta de pedúnculos de caju por fermentação submersa a temperatura de 35°C. Os autores referidos conseguiram um aumento de 20% do teor protéico do material fermentado, utilizando 5,0% de inóculo de levedura, com um tempo de fermentação inferior a 24 horas.

Canoilas (1991) verificou a influência da temperatura, pH e inóculo de *Candida sorboxylosa*, no desenvolvimento microbiano por fermentação semi-sólida do resíduo proveniente da industrialização da farinha de mandioca, com o intuito de fazer o enriquecimento protéico do mesmo. O efeito dos níveis de pH e inóculo de levedura foram significativos e tiveram influência na produção de proteína durante o processo de fermentação a temperatura de 32°C.

2.3. Fermentado de fruto

O vinho é uma bebida proveniente exclusivamente da fermentação alcoólica de uva madura e fresca ou suco de uva fresca (Aquarone et al., 1983). Portanto, a legislação brasileira vigente (Brasil, 1997) determina que bebidas elaboradas com outros frutos devem obrigatoriamente ser rotulado com a denominação fermentado acompanhada do nome do fruto da qual se originou, por

exemplo, fermentado de caju, fermentado de laranja, fermentado de acerola, fermentado de abacaxi, etc.

A legislação brasileira (Brasil, 1997) estabelece que o fermentado de fruta é uma bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura. O etanol é o principal componente do fermentado de fruta.

A análise dos componentes voláteis (acetaldeído, acetona, éster-acetato de metila e etila), metanol, etanol, álcoois superiores (1-propanol, isobutanol, amílico e isoamílico), acidez total, açúcares residuais e pH são de vital importância para verificar se as características do produto estão dentro das especificações estabelecidas pela legislação brasileira (Garruti, 2001).

Os vinhos ou fermentados de frutas são divididos em três classes no que se refere à quantidade de açúcares residuais. A primeira classe apresenta os vinhos do tipo seco, com até 5 g/L de açúcares totais, a segunda entre 5,1 e 20 g/L são do tipo meio seco e a terceira e última é a classe dos vinhos suaves ou doces com mais de 20,1 g/L (Rizzon et al., 1994).

De acordo com Aquarone et al. (1983), as principais substâncias presentes no vinho são: açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos.

A acidez total expressa em ácido acético, é a acidez titulável que determina a quantidade das funções ácidas livres presentes no suco ou no vinho, e é a soma da acidez volátil e acidez fixa. A legislação brasileira (Brasil, 1997) exige que, para os fermentados de frutas, os teores de acidez total estejam compreendidos na faixa de 3,3 a 7,8g/L (55 a 130 meq/L). O ácido acético é o principal ácido orgânico excretado no meio em fermentação, sendo expresso em acidez volátil (Rizzon et al., 1994).

Geralmente, o fermentado de fruta apresenta pH variando entre 3,0 e 4,0. A análise de pH facilita na avaliação da resistência do produto à contaminação bacteriana. O pH igual a 3,4 é o ideal para que o produto aumente a resistência às contaminações (Hashizume, 2001).

2.3.1. Microbiologia do vinho ou do fermentado

2.3.1.1. Leveduras

Os agentes da fermentação alcoólica são as leveduras (Aquarone et al., 1983). Lima et al. (2001) afirmam que existe um grande número de espécies de leveduras que se diferenciam por seu aspecto, sua forma de reprodução e também pela maneira de transformar o açúcar.

As leveduras encontradas na vinificação podem apresentar uma das quatro formas distintas: *elíptica ou oval*; *alongada, em forma de salsicha*; *esférica*; e *apiculada, alongada em suas extremidades, como limão* (Aquarone et al., 1983).

De acordo com Lima et al. (2001), a maior parte das leveduras do vinho apresenta duas formas de reprodução: vegetativa por brotamento e por formação de esporos, os quais formam novas leveduras após germinação. A multiplicação por brotamento de uma única célula de levedura pode dar origem a milhões de novas células em 24 horas. Os autores comentam que a população de leveduras no mosto em plena concentração é na ordem de 8×10^6 a 12×10^6 por mL.

As vantagens do emprego de leveduras, quando bem realizado, podem ser resumidas como segue (Lima et al., 2001):

- 1) Início da fermentação mais rápida;
- 2) Uma fermentação mais regular e sua conclusão sempre mais rápida.
- 3) Boa conservação de vinhos, sendo bem secos, isto é, isento de açúcares fermentecíveis.

Segundo Korhola et al. (1989), as leveduras utilizadas na produção de bebidas alcoólicas devem apresentar as seguintes características: alta tolerância ao álcool, bom rendimento, fermentar rapidamente o meio e minimizar o risco de contaminações, produzir a melhor concentração e balanço de compostos secundários desejáveis.

2.3.2. Fermentação alcoólica

A fermentação é um dos processos mais antigos e usados pelos egípcios na fabricação de bebidas alcoólicas a partir de frutas e cereais existentes há mais de 4.000 anos (Aquarone et al., 1983). A fermentação alcoólica segundo Sachs (2001) é feita por leveduras, normalmente em cultura pura com levedo

selecionado, isto é, cepas com boa capacidade de produzir álcool, ou ainda, são usadas leveduras de panificação devido a facilidade de se obter este fermento como inóculo. As leveduras utilizadas são: *Saccharomyces cerevisiae*, *saccharomyces cerevisiae ellipsoideus* e eventualmente *Saccharomyces uvarum*. As leveduras atacam basicamente os açúcares (amido, glicose, frutose, sacarose e outros) transformando-os em álcool etílico e gás carbônico, além de outros produtos secundários, como ácidos orgânicos.

No processo da fermentação alcoólica de açúcares, os principais produtos formados são álcool etílico e gás carbônico, de acordo com a reação a seguir (Aquarone et al., 1983):



Entretanto, a molécula da glicose passa em processo anaeróbio por doze etapas intermediárias antes de ser transformada em etanol e gás carbônico. Ao lado de etanol e gás carbônico, formam acetaldeído, glicerol, 2-3-butilenoglicol, ácido láctico e ácido cítrico como produtos constantes da fermentação alcoólica e que contribuem para o sabor e o aroma do vinho. Os ésteres, como acetato de etila, são também formados pela esterificação de ácidos orgânico fixos, como ácido tartárico e málico também catalisados pelas enzimas das leveduras.

Durante a fermentação alcoólica, alguns fatores que influenciam no processo são:

- A concentração de carboidrato no meio;
- O pH do meio;
- A concentração de levedura;
- A temperatura de fermentação.

A temperatura é um dos fatores de maior importância durante a fermentação alcoólica. Temperatura variando entre 25 e 33°C permite obter alto rendimento em álcool, por permitir uma fermentação mais completa e também por minimizar a perda por evaporação.

O controle de pH é importante durante o processo de fermentação alcoólica, onde o valor de pH inicial pode variar de 3,8 a 4,0, sendo esta faixa de pH suficiente para permitir uma rápida fermentação alcoólica e inibir bactérias indesejáveis (Aquarone et al., 1983).

2.3.3. Compostos produzidos na fermentação alcoólica

Durante a fermentação alcoólica, o etanol não é o único composto formado. É produzido o dióxido de carbono e um grande número de componentes secundários, que conferem aroma e sabor as bebidas. Dentre os produtos secundários formados, o mais abundante são os álcoois superiores, que são produzidos juntamente com o etanol. Outros componentes presentes em pequenas quantidades, também desempenham importante papel no sabor e aroma das bebidas, tais como ácidos orgânicos e compostos carbonílicos.

2.3.3.1. Etanol

O etanol é o principal produto da fermentação alcoólica. De acordo com Vogt (1984), ele atua na inibição do crescimento de outros microrganismos presentes no mosto (fungos, leveduras selvagens e bactérias). O CO₂ que também é produzido na fermentação atua como “gás protetor”, já que o mesmo desloca o ar e reduz a possibilidade de sobrevivência dos microrganismos aeróbios.

2.3.3.2. Álcoois superiores

Os álcoois superiores são formados no decorrer do processo fermentativo a partir de aminoácidos constituintes do meio em fermentação. Os principais álcoois superiores são 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-metil-1-butanol (álcool amílico ativo) e 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico). Menores quantidades de álcoois alifáticos têm sido encontradas em vinhos, como 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol (álcool amílico), 1-hexanol, 1-octanol e outros (Garruti, 2001). A composição do meio (concentração de açúcar, pH, concentração e tipo de fonte de nitrogênio), temperatura, grau de aeração e a linhagem da levedura também influenciam a produção dos álcoois superiores.

Amarine et al. (1972) comenta que os álcoois superiores podem ser importantes por apresentarem seus odores próprios e pela sua ação solvente sobre outras substâncias odoríferas, interferindo na volatilidade das mesmas e conseqüentemente nas suas características sensoriais.

2.3.3.3. Acetaldeído

O principal aldeído associado à fermentação alcoólica é o acetaldeído. Em fermentações normais, este composto aparece no mosto durante as primeiras horas, mas tende a diminuir no estágio final da fermentação (Maia, 1994). Entre os compostos carbonila, o acetaldeído constitui mais de 90% do total de aldeídos contidos em vinhos e bebidas alcoólicas destiladas (Nikänem, 1986). Parte do acetaldeído excretado no vinho durante a fermentação, fica ligado ao SO₂, enquanto o restante permanece livre e, conseqüentemente, disponível para o metabolismo da levedura (Millán & Ortega, 1988).

O acetaldeído também é produzido no corpo humano pelo metabolismo do etanol, e embora seja importante para o aroma e sabor de bebidas alcoólicas, em doses elevadas, é tóxico para o organismo humano. Quando há o aumento da concentração sanguínea do acetaldeído, ocorre vermelhidão na face, dor de cabeça, dificuldade respiratória, vômito, transpiração, inquietação, aceleração do ritmo cardíaco e baixa na pressão sanguínea (Nascimento et al., 1997).

2.3.3.4. Ésteres

Os ésteres constituem a maior classe de compostos de aroma nas bebidas alcoólicas. Os ésteres são originados da reação de esterificação entre um ácido e um álcool. Essa reação pode ser catalisada por enzimas esterasas, ou pode ser efetuada quimicamente sem interferência de enzimas (Yokoya, 1995). A quantidade de éster produzida depende da quantidade relativa de álcool e acetil produzidos pela levedura. O acetato de etila é normalmente o éster encontrado em maior quantidade (Berry, 1995).

Os fatores que mais afetam a concentração de ésteres no mosto são a composição do meio (fonte de carbono e sua concentração, suprimento de nitrogênio, pH do meio, variabilidade de micronutrientes e níveis de ácidos graxos insaturados/esteróis) e os procedimentos de fermentação tais como a temperatura de fermentação, concentração de dióxido de carbono (CO₂), oxigenação do meio e a seleção da linhagem da levedura (Soles et al., 1982). Além da levedura, a matéria-prima (variedade da fruta) utilizada também interfere na formação de ésteres (Suomalainen et al., 1974).

2.3.3.5. Metanol

O metanol é um álcool particularmente indesejável em bebidas alcoólicas, e não tem importância no aroma das mesmas. A ingestão constante de metanol pelo ser humano, mesmo em doses muito pequenas, pode levar à cegueira e até a morte (Maia, 1994).

Segundo observações de Postel citado por Mutton (1992), a maior concentração de metanol nas aguardentes de frutas deve-se à composição do mosto fermentado que originou a bebida, já que o álcool metílico origina-se pela degradação enzimática da pectina e esta última é um constituinte dos tecidos vegetais, principalmente de frutas.

2.3.4. Trabalhos sobre fermentado de fruta (Estado da arte)

Torres Neto et al. (2006) estudaram o aproveitamento do pedúnculo do caju para a produção de fermentado de caju. Realizaram o processo de fermentação alcoólica em batelada agitado, utilizando a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. O fermentado de caju produzido apresentou um teor alcoólico de 11,5°GL que atende as normas estabelecidas pela legislação brasileira de bebidas.

Lopes et al. (2005) estudaram o aproveitamento do figo da índia (fruto da palma) na produção de fermentado de fruta. Observaram nos fermentados produzidos, uma concentração média de etanol acima de 6°GL, acidez total abaixo de 130 meq L⁻¹, pH de 3,5 e um sabor delicado e agradável. Os valores médios de rendimento (% Conversão) e produtividade obtidos nos experimentos foram de 73,29% e 2,6 g/h.L, respectivamente.

Asquiere et al. (2004) estudaram a fabricação de fermentado branco e tinto de jabuticaba utilizando a polpa e a casca, respectivamente. Concluíram que o fermentado de jabuticaba apresentou muita semelhança com o vinho de uva. Os teores alcoólicos das bebidas foram de 10 a 12°GL, para o fermentado (vinho) branco e seco, respectivamente. O pH para o vinho tinto e branco variou entre 4,0 - 3,3, respectivamente. A concentração final de sacarose foi de 40 e 41g/L para os vinhos tinto e branco, respectivamente.

Asquiere et al. (2004) fizeram o estudo das características físico-químicas e sensoriais dos fermentados de jabuticaba tinto seco e doce, fabricados com o

fruto integral. A acidez total para o fermentado seco de jabuticaba foi 122,3 meq/L e 79,3 meq/L para o fermentado doce e 129 meq/L e 106,3 meq/L para fermentados jovens e velhos, respectivamente, observando uma redução de acidez com o tempo de armazenamento. Com relação ao pH, este se situou entre 3,16 e 3,3 para o fermentado seco e para o fermentado doce entre 3,31 e 3,32 de 4 meses a um ano de armazenamento, respectivamente. A concentração final de sacarose foi 63,44g/L para o fermentado tinto e 39,8g/L para o mesmo fermentado após 1 ano de engarrafado. Para fermentados doces teve 87,4g/L e 96,26g/L em 4 meses e um ano de engarrafado, respectivamente.

Andrade et al. (2003) estudaram a produção da bebida fermentada a partir do fruto da pupunha. O processo fermentativo foi conduzido a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 dias. A bebida apresentou uma graduação alcoólica de 12°GL, atraente coloração alaranjada clara, limpidez, sabor e aroma agradáveis e boa aceitabilidade. O rendimento da produção foi em torno de 60%.

Bortolini et al. (2001) estudaram a fermentação alcoólica do suco de kiwi avaliando seis formas de preparação do mosto, variando a quantidade de nutrientes e de sacarose. O processo fermentativo foi conduzido com temperatura a 28°C , e com inóculo de 10^6 UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae*. O rendimento da fermentação alcoólica variou entre 75,6-92,4% e produtividade entre 0,72 a 2,0 g/L.h.

Dias (2001) estudou a produção de bebida fermentada a partir dos mostos de cajá e cacau. A fermentação foi conduzida à temperatura de 22°C durante dez dias, com acompanhamento diário do °Brix e da atividade fermentativa pela liberação de CO_2 . Os mostos foram inoculados com a levedura selecionada *Saccharomyces cerevisiae* a uma concentração de 10^7 células/mL. As graduações alcoólicas das bebidas fermentadas de cacau e cajá foram 11,5 e 12°GL, respectivamente. Não foram detectadas concentrações de metanol nas bebidas, o que indica que provavelmente, a levedura Sc_2 (que foi uma estirpe de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada) não possui a enzima pectinametilesterase, responsável pela liberação de grupos metil das cadeias de pectina.

Corazza et al. (2001) estudaram o aproveitamento de laranjas não comercializadas devido a defeitos nas cascas e tamanhos, na produção de fermentado de laranja. Fizeram o monitoramento do pH, °Brix, densidade, acidez

total e graduação alcoólica do mosto. O fermentado produzido apresentou uma graduação alcoólica, de 10,6°GL, que atende as exigências da legislação vigente.

2.4. Fermentado acético (vinagre)

Uma definição bem geral de vinagre é que o mesmo consiste no alimento do grupo dos condimentos obtidos por fermentação alcoólica de matérias-primas açucaradas ou amiláceas, seguida de fermentação acética (Bortolini et al., 2001).

Segundo Lima et al. (2001), o vinagre provém, em geral, de duas fermentações sucessivas, a alcoólica e a acética, toda matéria-prima usada para a produção fermentativa de álcool serve, em princípio, também como matéria-prima do vinagre.

Define-se também o vinagre como sendo um produto obtido por uma fermentação alcoólica seguida de uma fermentação acética, na qual ocorre a oxidação química do álcool em ácido acético, produzida por bactérias do gênero *acetobacter* ou *gluconobacter*.

O vinagre (vinho azedo) é um produto obtido através da fermentação acética, onde bactérias do gênero *Acetobacter* convertem álcool em ácido acético (Rizzon & Meneguzzo, 2002).

Fermentado acético é o produto obtido da fermentação acética do fermentado alcoólico de mosto de frutas, cereais ou de outros vegetais, de mel, ou da mistura de vegetais, ou ainda da mistura hidroalcoólica, devendo apresentar acidez volátil mínima de 4,0 (quatro) gramas por 100 mL, expressa em ácido acético, podendo ser adicionado de vegetais, partes de vegetais ou extratos vegetais aromáticos ou de sucos, aromas naturais ou condimentos, determinadas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Brasil, 1999).

As melhores matérias-primas para produzir vinagre são o vinho e o suco de frutas. Para a produção de vinagres de vinhos e fermentados de frutas, é recomendável a acetificação com vinhos secos, pois os açúcares residuais podem favorecer contaminações posteriores especialmente por leveduras (Rizzon & Meneguzzo, 2002).

Em função da matéria-prima, Aquarone et al. (1983) classifica os vários tipos de vinagres:

- Vinagres de sucos de frutas: uva, maçã, abacaxi, framboesa, pêssego, morango, caju, etc.
- Vinagres de tubérculos amiláceos: batata, mandioca, batata doce, etc.
- Vinagres de cereais: cevada, centeio, trigo, arroz, milho, etc.
- Outras matérias-primas açucaradas ou alcoólicas: mel, melaço, aguardente em geral, álcool diluído, etc.

2.4.1. Microbiologia do vinagre

2.4.1.1. Bactérias acéticas

As bactérias acéticas pertencentes à família *Acetobacteriaceae* do gênero *Acetobacter*, Gram negativas ou variáveis têm formas elipsoidais ou de bastonetes, ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias. Quanto à nutrição, as melhores fontes de carbono para o crescimento são manitol, etanol, n-butanol, glicerol e lactato. Ácido é formado a partir de n-propanol, n-butanol e D-glicose. Não hidrolisam amido nem lactose e são quimiorganotróficas (De Ley et al., 1984).

Na fermentação acética, Aquarone et al. (1983) relatam que se emprega uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedade dessa bactéria, que é considerada mais eficiente. Os autores ainda acrescentam que poucas espécies do gênero *Acetobacter* apresentam qualidades industriais, como:

- 1) produzir concentrações elevadas de ácido acético;
- 2) não formar material viscoso;
- 3) ter tolerância a concentrações razoáveis de etanol;
- 4) ter tolerância a concentrações razoáveis de ácido acético;
- 5) trabalhar em temperaturas entre 25°C e 30°C.

As bactérias acéticas (*Acetobacter*), quando jovens têm a forma de bastonetes às vezes móveis, ocorrem isoladas, aos pares ou em cadeias e são obrigatoriamente aeróbias. Formam película ou crosta na superfície da cultura, vulgarmente chamada de "mãe de vinagre", que é o vinagre não diluído e não pasteurizado de uma fermentação anterior, contendo elevadas concentrações de bactérias acéticas (Aquarone et al., 1983).

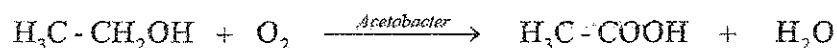
2.4.2. Fermentação acética

A fermentação acética corresponde à transformação do álcool em ácido acético por determinadas bactérias, conferindo-lhe o gosto característico do vinagre (Rizzon & Meneguzzo, 2002). Em linhas gerais, a expressão “fermentação acética” consiste na oxidação do álcool etílico contido no fermentado de fruta em ácido acético, realizada por um conjunto de bactérias do gênero *Acetobacter* ou *Gluconobacter*.

Em relação ao processo de fermentação, algumas considerações devem ser observadas:

- As bactérias acéticas utilizadas no processo são aeróbias;
- Os microrganismos devem tornar viável o custo de produção;
- Apresentar fermentação rápida;
- Oferecer bons rendimentos produtivos.

Na fermentação acética, o ácido acético produzido por bactérias do gênero *Acetobacter aceti* é o principal composto do vinagre. É obtido a partir da fermentação alcoólica do mosto açucarado e subsequente fermentação acética, conforme reação abaixo:



As espécies do gênero *Acetobacter* são bastante produtivas e para que elas tenham um bom desempenho necessitam de condições especiais de:

- Concentração do álcool;
- Temperatura de fermentação (entre 20° C e 30° C);
- Quantidade de oxigênio (O₂);
- Clarificação e pasteurização.

De um modo geral, um processo fermentativo pode ser constituído de duas etapas principais: (a) preparação do inóculo e (b) a fermentação propriamente dita. Denomina-se inóculo, ou pé de cuba, ou pé de fermentação, um volume de suspensão de microrganismo de concentração adequada capaz de garantir, em condições econômicas, a fermentação de um dado volume de mosto (Aquarone et al., 1983). A primeira etapa tem, basicamente, por finalidade preparar o microrganismo em condições apropriadas, de modo a garantir o desenvolvimento adequado da segunda etapa.

2.4.3. Preparo do meio a acetificar

Sachs (2001) comenta que no preparo do meio é necessário levar em consideração alguns fatores para se obter uma boa fermentação, tais como: concentração alcoólica, acidez inicial, controle de oxigenação, controle do teor residual de álcool e controle de temperatura.

2.4.3.1. Concentração alcoólica

O fermentado de fruta deve conter entre 5 a 12°GL. Concentrações muito baixas resultam em vinagres fracos e concentrações elevadas são tóxicas às bactérias acéticas, dificultando a fermentação (Sachs, 2001).

2.4.3.2. Acidez inicial

A acidez inicial deve estar entre 1 e 3% de ácido acético, que pode ser conseguida pela adição de vinagre forte não pasteurizado. Baixa acidez favorece a contaminação além de retardar o início da fermentação e a acidez elevada é tóxica ao fermento acético (Sachs, 2001).

2.4.3.3. Controle da oxigenação

Por se tratar de um microrganismo aeróbio estrito, o suprimento de oxigênio deve ser adequado, para que ocorra a fermentação. Uma aeração excessiva pode causar perda de álcool por evaporação e ácido acético por oxidação.

2.4.3.4. Controle do teor residual de álcool

Após o término da fermentação, o vinagre não deve permanecer na vinagreira, pois as bactérias acéticas não tendo mais álcool para metabolizar, começam a oxidar o ácido acético e causam o enfraquecimento do vinagre (Sachs, 2001).

2.4.3.5. Controle da temperatura

De modo geral, a temperatura ideal para o crescimento das bactérias acéticas situa-se entre 25 e 32°C. Baixas temperaturas reduzem a velocidade de fermentação e altas temperaturas provocam perda da viabilidade da cultura (Sachs, 2001).

2.4.4. Trabalhos sobre vinagre (Estado da arte)

Silva et al. (2007) estudaram a produção de vinagre de fermentado de caju. Para o estudo cinético e otimização da fermentação acética utilizaram um planejamento fatorial 2^2 , tendo como variáveis de entrada as concentrações iniciais de etanol e de ácido acético. Verificaram que as faixas de valores das variáveis que otimizam o processo são de 4,8 a 6,0% e de 1,0 a 1,3% para as concentrações de etanol e acidez acética, respectivamente. Observaram que os rendimentos variaram de 38,5 a 86,2% e a produtividade de 0,31g/L.h a 0,63g/L.h.

Marangon et al. (2003), com a finalidade de obter um produto de características diferentes em termos sensoriais, produziram vinagre de caqui. O experimento foi realizado em três bateladas. O caqui foi fermentado em forma de polpa e em pedaços. Concluíram que, o rendimento da fermentação alcoólica da polpa de caqui foi de 97% e produtividade de 0,665 g/L.h e quando fermentado em pedaços, alcançou um rendimento de 74% e produtividade de 0,582 g/L.h, e o vinagre de caqui atingiu o nível de 4,38% de ácido acético.

Pedroso (2003) estudou a utilização do biorreator *Airlift* para a produção de vinagre de maçã. Foram realizados quatro experimentos para biorreator *Airlift* e quatro para o biorreator clássico batelada, com temperatura e reação controlada. A produtividade máxima obtida no quarto experimento foi 4,2 g/L.h (*Airlift*) e 1,6 g/L.h (clássico). Foram analisados os parâmetros cinéticos para a fermentação realizada no biorreator *Airlift*, onde a velocidade específica média de crescimento celular foi de $0,14d^{-1}$ (*Airlift*) e $0,10d^{-1}$ (clássico). Os fatores de conversão médios $Y_{p/s}$, foram de 0,56 g/g (*Airlift*) e 0,25 g/g (clássico). Os fatores de conversão médios $Y_{x/s}$, foram de 0,009 g/g (*Airlift*) e 0,006 g/g (clássico). A partir dos resultados obtidos foi comprovado que a utilização do *Biorreator Airlift* é mais vantajosa.

Alcântara & Swarnakar (2006) estudaram a metodologia de superfície de resposta e avaliaram a eficiência da fermentação acética na obtenção de vinagre a partir do etanol, na temperatura ambiente, em escala de bancada em reatores contínuos. As concentrações de entrada (fatores independentes) foram: concentrações iniciais de ácido acético e etanol, obtendo como respostas: rendimento e produtividade. O rendimento da fermentação acética foi aproximadamente de 70% e obteve seu valor da acidez máxima com 309 horas de fermentação, alcançando o valor de 8,81g/100mL.

Bortolini et al. (2001) estudaram a fermentação acética do suco de kiwi na produção de vinagre e, avaliaram a fermentação acética que foi processada em gerador vertical (GV) a temperatura ambiente e em fermentador submerso (PS) a 25°C, com agitação e oxigenação controlada. Os resultados mostraram que o vinagre obtido pelo PS, em 12 horas, tiveram rendimentos variando de 93,24 e 98,34 % e produtividade entre 0,83 e 1,73 g/L.h.

Ferreira (2001) estudou em escala de bancada as melhores condições da fermentação acética em batelada. Iniciou-se o trabalho realizando um estudo cinético da fermentação acética com a intenção de determinar a influência das variáveis de entrada: concentração de etanol, concentração de fósforo e concentração de nitrogênio sobre o processo. Foi utilizada a metodologia de planejamento fatorial completo 2^3 . Através dos modelos matemáticos empíricos obtidos com o estudo e a partir das análises de superfícies de resposta, verificou-se que a variável de maior influência sobre o rendimento e produtividade do processo foi a concentração inicial de etanol. Com a concentração de etanol no vinho de 4,0%, maximizou-se o rendimento e a produtividade do processo. O nitrogênio apresentou uma discreta influência a uma concentração de 1,7 g.mL⁻¹, enquanto o fósforo não exerceu nenhuma influência significativa.

Capítulo 3

Material e Métodos

Capítulo 3

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta as metodologias empregadas nos ensaios do enriquecimento nutricional do mandacaru, por fermentação semi-sólida, bem como os procedimentos utilizados na elaboração da bebida fermentada por fermentação alcoólica e vinagre por fermentação acética, utilizando o fruto do mandacaru. Expõe também a caracterização dos substratos utilizados, estudo cinético dos processos e as análises realizadas durante os processos fermentativos.

