

MARIA CAROLINA SANTOS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE  
SUCO DE MAÇÃ OBTIDO POR LIQUEFAÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof.Dr.Gilvan Wosiacki  
Co-orientador: Prof. Dra. Nelci Catarina Chiquetto Silva

PONTA GROSSA

2006

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

MARIA CAROLINA SANTOS DE OLIVEIRA

### **AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE SUCO DE MAÇÃ OBTIDO POR LIQUEFAÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Univerisdade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

---

Gilvan Wosiacki  
UEPG/PR

---

José Luiz Ferreira da Trindade  
UTFPR/PR

---

Mareci Mendes de Almeida  
UEPG/PR

Ponta Grossa, 27 de janeiro de 2006

A Nossa Senhora Auxiliadora, aos meus pais João e Mariza, meu irmão João Manoel e a pessoa maravilhosa que Deus guardou para mim, Jocelito, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe Nossa Senhora Auxiliadora que por muitos momentos me carregou em seus braços para que pudesse suportar as dificuldades encontradas.

Aos meus pais que nortearam minha vida e me ensinaram que o sabor da conquista é muito melhor quando fazemos algo com o coração e a alma.

Ao meu irmão, que mesmo estando longe, contribui com meu crescimento profissional a cada telefonema dado para pedir sua ajuda.

Ao meu orientador, Profe Gilvan, que guiou meus passos e me mostrou o que é ter dedicação pela pesquisa.

A Nelci, amiga de fé, pela praticidade e pelo profissionalismo que me ensinou durante todo nosso período de convivência.

A Daniani, Denise e Rita, os anjos do laboratório, que sem elas nenhum trabalho de mestrado teria saído.

Aos meus colegas, e em especial Kika, Lu, Helô, Vinícius e Alessandro pela boa convivência e pela força em momentos difíceis.

A UTFPR–Ponta Grossa e meus colegas Maria Helene, Elenise, Denise, Ciro pela ajuda concedida em muitos momentos.

A Jocelito, pelo tempo, carinho, paciência e amor dedicados a mim.

“Ando devagar porque já tive pressa, levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei. Penso que entender a vida seja simplesmente compreender a marcha, ir tocando em frente como um velho boiadeiro tocando a boiada, eu vou tocando os dias pela longa estrada, pela estrada eu vou, estrada eu sou. Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das maçãs. É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é preciso chuva para florir”.

Almir Sater

## RESUMO

A aplicação do conceito da tecnologia limpa visa otimizar o processo de extração para que o máximo de suco seja obtido, diminuir perdas e gerenciando a aplicabilidade do resíduo gerado. A utilização de complexos enzimáticos, constituídos por celulases e pectinases, na extração de suco permite além de modificar características físico-químicas dos produtos, minimizar a geração de resíduos. Estudar o comportamento fermentativo do suco de maçã obtido a partir o conceito da tecnologia limpa, usando a liquefação enzimática, foi o objetivo deste trabalho. As características do processo e dos produtos da liquefação foram comparadas à extração por prensagem. Foi verificado um aumento em 28,43% na acidez total, 28,6% para o nitrogênio total e 39,38% nos compostos fenólicos no suco obtido por liquefação. No bagaço proveniente da liquefação foi obtida uma diminuição de 23,35% de pectina, um aumento no extrato etéreo de 38,3% e não foi verificada diferença estatística entre os valores obtidos para fibra alimentar total. Com a utilização do processo de liquefação enzimática foi verificada uma redução de 19% na quantidade de resíduo úmido gerado, quando comparado ao processo de prensagem. Os sucos provenientes tanto da liquefação enzimática quanto da prensagem foram submetidos à fermentação, em condições padrão de temperatura e tempo, sendo analisada a cinética de produção de biomassa, etanol, formação dos compostos voláteis do aroma e o consumo de açúcares redutores totais. A soma dos álcoois superiores foi de 133,6mg.L<sup>-1</sup> e 130,4mg.L<sup>-1</sup> para os fermentados obtidos da liquefação e prensagem, respectivamente. Os teores médios de metanol, resultantes da desmetoxilação da pectina pela atividade da pectinesterase foram de 486,24mg.L<sup>-1</sup> para o fermentado obtido da liquefação e 13,95mg.L<sup>-1</sup> para o fermentado proveniente da prensagem.