Para uma melhor compreensão da metodologia utilizada, este capítulo foi subdividido em três tópicos 3.1, 3.2 e 3.3 com o intuito de apresentar separadamente as etapas realizadas nos três processos fermentativos (fermentação semi-sólida, fermentação alcoólica e fermentação acética).

As etapas dos ensaios realizados no processo de enriquecimento nutricional dos cladódios do mandacaru são mostradas na Figura 3.1. As Figuras 3.2 e 3.3 apresentam as etapas dos experimentos realizados na elaboração da bebida fermentada e vinagre do fruto do mandacaru, respectivamente.

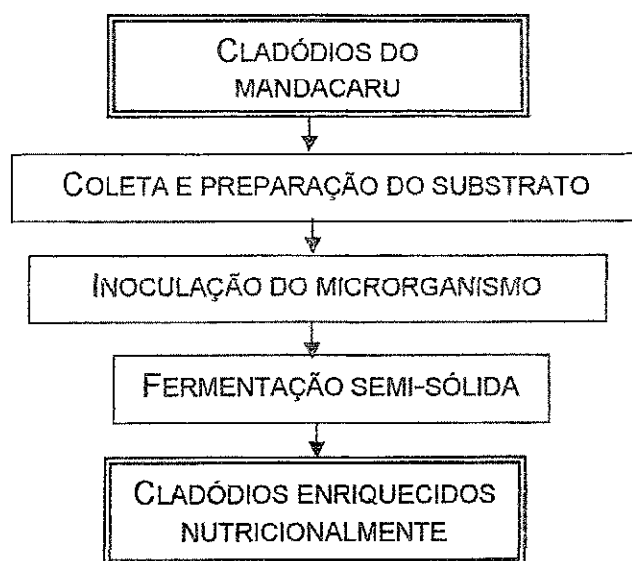


Figura 3.1 - Etapas do enriquecimento nutricional do mandacaru

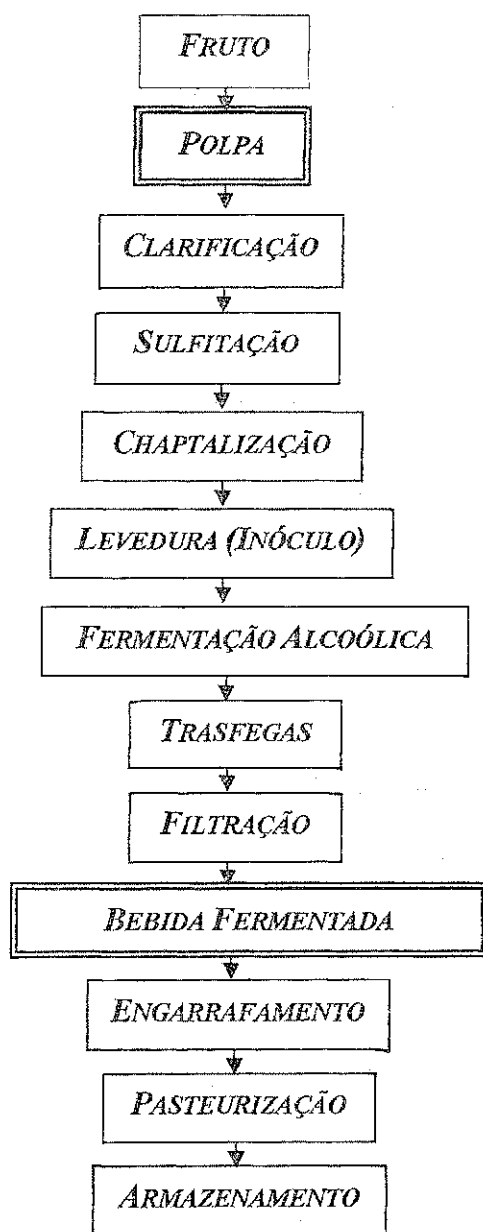


Figura 3.2 - Etapas da produção de fermentado do fruto do mandacaru

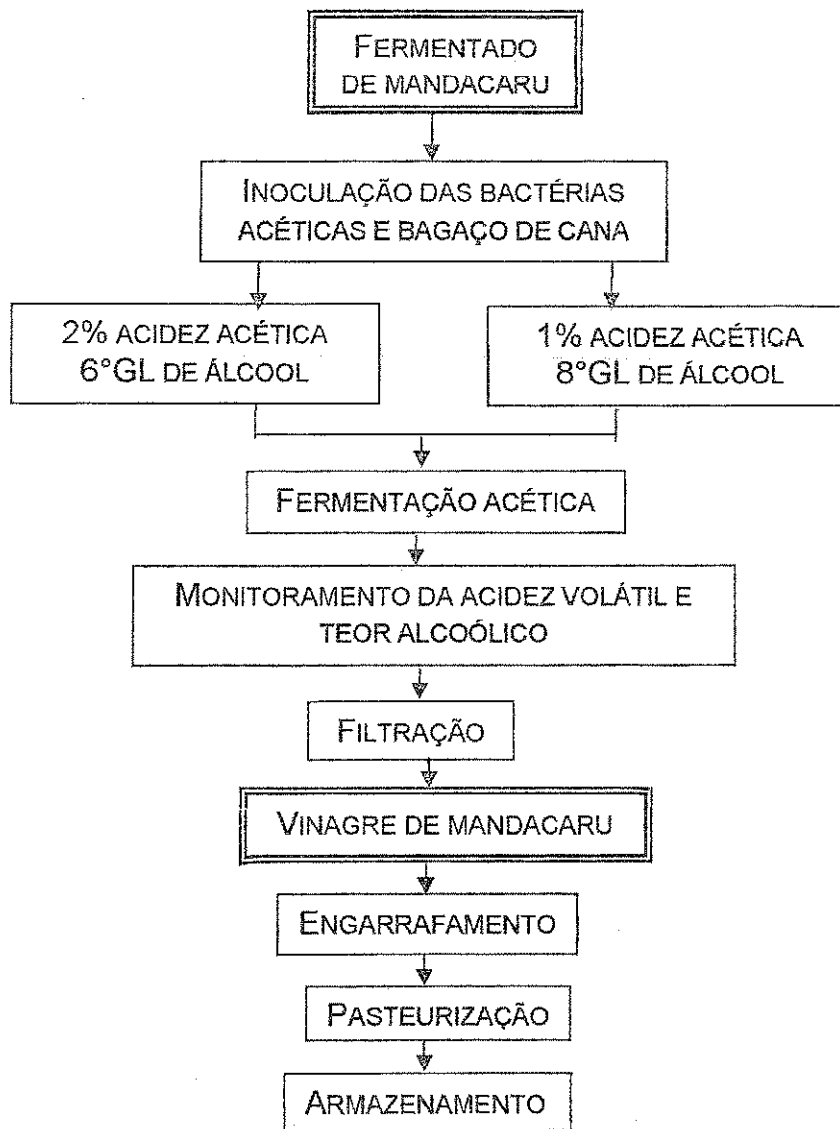


Figura 3.3 - Etapas da metodologia de produção do vinagre do fermentado do fruto do mandacaru

3.1. Enriquecimento nutricional da cactácea

3.1.1. Materiais

Os cladódios do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P. DC.) utilizados neste trabalho foram provenientes de uma plantação intensiva localizada na cidade de Lagoa Seca-PB, a 7 Km de Campina Grande-PB.

3.1.2. Microrganismos

O microrganismo empregado no enriquecimento nutricional do mandacaru sem espinhos, em bandejas, foi o fungo filamentosso *Aspergillus niger* mutante CCT 0916, pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza-CE. Os conídios da linhagem foram preservados em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, contendo solo estéril, e foram estocados em freezer a temperatura de -18°C. No estudo do enriquecimento, em tambor rotativo, foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fermento biológico comercial.

3.1.3. Metodologias

3.1.3.1. Caracterização química dos cladódios do mandacaru

Inicialmente, os cladódios do mandacaru foram lavados, triturados e colocados em bandejas de alumínio. Posteriormente, as bandejas foram colocadas em estufa com circulação de ar a temperatura de 55 a 60°C, por um período de três dias. Após a secagem, o material foi moído e acondicionado em recipiente de plástico hermético. As análises de proteína bruta (%), nitrogênio (%), fósforo (%), potássio (%) e extrato etéreo, no material *in natura*, foram realizadas no laboratório de química e solos da EMBRAPA/Algodão-PB. No laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG foram realizadas as análises de açúcares redutores totais (ART), umidade, cinzas e matéria seca.

3.1.3.1.1. Proteína bruta e nitrogênio

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl com adaptação para nitrogênio (N), por espectrofotometria UV-VIS, segundo o

método descrito em Le Poidevin & Robinson (1964). O teor de proteína foi obtido em função do N, multiplicando o mesmo por 6,25, ou seja, $PB (\%) = N (\%) \times 6,25$.

3.1.3.1.2. Potássio

O percentual de potássio (K) foi determinado pelo método de digestão sulfúrica seguido do método de fotometria de chama, conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

3.1.3.1.3. Fósforo

O percentual de fósforo (P) foi determinado pelo método de digestão sulfúrica seguido do método de espectrofotometria, conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

3.1.3.1.4. Extrato etéreo

O extrato etéreo foi determinado seguindo a metodologia de Silva (1998).

3.1.3.1.5. Açúcares redutores totais

O método para a obtenção de ART baseia-se na redução do DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) a ácido 3-amino-5-nitro salicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após aquecimento, a solução torna-se alaranjada, sendo lida, em espectrofotômetro, a 540nm. Utilizou-se a metodologia descrita por Miller (1959) com algumas modificações.

Na determinação de ART (frutose, glicose e sacarose) foi necessário fazer inicialmente a inversão da sacarose da amostra diluída, e posteriormente seguir o método de DNS (Apêndice A).

3.1.3.1.6. Umidade

O teor de umidade foi determinado seguindo a metodologia de Brasil (2005).

3.1.3.1.7. Cinzas

As cinzas foram determinadas seguindo o método da AOAC (1997). O teor de cinzas serve para determinar a matéria orgânica, onde $MO = 100 - \text{Cinzas}$.

3.1.3.1.8. Matéria seca

Para a determinação da massa seca, a amostra foi colocada em estufa a 105°C, até atingir peso constante, de acordo com a metodologia de Brasil (2005).

3.1.3.1.9. Fibra bruta

O teor de fibra bruta foi determinado por análise gravimétrica segundo a metodologia de Brasil (2005).

3.1.3.2. Isotermas de adsorção de umidade

Realizou-se o levantamento das isotermas de adsorção de umidade dos cladódios do mandacaru sem espinhos. As temperaturas estudadas foram 25, 30, 35 e 40°C, e o equipamento utilizado para a determinação da atividade de água das amostras foi o Termoconstanter Novasina TH200. Para tanto, pesou-se 10 gramas do mandacaru seco em 10 recipientes diferentes e adicionaram-se diferentes quantidades de água destilada (0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0mL). Amostras de aproximadamente 2,0 g do material umedecido foram colocadas dentro de células que acompanham o aparelho e, após serem pesadas, foram inseridas no equipamento. As amostras permaneceram no equipamento, até que a leitura fosse estabilizada, fazendo-se a leitura direta de a_w . Após cada leitura, retirava-se e pesava-se cada amostra em balança analítica, e deixava-se no dessecador. Terminada as leituras, determinou-se a umidade de equilíbrio (Equação 1), em base seca, de todas as amostras.

$$X_{eq} = \frac{m_i - m_s}{m_s} \quad (1)$$

Onde:

X_{eq} – umidade (base seca)

m_i - massa inicial (g)

m_s - massa seca (g)

Com os valores de atividade de água (a_w) obtidos para cada amostra úmida e suas respectivas umidades de equilíbrio (X_{eq}) construíram-se as isotermas de adsorção para as quatro temperaturas estudadas (25, 30, 35 e 40°C). Utilizou-se o software Statistica, para determinar os parâmetros dos modelos matemáticos de

GAB e Henderson modificado (Tabela 2.6), através de regressão não linear dos dados experimentais, utilizando os métodos de estimativa Quase-Newton e Simplex.

O critério utilizado para avaliar o ajuste de cada equação aos dados experimentais foi o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio percentual médio (P), que foi determinado pela Equação 2:

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|VE - VT|}{VE} \quad (2)$$

em que:

n - número de dados experimentais

VE - valor de umidade experimental do material

VT - valor de umidade teórico

3.1.3.3. Obtenção do enriquecido protéico

Coleta e preparação do substrato

Os cladódios do mandacaru sem espinhos foram coletados através de cortes nas articulações, evitando assim danos à planta. O material foi coletado e posteriormente conduzido para o Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG, onde foi lavado, cortado e triturado em liquidificador, resultando numa mucilagem com consistência pastosa (substrato).

Preparo do inóculo

De acordo com procedimento adotado por Couri (1993), os conídios foram ativados em duas etapas de transferência, usando um meio básico. Neste meio a pectina é a única fonte de carbono, como é mostrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Composição do meio básico

COMPONENTES (grau p.a.)	CONCENTRAÇÃO (g/l)
Pectina cítrica	10,00
NaNO ₃	3,00
KH ₂ PO ₄	1,00
MgSO ₄	0,50
KCl	0,50
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01
Agar-Agar	20,00
Água destilada	q.s.p.

Fonte: Couri (1993)

O meio foi preparado dissolvendo a pectina em água destilada sob agitação vigorosa. Posteriormente, os outros componentes foram adicionados, e o volume do balão aferido. O meio foi então levado à fervura para cozimento do mesmo e depois distribuído em tubos de ensaio (18x180 mm), nos quais foram adicionados cerca de 20 mL do meio e tampados com rolhas de algodão envolvidos em gaze. O meio foi então esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 0,5 atm e ainda quente, inclinado.

Os conídios, com o auxílio da alça de platina foram retirados do solo e transferidos para o meio e incubados por cinco dias em estufa a 30°C, e mantidos sob refrigeração por um período máximo de quatro meses, obtendo-se assim o primeiro repique.

Para obtenção do segundo repique foi utilizado o cultivo do primeiro repique, para tanto, com auxílio da alça de platina os esporos foram transferidos para o meio básico, descrito anteriormente, e incubados a temperatura de 30°C durante cinco dias. Após este período foram utilizados para obtenção de esporos no meio de sabugo de milho, podendo permanecer sob refrigeração por um período de quatro meses. Cada suspensão de conídios no solo, conforme este procedimento, só deve ser usada 4 ou 5 vezes, e descartada.

O meio de sabugo de milho foi um meio usado para produção de grande quantidade de conídios. O sabugo é apropriado para este fim, uma vez que, o fungo cresce em uma superfície maior e conseqüentemente aumenta a

esporulação. Foi preparado de acordo com protocolo da Embrapa/CNPAT, no qual primeiro prepara-se às soluções A e B e em seguida a solução umidificante:

Solução A: pesar 20 g de fosfato de potássio monobásico e dissolver em água destilada, transferir para balão volumétrico de 100 mL e aferir.

Solução B: Pesar 3,96 g de sulfato de zinco e dissolver em um pouco de água destilada. Adicionar 4,60 g de sulfato de ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5mL de ácido sulfúrico (95-97%). Após completa dissolução avolumar a 100 mL com água destilada.

Solução umidificante: pesar 2,8 g de peptona e dissolver em um pouco de água destilada, transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 0,19 mL da solução A e 0,025 mL da solução B, avolumar e homogeneizar.

Foram pesados 9,2 g de sabugo de milho seco e moído (com granulometria de aproximadamente 1 cm) e adicionado 12 mL da solução umidificante, para cada erlenmeyer de 250 mL. O frasco foi fechado com tampão de algodão envolvido com gaze, homogeneizado e esterilizado em autoclave por 1 hora a 1 atm.

Para inoculação do meio de sabugo de milho foram transferidos 10 mL de uma solução 0,3% (v/v) de Tween 80 para tubos com microrganismo de segundo repique. Com auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram desprendidos, homogeneizados e transferidos 2 mL para cada frasco contendo o sabugo. Os frascos foram agitados e incubados em estufa a 30°C por um período de 5 dias. Após este período os frascos foram armazenados sob refrigeração por um período máximo de três meses e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

Nos frascos de sabugo com esporos foram adicionados cerca 60 mL de solução 0,3% v/v de Tween. Após agitação vigorosa os esporos foram transferidos para erlenmeyer estéril com auxílio de gaze estéril. Realizou-se a quantificação da suspensão através de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer. O volume de suspensão de esporos que foi adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a obter um inóculo de 10^8 esporos por grama de substrato. Esta concentração de inóculo foi fixada nos 7 experimentos listados na matriz de planejamento.

Contagem de células (Câmara de Neubauer)

Depois de preparada a solução contendo os microrganismos, foi feita uma diluição para facilitar a visualização e contagem dos esporos presentes na câmara de Neubauer. Procedeu-se a diluição da seguinte forma: 1 mL de amostra mais 49 mL de Tween 80 0,3% v/v estéril, logo após a junção dessas substâncias a solução foi homogeneizada. Em seguida, a câmara foi preenchida com a amostra diluída e logo após procedeu-se a contagem em microscópio óptico de campo claro com aumento de 400 vezes. Foram contados 5 dos 25 quadrículos do quadrante central da câmara e o número de células viáveis foi calculado pela Equação 3 (Bio-Rad Laboratories, citado por Dias, 2001).

$$\text{Contagem.de.esporos} = \frac{\sum nq \times 25 \times fd \times 10^4}{n} \quad (3)$$

em que:

$\sum nq$ - soma algébrica do número de células viáveis contadas nos n quadrículos

25 - número total de quadrículos na câmara

Fd - fator de diluição utilizado

10^4 - constante padrão da câmara

n - número de quadrículos contados, dentro dos 25 disponíveis

Estudo cinético da fermentação em bandejas, em meio semi-sólido

Planejamento fatorial para fermentação em bandejas

O planejamento experimental fatorial tem o objetivo de realizar um estudo mais abrangente da influência das variáveis sobre o sistema de maneira mais organizada e em quantidade mínima de experimentos. Foram escolhidos os níveis para cada variável, e com isso foram realizados os ensaios, registrando as respostas observadas em todas as possíveis combinações. A listagem dessas combinações é chamada de matriz de planejamento (Barros Neto et al., 1995).

O objetivo é avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada (espessura da camada e temperatura de fermentação) sobre as respostas (proteína bruta, umidade, açúcares redutores totais, aumento protéico). Na Tabela 3.2 são mostrados os níveis reais e codificados das variáveis independentes. A matriz de planejamento fatorial 2^2 , conforme Tabela 3.3., totaliza em 7

experimentos, sendo 4 ensaios distintos e mais 3 no ponto central, que são 3 ensaios idênticos com uma das finalidades de verificar a reprodução dos ensaios (Verificação dos erros). Os níveis fixados para a temperatura foram baseados nas condições climáticas da região Nordeste. Os níveis fixados para a espessura da camada foram definidos de acordo com os estudos realizados por Araújo (2004).

Variáveis de entrada:

Variável 1 (E) – Espessura da camada (cm)

Variável 2 (T) – Temperatura de fermentação (°C)

Tabela 3.2 – Valores codificados e reais das variáveis de entrada

Variável	Nível -1	Nível 0	Nível +1
E (cm)	1	3	5
T (°C)	30	34	38

Tabela 3.3 – Matriz de planejamento fatorial completo 2²

Experimentos	Variável 1	Variável 2
1	-1 (1 cm)	-1 (30°C)
2	+1 (5 cm)	-1 (30°C)
3	-1 (1 cm)	+1 (38°C)
4	+1 (5 cm)	+1 (38°C)
5	0 (3 cm)	0 (34°C)
6	0 (3cm)	0 (34°C)
7	0 (3 cm)	0 (34°C)

Fermentação em meio semi-sólido

Bandejas

A fermentação empregada para o enriquecimento nutricional do cladódio de mandacaru sem espinhos, foi do tipo semi-sólida, em sistema de batelada. Os 7 experimentos foram conduzidos em biorreatores (bandejas plásticas) com diferentes dimensões (50 x 30 x 8cm; 30 x 20 x 6cm; 25 x 20 x 6cm), para que

fosse possível fixar os níveis de espessura da camada determinados na matriz de planeamento e apresentados na Tabela 3.3. Foram pesados aproximadamente 1 kg de substrato por bandeja (Figura 3.4), e em seguida procedeu-se à inoculação do *Aspergillus niger* numa concentração de 10^8 esporos/mL. Foram monitorados durante a fermentação a proteína bruta, umidade, açúcares redutores totais e matéria seca a cada 32, 48 e 72 horas e no início do processo fermentativo.



Figura 3.4 – Fermentação em bandeja

Tambor rotativo

Os experimentos, em duplicata, foram conduzidos em tambor rotativo (Figura 3.5), a uma temperatura ambiente de 25°C. Foram pesados 4 kg de substrato por batelada, e em seguida procedeu-se à inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* numa concentração de 5%. Foram monitorados durante a fermentação semi-sólida a proteína bruta e os açúcares redutores totais a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 22, 24 e 26 horas e no início do processo fermentativo.



Figura 3.5 – Fermentação em tambor rotativo

3.1.3.3.4. Análises químicas

Realizou-se a secagem do material enriquecido em estufa com circulação de ar a temperatura de 55 a 60°C, por um período de três dias. Após a secagem, o material foi moído e acondicionado em recipiente de plástico hermético visando um melhor acondicionamento do mesmo, para posteriores análises. As análises de proteína bruta foram realizadas no laboratório de química e solos da EMBRAPA/Algodão-PB. No laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG foram realizadas as análises de açúcares redutores totais (ART), umidade e matéria seca.

Proteína bruta

A metodologia utilizada foi à mesma descrita no item 3.1.3.1.1.

Matéria seca

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.8.

Açúcares redutores totais

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.5.

Aumento de proteína bruta

O aumento protéico (AP), em termos de proteína bruta, é definido como a razão entre a diferença do valor protéico da cactácea enriquecida (g) pelo valor

inicial de proteína bruta da cactácea *in natura* (g) dividido pelo valor inicial de proteína bruta da cactácea *in natura*, de acordo com a Equação 4.

$$AP(\%) = \frac{\text{Proteína Bruta(enriquecido)} - \text{Proteína Bruta(in.natura)}}{\text{Proteína Bruta(in.natura)}} \times 100 \quad (4)$$

3.2. Produção de fermentado do fruto do mandacaru

3.2.1. Materiais

Os frutos do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) utilizados neste trabalho foram provenientes de plantações da Fazenda Pocinho, localizada no município de Barra de Santana – PB, a 19 km de Campina Grande.

3.2.2. Microrganismo

O microrganismo utilizado na fermentação alcoólica foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico comercial, marca Fleischmann, 70% de umidade, em base úmida), onde foi adicionado ao mosto uma concentração de 3 g/L de levedura em base seca.

3.2.3. Metodologias

3.2.3.1. Caracterização física e físico-química dos frutos utilizados na produção de bebida fermentada do fruto do mandacaru

Recepção e seleção

Os frutos de mandacaru foram coletados e levados para o Laboratório de Engenharia Bioquímica – UAEQ/CCT/UFCG, onde passaram por uma seleção visando eliminar os frutos defeituosos e machucados. A seleção é um ponto importante para garantir um produto de boa procedência e também para não comprometer o processo fermentativo.

Lavagens e pesagens

As lavagens foram feitas com água clorada visando eliminar os microrganismos e as sujeiras mais grosseiras aderidas no fruto. Os frutos foram imersos em água clorada (20ppm) durante 15 minutos, e em seguida realizou-se

uma nova lavagem em água corrente visando eliminar o resíduo de cloro remanescente da lavagem anterior.

Os frutos inteiros foram pesados individualmente e em seguida foram cortados como apresentados nas Figuras 3.6 e 3.7, separando a casca, polpa e semente, procedendo-se então a caracterização física dos frutos de mandacaru. As determinações físicas realizadas nos frutos foram: diâmetros (maior, intermediário e menor) utilizando-se paquímetro digital de marca Mitutoyo, massa do fruto, polpa, casca e semente pesados em balança digital.



Figura 3.6 – Cascas do fruto do mandacaru

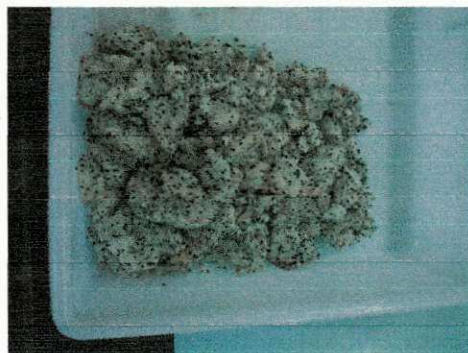


Figura 3.7 – Polpa e semente do fruto do mandacaru

Rendimento em relação ao fruto

Os frutos utilizados na elaboração da bebida fermentada foram pesados em uma balança analítica, com o objetivo de verificar o rendimento da produção. Os cálculos dos rendimentos são relações simples entre as massas e volumes correspondentes ao fruto utilizados na produção da bebida produzida.

Os percentuais de rendimento (p/p) de polpa (RP), casca (RC) e semente (RS) do fruto do mandacaru representam a quantidade de polpa, casca e semente com relação ao fruto inteiro e calculados pelas Equações 5, 6 e 7:

$$RP(\%) = \frac{\text{Massa} \cdot \text{da} \cdot \text{polpa}}{\text{Massa} \cdot \text{do} \cdot \text{fruto}} \times 100 \quad (5)$$

$$RC(\%) = \frac{\text{Massa} \cdot \text{da} \cdot \text{casca}}{\text{Massa} \cdot \text{do} \cdot \text{fruto}} \times 100 \quad (6)$$

$$RS(\%) = \frac{\text{Massa} \cdot \text{da} \cdot \text{semente}}{\text{Massa} \cdot \text{do} \cdot \text{fruto}} \times 100 \quad (7)$$

A relação entre o volume de bebida pela massa de polpa do fruto utilizada (RVP) expressa, em porcentagem, o volume de bebida obtida a partir da polpa utilizada na produção da bebida (Equação 8).

$$RVP(\%) = \frac{\text{Volume} \cdot \text{de} \cdot \text{bebida}}{\text{Massa} \cdot \text{da} \cdot \text{polpa}} \times 100 \quad (8)$$

Extração e filtração do suco do fruto

Esta etapa consiste na obtenção da polpa natural livre de fibras e sementes. A polpa e sementes separadas podem ser observadas na Figura 3.8. A separação da polpa foi através de uma filtração em tecido de algodão limpo, reservando a polpa para a caracterização físico-química e posteriormente ser utilizada na produção da bebida fermentada.

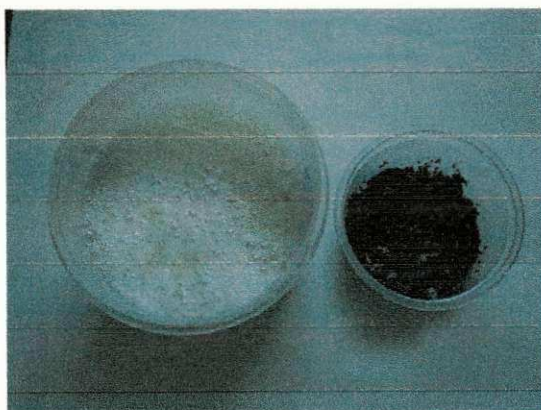


Figura 3.8 – Polpa e semente do fruto do mandacaru separada

A caracterização físico-química da polpa do fruto do mandacaru foi realizada no laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG, onde foram realizadas análises de açúcares redutores totais (ART), umidade, cinzas, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT), fibra bruta, pH, matéria seca e pectina. As análises de proteína bruta, nitrogênio, fósforo e potássio foram realizadas no laboratório de química e solos da Embrapa/Algodão-PB.

3.2.3.1.1. Açúcares redutores totais

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.5.

3.2.3.1.2. Umidade

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.6.

3.2.3.1.3. Cinzas

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.7.

3.2.3.1.4. Sólidos solúveis totais (°Brix)

Os sólidos solúveis totais foram determinados seguindo a metodologia de Brasil (2005).

3.2.3.1.5. Acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada pelo método da AOAC (1997).

3.2.3.1.6. Fibra bruta

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.9.

3.2.3.1.7. pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, com o pHmetro previamente calibrado com as soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0.

3.2.3.1.8. Matéria seca

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.8.

3.2.3.1.9. Proteína bruta e percentual de nitrogênio

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.1.

3.2.3.1.10. Potássio

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.2.

3.2.3.1.11. Fósforo

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.3.

3.2.3.1.12. Pectina

A pectina foi determinada pelo método de Rangana (1979).

Armazenamento da polpa

Mediu-se volumetricamente a polpa em embalagens plásticas de 1 litro, como mostra a Figura 3.9, fez-se a etiquetagem e armazenou-se em freezer com a finalidade de prolongar a vida útil, e posteriormente foi utilizada na produção da bebida fermentada do fruto do mandacaru.



Figura 3.9 – Polpas do fruto do mandacaru embalada em sacos plásticos

Produção de bebida fermentada do fruto do mandacaru

A produção da bebida fermentada foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica da UAEQ/CCT/UFMG, em biorreatores de polietileno, em sistema de batelada simples, com capacidade de 10 litros. O volume de mosto de fruta a fermentar foi de 5 litros e os experimentos foram realizados em duplicata. O processo de produção do fermentado, utilizado neste trabalho foi baseado na metodologia descrita na produção de fermentado de caju (Silva, 2004), com algumas adaptações.

Clarificação e filtração da polpa

Inicialmente, a polpa foi retirada do freezer e descongelada em temperatura ambiente, para fazer a clarificação da mesma. A etapa de clarificação consiste na remoção da pectina que é um polissacarídeo encontrado em níveis mais elevados em frutas de origem tropical. Sua presença no mosto pode ocasionar o surgimento de uma substância tóxica, o metanol que, se ingerida pode causar danos à saúde. A clarificação foi realizada utilizando-se uma solução de gelatina a 10% (comercial, incolor e inodora), numa proporção de 10 ml/L de polpa, adicionando-a a polpa e homogeneizando. Em seguida, a polpa (mosto) foi colocada em geladeira por um período de 24 horas.

Posteriormente, fez-se uma filtração da polpa através de tecidos de algodão previamente lavado com água clorada e secos ao ar livre. Dessa forma, o mosto (meio fermentativo) clarificado apresentou um aspecto mais límpido, Figura 3.10.

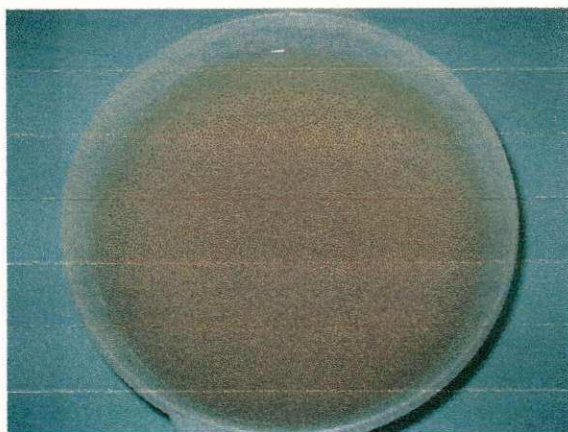


Figura 3.10 – Suco do fruto do mandacaru

Sulfitação e inóculo

A sulfitação consiste em eliminar os fenômenos indesejáveis durante a fermentação, tais como o escurecimento e a proliferação de bactérias. Foi adicionado o metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$), numa concentração de 3 gramas para cada 10 litros de suco clarificado.

Foi adicionada ao mosto uma concentração de 3g/L (base seca) de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fermento biológico comercial. A concentração de levedura foi definida baseando-se nos dados obtidos por Lopes (2005) quando produziu o fermentado do fruto da palma.

Chaptalização (Correção do açúcar)

A chaptalização consiste em adicionar sacarose (açúcar comercial) ao mosto, para se obter uma bebida com uma graduação alcoólica dentro das especificações exigidas pela legislação brasileira (Brasil, 1997), que estabelece uma graduação de 4 a 14 por cento em volume, a 20°C. Geralmente, a chaptalização é feita quando a fruta não tem quantidades suficientes de açúcares ou quando se deseja uma bebida com graduação alcoólica elevada (fermentados secos). Foram adicionados 100 g/L de açúcar comercial (chaptalização) ao mosto que já apresentava na sua composição 102 g/L de sacarose. Foi realizada uma primeira chaptalização (30g) no início da fermentação, e uma segunda chaptalização (70g) quando o °Brix do mosto estabilizasse. Os valores da chaptalização (30g e 70g) foram baseados nos estudos realizados por Torres Neto et al. (2006), onde esta chaptalização foi dividida para que não houvesse inibição do microrganismo pelo substrato.

Fermentação alcoólica

Terminada a preparação do mosto, iniciou-se a primeira etapa da fermentação alcoólica (primeira chaptalização). O volume de mosto a fermentar foi de 5 litros, a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante a primeira fase da fermentação alcoólica realizou-se a cada 2 horas o controle das seguintes variáveis: concentração de açúcares redutores totais (ART); sólidos solúveis totais (SST), temperatura; pH; teor alcoólico e acidez total, até que o °Brix do mosto ficasse próximo de zero. Posteriormente, adicionaram-se os 70g/L restantes de sacarose

(segunda chaptalização) iniciando a segunda etapa da fermentação alcoólica, fazendo-se novamente o controle de todas as variáveis observadas na primeira etapa até que o valor do °Brix ficasse constante.

Na Figura 3.11 é mostrado o biorreator utilizado durante a fermentação alcoólica da bebida fermentada do fruto do mandacaru.

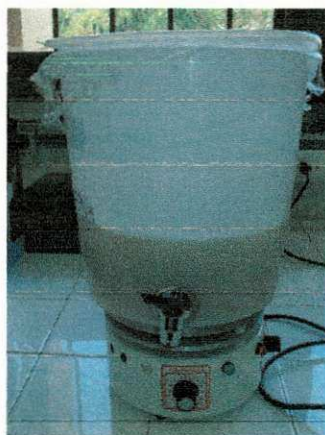


Figura 3.11 – Biorreator utilizado na fermentação

Trasfegas

A trasfega consiste na remoção das partículas sólidas em suspensão, que caso não sejam removidas, podem dar origem a produtos de odor desagradável, como H₂S ou mercaptana, os quais depreciam o vinho (Aquarone et al., 1983). A trasfega consiste em transferir, após filtração, a bebida pronta do biorreator para outro recipiente.

Engarrafamento e pasteurização

O fermentado foi engarrafado em garrafas de vidro escuro e fechado com rolhas de cortiça, como mostra a Figura 3.12.

O processo de pasteurização visa eliminar os microrganismos indesejáveis, inclusive resíduos remanescentes do fermento, por choque térmico. A pasteurização foi realizada em água previamente aquecida a uma temperatura de 65°C durante 30 minutos, Figura 3.13. O choque térmico foi realizado com o resfriamento das garrafas em água corrente. O equipamento é um tanque de aço inoxidável provido de serpentina de aquecimento elétrico (18 BU, Braun Biotech International, variação de 0 a 140°C).



Figura 3.12 – Bebida fermentada engarrafada



Figura 3.13 – Pasteurização da bebida fermentada de mandacaru

Armazenamento

O fermentado de mandacaru engarrafado e pasteurizado foi mantido em ambiente seco, onde parte da bebida foi reservada para a produção do vinagre.

Análises físico-químicas do processo de fermentação alcoólica

Durante a fermentação alcoólica da bebida fermentada do fruto do mandacaru, foram realizadas a cada 2 horas análises de: concentração de açúcares redutores totais (ART), sólidos solúveis totais (°Brix), temperatura, pH, concentração de biomassa (g/l), concentração de etanol (°GL) e acidez total (g/100ml). As metodologias de cada análise são descritas a seguir.

3.2.3.2. Análises realizadas durante a fermentação alcoólica

3.2.3.2.1. Sólidos solúveis totais (°Brix)

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.1.4.

3.2.3.2.2. Concentração de biomassa

A biomassa celular foi determinada adotando-se o método de massa seca descrito por Florentino (2006), que consiste em separar as células do meio, secá-las e pesá-las. Com o auxílio de uma pipeta 2 mL da amostra foram transferidos para tubos de eppendorff secos e pesados. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a uma rotação de 10.000 rpm e a solução sobrenadante, aspirada e desprezada. Aos tubos, contendo a levedura, foram adicionadas água destilada, e a operação de lavagem foi repetida duas vezes. Após a segunda lavagem as amostras eram colocadas em estufa a 105°C por 24 horas e pesadas até massa constante. A massa seca foi determinada pela diferença entre a massa final (M2) e a massa inicial do tubo (M1), e essa diferença dividida pelo volume (V) de amostra utilizado (2 mL) e o resultado final multiplicado por 1000, obtendo assim o resultado em g/L, conforme a Equação 9:

$$\frac{M1 - M2}{V} \times 1000 \quad (\text{g/L}) \quad (9)$$

3.2.3.2.3. Acidez total

A concentração de acidez total foi determinada pelo método de titulação volumétrica seguindo a metodologia proposta por Brasil (2005).

3.2.3.2.4. pH

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.1.7.

3.2.3.2.5. Concentração de etanol (teor alcoólico)

A concentração de etanol foi determinada utilizando-se o ebulliômetro. Inicialmente foi feita a calibração do equipamento com água destilada, até a temperatura de ebulição, a qual serve de referência para o etanol. Com a temperatura de ebulição da água e da amostra, determinou-se a concentração de etanol da amostra, utilizando a régua de conversão que acompanha o equipamento.

3.2.3.2.6. Açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares redutores totais foram determinados seguindo a metodologia descrita no item 3.1.3.1.5, com algumas modificações.

3.2.3.2.7. Análises cromatográficas da bebida fermentada

A bebida fermentada foi analisada para determinar a concentração de álcoois superiores e voláteis e confrontá-los com a legislação brasileira de bebidas (Brasil, 1999). As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de álcool da GIASA S.A/PB.

Percentual de Conversão, produtividade e parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica

O percentual de conversão e a produtividade (g/L.h) para a produção de bebida fermentada do fruto do mandacaru, foram calculados pelas Equações 10 e 11, respectivamente:

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{P}{S_0 \times 0,511} \times 100 \quad (10)$$

$$\text{Produtividade (g/L.h)} = \frac{P}{t} \quad (11)$$

em que:

P - concentração de etanol experimental;

S₀ - concentração inicial de substrato;

t - tempo de fermentação (h).

Através das Equações 12 e 13, foram calculados os parâmetros cinéticos Y_{X/S} e Y_{P/S}:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (12)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (13)$$

em que:

X - concentração final de biomassa (g/L);

X₀ - concentração inicial de biomassa (g/L);

S - concentração final de substrato (g/L);

S_0 - concentração inicial de substrato (g/L);

P - concentração final de produto (g/L);

P_0 - concentração inicial de produto (g/L);

$Y_{x/s}$ (rendimento de biomassa) - quantidade de biomassa formada em relação à quantidade de substrato limitante consumido;

$Y_{p/s}$ (rendimento do produto) - quantidade de produto formado em relação à quantidade de substrato limitante consumido.

O valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ foi obtido graficando-se a curva de crescimento microbiano ($\ln X$ em função do tempo). Observou-se a fase logarítmica na curva e com os pontos que compõem esta fase, obteve-se o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ através de regressão linear. A tangente da reta do gráfico $\ln X \times$ tempo é o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$, que indica a velocidade máxima de crescimento celular.

3.3. Vinagre de fermentado do fruto do mandacaru

3.3.1. Materiais

Foi utilizado o fermentado tipo seco produzido com a polpa do fruto do mandacaru, o qual apresentou uma graduação alcoólica de 10°GL.

3.3.2. Microrganismo

Foram utilizadas bactérias acéticas contidas no vinagre forte (não pasteurizado) e no bagaço de cana obtidas no Laboratório de Produção Industrial (LAPI/UAEQ/UFCG), e utilizadas na produção de vinagre de álcool.

3.3.3. Metodologias

O vinagre forte e o bagaço de cana (condições para suporte das bactérias, conforme reatores em escala ampliada de produção de vinagre de álcool etílico) utilizados nos experimentos foram obtidos de um reator de polietileno com a capacidade de 50 L, denominado Reator 1, que é utilizado na produção de vinagre de etanol do LAPI. O vinagre forte não foi submetido ao processo de pasteurização, tornando o mesmo rico em microrganismos acidificantes. A produção do vinagre utilizando o fermentado de mandacaru foi realizada no

Laboratório de Engenharia Bioquímica do UAEQ/CCT/UFMG, em biorreatores de polietileno com capacidade de 4 litros. Foi utilizado 1,2L de fermentado em cada experimento, e os mesmos foram conduzidos em duplicata.

3.3.3.1. Preparação da matéria-prima (fermentado de mandacaru)

A preparação da matéria-prima consistiu em verificar inicialmente a acidez total e a graduação alcoólica do vinagre forte (não pasteurizado) e em seguida calcular o volume de vinagre forte a ser adicionado ao fermentado de mandacaru de modo a obter as condições iniciais pré-fixadas para os dois experimentos distintos: Experimento 1 (2% de acidez acética e 6°GL de álcool) e Experimento 2 (1% de acidez acética e 8°GL de álcool), os quais foram realizados em duplicata. Pesou-se 350g de bagaço de cana-de-açúcar retirado do Reator 1 e mediram-se os volumes de vinagre forte os quais foram adicionados a 1,2L da bebida fermentada de mandacaru de modo a obter as condições iniciais do dois experimentos distintos.

3.3.3.2. Inoculação do microrganismo (*Acetobacter*)

Foram inoculadas bactérias acéticas presentes no vinagre forte (vinagre não pasteurizado) e no próprio bagaço de cana-de-açúcar retirado do Reator 1.

3.3.3.3. Fermentação acética

O biorreator utilizado na fermentação acética do fermentado de mandacaru é mostrado na Figura 3.14. Durante a fermentação realizou-se a cada 24 horas o controle das seguintes variáveis: acidez total, acidez fixa e teor alcoólico. A fermentação foi conduzida até que o fermentado acético (vinagre) produzido atingisse uma acidez volátil mínima de 4%, estabelecida pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Brasil, 1999).



Figura 3.14 – Bioreatores utilizados na fermentação acética do vinagre

3.3.3.4. Filtração

Foi realizada a filtração com o intuito de remover o máximo possível de resíduos da fermentação, existentes no produto final. Depois da filtração, foi determinado o percentual de acidez volátil do fermentado acético, para verificar se o mesmo estava dentro das especificações da legislação brasileira (Brasil, 1999), ou seja, 40 g/L ou 4,0% em ácido acético.

3.3.3.5. Engarrafamento e pasteurização

O engarrafamento foi realizado em garrafas plásticas transparentes de 500 mL, apropriada para vinagre, e tampadas manualmente (Figura 3.15). O processo de pasteurização do vinagre foi feito da mesma forma descrita anteriormente para o fermentado.



Figura 3.15 – Vinagre engarrafado

3.3.3.6. Armazenamento

As garrafas transparentes foram mantidas em prateleiras, na posição vertical, e em local arejado.

3.3.3.7. Análises realizadas durante a fermentação acética

3.3.3.7.1. Acidez total, acidez fixa e acidez volátil

A concentração de acidez total e fixa do vinagre foram determinadas pelo método de titulação volumétrica seguindo a metodologia proposta por Brasil (2005). A acidez volátil foi obtida pela diferença entre a acidez total e fixa.

3.3.3.7.2. Concentração de etanol (teor alcoólico)

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.2.5.

3.3.3.8. Análises físico-químicas do vinagre

Com o propósito de avaliar as características do fermentado acético obtido procederam-se às análises de pH, acidez volátil em ácido acético, extrato seco e cinzas para confrontar com as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Brasil, 1999).

3.3.3.8.1. pH

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.1.7.

3.3.3.8.2. Acidez volátil

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.3.3.7.1.

3.3.3.8.3. Extrato seco

Foi determinado seguindo a metodologia descrita por Brasil (2005).

3.3.3.8.4. Cinzas

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.1.3.1.7.

3.3.3.9. Cálculo do rendimento e produtividade do processo de fermentação acética

Para determinar o rendimento da produção é necessário calcular a acidez teórica a partir da reação de conversão do etanol a ácido acético, onde 1,0 g de etanol converte-se em 1,304 g de ácido acético (100%). Desta forma, o rendimento é obtido pela razão entre a acidez experimental e a acidez teórica como mostra a Equação 14:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{A_{C_{EXP}}}{A_{C_{TEO}}} \times 100 \quad (14)$$

em que:

$A_{C_{EXP}}$ - concentração de ácido acético experimental;

$A_{C_{TEO}}$ - concentração de ácido acético teórica (máxima).

A produtividade revela a velocidade de formação de ácido acético, durante um determinado intervalo de tempo, ou seja, a produtividade é expressa em (g/L.h), como apresenta a Equação 15.

$$\text{Produtividade}(\text{g/L.h}) = \frac{A_{C_{EXP}}}{t} \quad (15)$$

onde:

$A_{C_{EXP}}$ - Concentração de ácido acético experimental;

t - Tempo de fermentação acética.

Capítulo 4

Resultados e Discussão do Enriquecimento Protéico

Capítulo 4

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussão da composição química dos cladódios do mandacaru antes do enriquecimento protéico, e as isotermas de adsorção de umidade obtidas nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, com os respectivos parâmetros dos modelos de GAB e Henderson modificado. Consta o estudo do enriquecimento protéico da cactácea e análise de regressão das variáveis de entrada do processo de fermentação com o fungo *Aspergillus niger* CCT 0916 em bandejas (método estático), bem como o estudo do enriquecimento protéico do mandacaru com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em tambor rotativo (método dinâmico).

4.1. Caracterização química dos cladódios do mandacaru

A caracterização química dos cladódios do mandacaru sem espinhos *in natura* é apresentada na Tabela 4.1, na qual a umidade do mandacaru é expressa em base úmida e os demais parâmetros expressos em base seca.

Tabela 4.1 – Caracterização química dos cladódios do mandacaru sem espinhos

Parâmetros	Média ± desvio padrão
Umidade (base úmida) (%)	92,65 ± 0,57
Proteína bruta (%)	14,38 ± 0,15
Extrato etéreo (%)	2,15 ± 0,05
Cinzas (%)	1,37 ± 0,08
Matéria orgânica (%)	98,63 ± 0,0
Matéria seca (%)	7,35 ± 0,07
Açúcares redutores totais (%)	7,85 ± 0,05
Fibra bruta (%)	41,22 ± 0,30
Fósforo (%)	0,23 ± 0,01
Nitrogênio (%)	2,30 ± 0,15
Potássio (%)	1,60 ± 0,06

Como pode ser observado na Tabela 4.1, o mandacaru apresenta alto teor de umidade, uma vez que esta planta apresenta grande capacidade de reter água. O teor de umidade do substrato é um dos fatores que mais influencia o

processo fermentativo e varia de acordo com a natureza do substrato e necessidade do microrganismo. Um teor de umidade elevado pode causar aumento no risco de contaminação, baixa difusão de oxigênio e redução de troca gasosa. Por outro lado, baixos níveis de umidade, resultam num crescimento insuficiente em relação ao ótimo. No processo de enriquecimento protéico deve-se levar em consideração os níveis de umidade e atividade de água do substrato adequada ao microrganismo. A literatura apresenta diferentes teores iniciais de umidade no processo de enriquecimento protéico. Araújo (2004) estudando o enriquecimento protéico do mandacaru e da palma forrageira com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, iniciou o processo fermentativo com teores de umidade em torno de 90% o que corresponde a uma atividade de água em torno de 0,9. Suhet (1997) estudando o processo de enriquecimento protéico de resíduos da industrialização do abacaxi com o *Aspergillus niger*, iniciou o processo com teor de umidade inicial de 84,56%. De acordo com Ramana et al. (1993) os fungos filamentosos, como é o caso do *Aspergillus niger*, necessitam de um meio com uma atividade de água mínima de aproximadamente 0,7. O teor de umidade inicial do substrato utilizado para o processo de enriquecimento protéico do mandacaru, deste trabalho, com o *Aspergillus niger*, foi em torno de 92%. Este teor de umidade corresponde a uma atividade de água acima de 0,9, para as temperaturas de 30, 34 e 38°C, onde estes valores de atividade de água foram preditos pelas isotermas de dessorção de umidade do mandacaru, ajustadas pelo modelo de GAB, obtidas por Araújo et al. (2004). Esta atividade de água acima de 0,9 de acordo com a literatura é perfeitamente tolerável por fungos filamentosos. Correia (2004) afirma que a maioria dos fungos filamentosos tem como faixa ótima de atividade de água 0,96 a 0,98, mas são capazes de crescer em atividades inferiores a isso, em torno de 0,9.

O teor de proteína bruta do mandacaru utilizado neste estudo foi de 14,38%. Este valor está acima dos resultados encontrados na literatura. Araújo (1995), Barbosa (1998), Araújo (2004), Braga (1960) e Germano (1991) caracterizaram os cladódios do mandacaru e encontraram teores de 7,22%, 9,3%, 9,17%, 10,72% e 10,18% de proteína bruta, respectivamente. Perazzo Neto (1999) caracterizou a palma forrageira e observou um valor de 7,43%.

Com relação ao percentual de fibra bruta do mandacaru, foi observado um valor médio de 41,22% sendo superior aos valores encontrados por outros

pesquisadores. Em pesquisas realizadas por Barbosa (1998), Araújo (2003) e Braga (1960) com o mandacaru, encontraram valores de 19,7%, 14,0% e 16,22%, respectivamente.

O teor de extrato etéreo, fósforo, nitrogênio e potássio encontrados no mandacaru utilizado neste estudo foi de 2,15%, 0,23%, 2,30% e 1,60%, respectivamente, sendo estes valores superiores aos encontrados por Braga (1960) e Barbosa (1998) nesta mesma cactácea.

Os açúcares redutores totais são os açúcares solúveis presentes no material, compostos por glicose, frutose e sacarose. O teor de ART observado no mandacaru foi de 7,85%. Barbosa (1983) observou uma concentração menor de ART na palma forrageira, de 5,7%.

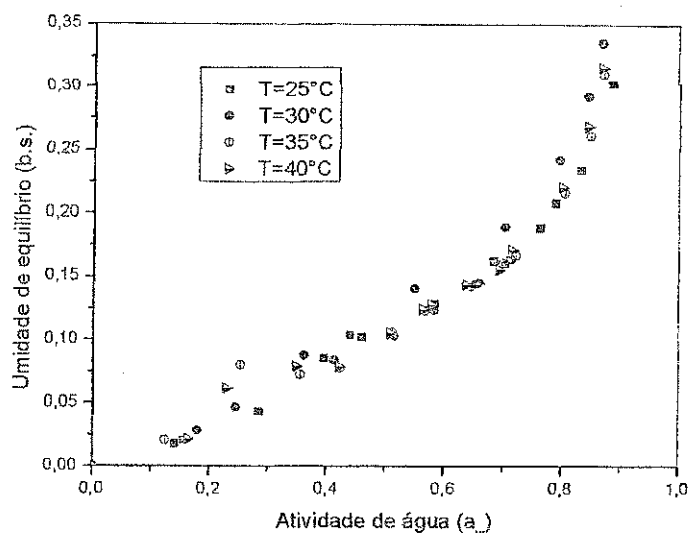
Araújo (2004) determinou a composição química do mandacaru, encontrando valores de MS = 10,85%, PB = 9,17%, PV = 9,86%, FDA = 15,4%, FDN = 35,13%, HC = 19,73% e MO = 89,59%. Afirmou também que vários fatores influenciam a composição química dos alimentos, alguns relacionados ao meio ambiente como: o solo e o clima, enquanto outros estão relacionados com as características da planta, variedade, estado de crescimento, desenvolvimento e ciclo vegetativo. Do ponto de vista bromatológico, o valor nutritivo de uma planta forrageira depende da concentração de proteínas, fibra bruta, extrato etéreo, extrato não nitrogenado, minerais e vitaminas.

4.1.1. Isotermas de adsorção de umidade dos cladódios do mandacaru

Foram obtidas as isotermas de adsorção de umidade para os cladódios do mandacaru sem espinhos (seco) nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C. No Apêndice A, encontra-se a Tabela A1 com os dados experimentais da atividade de água (a_w) e umidade de equilíbrio (b.s.) nas quatro temperaturas estudadas.

A Figura 4.1 apresenta as isotermas de adsorção de umidade do mandacaru a 25, 30, 35 e 40°C, representando os valores da umidade de equilíbrio (b.s) em função das diferentes atividades de água.

Verifica-se que, como na maioria dos materiais higroscópicos, a umidade de equilíbrio (b.s.) aumentou com o aumento da atividade de água (a_w) e as isotermas se encontram muito próximas umas das outras. Para atividades de água acima de 0,5 a curva de 30°C ficou acima das curvas a 25, 35 e 40°C.



Figuras 4.1 – Isothermas de adsorção de umidade dos cladódios do mandacaru (seco) nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C

Os parâmetros de ajuste dos modelos matemáticos de GAB e Henderson modificado, os coeficientes de determinação (R^2) e os desvios percentuais médios (P) obtidos para os dados experimentais das isothermas de adsorção nas quatro temperaturas estudadas encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Valores dos parâmetros de ajuste dos modelos e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e desvios percentuais médios (P)

Modelos	Parâmetros	T = 25°C	T=30°C	T=35°C	T=40°C
GAB	X_m	0,082	0,066	0,057	0,060
	C	3,343	5,318	11,685	7,975
	K	0,842	0,936	0,940	0,940
	R^2	0,994	0,995	0,994	0,996
	P (%)	14,83	9,12	12,03	21,42
Henderson modificado	a	2,096	1,162	1,488	1,335
	t	0,700	1,009	0,851	0,931
	b	3,356	3,671	3,513	3,598
	c	1,098	0,896	0,964	0,935
	R^2	0,993	0,990	0,984	0,988
	P (%)	11,99	10,07	9,78	9,75

Observando os parâmetros do modelo de GAB na Tabela 4.2, pode-se verificar que os valores do parâmetro C, que representa o calor de sorção, não apresentaram uma tendência bem definida sob o aumento da temperatura, uma

vez que, embora sejam crescentes entre 25 e 40°C, teve um valor maior a 35°C do que o valor obtido para 40°C.

Quanto ao parâmetro K , observa-se que o mesmo aumentou entre 25 e 30°C e permaneceu praticamente constante nas temperaturas de 35 e 40°C, com valores variando de 0,8423 a 0,9399. Lima (2006) obteve valores de K variando de 0,95 e 0,99 estudando as isotermas de adsorção da farinha de facheiro, para as temperaturas de 10, 20, 30 e 40°C.

Os valores de X_m , ao contrário de C e K , sofreram reduções com o aumento da temperatura, entre 25 e 30°C, no entanto ficou constante nas temperaturas de 35°C e 40°C. Santos et al. (2004) estudando as isotermas de adsorção, nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, de duas formulações de farinhas de mandioca temperadas observaram reduções no valor de X_m com o aumento da temperatura. O parâmetro X_m (GAB) que representa a fração de umidade na monocamada do material adsorvente, não sofreu grandes influências da temperatura. Esse parâmetro é muito importante por estar relacionado com o início de uma série de reações químicas de deterioração de substratos (Ferreira & Pena, 2003).

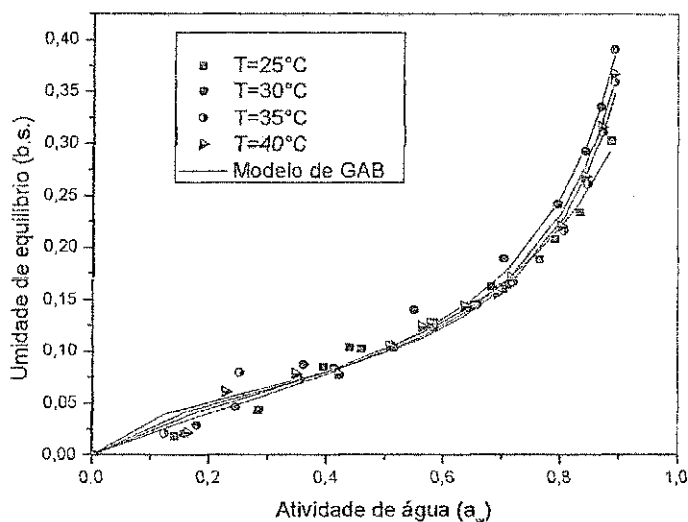
As formas das isotermas obtidas para as quatro temperaturas estudadas, são classificadas como isotermas do tipo II, de acordo com a classificação de Brunauer citado por Blahovec (2004), em forma de J. Essas formas são típicas de alimentos com grande quantidade de açúcar e solutos e que apresentam pouca adsorção por capilaridade, como frutas e os doces de frutas (Ordóñez, 2005).

Houve um bom ajuste do modelo GAB aos dados experimentais nas quatro temperaturas estudadas, havendo uma equivalência entre os coeficientes de determinação, com valores próximos de 0,995. Ferreira & Pena (2003) estudando as isotermas de adsorção da farinha de pupunha nas temperaturas de 15 e 35°C, observou um bom ajuste aos dados pelo modelo de GAB.

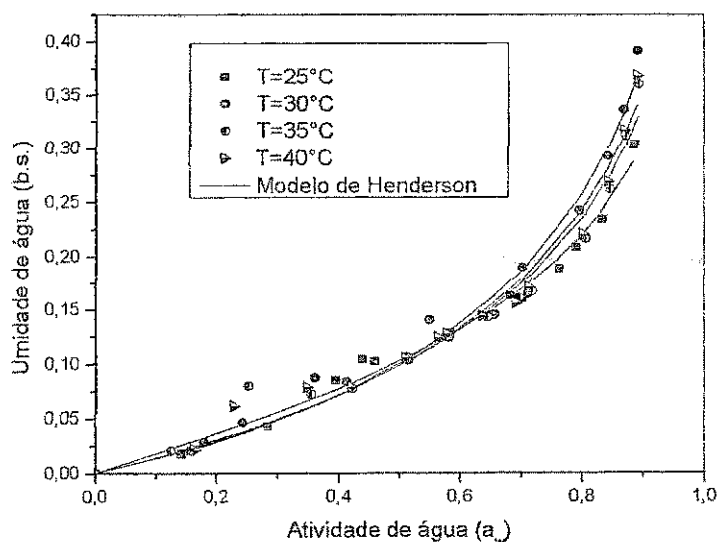
Nas temperaturas de 25, 35 e 40°C, o melhor modelo de ajuste aos dados experimentais foi o de Henderson modificado, o qual apresentou coeficientes de determinação em torno de 0,9, e os menores valores de desvios percentuais médios (P), em torno de 10%. Para a temperatura de 30°C o modelo de GAB apresentou melhor ajuste aos dados experimentais, apresentando um desvio percentual médio de 9,12%, e um coeficiente de determinação de 0,995. Lomauro

et al. (1985) afirmaram que os modelos que apresentam desvios percentuais abaixo de 10% são considerados aceitáveis.

As Figuras 4.2 e 4.3 ilustram as isotermas nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C, ajustadas pelos modelos de GAB e Henderson modificado, respectivamente. Verifica-se que para ambos os modelos, as curvas se encontram bem próximas umas das outras, e que houve um bom ajuste dos modelos aos dados experimentais para atividades acima de 0,6.



Figuras 4.2 – Isotermas de adsorção de umidade do mandacaru (seco) nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, ajustadas pelo modelo de GAB



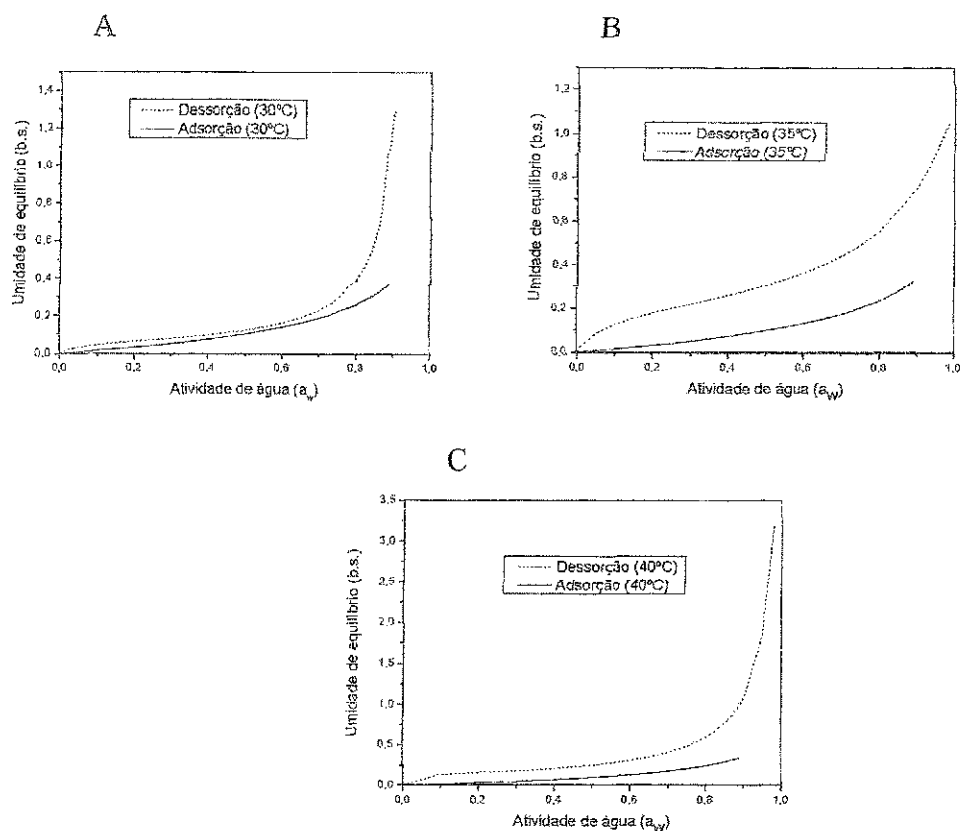
Figuras 4.3 – Isotermas de adsorção de umidade do mandacaru (seco) nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, ajustadas pelo modelo de Henderson modificado

4.1.2. Estudo da histerese

A Figura 4.4 (A, B e C) apresenta as isotermas de adsorção e dessorção do mandacaru *in natura* nas temperaturas de 30, 35 e 40°C, respectivamente. Os gráficos mostram claramente que os valores do teor de umidade de equilíbrio obtidos por dessorção são maiores do que aqueles obtidos por adsorção. As isotermas de dessorção do mandacaru foram obtidas por Araújo (2004) que ajustou os dados experimentais ao modelo de GAB, obtendo coeficientes de determinação nas temperaturas de 30, 35 e 40°C de 0,91, 0,92 e 0,86, respectivamente, sendo estes valores de ajuste razoáveis. As isotermas de adsorção do mandacaru obtidas neste estudo tiveram um melhor ajuste pelo modelo de Henderson modificado, com coeficientes de determinação próximos de 0,99 e desvio percentual médio em torno de 10%.

Foi observado na Figura 4.4 o efeito de histerese nas isotermas de sorção do mandacaru. Almeida et al. (2006) definem a histerese como a diferença entre o teor de umidade obtido por dessorção (perda de água) e o teor de umidade obtido por adsorção (ganho de água), e ainda afirmam que a mesma tende a desaparecer nas extremidades das isotermas, ou seja, os teores de umidade de equilíbrio são iguais independentemente do caminho feito para se atingir o equilíbrio higroscópico, se por ganho ou perda de água.

Verificou-se que o efeito de histerese, Figura 4.4, foi maior na temperatura de 35°C, quando se observa a partir da curva ajustada pelo modelo, entretanto não é observada uma diferença acentuada quando analisado os dados experimentais. Isto se deve ao fato de que o coeficiente de determinação (R^2) de GAB foi baixo na ordem de 0,90, como descrito anteriormente, se comparado aos valores obtidos para o modelo de Henderson modificado que foi de 0,99. Campos (2005) também observou maior efeito de histerese na isoterma de sorção da palma forrageira, a temperatura de 35°C. Comportamentos similares também foram observados por Arslan & Togrul (2006) quando estudaram o efeito da histerese nas isotermas de sorção de chá nas temperaturas de 25, 35 e 45°C.



Figuras 4.4 – Histerese das isotermas de desorção e adsorção de umidade do mandacaru, ajustadas pelos modelos de GAB e Henderson modificado, respectivamente, nas temperaturas de 30, 35 e 40°C.

4.2. Estudo cinético da fermentação semi-sólida do enriquecimento protéico dos cladódios do mandacaru utilizando o microrganismo *Aspergillus niger*

4.2.1. Proteína bruta

O estudo da cinética de crescimento do *Aspergillus niger*, no processo de enriquecimento protéico dos cladódios do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P. DC.), teve o objetivo de determinar o tempo que produz o maior teor protéico no material enriquecido.

Na Tabela 4.3 são apresentados os percentuais de proteína bruta dos cladódios do mandacaru na forma *in natura* e durante o processo de enriquecimento protéico, utilizando o fungo *Aspergillus niger*, obtidas para os 7 experimentos da matriz de planejamento experimental (Capítulo 3).

Tabela 4.3 – Valores de proteína bruta inicial e após 32, 48 e 72 horas de fermentação para os sete experimentos realizados

Tempo (h)	Proteína bruta (%)						
	Exp. 1 (1cm; 30°C)	Exp.2 (5cm; 30°C)	Exp. 3 (1 cm; 38°C)	Exp. 4 (5 cm; 38°C)	Exp. 5	Exp. 6 (3 cm; 34°C)	Exp. 7
<i>in natura</i>	15,64	13,13	13,13	13,13		13,13	
0	17,58	14,88	15,65	14,60	13,18	13,19	13,20
32	23,18	18,76	22,94	15,85	13,35	13,95	14,06
48	26,34	17,99	19,55	21,37	16,46	14,71	14,66
72	27,67	17,39	19,41	18,52	17,33	19,52	17,01

As Figuras 4.5 a 4.9 apresentam a cinética da fermentação semi-sólida do processo de enriquecimento protéico do mandacaru correspondentes aos 7 experimentos realizados, visando determinar o melhor tempo na maximização do teor protéico.

Analisando a Figura 4.5, pode-se observar que o teor protéico do substrato aumentou linearmente nas primeiras 48 horas de fermentação. O percentual de proteína bruta do mandacaru sem espinhos no início do processo foi de 17,58%, o qual aumentou gradativamente ao longo do tempo de fermentação atingindo o valor máximo de 27,67% no tempo de 72 horas.

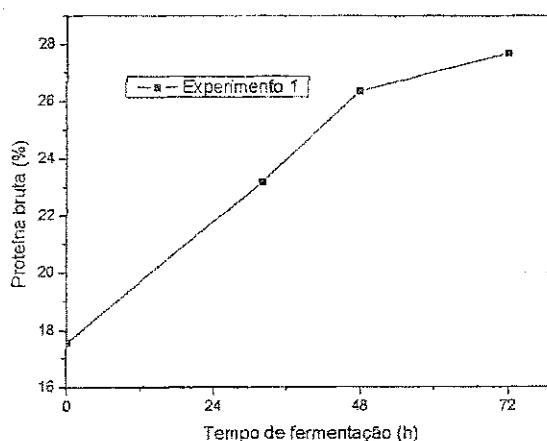


Figura 4.5 – Cinética do aumento de proteína bruta do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 1 cm e Temperatura = 30°C (Experimento 1).

Pode-se verificar pelas Figuras 4.6 e 4.7 que o teor de proteína do substrato teve o mesmo comportamento durante o processo de fermentação semi-sólida, para as condições dos experimentos 2 e 3. Em ambos os casos, o substrato atingiu um teor protéico máximo nas primeiras 32 horas de fermentação. O prolongamento desse tempo de fermentação para 72 horas causou um efeito negativo, resultando uma redução no teor de proteína bruta de 18,76% e 22,94% para 17,39% e 19,41%, respectivamente. Essa redução pode ser atribuída provavelmente à volatilização do N_2 , produção de amônia (contaminação de bactérias) e desnaturação da proteína celular do microrganismo (Araújo, 2004).

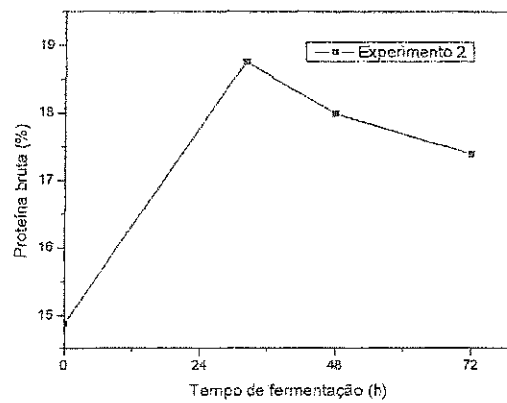


Figura 4.6 – Cinética do aumento de proteína bruta do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 5 cm e Temperatura = 30°C

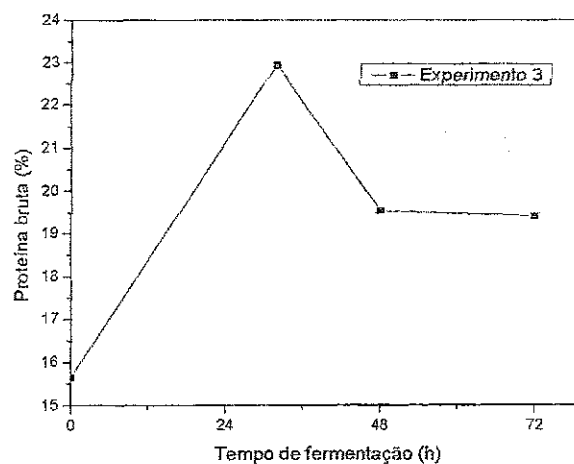


Figura 4.7 – Cinética do aumento de proteína bruta do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 1 cm e Temperatura = 38 °C

Observando a Figura 4.8, pode-se verificar um pequeno aumento no teor proteína bruta do mandacaru sem espinhos nas primeiras 32 horas de fermentação. Com um tempo de 48 horas de fermentação o substrato já atingiu o valor máximo do teor protéico, que foi de 21,37%. Observou-se ainda, que o prolongamento desse tempo para 72 horas resultou numa redução do teor de proteína 21,37% para 18,52%.

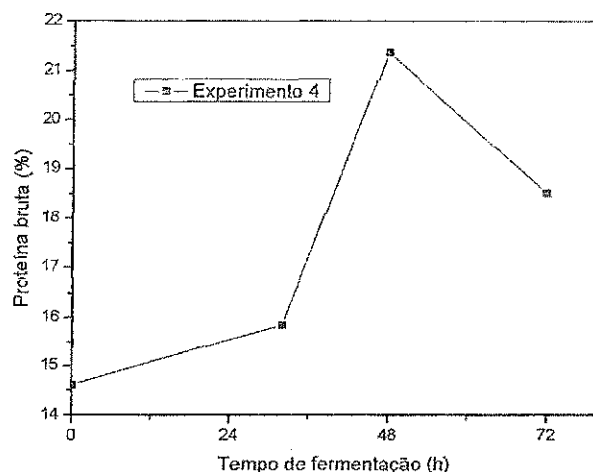


Figura 4.8 – Cinética do aumento de proteína bruta do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 5 cm e Temperatura = 38°C

A Figura 4.9 descreve o comportamento da proteína bruta nos 4 experimentos distintos, para uma melhor visualização do aumento do teor de proteína durante o processo de enriquecimento protéico do mandacaru, os quais já foram discutidos e apresentados anteriormente nas Figuras 4.5 a 4.8.

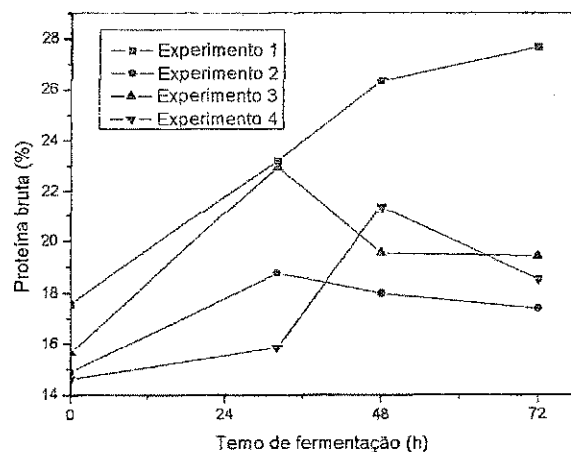


Figura 4.9 – Cinética do aumento de proteína bruta do mandacaru sem espinhos nos quatro experimentos distintos da matriz de planejamento

A Figura 4.10 ilustra o comportamento do teor de proteína bruta do mandacaru nos experimentos do ponto central da matriz de planejamento, ou seja, três experimentos idênticos. Pode-se verificar um perfil similar no teor de proteína ao longo do processo para os três experimentos realizados. Foi observado um aumento gradativo no teor protéico ao longo do processo, atingindo um teor máximo de proteína bruta no tempo de 72 horas. O valor médio do teor inicial de proteína bruta do mandacaru foi de 13,15%, o qual aumentou ao longo do tempo de fermentação, apresentando um teor médio final de 17,95%.

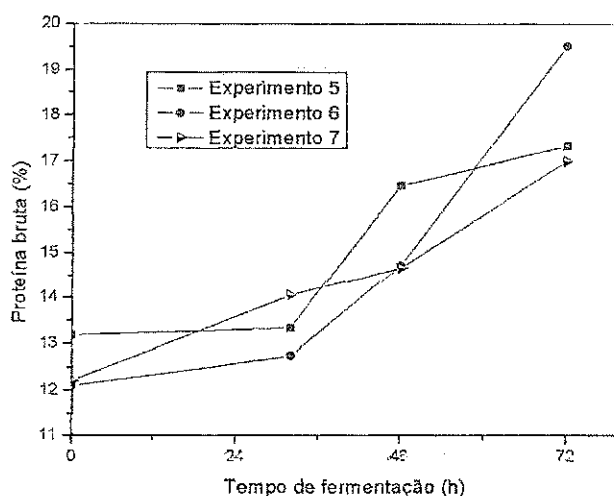


Figura 4.10 – Cinética do aumento de proteína do mandacaru sem espinhos, com Espessura da camada = 3 cm e Temperatura = 34°C

Os percentuais finais de aumento protéico do mandacaru enriquecido obtido neste estudo em relação aos valores da amostra *in natura* variaram de 29,55 a 76,92%. Estes valores estão abaixo dos percentuais de aumento protéico observados por Araújo (2004) quando estudou o processo de enriquecimento protéico do mandacaru e da palma forrageira, em escala de bancada, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, observando um aumento de 320% e 400%, respectivamente. Isto revela que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi mais eficiente no processo de metabolização protéica do que o *Aspergillus niger*. Isso pode ter sido, provavelmente, pelas condições operacionais mais apropriadas para a levedura do que para o *Aspergillus niger*. Perazzo Neto (1999) estudando o enriquecimento protéico da palma e algaroba com o *Aspergillus niger*, obteve um aumento protéico na palma de 48%, valor este que se encontra dentro da

faixa obtida neste trabalho. Para a algaroba, o aumento protéico atingido foi de 103%, superior ao verificado neste trabalho.

Os teores finais de proteína bruta do mandacaru estudado variaram de 17,01 a 27,67%. Estes valores são semelhantes ou até maiores do que os teores dos concentrados convencionais, tais como concentrado de aveia esmagada, farelo grosso de trigo, torta de babaçu, coco da Bahia prensado, semente de algodão, grãos de ervilha, farelo de babaçu e farelo de aveia, que apresentam teores de 14,7%; 15,0%; 20,5%; 21,2%; 23,1%; 23,4%; 24,0% e 25,8%, respectivamente (NRC, 1989).

Os teores protéicos do mandacaru processado estão de acordo com as normas da NRC (1989), com teores superiores ao nível de 8%, que é a exigência mínima determinada para o animal em termos de manutenção; e para crias recém desmamadas, fêmeas secas e em lactação, o teor protéico exigido é de 16 a 24%.

4.2.2. Açúcares redutores totais

O comportamento do teor de açúcares redutores totais e do percentual de proteína bruta ao longo da fermentação semi-sólida no processo de enriquecimento protéico do mandacaru para as condições do experimento 4 (5cm e 38°C) podem ser observados na Figura 4.11.

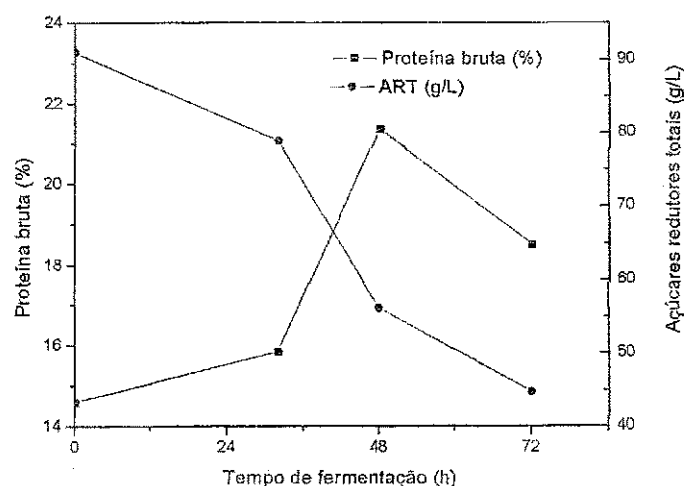


Figura 4.11 – Teores de açúcares redutores totais e proteína bruta durante a fermentação semi-sólida com *Aspergillus niger*

A Figura 4.11 mostra que nas primeiras 32 horas de fermentação houve uma ligeira queda nos açúcares redutores, seguido de um consumo mais acentuado até as 72 horas de fermentação. Os teores de açúcares redutores totais no início do processo fermentativo foi de 90,92g/L e termina com 44,74g/L, o que expressa um consumo total de 50,8% ao longo do processo. A tendência observada para os açúcares redutores totais condiz com o comportamento da proteína bruta, que atingiu seu maior valor no tempo de 48 horas, decrescendo até o tempo de 72 horas. Correia (2004) observou um comportamento diferente no teor de açúcares redutores ao estudar o enriquecimento protéico de resíduos de abacaxi com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, verificando que após 24 horas de fermentação, os açúcares já tinham sido consumidos quase que completamente, apresentando apenas um teor residual de 10% no final da fermentação.

4.3. Estudo da influência das variáveis espessura da camada e temperatura sobre o processo fermentativo com o *Aspergillus niger*

Tendo a finalidade de verificar a influência das variáveis: espessura da camada do substrato no reator e temperatura sobre o aumento protéico (AP) e proteína bruta (PB), os dados experimentais foram submetidos a uma análise de regressão linear, utilizando o programa Statistica, e os coeficientes dos modelos codificados foram determinados. No Apêndice A encontra-se a Tabela A2 com os dados experimentais da proteína bruta e o aumento protéico obtidos após 32h, 48h e 72h de fermentação. As Tabelas 4.4 e 4.5 apresentam os modelos de ajuste linear e os respectivos valores dos coeficientes de determinação (R^2).

O teor de proteína bruta e o aumento protéico foram expressos em função das variáveis independentes pelo modelo matemático de 1ª ordem, onde a espessura, temperatura e a interação da espessura com a temperatura são representadas pelos modelos.

Observando as Tabelas 4.4 e 4.5, verificou-se que os modelos lineares codificados das respostas estudadas não foram estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança, ou seja, não houve um bom ajuste do modelo linear aos dados experimentais, e os coeficientes de determinação para todos os

modelos lineares estudados foram muito baixos. Como o modelo linear não foi satisfatório no ajuste, foi feito o teste da curvatura ao modelo com o objetivo de checar se o ajuste do modelo é quadrático. Os valores marcados em negrito são os coeficientes estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança, para o aumento protéico e ao nível de 90% de confiança para a proteína bruta.

Tabela 4.4. Modelos da regressão linear codificado para a variável resposta de aumento protéico (AP) após 32, 48 e 72 horas de fermentação

Tempo (h)	Modelos empíricos codificados	R ² (%)
32	AP = 28,79 – 14,85E – 1,09T – 2,54ET	33,08
48	AP = 39,45 – 4,38E + 1,55T + 11,30ET	21,74
72	AP = 44,07 – 12,82E – 5,12T + 9,41ET	69,17

E – espessura; T - temperatura

Tabela 4.5. Modelos da regressão linear codificado para a variável resposta de proteína bruta (PB) após 32, 48 e 72 horas de fermentação

Tempo (h)	Modelos empíricos codificados	R ² (%)
32	PB = 17,44 – 2,88E – 0,788T – 0,665ET	34,68
48	PB = 18,72 – 1,63E – 0,85T + 2,54ET	37,93
72	PB = 19,55 – 2,79E – 1,78T + 2,35ET	79,42

E – espessura; T - temperatura

As Tabelas 4.6 e 4.7 apresentam os modelos de ajuste com curvatura e os respectivos valores dos coeficientes de determinação (R²) e a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$. Observou-se que os valores dos coeficientes de determinação foram bem mais altos quando comparados ao modelo linear. De acordo com a Tabela 4.6 constata-se que os modelos com curvatura para o aumento protéico são estatisticamente significativos para o tempo de 32h, por apresentar a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ maior que 1. Os modelos obtidos para 48h e 72h apresentaram uma razão $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ inferior a 1, não sendo portanto significativo.

Com relação à resposta proteína bruta (PB), verificou-se que os modelos foram significativos para os tempos de 32h, 48h e 72 h, com uma razão de

Capítulo 4 – Resultados e discussão do enriquecimento protéico

$F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ de 19,40; 2,62 e 1,15, respectivamente, como mostrado na Tabela 4.7. Os resultados referentes a significância dos modelos (ANOVA) são apresentados nas Tabelas A3, A4, A5 e A6 do Apêndice A.

Tabela 4.6. Modelos com curvatura para a variável resposta de aumento protéico (AP) após 32, 48 e 72 horas de fermentação

Tempo (h)	Modelos empíricos codificados	R ² (%)	F _{calc} /F _{tab}
32	AP = 46,65 - 41,66Curvatura - 14,85E + 1,09T - 12,18ET	99,62	6,81
48	AP = 54,26 - 34,56Curvatura - 4,38E + 1,55T + 11,30ET	96,26	0,67
72	AP = 49,56 - 12,81Curvatura - 12,82E - 5,12T + 9,41ET	86,59	0,17

E – espessura; T - temperatura

Tabela 4.7. Modelos com curvatura para a variável resposta de proteína bruta (PB) após 32, 48 e 72 horas de fermentação

Tempo (h)	Modelos empíricos codificados	R ² (%)	F _{calc} /F _{tab}
32	PB = 20,18 - 6,40Curvatura - 2,88E - 0,79T - 0,67ET	99,73	19,40
48	PB = 21,31 - 6,03Curvatura - 1,63E - 0,85T + 2,54ET	97,98	2,62
72	PB = 20,75 - 2,79Curvatura - 2,79E - 1,78T + 4,70ET	95,51	1,15

E – espessura; T - temperatura

O diagrama de Pareto apresenta graficamente os efeitos significativos ao nível de confiança utilizado. Os valores que ultrapassam o valor de p são considerados estatisticamente significativos, observando-se o teste t. As Figuras 4.12 a 4.15 apresentam o gráfico de Pareto com nível de significância de 90 e 95% para a estimativa dos efeitos principais e das interações.

Analisando as Figuras 4.12 e 4.14 verifica-se um mesmo comportamento, ou seja, que o efeito da curvatura, espessura e a interação entre espessura e temperatura foram estatisticamente significativas para o aumento protéico e de proteína bruta, respectivamente, observando ainda que a curvatura apresentou maior influência. Em ambos os casos a temperatura não teve influência significativa.

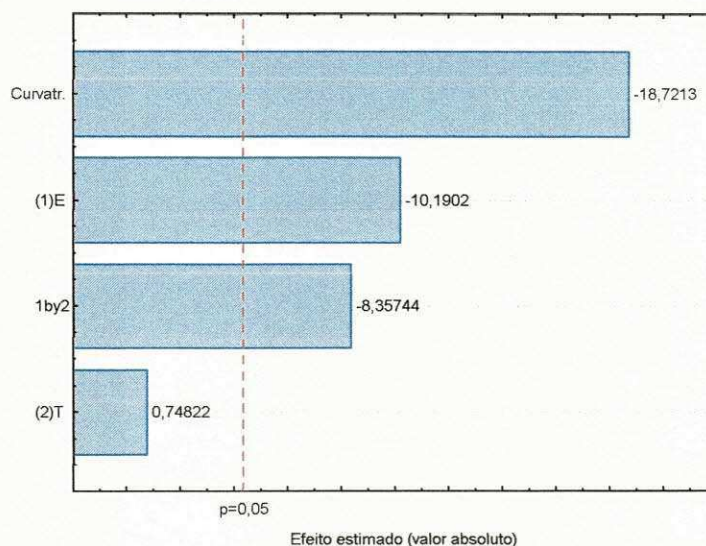


Figura 4.12 – Gráfico de Pareto para o aumento protéico após 32h de fermentação

Analisando a Figura 4.13 verificou-se que todas as variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos sobre a resposta proteína bruta. Observa-se ainda que a curvatura apresentou maior influência sobre a resposta PB.

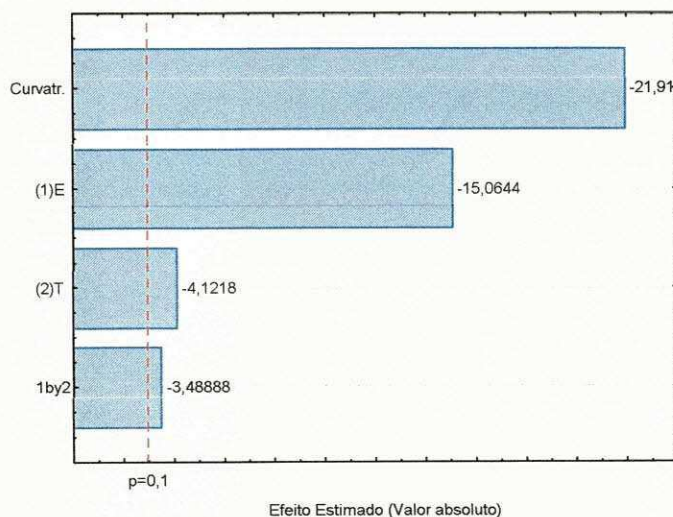


Figura 4.13 – Gráfico de Pareto para o teor de proteína bruta após 32h de fermentação

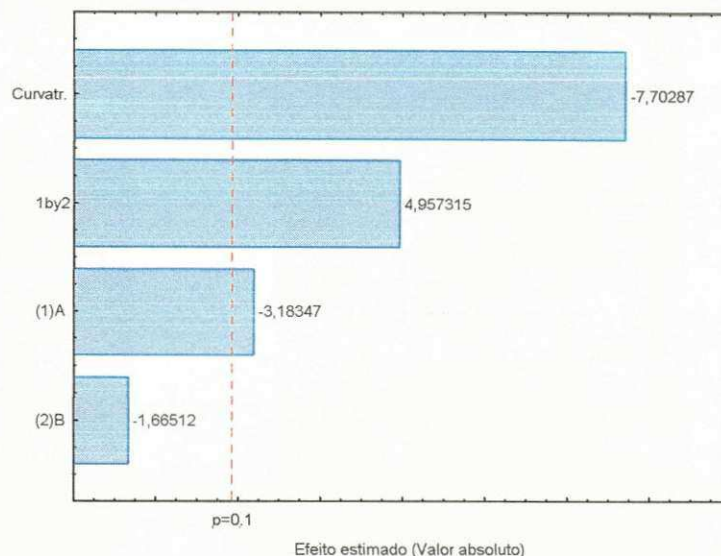


Figura 4.14 – Gráfico de Pareto para o teor de proteína bruta após 48h de fermentação

Verifica-se na Figura 4.15 que os efeitos da espessura e a interação espessura com a temperatura foram significativos, e para este caso a curvatura e a temperatura não influenciaram a resposta PB.

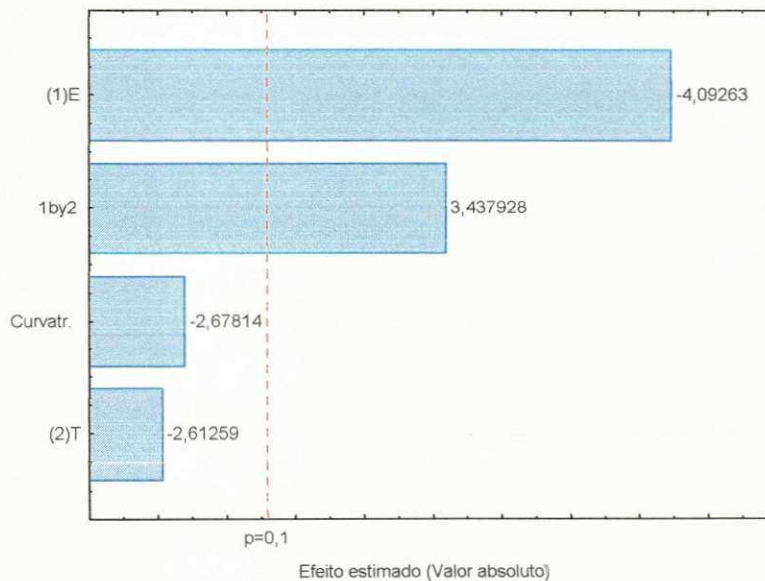


Figura 4.15 – Gráfico de Pareto para o teor de proteína bruta após 72h de fermentação

4.3.1. Análise de superfície de resposta para a variável proteína bruta (PB) e aumento protéico (AP)

Buscando verificar os melhores valores das variáveis de entrada que maximizam as respostas, utilizou-se dos modelos usando curvatura, que são usados apenas para mostrar tendências. Para ter certeza que o modelo é de segunda ordem, deve-se trabalhar com os níveis axialmente (configuração estrela).

A Figura 4.16 apresenta os efeitos das variáveis de entrada espessura da camada e temperatura sobre o aumento protéico após 32h de fermentação. Verifica-se que a espessura apresenta influência negativa, ou seja, quando passa do nível -1 para o nível +1 o aumento protéico diminui. Fixando a temperatura acima de 36°C, com a espessura abaixo de 1,5cm obtém-se aumento protéico em torno de 70%.

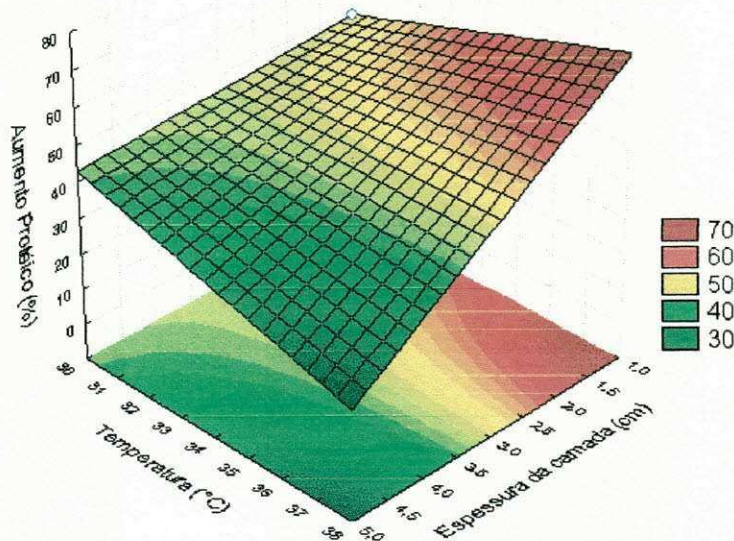


Figura 4.16 – Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre o aumento protéico após 32h de fermentação

A Figura 4.17 apresenta a superfície de resposta com os efeitos da temperatura e da espessura da camada sobre o teor de proteína bruta (PB). Verificou-se que a espessura apresenta efeito negativo sobre a resposta, ou seja,

quando passa do nível -1 para o nível +1, o teor de proteína bruta diminui. Fixando a espessura da camada abaixo de 2cm obtém-se um teor de proteína em torno de 23%, em toda faixa de temperatura estudada.

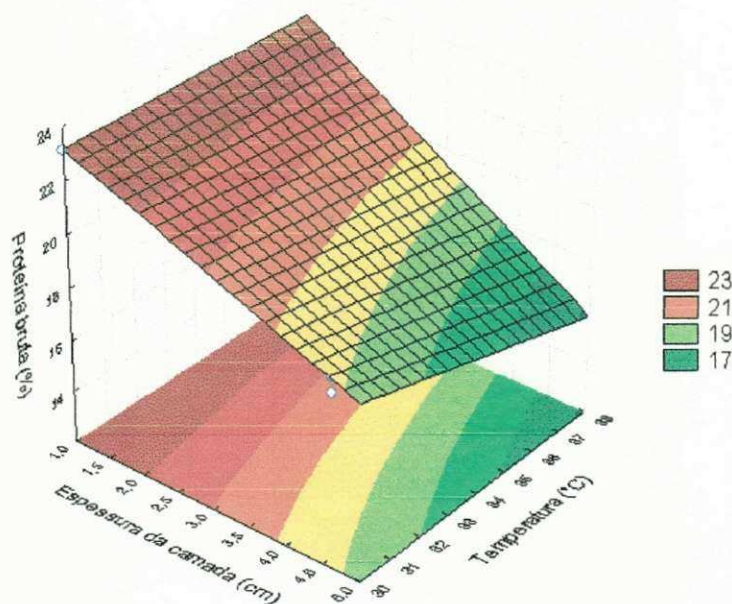


Figura 4.17 – Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre a proteína bruta com 32h de fermentação

A Figura 4.18 mostra o efeito da temperatura e da espessura da camada sobre o teor de proteína bruta (PB). Verificou-se que a espessura apresenta influência negativa. Fixando a espessura abaixo de 1,5cm e temperatura abaixo de 31°C obtém-se um teor de proteína em torno de 26%.

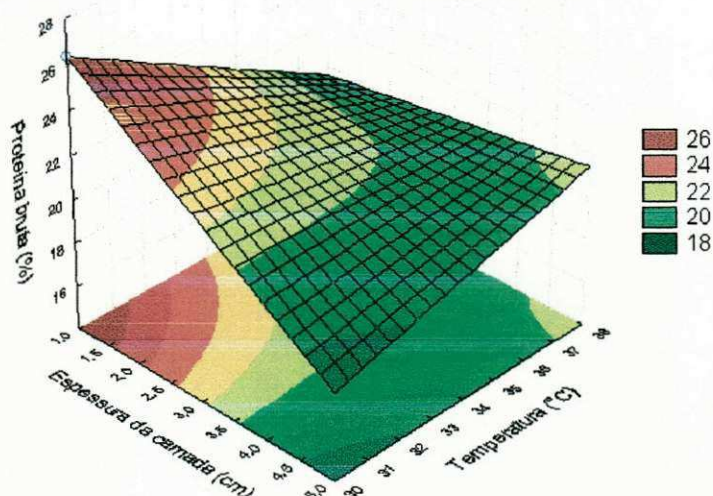


Figura 4.18 – Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre a proteína bruta com 48h de fermentação

A Figura 4.19 mostra os efeitos das variáveis de entrada espessura da camada e temperatura sobre a proteína bruta com 72h de fermentação. Observa-se que a variável de entrada E, apresenta efeito negativo sobre a variável resposta (PB), observando-se uma redução acentuada no aumento protéico quando a espessura passa do nível -1 para +1. Fixando a temperatura abaixo de 31°C, com a espessura abaixo de 1,5cm obtém-se um teor de proteína bruta acima de 27%.

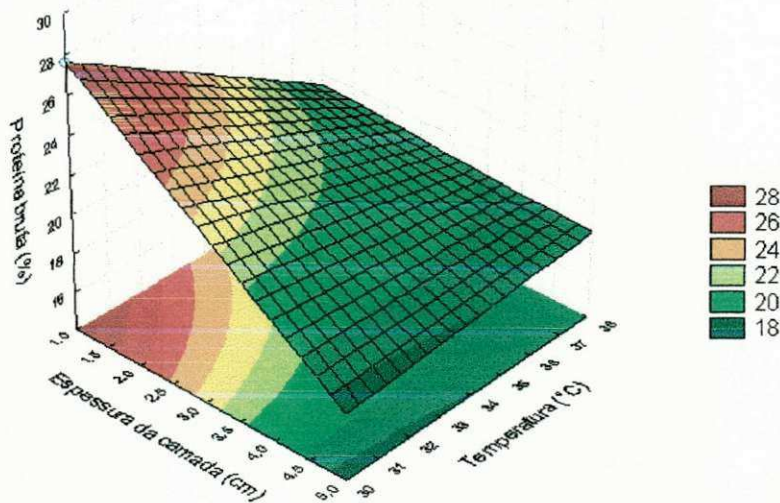


Figura 4.19 – Influência das variáveis de entrada espessura (E) e temperatura (T) sobre a proteína bruta com 72h de fermentação

Observando as superfícies de respostas para o aumento protéico e proteína bruta nos diferentes tempos avaliados, pode-se verificar que a espessura da camada foi a variável que apresentou maior influência nas respostas AP e PB. Araújo (2004) estudando o processo de enriquecimento protéico com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em escala de bancada, observou que a variável espessura da camada não teve influência sobre a resposta proteína bruta durante o processo fermentativo.

4.4. Estudo do enriquecimento protéico do mandacaru em tambor rotativo utilizando-se o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*

Considerando que o estudo do enriquecimento protéico do mandacaru com o *Aspergillus niger* não obteve bons resultados se comparado aos dados obtidos por Araújo (2004), foi realizado o estudo do enriquecimento protéico do mandacaru com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em tambor rotativo com o propósito de comparar os resultados obtidos aos valores de Araújo (2004) que estudou o enriquecimento do mandacaru com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em escala de laboratório (bandeja).

A Figura 4.20 descreve o comportamento da proteína bruta e dos açúcares reductores totais do mandacaru sem espinhos durante a fermentação semi-sólida, com concentração inicial de levedura de 5%, e temperatura ambiente de 25°C.

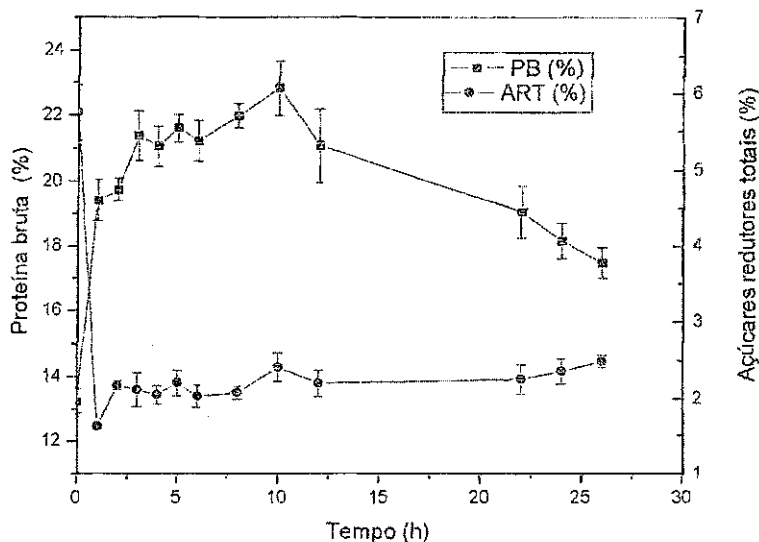


Figura 4.20 – Comportamento dos teores de proteína bruta e açúcares reductores totais durante a fermentação semi-sólida utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*

Observa-se que o teor de proteína aumentou rapidamente na primeira hora de fermentação atingindo um teor protéico de 19,41% que equivale a um aumento protéico de 1,47 vezes. Após 10 horas de fermentação, o substrato atingiu um teor protéico máximo de 23%, que corresponde a quase duas vezes ao teor de proteína bruta do mandacaru *in natura*, ou seja, um aumento protéico de 1,72 vezes. Logo em seguida, ocorreu decréscimo do teor protéico até o final da fermentação. O teor máximo de proteína bruta alcançado por Araújo (2004), que estudou o enriquecimento protéico em bandejas desta cactácea foi em torno de 23%, utilizando uma concentração inicial de inóculo de 5%, verificando que o teor máximo de proteína bruta atingido ocorreu com 48 horas de fermentação, tempo este bem superior ao observado neste trabalho. A redução no tempo de fermentação de 48 horas para 10 horas observada neste estudo ocorreu provavelmente pela oxigenação promovida pela agitação do tambor rotativo.

Observa-se ainda na Figura 4.20, que 72% dos açúcares redutores totais presentes no substrato foram consumidos logo na primeira hora de fermentação mantendo-se praticamente constante até o final da fermentação, o que revela que a levedura consome os açúcares como fonte de carbono para sua multiplicação, transformando-os em CO₂, H₂O e energia.

Rodrigues & Sant'anna (2001) estudaram a produção de proteínas utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em substrato semi-sólido de batatas. A levedura utilizada neste estudo foi sob a forma de fermento de pão granulado seco numa concentração de 3,6 mg/g de substrato em fermentador de leite fluidizado, constatando que, a concentração de proteínas extracelulares totais aumenta cerca de 14 vezes após 24 horas de fermentação, quando foi adicionado o cloreto de sódio 0,6M ao meio.

Correia et al. (2007) também utilizaram a *Saccharomyces cerevisiae* no estudo do enriquecimento protéico de resíduo de abacaxi e observaram após 48 horas de fermentação, que o teor protéico do resíduo aumentou mais que o dobro da proteína do resíduo *in natura*. Os mesmos autores testaram ainda o sulfato de amônia e uréia como fonte de nitrogênio e observaram que a adição de 2,5% de sulfato de amônia acarretou em um aumento de quase quatro vezes do conteúdo inicial de proteína.

O incremento observado no teor protéico do substrato utilizado, de acordo com Correia (2004) é explicado pela habilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em excretar enzimas extracelulares no substrato, além da eficiente multiplicação da levedura na forma de SCP (*single cell protein*), o que resulta no aumento protéico observado. O teor de proteína bruta alcançado pelo mandacaru sem espinho depois do enriquecimento protéico está de acordo com as normas de alimentação recomendadas pela NRC (1989). Desta forma, o mandacaru enriquecido pode ser usado na época de escassez de alimentos como suplemento protéico na dieta de várias categorias de animais como: crias recém desmamadas, fêmeas secas e em lactação que necessitam de um teor protéico de 16 a 24%, considerando os requisitos de manutenção e produção. Logo, pode-se concluir que a utilização do mandacaru enriquecido como ração animal para ruminantes é muito promissora.

Outro aspecto importante que pode ser levado em consideração com relação ao enriquecimento protéico utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* é que esta levedura não produz a toxina fúngica que é produzida pelo gênero *Aspergillus* (Yang, 1988).

Capítulo 5

Resultados e Discussão do fermentado e vinagre do fruto do mandacaru

Capítulo 5

Este capítulo tem o intuito de apresentar os resultados e discussão referentes à produção de fermentado e vinagre do fruto do mandacaru. Apresenta os resultados da caracterização física, físico-química e química dos frutos utilizados como matéria-prima na produção da bebida fermentada, o estudo cinético da fermentação alcoólica, e a análise físico-química e cromatográfica da bebida produzida comparando os dados obtidos com as normas exigidas pela legislação brasileira de bebidas. Os resultados do estudo cinético da fermentação acética na produção do vinagre, bem como a sua caracterização físico-química.

5.1. Fermentado de mandacaru

5.1.1. Caracterização física e físico-química dos frutos de mandacaru

A caracterização física e os valores referentes às pesagens e rendimentos (polpa, casca e sementes) do fruto são apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.2, respectivamente.

Tabela 5.1 – Caracterização física do fruto do mandacaru

Parâmetros	Média ± erro padrão médio
Diâmetro maior (cm)	109,85 ± 3,16
Diâmetro intermediário (cm)	66,45 ± 1,32
Diâmetro menor (cm)	64,89 ± 1,20
Massa do fruto (g)	241,16 ± 10,98
Massa da polpa+semente (g)	105,15 ± 5,72
Massa da casca (g)	135,83 ± 6,25

Pode-se observar na Tabela 5.1, que o valor médio da massa e os diâmetros (maior, intermediário e menor) dos frutos utilizados neste trabalho foram superiores aos determinados por Oliveira et al. (2004) que obtiveram para a massa e para os diâmetros médios (transversal e longitudinal), valores de 137,0316±53,6603 g, 58,06±7,58 cm e 82,73±16,96 cm, respectivamente. Almeida et al. (2005) avaliaram o tamanho e a massa do fruto do mandacaru proveniente da cidade de Lagoa Seca e observaram que os mesmos são

menores, com diâmetros maior, intermediário e menor de 81,18 cm; 54,24 cm e 52,33 cm, respectivamente, e massa média de 123,77 g. Canuto (2006) fez a caracterização física de frutos da palma forrageira, provenientes do cariri paraibano, e também observou variação na massa e tamanho desses frutos de acordo com a região de cultivo. As variações observadas na massa e tamanho dos frutos ocorrem principalmente pelo fato dos locais de cultivo apresentarem condições climáticas diferentes. Os frutos de maior tamanho e massa são mais apreciados para o consumo *in natura*, uma vez que os consumidores observam e dão preferência à aparência do fruto, que de acordo com Chitarra & Chitarra (1990), é um fator de qualidade que determina o valor comercial do produto, sendo importante nas operações de processamento, porque facilitam os cortes, descascamento ou mistura para produtos uniformes.

O rendimento de casca (RC), polpa (RP) e semente (RS) dos frutos oriundos de Barra de Santana e o rendimento de fermentado com relação à polpa utilizada (RVP), encontram-se na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Dados referentes às pesagens e rendimentos dos frutos do mandacaru utilizados na produção de bebida fermentada

Parâmetro	Valor
Massa total dos frutos (g)	33.388,16
Massa de polpa + sementes (g)	15.128,03
Massa total de polpa (g)	12.929,56
Massa das cascas dos frutos (g)	18.260,13
Massa das sementes (g)	2.198,47
Rendimento de polpa (% p/p)	38,70
Rendimento de casca (% p/p)	54,70
Rendimento de semente (% p/p)	6,60
RVP (%)	58,33

Comparando estes valores obtidos com os resultados de Lopes (2005) verificou-se que o percentual de polpa do mandacaru é inferior ao do fruto da palma forrageira (48%), espécie de cactácea também encontrada na região Semi-

Árida do Nordeste; no entanto, indicam maiores percentuais de casca e semente. O rendimento de fermentado de mandacaru (RVP) de 58,33% obtido neste trabalho foi superior ao valor de 41% verificado por Lopes (2005) quando fez o fermentado do fruto da palma e utilizou apenas a polpa do fruto, por outro lado quando utilizou o fruto integral o rendimento foi de 59% sendo praticamente igual ao deste trabalho.

A caracterização físico-química e química da polpa do mandacaru, utilizada na elaboração da bebida fermentada pode ser observada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Caracterização físico-química e química da polpa do fruto do mandacaru

Parâmetros analisados	Média e desvio padrão
Umidade (%)	90,59 ± 0,08
Cinzas (%)	0,18 ± 0,03
Sólidos solúveis totais (°Brix)	11,00 ± 0,01
Açúcares redutores totais (%)	9,82 ± 0,06
Proteína bruta (%)	6,27 ± 0,30
Fibra bruta (%)	1,83 ± 0,12
Pectina	0,09 ± 0,01
pH	4,10 ± 0,02
ATT (% ácido cítrico)	0,31 ± 0,02
Nitrogênio (%)	1,00 ± 0,20
Fósforo (%)	0,02 ± 0,01
Potássio (%)	0,90 ± 0,01
Cálcio (%)	0,21 ± 0,06
Magnésio (%)	0,18 ± 0,08
Enxofre (%)	0,02 ± 0,01

A polpa do fruto do mandacaru apresentou um alto percentual de umidade de 90,59%, como pode ser observado na Tabela 5.3. Comparando este percentual de umidade do mandacaru com os resultados obtidos por Askar e El-Samary (1981) pode-se verificar que o mesmo é superior a do figo-da-índia (fruto da palma forrageira) que é de 85,1%, enquanto o teor de cinzas (0,4%) e SST (13,2°Brix) são inferiores. Estudos realizados por Sawaya et al. (1983) e

Sepúlveda e Sáenz (1990) com o fruto da palma forrageira verificaram maiores teores de cinzas (0,44 e 0,44%), açúcar total (12,8 e 14,06%), pH (5,75 e 6,37) e SST (14,20 e 14,06°Brix), respectivamente, sendo essas diferenças atribuídas ao tipo de fruto e às variações de temperatura e tipo de solo nos locais de cultivo, que de acordo com Chitarra e Chitarra (1990) são fatores que tem grande influência na composição dos frutos.

Os sólidos solúveis totais (SST), expressos em °Brix, são os compostos que se misturam ou se dissolvem no suco da fruta, formados principalmente por açúcares, que dão o sabor doce ou ácido. O valor de SST observado no fruto do mandacaru é relativamente elevado (11°Brix) e é comparável a outros frutos como, por exemplo, ao mamão (Fagundes & Yamanishi, 2001), jabuticaba (Oliveira et al., 2003), umbu-cajá (Lira Júnior, 2005; Noronha et al., 2000) e caju (Silva, 2004), o que favorece a utilização deste fruto em processos biotecnológicos (por ex.: fermentação alcoólica e fermentação acética) e na produção de bebidas fermento-destiladas.

Oliveira et al. (2004) estudando as características físico-químicas dos frutos do mandacaru obtiveram maiores teores de umidade (93,77%), SST (12,17%), cinzas (0,2651%) e pH (4,52) quando comparado com os valores observados neste trabalho, no entanto, os teores de ATT e AR dos frutos em estudo foram superior aos destes pesquisadores que obtiveram 0,2110% ácido cítrico e 9,54% glicose, respectivamente.

Os percentuais de umidade, proteína bruta e fibra bruta do fruto do mandacaru estão acima dos citados por Canuto (2006), que observou no fruto da palma valores de 87,8% de umidade, 1% de proteína bruta e 0,26% de fibra bruta. Os teores dos minerais na polpa do fruto do mandacaru podem ser observados na Tabela 5.3, onde se verificou maior percentual de nitrogênio e potássio, 1,0 e 0,9%, respectivamente.

5.1.2. Estudo cinético da produção do fermentado de mandacaru

O comportamento da concentração celular (biomassa), concentração de etanol (produto) e concentração de açúcares redutores (substrato) durante a fermentação alcoólica pode ser observado nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3. No Apêndice A estão as Tabelas A7, A8 e A9 que apresentam os dados experimentais.

Os experimentos da fermentação alcoólica, para a produção de bebida fermentada foram realizados em duplicata, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e foram conduzidos em biorreatores em batelada. Verificou-se que o comportamento cinético nos dois experimentos realizados apresentou uma reprodutibilidade muito boa dos dados da concentração celular (X), concentração de etanol (P) e açúcares redutores totais (ART). Os gráficos com o comportamento cinético da biomassa, substrato e produto, utilizando o valor médio dos dois experimentos, são mostrados nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6.

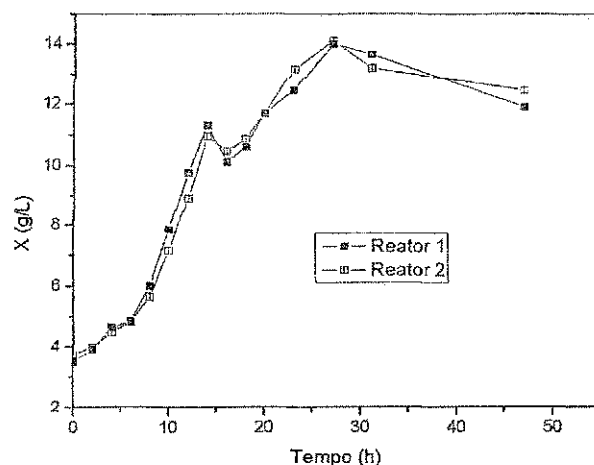


Figura 5.1 – Curva de crescimento celular durante a fermentação alcoólica

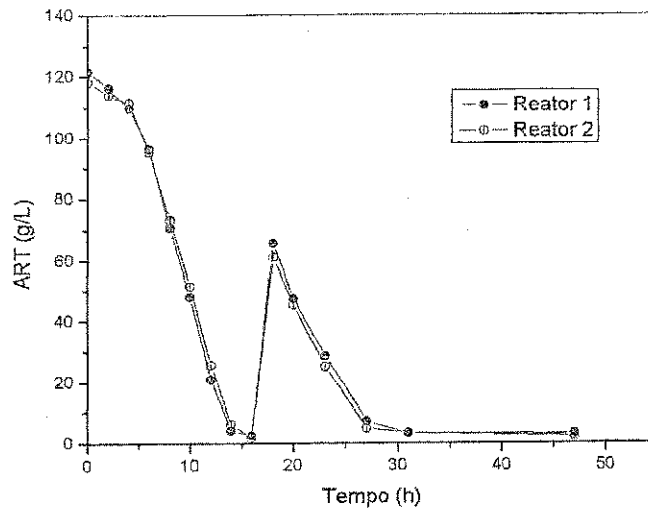


Figura 5.2. – Comportamento do substrato (ART) durante a fermentação alcoólica

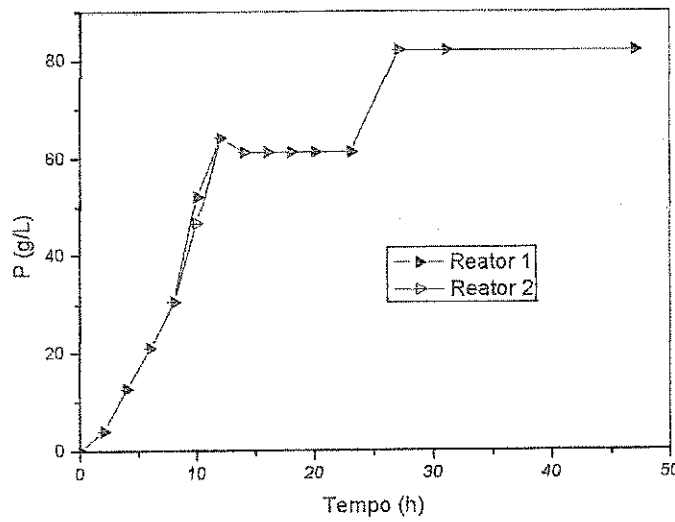


Figura 5.3. – Comportamento do produto (etanol) durante a fermentação alcoólica

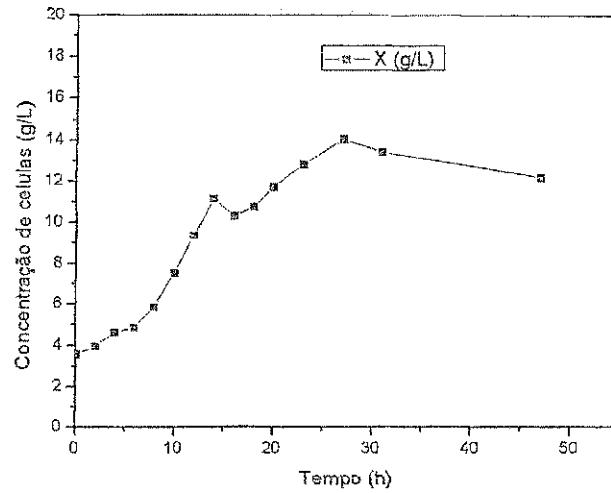


Figura 5.4 – Comportamento dos valores médios de crescimento celular durante a fermentação alcoólica

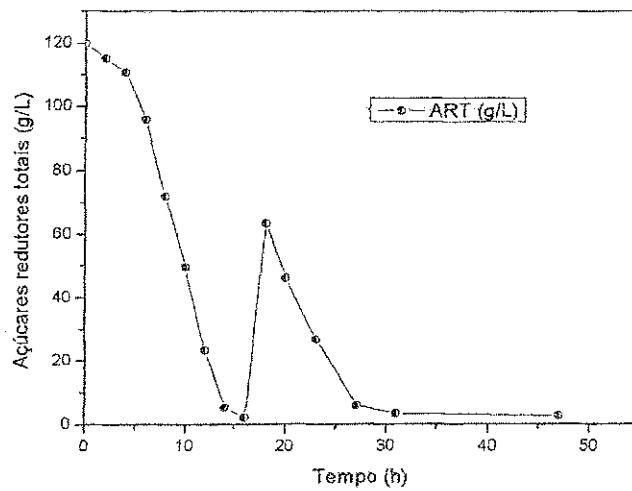


Figura 5.5 – Comportamento dos teores médios do substrato durante a fermentação alcoólica

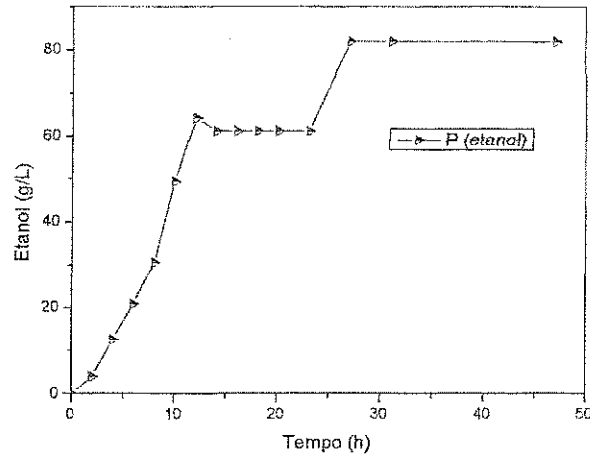


Figura 5.6 – Comportamento dos valores médios do substrato durante a fermentação alcoólica

Durante o processo de fermentação alcoólica, foi observado o comportamento cinético das concentrações de açúcares redutores totais (substrato), concentração celular (biomassa) e produto (etanol) em função do tempo de fermentação, Figura 5.7, que apresenta o comportamento das principais variáveis do processo.

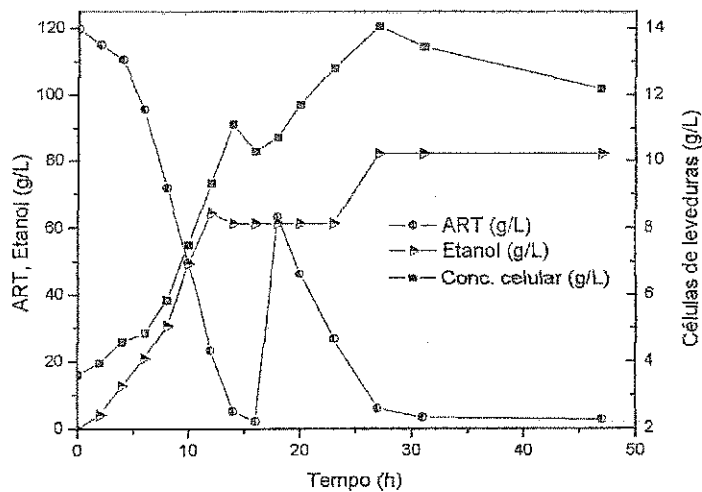


Figura 5.7 – Cinética do processo de fermentação alcoólica para a produção de fermentado do fruto do mandacaru

Durante a fermentação alcoólica o °Brix do mosto foi corrigido para 13°Brix no início da fermentação alcoólica e depois de 16 horas para 10,5°Brix, como pode ser observado na Figura 5.7. Foi adicionado 30g/L de sacarose na primeira etapa da fermentação e 70g/L na segunda etapa. Silva (1998) comenta que a chaptalização é uma prática realizada em duas etapas visando minimizar a inibição do microrganismo pelo substrato, e já verificada nas pesquisas de Corazza et al. (2001), Chaves (2003) e Torres Neto et al. (2006).

Analisando a Figura 5.7 verifica-se que houve uma redução lenta na concentração de ART nas primeiras 6 horas da fermentação alcoólica, tornando-se mais rápida ao longo do tempo, atingindo um nível de 2,1g/L de ART com 16 horas de fermentação em decorrência do consumo do substrato pelo microrganismo, indicando que o substrato já havia sido consumido quase que completamente, representando um consumo de 98% de ART. Observando-se ainda um aumento na concentração de etanol chegando a uma concentração de 61,27 g/L que corresponde a uma graduação alcoólica de 7,76% v/v. Após o período de 16 horas, verificou-se que o teor de sólidos solúveis totais estava constante e apresentava um valor de 4%, e conseqüentemente a fermentação tinha cessado. Adicionou-se a segunda parte da sacarose ao mosto (segunda chaptalização) o que ocasionou um aumento na concentração de ART de 2,10 para 63,25 g/L dando início a segunda fase da fermentação.

A concentração de ART começou novamente a decrescer com o tempo de fermentação, sendo este decaimento mais rápido entre 18 e 27 horas, tornando-se lento até o final da fermentação, devido a presença de elevadas concentrações de etanol. Verificando-se ainda, uma redução de 94% de ART ao completar 27 horas de fermentação, e a concentração de etanol já atingia o pico máximo, 82,11 g/L, que corresponde a 10,4% em volume, a 20 °C. Verifica-se que, nestas condições, a *Saccharomyces cerevisiae* produziu 82,11g de álcool por litro de fermentado. Resultados semelhantes foram observados por Torres Neto et al. (2006), Corazza et al. (2001), Bortolini et al. (2001), Oliveira et al. (2003) e Dias et al. (2003) quando produziram fermentados de caju, laranja, kiwi, pupunha e cajá, observando valores de 11,5; 10,6; 10,4; 12,0 e 12,0°GL, respectivamente.

Constata-se ainda, que no final da fermentação o °Brix permaneceu constante, 5,5°Brix, provavelmente, pela presença de açúcares infermentescíveis no suco de mandacaru. Este fato também constatado por Corazza et al. (2001)

quando produziu fermentado de laranja e observou que no final da fermentação o °Brix permaneceu constante, em aproximadamente 8°Brix, valor este superior ao observado no fermentado de mandacaru.

A concentração celular aumentou lentamente nas primeiras 6 horas de fermentação, como mostra a Figura 5.7, verificando-se um aumento exponencial na concentração celular nas primeiras 14 horas de fermentação, indicando assim que não houve fase de adaptação dos microrganismos ao meio. Este fato condiz com o comportamento do teor de ART descrito anteriormente, o qual decresceu com o tempo de fermentação. Observando-se que entre 6 e 14 horas de fermentação, ocorreu um rápido crescimento microbiano e um intenso consumo de ART. Na segunda fase da fermentação, observou-se uma nova fase exponencial, compreendida entre 16 e 27 horas de fermentação, na qual ocorreu um rápido crescimento celular até 27 horas, atingindo um pico máximo de 14,05g/L, seguido da fase estacionária no qual o número de microrganismos permanece praticamente inalterado. Torres Neto et al. (2006) estudaram a elaboração de fermentado de caju e observaram em seus estudos uma fase de adaptação do microrganismo ao meio, em torno de 10 horas de fermentação. Por outro lado, Bortolini et al. (2001) estudando a fermentação alcoólica do kiwi, com a levedura *S. cerevisiae*, observaram um pico máximo de crescimento celular entre 12 e 36 horas de fermentação. Essa variação depende de alguns fatores, como a linhagem de levedura utilizada, bem como a concentração inicial de açúcares totais. Altas concentrações de açúcares totais no início da fermentação podem causar uma inibição e retardar o consumo de substrato por parte das leveduras.

A Figura 5.8 mostra a variação de pH e acidez total durante o processo fermentativo. Pode-se constatar que o pH decresceu linearmente nas primeiras 12 horas, tornando-se praticamente constante até o final da fermentação, em contrapartida, a formação de ácidos foi crescente nas 8 primeiras horas de fermentação, tornando-se praticamente estável até o final da fermentação.

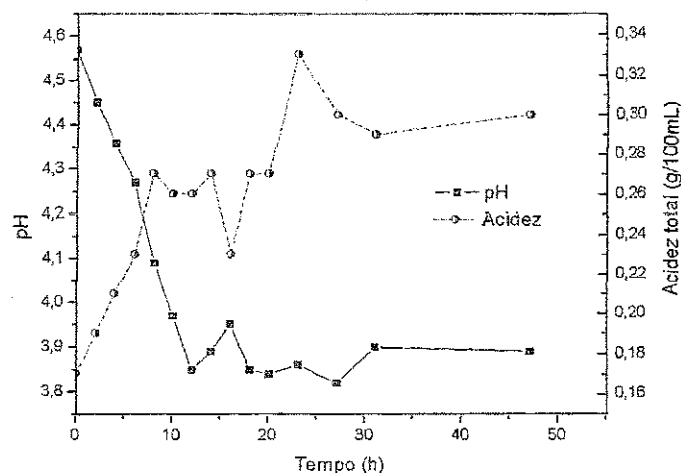


Figura 5.8 – Variação do pH e da concentração de acidez total (g/100mL de ácido acético) em função do tempo de fermentação

O aumento da acidez total e conseqüentemente a redução no pH ao longo do processo fermentativo mostrados na Figura 5.8 são decorrentes provavelmente da produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico, acético e succínico (Borzani et al., 1983). Verifica-se ainda que a faixa de pH trabalhada de 3,82 a 4,45, durante o processo de fermentação foi suficiente para permitir uma rápida fermentação alcoólica e inibir bactérias indesejáveis (Bortolini, 2001). Furletti (1986) afirma que a faixa de pH de 4 a 4,5 conduz a uma boa fermentação alcoólica e que as leveduras alcoólicas em geral apresentam uma zona ótima de pH variável (inferior a 7,0), e são consideradas como microrganismos acidófilos.

Comportamentos semelhantes na acidez e pH durante o processo fermentativo também foram verificados por Bortolini et al. (2001), Andrade et al. (2003), Torres Neto et al. (2006) e Lopes (2005). É importante ressaltar que a variação na acidez durante a fermentação tem grande influência na estabilidade e coloração das bebidas fermentadas (Rizzon et al., 1994).

Na Tabela 5.4 estão os resultados do percentual de conversão, produtividade da bebida fermentada do fruto do mandacaru e os parâmetros cinéticos da fermentação: Y_x/s , Y_p/s e $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1}), após 27 horas, 31 horas e 47 horas de fermentação. Prolongou-se o tempo de fermentação para verificar a variação do °Brix da bebida, a qual não apresentou variação quando atingiu o tempo de 47 horas. Portanto, foi considerado que o final da fermentação alcoólica se deu no tempo de 27 horas. Verificando-se na Tabela 5.4 que o %conversão, a

produtividade em álcool (etanol) e os parâmetros cinéticos diminuem com o prolongamento do processo fermentativo. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ de $0,082\text{h}^{-1}$ foi determinado na fase log de crescimento da 1ª etapa de fermentação.

Tabela 5.4 – Resultados do % conversão, produtividade e parâmetros cinéticos do processo fermentativo

Parâmetros	Valores	Valores	Valores
	experimentais (27 horas)	experimentais (31 horas)	experimentais (47 horas)
% Conversão	91,82	90,45	90,12
Produtividade (g/L.h)	3,04	2,65	1,75
$Y_{X/S}$	0,075	0,055	0,048
$Y_{P/S}$	0,469	0,462	0,461

Pode-se constatar pela Tabela 5.4, que o percentual de conversão e produtividade em álcool obtidos neste trabalho, estão dentro da faixa encontrada na literatura, onde o %Conversão e produtividade variam de 55,67% e 0,78 g/L.h (Silva, 2004) a 95% e 5,9 g/L.h (Lopes, 2005), respectivamente. Bortolini et al. (2001) obtiveram percentuais de conversão variando de 75,6 a 92,4% e produtividades de 0,74 a 2 g/L.h quando estudaram a fermentação alcoólica do kiwi. O rendimento em produto ($Y_{P/S}$) deste trabalho foi de 0,469g/g, sendo este valor superior ao encontrado por Silva (2004) que obteve 0,3 e bem próximo ao de Andrietta & Stupiello (1990) que verificaram para $Y_{P/S}$ valores de 0,445 ao estudarem a fermentação alcoólica do caldo de cana. O rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) e o valor de $\mu_{\text{máx}}$ deste trabalho foram de 0,075g/g e $0,082\text{h}^{-1}$, respectivamente, os quais estão bem próximos aos valores reportados por Ribeiro & Horri (1999) e Cassini (2003) que estudaram a fermentação do caldo de cana. As variações observadas nos parâmetros cinéticos por várias pesquisas podem ser atribuídas a vários fatores como: cepa de levedura, operação do reator, temperatura e substrato.

Ribeiro & Horri (1999) avaliou o desempenho de 3 linhagens de leveduras constatando valores de produtividade que variaram de 2,88 a 3,40 g/L.h, $Y_{P/S}$ entre 0,43 e 0,46, rendimento variando de 83,2 a 89,9%, $Y_{X/S}$ de 0,07 a 0,09 e

$\mu_{\text{máx}}$ variando de $0,07 \text{ h}^{-1}$ a $0,1 \text{ h}^{-1}$. Cassini (2003) estudou o desempenho de 7 linhagens de leveduras (A, B, C, D, E, F e M) na produção de aguardente de cana e verificou que a levedura M apresentou o maior valor de $Y_{P/S}$ de 0,440. Os valores de $Y_{X/S}$ variaram de 0,043 (levedura F) a 0,061 (levedura D), enquanto os valores de $Y_{X/P}$ variaram de 0,094 (levedura F) a 0,140 (levedura D). Com relação à produtividade todas as leveduras isoladas da destilaria de aguardente apresentaram valores próximos a $2,1 \text{ g/L.h}$. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ variou de $0,081 \text{ h}^{-1}$ a $0,105 \text{ h}^{-1}$. Lopes (2005) estudando a produção de fermentado a partir do fruto da palma verificou um percentual de conversão e produtividade máximas de 88% e $5,9 \text{ g/L.h}$ para o fermentado do fruto integral e 95% e $3,6 \text{ g/L.h}$ para o fermentado da polpa, um rendimento de produto ($Y_{p/s}$) de 0,39 e um valor de $\mu_{\text{máx}}$ de $0,16 \text{ h}^{-1}$.

De forma geral, pode-se considerar que os dados experimentais dos parâmetros cinéticos (%Conversão, produtividade, $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e $\mu_{\text{máx}}$) deste trabalho foram relevantes, uma vez que os valores obtidos se encontra dentro da faixa apresentada na literatura, confirmando a viabilidade técnica de operar o processo com a levedura comercial em reator batelada, utilizando o suco do fruto do mandacaru.

5.1.3. Caracterização físico-química e cromatográfica da bebida fermentada do fruto do mandacaru

A composição físico-química da bebida fermentada do fruto do mandacaru pode ser observada na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Resultados das análises físico-químicas da bebida fermentada

Parâmetros analisados	Média
Açúcares redutores (g/L)	0,4
Sólidos solúveis (°Brix)	5,5
Etanol (g/L); °GL (%v/v)	82,11; 10,4
pH	3,91
Acidez total (%ácido acético)	0,24

O teor residual de açúcares redutores classifica a bebida como fermentado do tipo seco, pois de acordo com Rizzon et al. (1994) os fermentados com até 5 g/L de açúcares totais são classificados como tipo seco. O teor alcoólico 82,11g/L (10,4°GL) da bebida fermentada de mandacaru está de acordo com as especificações exigidas pela legislação brasileira de bebidas (Brasil, 1997), que determina para fermentados de fruta uma graduação alcoólica de 4 a 14°GL. A graduação alcoólica do fermentado do mandacaru é bem próximo aos teores alcoólicos obtidos para o fermentado de laranja (Corazza et al., 2001), caju (Garruti, 2001; Torres Neto et al., 2006), cajá (Dias et al., 2003), pupunha (Andrade et al., 2003) e uva (Rizzon e Miele, 2003; Manfroi et al., 2006).

A bebida fermentada apresentou valores de açúcares redutores, sólidos solúveis, etanol e acidez total inferiores à bebida do fruto da pupunha obtida por Andrade et al. (2003) que foi de 1,01g/L; 7,25°Brix; 95,2g/L e 6,4g/L, respectivamente. No entanto, Chaves (2003) e Lopes et al. (2005) estudando a produção do fermentado de acerola e do fruto da palma forrageira obtiveram um valor médio de etanol de 7,3% e 6,05% (v/v), respectivamente, valores que são inferiores ao obtido nesse trabalho.

O pH de 3,91 observado no fermentado de mandacaru está acima dos valores reportados para o fermentado de laranja (Corazza et al., 2001), caju (Garruti, 2001), cajá (Dias et al., 2003) e uva (Rizzon & Miele, 2003; Manfroi et al., 2006). Este valor de pH (3,91) confere a bebida uma maior resistência às infecções bacterianas (Hashizume, 2001). A acidez total da bebida não teve seu valor duplicado, quando comparado ao início da fermentação, o que revela que não houve produção excessiva de ácidos orgânicos, ou seja, não houve contaminação por bactérias.

Na Tabela 5.6 estão os valores dos compostos voláteis, metanol e álcoois superiores do fermentado do fruto do mandacaru.

Tabela 5.6 – Resultados da análise cromatográfica da bebida fermentada expressos em mg/L

Parâmetros analisados	Média ± desvio padrão
Acetaldeído (etanal)	154,33 ± 9,11
Acetato de etila	118,93 ± 7,02
Metanol	356,77 ± 21,07
N-propanol	135,30 ± 7,99
Iso-butanol	377,70 ± 22,29
N-butanol	7,17 ± 0,42
Iso amílico	1385,47 ± 81,79
Álcoois superiores	1905,63 ± 112,55

A concentração de acetaldeído (etanal) encontrado no fermentado do fruto do mandacaru, 154,33mg/L, foi inferior ao valor observado no fermentado de caju, o qual apresentou uma concentração de 690mg/L (Torres Neto et al., 2006), porém é superior aos valores encontrados no vinho por Rizzon et al. (2000) e Rizzon e Miele (2003). O acetaldeído ou etanal é um produto resultante da oxidação do etanol (Salton et al., 2000), e também pode ser formado pela oxidação do mosto em função da aeração excessiva, um cuidado tomado durante a estabilização da bebida (Dias et al., 2003).

O teor de acetato de etila apresentou uma concentração de 118,93mg/L, superior aos valores encontrados em fermentados de caju (Torres Neto et al., 2006), uva (Rizzon et al., 2000; Rizzon & Miele, 2003; Manfroi et al., 2006), no entanto, o teor de acetato de etila observado no fermentado de mandacaru é inferior ao encontrado por Dias et al. (2003) no fermentado de cajá. De acordo com Rizzon (1987), teores elevados de acetato de etila proporcionam gosto acético nos vinhos, prejudicial a sua qualidade. O acetato de etila representa aproximadamente 80% dos ésteres voláteis dos vinhos.

O metanol presente no fermentado resultante da hidrólise das pectinas é um dos constituintes de maior importância, uma vez que a sua produção é indesejável devido a sua toxicidade. Como pode ser observada na Tabela 5.6, a concentração de metanol foi relativamente elevada e superior a concentração reportada na literatura para outros fermentados de fruta, 100mg/L (Torres Neto et

al., 2006), 75,3 – 140,5mg/L (Manfroi et al., 2006), 139,0mg/L (Rizzon & Miele, 2003) e 14,0 mg/L (Lopes et al., 2005). A concentração elevada de metanol é devido à pectina presente no fruto do mandacaru (0,08%), o que demonstra que a remoção da pectina no processo de clarificação não foi eficiente.

A concentração de álcoois superiores foi de 1905,63mg/L, sendo este valor superior aos descritos por Rizzon et al. (2000), Manfroi et al. (2006), Dias et al. (2003) e Rizzon & Miele (2003) e inferior ao reportado por Torres Neto et al. (2006). De acordo com Garruti (2001), os álcoois superiores são formados a partir do metabolismo dos aminoácidos, como por exemplo, a leucina, isoleucina e valina, presentes no mosto ou resultantes da hidrólise das proteínas das células de leveduras.

5.2. Vinagre do fruto do mandacaru

5.2.1. Estudo cinético da produção de vinagre

Parte da bebida fermentada produzida foi estocada em garrafas de vidro e a outra parte utilizada na produção de vinagre, onde os experimentos da fermentação acética foram conduzidos em biorreatores, com capacidade para 4 litros, sendo 1,2 L o volume útil de trabalho.

As bactérias acéticas (vinagre forte) foram inoculadas ao fermentado resultante da fermentação alcoólica. O tempo de fermentação para os experimentos realizados na produção do vinagre variou de 144 a 240 horas. As condições iniciais pré-fixadas nos dois experimentos estão apresentadas na Tabela 5.7. Nos experimentos foram monitorados a produção de ácido acético (Acidez volátil) e o consumo de etanol.

Tabela 5.7 – Condições iniciais usadas nos experimentos da fermentação acética

Experimentos	Teor alcoólico (°GL)	Acidez volátil inicial (% ácido acético)
1 e 2 (duplicata)	6	2
3 e 4 (duplicata)	8	1

O comportamento cinético da fermentação acética na produção de vinagre para os quatro experimentos realizados pode ser observado nas Figuras de 5.9 a 5.16. No Apêndice A estão as Tabelas A10, A11, A12, A13, A14 e A15 que apresentam os dados experimentais da produção do vinagre.

Os experimentos da fermentação acética, para a produção do vinagre foram realizados em duplicata, utilizando bactérias acéticas, e foram conduzidos em biorreatores em batelada. Verificou-se que o comportamento cinético nos quatro experimentos realizados apresentou uma boa reprodutibilidade dos dados da concentração de acidez volátil e consumo de etanol. Os gráficos com o comportamento cinético das concentrações de acidez volátil e etanol dos experimentos realizados são mostrados nas Figuras 5.11 a 5.16.

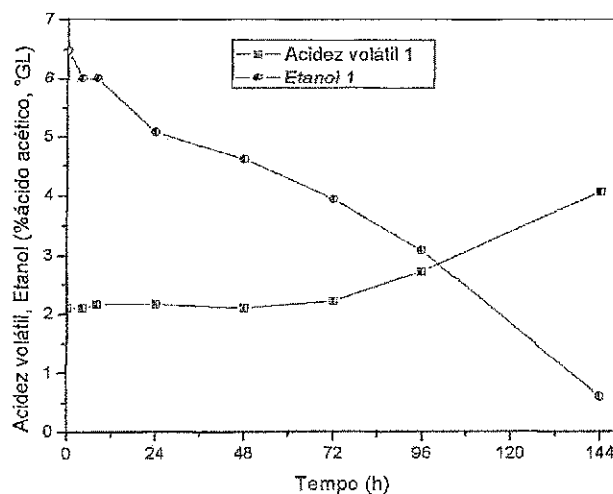


Figura 5.9 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 1)

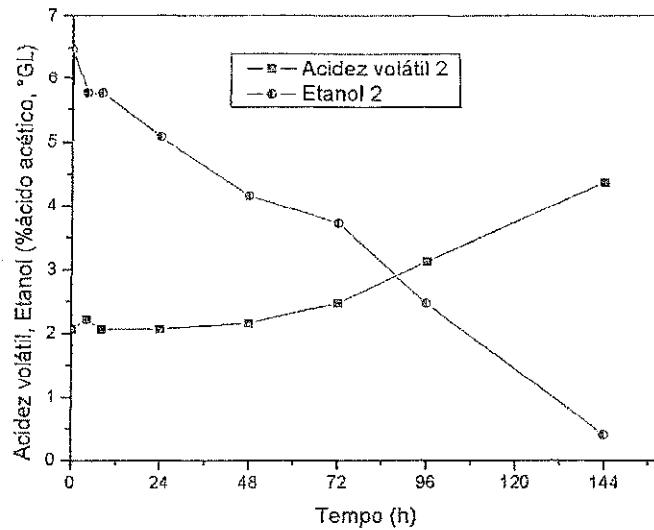


Figura 5.10 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 2)

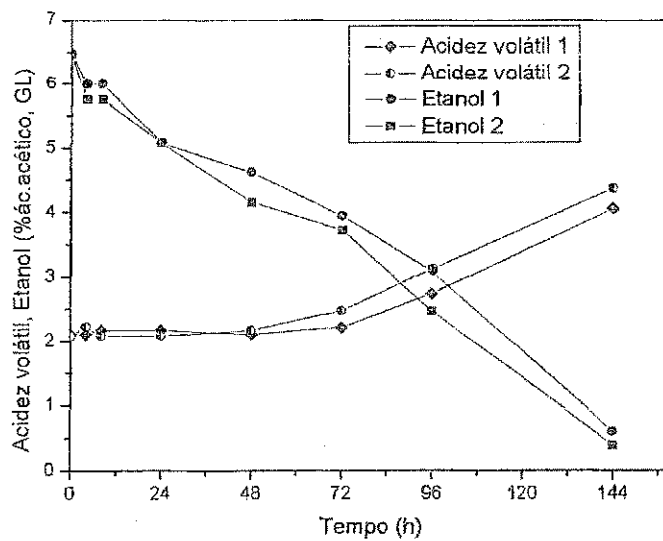


Figura 5.11 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimentos 1 e 2)

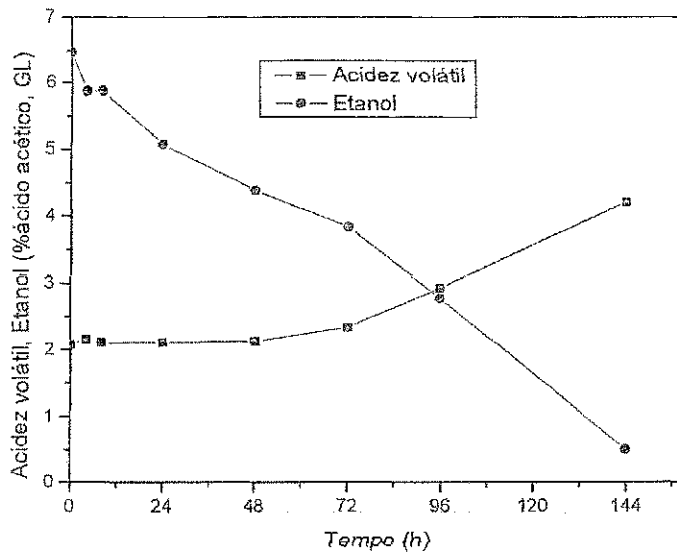


Figura 5.12 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Valor médio - Experimentos 1 e 2)

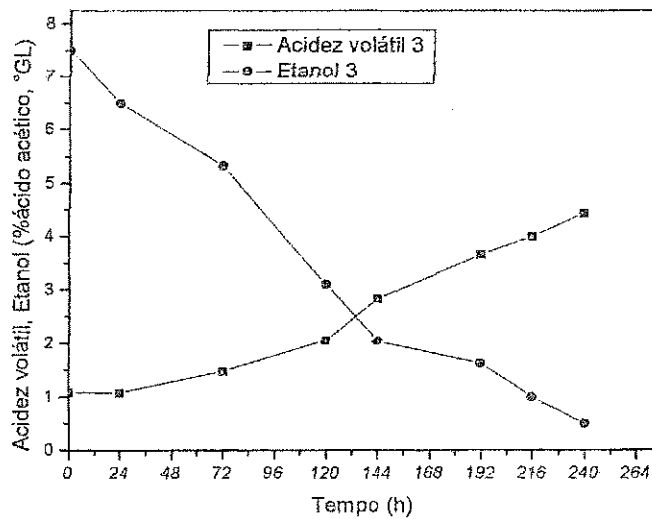


Figura 5.13 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 3)

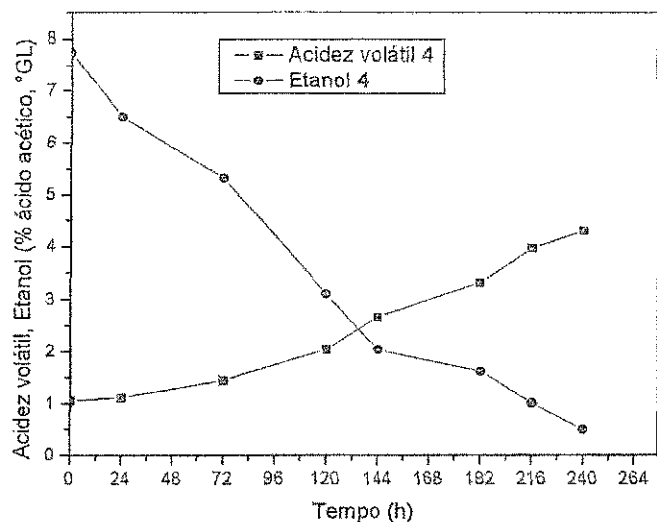


Figura 5.14 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimento 4)

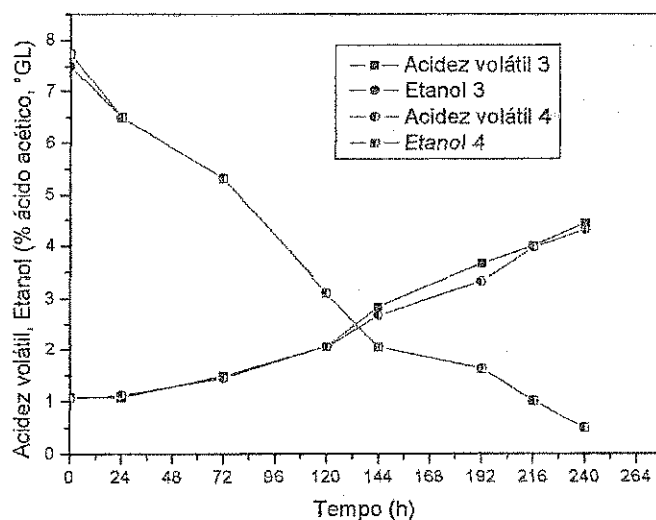


Figura 5.15 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Experimentos 3 e 4)

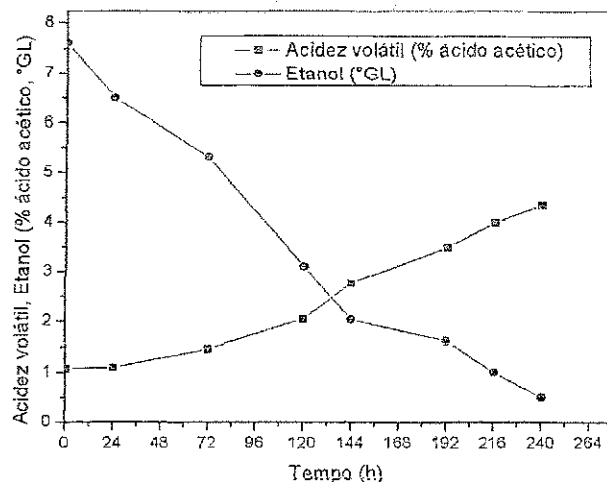


Figura 5.16 – Perfil cinético da produção de ácido acético e consumo de etanol durante a fermentação acética (Valor médio - Experimentos 3 e 4)

Analisando o comportamento cinético a partir das Figuras 5.12 e 5.16, pode-se constatar que o teor alcoólico inicial e a acidez acética tiveram grande influência nos ensaios realizados. Verificou-se que nas primeiras 72 horas de fermentação não houve praticamente produção de ácido acético nos quatro experimentos realizados. Sendo que, nos experimentos 1 e 2 por iniciaram com uma acidez acética de 2%, o tempo de fermentação na produção de vinagre foi menor, com um tempo de 144 horas, atingindo uma acidez volátil de 4,16% ácido acético. Nos experimentos 3 e 4, os quais iniciaram com uma acidez de 1%, o tempo de fermentação foi maior como já era esperado, com um tempo de 240 horas, onde o vinagre produzido atingiu uma acidez volátil de 4,37% ácido acético. De acordo com Sachs (2001), concentrações acéticas iniciais inferiores a 2% resultam em fermentações mais demoradas, levando a maiores perdas de etanol por evaporação, além de favorecer contaminações. Concentrações acéticas superiores a 3% são tóxicas para as bactérias, principalmente no início da fermentação. Tempos de fermentação iguais ao deste trabalho também foram constatados por Florentino (2006) ao estudar a fermentação acética na produção de vinagre utilizando o soro do queijo, e verificar a influência da aeração, agitação e concentração de inóculo na obtenção do vinagre, obtendo em seus ensaios vinagres com acidez volátil variando de 4,40 a 5,2 g de ácido acético/100mL. Chaves (2003) estudando a produção de vinagre de acerola com condições iniciais de acidez acética e etanol em torno de 2% ácido acético e 6% (v/v),

respectivamente, observou um tempo de fermentação acética acima dos valores observados neste trabalho, com um tempo de fermentação que variou de 384 horas a 480 horas, onde o vinagre de acerola produzido apresentou uma acidez volátil variando de 4,16 a 4,37%.

Os rendimentos obtidos neste trabalho foram de 67,4% para os experimentos 1 e 2 (6°GL; 2% acidez volátil) e 53,09% para os experimentos 3 e 4 (8°GL; 1% acidez volátil) e produtividades de 0,29 e 0,18g/L.h, respectivamente.

Silva (2004) estudou a produção de vinagre de caju e verificou a influência das concentrações iniciais de acidez acética e etanol, e observou que entre 48 e 72 horas de fermentação o vinagre produzido atingiu a acidez acética máxima, onde os vinagres produzidos apresentaram uma acidez acética que variou de 2,64 a 4,58% de ácido acético. Bortolini et al. (2001) estudaram a fermentação acética do suco de kiwi na produção de vinagre e, avaliaram a fermentação acética em fermentador submerso a 25°C, com agitação e oxigenação controlada. O vinagre obtido, em 12 horas apresentou uma acidez variando de 7,99 a 8,56% de ácido acético. Os rendimentos observados por estes pesquisadores variaram de 93,24 e 98,34% e produtividade entre 0,83 e 1,73 g/L.h. Acredita-se que existe alguma substância presente no fermentado de mandacaru que inibe o desempenho das bactérias na fermentação acética e conseqüentemente retarda a produção do ácido acético.

A temperatura de fermentação também influencia na fermentação acética, pois de acordo com Rizzon & Meneguzzo (2002) e Sachs (2001), em geral, a temperatura ideal para o crescimento e conseqüentemente produção de ácido acético situa entre 25-32°C. A temperatura de fermentação variou de 26 a 28,7°C nos experimentos realizados na produção de vinagre de mandacaru. Com relação à concentração inicial de etanol, Sachs (2001) afirma que o fermentado destinado à produção de vinagre deve conter entre 5 e 12°GL, pois concentrações muito baixas resultam em vinagres fracos e, concentrações elevadas, são tóxicas às bactérias acéticas. Neste trabalho, a concentração inicial de etanol fixada nos experimentos da produção de vinagre foi de 6 e 8°GL, respectivamente.

5.2.2. Análise do vinagre produzido

A composição físico-química do vinagre do fruto do mandacaru pode ser observada na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Resultados das análises físico-químicas do vinagre

Parâmetros analisados	Resultados	Legislação
pH	3,09 - 3,17	--
Acidez volátil (% ác. acético)	4,16 - 4,37	Mínimo 4,0
Extrato seco (g/L)	6,34 - 7,24	Mínimo 6,0
Cinzas (%)	0,1	Mínimo 0,1
Teor alcoólico (°GL)	0,5	Máximo 1,0

De acordo com os resultados obtidos, Tabela 5.8, constata-se que o vinagre de mandacaru produzido apresentou teores de extrato seco e cinzas que atende aos padrões exigidos pelo Ministério de Agricultura e Abastecimento (Brasil, 1999), que é de no mínimo 6,0 g/L de extrato seco e 0,1% de cinzas para vinagres de fruta. O teor alcoólico de 0,5°GL está de acordo com as normas técnicas (Brasil, 1999), que determina uma graduação alcoólica máxima de 1,0°GL. A acidez volátil do vinagre de mandacaru apresentou um percentual de 4,16 - 4,37% em ácido acético, estando acima do valor mínimo estipulado pelo MAA (Ministério de Abastecimento e Agricultura) que determina uma acidez volátil de 4,0% (Brasil, 1999). O pH obtido para o vinagre variou de 3,09 - 3,17. Florentino et al. (2004) avaliaram oito tipos diferentes de vinagres, sendo de álcool, maçã e vinho, e verificaram valores de pH abaixo de 3,0. É interessante lembrar que os vinagres de frutas são mais apreciados do que o vinagre de álcool, pelo fato de apresentar nutrientes, como vitaminas e sais minerais, em sua composição (Florentino, 2006).

Capítulo 6

Conclusões

Capítulo 6

CONCLUSÕES

Enriquecimento protéico dos cladódios do mandacaru

- O modelo de Henderson apresentou melhor ajuste aos dados experimentais das isotermas de adsorção de umidade do mandacaru seco nas temperaturas de 25°C, 35°C e 40°C, havendo uma equivalência entre os coeficientes de determinação, com valores próximos de 0,99 e menores desvios percentuais (P), com exceção da isoterma a 30°C que teve melhor ajuste com o modelo de GAB;
- O maior aumento protéico, em relação à amostra *in natura*, observado durante a fermentação semi-sólida dos cladódios do mandacaru com o fungo *Aspergillus niger* foi de 76,9% após 72 horas de fermentação a uma temperatura de 30°C, com uma espessura da camada de 1cm;
- Das duas variáveis de entrada estudadas (espessura da camada e temperatura) a espessura da camada foi a que apresentou maior influência sobre as respostas aumento protéico (AP) e proteína bruta (PB);
- Os aumentos protéicos alcançados no estudo do enriquecimento protéico do mandacaru com o *Aspergillus niger* foram inferiores aos dados obtidos por Araújo (2004) com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- O processo de enriquecimento protéico do mandacaru com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em tambor rotativo reduziu consideravelmente o tempo de fermentação com relação ao processo realizado em bandejas (Araújo, 2004), de 48 horas para 10 horas de fermentação;
- Os teores de proteína bruta do enriquecido protéico obtido neste estudo, em torno de 23%, estão de acordo com as normas da NRC (1989), independente do tipo de reator e do microrganismo inoculado, e pode ser utilizado como suplemento protéico para animais na época de escassez de alimentos.

Fermentado e vinagre do fruto do mandacaru

- Os frutos do mandacaru utilizados na produção de fermentado e vinagre, apresentaram características adequadas para o consumo *in natura*, bem como para o processamento industrial.
- Os parâmetros de %conversão, produtividade em álcool, $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e μ_{\max} observados confirmam que a levedura de panificação utilizada apresentou bom desempenho no processo de fermentação alcoólica;
- A bebida fermentada de mandacaru teve uma concentração de etanol (10,4°GL) dentro das especificações exigidas pela legislação brasileira, no entanto apresentou uma concentração relativamente alta de metanol;
- Os maiores percentuais de rendimento e produtividade na produção de vinagre foram observados nos experimentos com concentrações iniciais para etanol e acidez volátil de 6°GL e 2% ácido acético, respectivamente;
- O vinagre de mandacaru obtido está dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira, com acidez volátil acima de 4%.
- A produção de bebida fermentada e vinagre de mandacaru são tecnicamente viáveis em função da qualidade do produto, e pode ser considerado como uma forma promissora de aproveitamento dos frutos do mandacaru.

Capítulo 7

Perspectivas

Capítulo 7

PESPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Enriquecimento protéico

- Fazer o estudo termodinâmico das isotermas de sorção do mandacaru;
- Estudo da ampliação de escala do processo fermentativo (*scale up*) e da sua viabilidade econômica;
- Otimização do processo, fazendo a utilização seqüencial dos dois microrganismos *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* para metabolização completa dos carboidratos presentes no substrato;
- Fazer o teste de aflatoxina no enriquecido produzido utilizando-se o fungo *Aspergillus niger*;
- Estudo do enriquecimento protéico com a *Saccharomyces cerevisiae* avaliando outras variáveis de entrada, como adição de diferentes fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, uréia), granulometria e design de reator;
- Testar o enriquecido produzido com animais a fim de obter informações a respeito do desempenho no ganho de peso e produção de leite.

Bebida fermentada e vinagre do fruto do mandacaru

- Fazer a análise sensorial da bebida fermentada e vinagre do mandacaru para verificar a sua aceitação;
- Estudar o processo de clarificação do fruto com outras substâncias (clara de ovo, bentonite, ágar, etc.);
- Produzir a bebida fermentada e o vinagre utilizando o fruto integral (polpa e casca);
- Estudar a otimização do processo de produção de bebida fermentada, vinagre e aguardente do fruto do mandacaru.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

Capítulo 8

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P.M.; KOCH, F.; GOULART, T.T.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J.L. Enriquecimento proteico do bagaço de maçã com proteína fúngica através da fermentação em estado sólido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, 2003.

ALCÂNTARA, S.R.; SWARNAKAR, R. *Utilização de método de superfície de resposta para a avaliação da fermentação acética*. 2006. 49f. Monografia (conclusão do curso) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

ALMEIDA, M.M.; OLIVEIRA, A.S.; AMORIM, B.C.; FREIRE, R.M.M.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H. Características físicas e físico-químicas do fruto do mandacaru (*Cereus jamaçaru* P. DC.). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-COLHEITA DE FRUTOS TROPICAIS, 1., 2005, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa: UFPB, 2005. p.1-6.

ALMEIDA, F. de A.C.; DUARTE, M.E.M.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. *Tecnologia de armazenamento em sementes*. Campina Grande: UFCG, 2006. 402p.

AMARINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. Chemistry of Fermentation and Composition of Wines. In: AMARINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. *The technology of wine making*. 3. ed. Westport: The Avi Publish Company Inc., 1972. Cap. 5, p. 177-244.

ANDRADE-LIMA, D. Cactaceae de Pernambuco. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS, 11, 1966, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 1966.

ANDRADE, J.S.; PANTOJA, L.; MAEDA, R.N. Melhoria do rendimento e do processo de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 23(supl), p. 34-38, dezembro. 2003.

ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica (II) contínua. **STAB, Açúcar, Alcool e subprodutos**, Piracicaba, v.9, p.45-51, set./dez., 1990.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. v.2, 1141p.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A .; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1983. v. 5. 243p.

ARAGÃO, T.C.F.R.; SOUZA, P.A. S.; UCHÔA, A.F.; COSTA, I.R.; BLOCH Jr, C; CAMPOS, F.A.P. Characterization of a methionine-rich protein from the seeds of *Cereus jamacaru* Mill (Cactaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n.8, p. 897-903. 2000.

ARAÚJO, L.F. **Estudo da composição química bromatológica e da digestibilidade *in vitro* de alimentos utilizados pelos animais, no Cariri Oriental da Paraíba**. 1994. 66f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, Areia.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos (*Cereus jamacaru* P.DC.) e da Palma Forrageira (*Opuntia Ficus-índica* Mill) em Meio Semi-Sólido por Processo Biotecnológico**. 2003. 57f. Exame de Qualificação (Doutorado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos (*Cereus jamacaru* P.DC.) e da Palma Forrageira (*Opuntia Ficus-índica* Mill) em Meio Semi-Sólido por Processo Biotecnológico**. 2004. 197f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

ARAÚJO, L.F.; MEDEIROS, A.N.; PERAZZO NETO, A.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H. Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. **Brazilian Arch Biology and Technology**, v.48, Special n., p.161-168. June, 2005.

ARAÚJO, J.P.P. de; SILVA, V.V. *Cajucultura: modernas técnicas de produção*. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1995. p.23-41.

ARSLAN, N.; TOGRUL, H. The fitting of various models to water sorption isotherms of tea stored in a chamber under controlled temperature and humidity. *Journal of Stored Products Research*, v. 42, p.112-135, 2006.

ASQUIERI, E.R., CANDIDO, M.A., DAMIANI, C., ASSIS, E.M. *Vino de jaboticaba (Miriciaria jaboticaba Berg): Estudio de las características físico-químicas y sensoriales de los vinos tinto seco y dulce, fabricados con la fruta integral*. *Alimentaria*. España, v.355, p.111-122, 2004.

ASKAR, A.; EL-SAMAHY, S.K. Chemical composition of prickly pear fruits. *Lebensm. Rdsch*, v.77, p.279-281. 1981.

BARBOSA, H.P. *Tabela de Composição de Alimentos do Estado da Paraíba "Setor Pecuário"*; 2 ed. UFPB/ FAPEP, 1998. p. 23 –188.

BARBOSA, H.P. *Caracterizacion de la fermentation ruminal de lãs vainas y hojas del algarroba (Prosopis juliflora D.C.)*, 1983. 229f. Tese (Doutorado) - Universidade Politécnica de Madrid, Madrid.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 401p.

BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOT, J.R. *Fermented Beverage Production*. 1ed. London: Blackie Academic & Professional. Cap.2, p. 32-34, 1995.

DEL BIANCHI, V.L.D.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. *Fermentação em meio semi-sólido*. In: *Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. AQUARONE. L.; BORZANI, W.; LIMA, v.2, p.247-276, 2001.

BLAHOVEC, J. Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical approach. *Journal of Food Engineering*, v.65. p. 489–495. 2004.

BORTOLINI, F.; SANTANNA, E.S.; TORRES, R. C. *Comportamento das Fermentações Alcoólicas e Acética de Sucos de Kiwi (Actrñidia deliciosa)*;

- Composição dos Mostos e Métodos de Fermentação Acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.21, n.2, p. 236-243, 2001.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2.ed. Natal: Editora Universitária UFRN. 1960. 540p. (Coleção Mossoroense).
- BRASIL, Decreto nº 2314, 4 set. 1997, **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de set., 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). IV edição.
- CAMPOS, A.R.N. **Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale*) por fermentação semi-sólida**. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.
- CAMPOS, A.R.N. **Enriquecimento nutricional da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) por fungos: estudo experimental de ampliação de escala**. 2005. 83f. Exame de Qualificação (Doutorado) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.
- CANOILAS, L.M. **Enriquecimento protéico de resíduos de farinha de mandioca pelo desenvolvimento de leveduras**. 1991. 110f. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Piracicaba.
- CANNELL, E.; YOUNG, M. M. Solid state fermentation systems. **Proc. Biochem.**, p. 2-7, 1980.
- CANUTO, T. M. **Caracterização do fruto da palma (*Opuntia ficus indica* L. Mill)**. 2006. 38f. Monografia (Graduação em Química Industrial) – Universidade Estadual de Campina Grande, Campina Grande.
- CASSINI, C. E. B. **Produção de aguardente de cana de açúcar por células imobilizadas**. 2004. 143f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

- CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida.** 1997. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CHAVES, M. da C. V. **Produção de vinagre de acerola pasteurizado: estudo da fermentação alcoólica e acética.** 2003. 82f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320p.
- CONCRETES, A. **Manual de Forragicultura.** p.60. 1968.
- CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. **Preparação e caracterização do vinho de laranja.** *Química Nova.* v.24, n.4, p.449-452, 2001.
- CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi.** 2004. 163f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal.
- CORREIA, R.; MAGALHÃES, M.; MACEDO, G. **Protein enrichment of pineapple waste with *Saccharomyces cerevisiae* by solid state bioprocessing.** *Journal of Scientific & Industrial Research.* v.66, p.259-262. March 2007.
- COURI, F. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8.** 1993. 198f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- DAVET, A. **Estudo fitoquímico e biológico do cacto – *cereus jamacaru* de candolle, cactaceae.** 2005. 100f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteriaceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). ***Bergey's manual of systematic bacteriology.*** Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.267-277.

DIAS, D.R. **Elaboração de bebida alcoólica fermentada a partir de mostos de cajá (*Spondias mombin*) e cacau (*Theobroma cacao*)**. 2001. 130f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 342-350, set.-dez. 2003.

FAGUNDES, G. R.; YAMANISHI, O. K. Características físicas e químicas de frutos de mamoeiro do grupo 'solo' comercializados em 4 estabelecimentos de Brasília-DF. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.23, n.3, p.541-545. 2001.

FENNEMA, O. **Food chemistry**. New York: Marcel Decker, 1996.

FERREIRA, J.M.; **Estudo de Condições Ótimas pelo Método de Análise de Superfície de Resposta para Eficiência da Fermentação Acética**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

FERREIRA, C.D.; PENA, R.S. Comportamento higroscópico da farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p.251-255, 2003.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 174p.

FLORENTINO, E. R.; COSTA, A.S.S.; SILVA, S.F.; MACEDO, G.R.; DUARTE, M.M.L.; MARTINS, R.S. Avaliação das principais características de vinagres comerciais. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.119, p.36-39, 2004.

FLORENTINO, E. R. **Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática**. 2006. 138f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal.

- FURLETTI, M.E.M. Fatores físicos e químicos que interferem na fermentação etanólica. **Fermentação etanólica: microbiologia**. Unesp, Instituto de Biociências, São Paulo. 1986.
- GARRUTI, D.S. **Compostos voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. 2001. 218f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.
- GERMANO, R.H.; BARBOSA, H.P.; COSTA, R.G. da; MEDEIROS, A.N. de. Avaliação de composição química e mineral de seis cactáceas do semi-árido paraibano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Anais...** João Pessoa/PB. 1991. 719p.
- GOUVEIA, J. P. G. de. **Avaliação da cinética de secagem do gengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) em um secador de leito fixo**. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.
- GOMES, P. M. de A.; FIGUEIRÉDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. de M. Caracterização e isotermas de adsorção de umidade da polpa de acerola em pó. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.2, p.157-165, 2002.
- GUTIERREZ, R.; FAVELA, M.; TORRES, E. **Curso de fermentaciones em médio sólido. Biotecnologia para el aprovechamiento de resíduos agroindustriais e municipais**. Jaguaraúna: EMBRAPA, 8p. 1992. (Apostila do curso).
- HASHIZUME, T. In: Biotecnologia na Produção de Alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. Cap. 2, p. 21-67.
- HENNIES, P.T. **Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido**. 1996. Dissertação (Mestrado) - UEC/FEA, Campinas.

HOLANDA, J.S.; OLIVEIRA, A.J.E.; FERREIRA, A.C. Enriquecimento protéico de pedúnculos de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. v.33, n.5, p.787-792, 1998.

ISSE, M. G.; SCHUCHMANN, H.; SCHUBERT, H. *Divided soaption isotherm concept: on alternative way to describe sorption isotherm data*. v.16, n.2, p.147-157. 1993.

KORHOLA, M.; HARJU, K.; LEHTONEN, M. Fermentation. In: PIGGOT, J. R.; SHARP, R.; DUNCAN, R. B. *The Science and Technology of Whiskies*. London: Longman Scientific & Technical, Cap. 4, p. 89-117, 1989.

LOMAURO, C. J.; BAKSHI, A. S.; LABUZA, T. P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part II: milk, coffe, tea, nuts, oilseeds, spices and starchy foods. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. v.18, p.118-124. 1985.

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. Métodos ou diagnosticos foliar utilizados nas plantaçoens do grupo booken na Guíana Inglesa. Amostragem geral e tecnicas de analises. *Fertilité*, n.21, p.3-11, 1964.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. v. 4. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. 593p.

LIMA, E. E. *Produção e armazenamento da farinha de facheiro*. 2006. 132f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

LIRA JÚNIOR, J. S.; MUSSER, R. dos S.; MELO, E. de A.; MACIEL, M. I. S.; LEDERMAN, I. E.; SANTOS, V. F. Caracterização física e físico-química de frutos de cajá-umbu (*Spondias spp.*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.4, p.757-761. out.-dez. 2005.

LOPES, R.V.V.; ROCHA, A.S.; SILVA, F.L.H.; GOUVEIA, J.P.G. Aplicação do planejamento fatorial para otimização do estudo da produção de fermentado do

fruto da palma forrageira. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande, v.7, n.1, p.25-32, 2005.

LOPES, R. V. V. **Estudo cinético da produção de vinho do futo da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill)**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

MAIA, A.B.R. Componentes secundários da aguardente. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**. Piracicaba, v.12, n.6, p.29-34, jul./ago., 1994.

MANFROI, L.; MIELE, A.; RIZZON, L.A.; BARRADAS, C. I. N. Composição físico-química do vinho carbenet franc de videiras conduzidas no sistema lira aberta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.26, n.2. p.290-296, abr.-jun. 2006.

MARANGON, A.L.P.; DA SILVA, P.H.A.; MENDES, G.L. **Produção de Vinagre de Caqui**. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa – MG, 2003.

MORAES, A.F. **Enriquecimento protéico de farelo de arroz por fermentação semi-sólida em biorreator de coluna com leito fixo**. 1999. 110f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

MORDOCCO, A.; NOPRAHTANA, M. **Solid state fermentation (SSF) research and its position in the world today**. Disponível em: <<http://crunch.cheque.uq.oz.au/biologic/webrev2.html>>. Acesso em: 5 set. 2004.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. v.31, p. 426-428. 1959.

MILLÁN, C.; ORTEGA, J.M. Production of ethanol, acetaldehyde and acetic acid in wine by various yeasts races: role of alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.39, n.2, p.107-112, 1988.

MURTHY, M.; KARANTH, N.; RAO, K. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation. *Adv. App. Microb.*, v.38, p.99-147, 1993.

MUTTON, M.J.R. (ed). **Aguardente de cana – produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 171p.

NASCIMENTO, R.F.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Aldeídos em bebidas alcoólicas fermento-destiladas. *Rev. Engarrafador Moderno*, v.7, n.49, p.75-77, jan./fev., 1997.

NIKĀNEM, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* v.37, p.84-96, 1986.

NORONHA M.A.S.; CARDOSO E. de A.; DIAS N. da S. Características físico-químicas de frutos de umbu-cajá *spondias sp* . provenientes dos pólos Baixo-Jaguaribe (ce) e Assu-Mossoró (RN). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande, v.2, n.2, p.91-96, 2000.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Washington). Nutrient requirements of the beef cattle, 6.ed. Washington: National Academy of Science, (Nutriente requeriments of domestic animals, 6), v. 1, p.157, 1989.

OLIVEIRA, F.M.N.; ALEXANDRE, H.V.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J. M.; OLIVEIRA, A.R. *Características físico-químicas da polpa e casca do fruto do mandacaru*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. *Anais...* Recife: UFPE, 2004.

OLIVEIRA, M. A.; RODRIGUES, C.; REIS, E. M. dos.; NOZAKI, J. Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*. *Química Nova*, v.4, n.3, p.307-310, 2001.

OLIVEIRA, A.L.; BRUNINI, M.A.; SALANDINI, C.A.R.; BAZZO, F.R. *Caracterização tecnológica de jaboticabas 'sabará' provenientes de diferentes regiões de cultivo*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, n.3, p.397-400, 2003.

ORDÓÑEZ, J.A. *Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos*. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005. 294p.

PANDEY, A. Recent procers developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, London. v.27, p.109-117, 1992.

PEDROSO, P. R. F. *Produção de vinagre de maçã em biorreator airlift*. 2003. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Florianópolis.

PELCZAR, M.J., ROGER R., CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. Traduzido por Pereira, M.A.M. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981.

PERAZZO NETO, A. *Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus indica* Mill) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger**. 1999. 130f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. de M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido – Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. *Revista de Química Industrial*. Ano 74, n.724. p.17-20. 2006.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.127-135, 2003.

RAMANA, M.M.V.; KARANTH, N.G.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Biochemical Engineering aspects of solid-state fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, v.38, p.99-146, 1993.

RANGANA, S. *Manual of analysis of fruit and vegetable products*. New Delhi: Mc Graw-Hill. 1979.

RIBEIRO, C. A. F.; HORRI, J. Potencialidades de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. *Scientia Agrícola*, v.56, n.2. 1999.

RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J. *Elaboração de vinagre*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2002, 31p. (Embrapa Uva e vinho. Documentos, 36).

RIZZON, L.A.; ZANUZ, M.C.; MANFREDINI, S.; **Como Elaborar Vinho de Qualidade na Pequena Propriedade**, 3.ed., Embrapa: Bento Gonçalves, 1994. 36p.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.115-121, Abr., 2000.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, suplemento, p.156-161, dez., 2003.

RIZZON, L. A. **Composição química dos vinhos da microrregião homogênea vinicultora de Caxias do Sul (MRH 311) – Compostos voláteis**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1987. 4p. (Comunicado Técnico, 5).

ROCHA, E. A.; AGRA, M. F. Flora do pico do jabre, Brasil: Cactaceae juss. **Acta Botânica Brasileira**. n.16, p.15-21, 2002.

RODRIGUES, A.M.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do Cloreto de Sódio na Produção de Proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação Semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.57-62, jan, abr, 2001.

SACHS, L. G. **Vinagre**. Fundação Faculdades “Luiz Meneghel”. Bandeirantes – PR, 23p. 2001.

SALTON, M. A.; DAUDT, C. E.; RIZZON, L. A. Influência do dióxido de enxofre e cultivares de videira na formação de alguns compostos voláteis e na qualidade sensorial do destilado de vinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.302-308. Dez., 2000.

SANTIN, A.P. **Estudo da secagem e da inativação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Florianópolis.

SANTOS, F.S.; FIGUÊIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J. de M. Isotermas de adsorção de umidade de farinhas de mandioca temperadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.6, n.2, p.149-155, 2004.

SAWAYA, W.N., KHATCHADOURIAN, H.A., SAFI, W.N., AL-HAMMAD, H.M. Chemical characterization of prickly pear pulp (*Opuntia ficus-indica* Mill), and the manufacturing of prickly pear jam. **Journal of Food Technology**. n.18, p.183-193. 1983.

SEPÚLVEDA, E., SAÉNZ, C. Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* Mill) pul, **Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos**. n.30, p.551-555. 1990.

SCHEINVAR, L. Cactáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí. 1985.

SILVA, F.L.H. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua extrativa**. 1998. 162f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

SILVA, M.E. da. **Estudos cinéticos da fermentação alcoólica da produção de vinho e da fermentação acética de produção de vinagre de vinho de caju**. 2004. 96f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

SILVA, M.E.; TORRES NETO, A.B.; SILVA, W.B.; SILVA, F.L.H.; SWARNAKAR, R. Cashew wine vinegar production: Alcoholic and acetic fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.24, n.2, p.163-169, April-June, 2007.

SOLES, R. M., OUGH, C.S., KUNKEE, R.E. Esters concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.33, n.2, p.94-98, 1982.

SUHET, M.I. **Enriquecimento protéico do resíduo da industrialização do abacaxi (*Ananas comosus* Merrill) por fermentação: utilizando fungos filamentosos**. 1997. 82f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SUOMALAINEN, H; NIKANEN, L.; ERIKSSON, K. Composition and consumption of alcoholic beverages – A review. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.25, n.4, p.179-187, 1974.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais** – Boletim técnico Nº 5.2. Porto Alegre: UFRGS, Catalogação Internacional na Publicação, p.21 e 89-95, 1995.

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

VOGT, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis**. 2.ed. Tradução por: Jaime Esain Escobar. Zaragoza: Acribia, 1984. 293p.

YANG, S.S. Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid-state fermentation. *Biotechnology Bioengineering*, v.32, p.886-890, 1988.

YOKOYA, F. **Fabricação de aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, 1995. 92p. (Série Fermentações industriais, n.2)

Apêndice A

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS – Método de DNS

Inversão da sacarose (ART)

Em um tubo de ensaio, colocou-se 1mL da amostra diluída + 1mL de HCl 2N. Aqueceu-se a 100°C por 5 minutos. Resfriou-se e depois neutralizou-se a amostra com 3mL de NaOH 1N.

Logo após a inversão da sacarose na amostra diluída, seguir a metodologia a partir do ponto 7 da curva padrão.

Soluções reagentes

Solução 1 - Preparo de 250 ml de NaOH 2N

1. Pesar 20g de NaOH PA, em becker de 250 mL
2. Dissolver com 100 mL de água destilada em banho com água fria
3. Aferir em balão volumétrico de 250 mL com água destilada

Solução 2 - Preparo de 250 ml de DNS

1. Pesar 2,5g de DNS (ácido 3,5 – dinitro-salicílico) e adicionar 50 mL de NaOH 2N, em becker de 500 mL
2. Pesar 75g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolver em 125 mL de água destilada. Agitar sob aquecimento até dissolver total
3. Adicionar à solução A na solução B sob aquecimento até dissolver completamente
4. Deixar esfriar
5. Aferir em balão de 250 mL com água destilada
6. Armazenar a solução em frasco escuro sob condições mínimas de luz.

Curva padrão

1. Pesar 100 mg (0,1 g) de glicose ou frutose
2. Dissolver em 100 ml de água destilada em balão volumétrico
3. Homogeneizar vigorosamente
4. Transferir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ml da solução-mãe para tubos de ensaio
5. Completar o volume a 10 ml com água destilada
6. Homogeneizar
7. Transferir 1ml para tubos com 1 ml de DNS (em duplicata)
8. Homogeneizar

9. Aquecer os tubos a 100°C por cinco minutos, não colocar os tubos antes de aquecimento vigoroso do banho
10. Esfriar com água a temperatura ambiente por 5 minutos
11. Completar com 8 ml de água destilada
12. Homogeneizar
13. Ler a 540 nm.

Análise das amostras

1. É necessário determinar a quantidade inicial de amostra que resulte em leitura dentro da faixa padrão. As diluições necessárias devem ser usadas no cálculo do teor de açúcares da amostra.
2. Agitar até perfeita homogeneização, 10 minutos em agitador magnético
3. Filtrar com gaze.
4. Fazer a inversão da sacarose.
5. Seguir procedimento para curva padrão a partir do ponto 7.
6. Usar a curva padrão para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitros de solução.
7. Efetuar os cálculos para expressar os resultados em miligramas por grama de amostra inicial (mg açúcares / g de amostra).

Tabela A1 – Dados experimentais das isotermas de adsorção nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C para o mandacaru.

	25°C		30°C		35°C		40°C	
	a_w	X_{eq}	a_w	X_{eq}	a_w	X_{eq}	a_w	X_{eq}
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,141	0,0179	0,1800	0,0280	0,1250	0,0205	0,1630	0,0214	0,0214
0,157	0,0207	0,2440	0,0461	0,2520	0,0795	0,2270	0,0612	0,0612
0,283	0,0431	0,3610	0,0870	0,3550	0,0719	0,3470	0,0785	0,0785
0,394	0,0848	0,4120	0,0833	0,4220	0,0770	0,4190	0,0784	0,0784
0,439	0,1038	0,5150	0,1028	0,5120	0,1059	0,5080	0,1050	0,1050
0,459	0,1021	0,550	0,140	0,5670	0,1230	0,5620	0,1240	0,1240
0,584	0,1285	0,5830	0,1234	0,5770	0,1243	0,5780	0,1273	0,1273
0,653	0,1448	0,6580	0,1452	0,6450	0,1424	0,6360	0,1436	0,1436
0,682	0,1627	0,7020	0,1890	0,6980	0,1608	0,6910	0,1558	0,1558
0,702	0,1601	0,7120	0,1641	0,7200	0,1666	0,7130	0,1709	0,1709
0,762	0,1884	0,7960	0,2422	0,8050	0,2159	0,8000	0,2205	0,2205
0,79	0,2081	0,8430	0,2923	0,8470	0,2614	0,8420	0,2687	0,2687
0,832	0,2342	0,8680	0,3356	0,8710	0,3107	0,8680	0,3164	0,3164
0,885	0,3032	0,8920	0,3910	0,8920	0,3593	0,8900	0,3675	0,3675

Tabela A2 – Dados experimentais de proteína bruta e aumento protéico, em relação à amostra *in natura*, durante a fermentação semi-sólida do mandacaru com o *Aspergillus niger*.

Tempo (h)	Proteína bruta (%)						
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
<i>in natura</i>	15,64	13,13	13,13	13,13	13,13	13,13	13,13
0	17,58	14,88	15,65	14,60	13,18	13,19	13,20
32	23,18	18,76	22,94	15,85	13,35	13,95	14,06
48	26,34	17,99	19,55	21,37	16,46	14,71	14,66
72	27,67	17,39	19,41	18,52	17,33	19,52	17,01
	Aumento Protéico (%)						
0	12,40	13,33	19,19	11,20	0,38	0,46	0,53
32	48,23	42,89	74,76	20,72	1,66	6,24	7,07
48	68,41	37,03	48,89	62,74	25,38	22,07	11,65
72	76,92	32,45	47,83	41,05	31,99	48,67	29,55

Apêndice A

Tabela A3 – Análise de variância para aumento protéico para o tempo de 32 horas.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	4.454,41	4	1.113,60	131,17
Resíduo	16,98	2	8,49	-
Total	4.471,39	6	-	-
R ²	99,62%	-	-	-

Tabela A4 – Análise de variância para proteína bruta para o tempo de 32 horas.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	107,66	4	26,90	179,33
Resíduo	0,29	2	0,15	-
Total	107,95	6	-	-
R ²	99,73%	-	-	-

Tabela A5 – Análise de variância para proteína bruta para o tempo de 48 horas.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	101,83	4	25,46	24,25
Resíduo	2,10	2	1,05	-
Total	103,93	6	-	-
R ²	97,98%	-	-	-

Tabela A6 – Análise de variância para proteína bruta para o tempo de 72 horas.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	79,37	4	19,84	10,61
Resíduo	3,73	2	1,87	-
Total	83,10	6	-	-
R ²	95,50%	-	-	-

Tabela A7 – Dados da cinética de fermentação alcoólica do reator 1.

T (h)	Temp. (°C)	pH	Acidez (g/100mL)	SST (°Brix)	Etanol (°GL)	Etanol (g/L)	ART(g/L)	X (g/L)
0	20,0	4,58	0,15	13,00	0	0,00	121,50	3,50
2	23,5	4,44	0,21	12,80	0,51	4,03	116,10	3,90
4	25,5	4,36	0,24	12,00	1,60	12,63	109,70	4,65
6	27,0	4,26	0,18	11,00	2,65	20,92	96,10	4,85
8	28,5	4,09	0,24	10,00	3,88	30,63	70,60	6,00
10	30,0	3,96	0,27	8,00	6,60	52,11	47,90	7,85
12	30,5	3,84	0,24	6,00	8,14	64,27	21,00	9,75
14	30,5	3,89	0,3	4,00	7,76	61,27	4,10	11,30
16	29,0	3,95	0,24	4,00	7,76	61,27	2,40	10,10
18	29,0	3,85	0,27	10,75	7,76	61,27	65,50	10,60
20	29,0	3,84	0,3	9,50	7,76	61,27	47,20	11,70
23	29,5	3,86	0,33	7,00	7,76	61,27	28,50	12,45
27	30,5	3,81	0,3	5,60	10,4	82,11	7,10	14,00
31	29,0	3,89	0,3	5,60	10,4	82,11	3,20	13,65
47	28,0	3,89	0,3	5,60	10,4	82,11	3,00	11,90

Tabela A8 – Dados da cinética da fermentação alcoólica do reator 2.

T (h)	Temp. (°C)	pH	Acidez (g/100mL)	SST (°Brix)	Etanol (°GL)	Etanol (g/L)	ART(g/L)	X (g/L)
0	20,0	4,56	0,18	13,00	0,00	0,00	118,10	3,70
2	23,5	4,45	0,17	13,00	0,51	4,03	113,90	4,00
4	25,5	4,36	0,18	12,00	1,60	12,63	111,40	4,50
6	27,0	4,28	0,27	11,50	2,65	20,92	95,10	4,85
8	28,5	4,09	0,3	10,00	3,88	30,63	73,10	5,65
10	30,0	3,98	0,24	8,00	5,90	46,58	51,30	7,15
12	30,5	3,86	0,27	6,00	8,14	64,27	25,50	8,90
14	30,5	3,88	0,24	4,00	7,76	61,27	6,20	10,95
16	29,0	3,95	0,21	4,00	7,76	61,27	1,80	10,45
18	29,0	3,84	0,27	10,25	7,76	61,27	61,00	10,85
20	29,0	3,84	0,24	9,00	7,76	61,27	45,20	11,70
23	29,5	3,86	0,33	7,00	7,76	61,27	25,00	13,15
27	30,5	3,83	0,30	5,50	10,4	82,11	4,80	14,10
31	29,0	3,90	0,27	5,50	10,4	82,11	3,40	13,20
47	28,0	3,89	0,3	5,50	10,4	82,11	2,30	12,45

Tabela A9 – Valores médios dos dados da cinética da fermentação alcoólica do reator 1 e 2.

T (h)	Temp. (°C)	pH	Acidez (g/100mL)	SST (°Brix)	Etanol (°GL)	Etanol (g/L)	ART(g/L)	X (g/L)
0	20,0	4,57	0,17	13,00	0,00	0,00	119,80	3,60
2	23,5	4,45	0,19	12,90	0,51	4,03	115,00	3,95
4	25,5	4,36	0,21	12,00	1,60	12,63	110,55	4,58
6	27,0	4,27	0,23	11,25	2,65	20,92	95,60	4,85
8	28,5	4,09	0,27	10,00	3,88	30,63	71,85	5,83
10	30,0	3,97	0,26	8,00	6,25	49,35	49,60	7,50
12	30,5	3,85	0,26	6,00	8,14	64,27	23,25	9,33
14	30,5	3,89	0,27	4,00	7,76	61,27	5,15	11,13
16	29,0	3,95	0,23	4,00	7,76	61,27	2,10	10,28
18	29,0	3,85	0,27	10,5	7,76	61,27	63,25	10,73
20	29,0	3,84	0,27	9,25	7,76	61,27	46,20	11,70
23	29,5	3,86	0,33	7,00	7,76	61,27	26,75	12,80
27	30,5	3,82	0,30	5,55	10,40	82,11	5,95	14,05
31	29,0	3,90	0,29	5,55	10,40	82,11	3,30	13,43
47	28,0	3,89	0,3	5,55	10,40	82,11	2,65	12,18

Tabela A10 – Dados da cinética de fermentação acética do reator 1.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Acidez total (%)	Acidez Fixa (%)	Acidez volátil (%)	Etanol (%)
0	26,5	2,10	0,11	1,99	6,48
4	27,2	2,10	0,11	1,99	6,00
8	27,5	2,16	0,11	2,05	6,00
24	27,0	2,16	0,11	2,05	5,08
48	27,0	2,10	0,11	1,99	4,62
72	28,2	2,21	0,09	2,12	3,94
96	28,2	2,73	0,09	2,64	3,08
144	28,5	4,06	0,06	4,00	0,60

Tabela A11 – Dados da cinética de fermentação acética do reator 2.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Acidez total (%)	Acidez Fixa (%)	Acidez volátil (%)	Etanol (%)
0	26,7	2,07	0,11	1,96	6,48
4	27,5	2,22	0,11	2,11	5,76
8	27,5	2,07	0,11	1,96	5,76
24	27,0	2,07	0,11	1,96	5,08
48	27,0	2,16	0,11	2,05	4,16
72	28,0	2,47	0,09	2,38	3,72
96	28,2	3,12	0,09	3,03	2,46
144	28,2	4,37	0,06	4,31	0,40

Apêndice A

Tabela A12 – Valores médios dos dados da cinética de fermentação acética do reator 1 e 2.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Acidez total (%)	Acidez Fixa (%)	Acidez volátil (%)	Etanol (%)
0	26,60	2,09	0,11	1,98	6,48
4	27,35	2,16	0,11	2,05	5,88
8	27,50	2,12	0,11	2,01	5,88
24	27,00	2,12	0,11	2,01	5,08
48	27,00	2,13	0,11	2,02	4,39
72	28,10	2,34	0,09	2,25	3,83
96	28,20	2,93	0,09	2,84	2,77
144	28,35	4,22	0,06	4,16	0,50

Tabela A13 – Dados da cinética de fermentação acética do reator 3.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Acidez total (%)	Acidez Fixa (%)	Acidez volátil (%)	Etanol (%)
0	26,0	1,19	0,11	1,08	7,50
5	26,0	1,13	0,11	1,02	--
24	26,0	1,19	0,11	1,08	6,50
48	26,0	1,36	0,11	1,25	--
72	27,0	1,59	0,11	1,48	5,32
96	28,5	1,93	0,11	1,82	--
120	28,0	2,16	0,11	2,05	3,10
144	27,5	2,95	0,11	2,84	2,04
168	27,0	3,41	0,09	3,32	--
192	27,0	3,75	0,09	3,66	1,62
216	27,0	4,09	0,09	4,00	1,00
240	27,0	4,52	0,09	4,43	0,50

Tabela A14 – Dados da cinética de fermentação acética do reator 4.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Acidez total (%)	Acidez Fixa (%)	Acidez volátil (%)	Etanol (%)
0	26,0	1,16	0,11	1,05	7,74
5	26,0	1,22	0,11	1,11	--
24	26,0	1,22	0,11	1,11	6,50
48	26,0	1,28	0,11	1,17	--
72	27,0	1,56	0,11	1,45	5,32
96	28,7	2,04	0,11	1,93	--
120	28,0	2,16	0,11	2,05	3,10
144	27,5	2,78	0,11	2,67	2,04
168	27,0	3,18	0,09	3,09	--
192	27,0	3,41	0,09	3,32	1,62
216	27,0	4,06	0,09	3,97	1,00
240	27,0	4,40	0,09	4,31	0,50

Tabela A15 – Valores médios dos dados da cinética de fermentação acética do reator 3 e 4.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Acidez total (%)	Acidez Fixa (%)	Acidez volátil (%)	Etanol (%)
0	26	1,18	0,11	1,07	7,62
5	26	1,18	0,11	1,07	--
24	26	1,21	0,11	1,10	6,50
48	26	1,32	0,11	1,21	--
72	27	1,58	0,11	1,47	5,32
96	28,6	1,99	0,11	1,88	--
120	28	2,16	0,11	2,05	3,10
144	27,5	2,87	0,11	2,76	2,04
168	27	3,30	0,09	3,21	--
192	27	3,58	0,09	3,49	1,62
216	27	4,08	0,09	3,99	1,00
240	27	4,46	0,09	4,37	0,50