Palavras-chave: liquefação, fermentação, álcoois superiores, maçã.

## ABSTRACT

The application of clean technology concept aims to optimize the extraction process in order to obtain maximum juice, to decrease loss and to manage the generated residue applicability. The use of enzymatic complexes, of cellulases and pectinases, during juice extraction process allows to modify physical-chemical characteristics of the products and to minimize residue generation. This work aimed to study the fermentative behavior of apple juice obtained through the use of clean technology concept, called enzymatic liquefaction. Process and liquefaction products characteristics were compared to extraction by pressing. An increase of 28.43% in total acidity, 28.6% in total nitrogen and 39.38% in phenolic compounds was found in the juice obtained by liquefaction. The pomace presented a decrease of 23.35% in pectine, an increase of 38.3% in ether extract and was not observed statistical difference for total alimentary fiber values. By using enzymatic liquefaction process was observed a decrease of 19% of humid residue, when compared to pressing process. The juices obtained by enzymatic liquefaction and pressing process were submitted for fermentation, in defined conditions of temperature and time, when was undertaken the analysis of biomass production kinetics, ethanol, flavor volatile compounds formation and the total sugar reductor consume. The superior alcohol sum for fermented obtained from liquefaction and pressing was  $133.6\text{mg.L}^{-1}$  and  $130.4\text{mg.L}^{-1}$ , respectively. Methanol average levels, resulting from pectin desmetoxilation by pectinesterase activity were  $486.24\text{mg.L}^{-1}$  for liquefaction process and  $13.95\text{mg.L}^{-1}$  for pressing process.

Key words: liquefaction; fermentation; higher alcohol; apple.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PWR37T133 – cultivar codificada de maçã

EM26 – porta-enxerto codificado

F44P4 – cultivar codificada de maçã

lbf – libraforça

$\beta$  – beta

$\alpha$  - alfa

$K_M$  – Constante Michelis-Menten

$NAD^+$  - nicotinamida adenosina difosfato (forma oxidada)

$NADH$  – nicotinamida adenosina difosfato (forma reduzida)

NMP – número mais provável

UFC – unidade formadora de colônia

$\ln$  – logarítmo neperiano



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Modelo da parede celular primária de vegetais.....	18
FIGURA 2 - Detalhes estruturais da fibra de celulose.....	19
FIGURA 3 - Complexo enzimático que degrada a celulose.....	22
FIGURA 4 - Mecanismo da ação das pectinases.....	24
FIGURA 5 - Curvas de nível obtidas para os valores de rendimento.....	50
FIGURA 6 - Curvas de nível obtidas para os valores de sólidos solúveis.....	53
FIGURA 7 - Curvas de nível obtidas para os valores de compostos fenólicos.....	55
FIGURA 8 - Cromatograma de acetatos de alditóis dos açúcares neutros do bagaço proveniente de liquefação.....	66
FIGURA 9 - Cromatograma de acetatos de alditóis dos açúcares neutros do bagaço proveniente de prensagem.....	67
FIGURA 10 - Curvas ajustadas, de produção de biomassa dos mostos obtidos por liquefação e prensagem.....	73
FIGURA 11 - Consumo de açúcares e produção de etanol durante a fermentação alcoólica..	75
FIGURA 12 - Análise por cromatografia em fase gasosa dos compostos voláteis do aroma..	76
FIGURA 13 - Soma dos álcoois superiores para os sucos obtidos por liquefação e prensagem durante a cinética.....	76
FIGURA 14 - Formação de acetaldeído durante a cinética de fermentação.....	81
FIGURA 15 - Teores de acetato de etila determinados durante a fermentação.....	82
QUADRO 1 - Via glicolítica.....	30
QUADRO 2 - Biossíntese de glicerol.....	32
QUADRO 3 - Interrelação metabólica de aminoácidos, ácidos cetônicos, álcoois superiores e ésteres formados durante a fermentação.....	34
QUADRO 4 - Fluxograma de extração do suco por prensagem.....	37
QUADRO 5 - Fluxograma de extração do suco por liquefação.....	38

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação dos aminoácidos segundo sua velocidade de assimilação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
TABELA 2 - Região do domínio do modelo experimental.....	44
TABELA 3 - Planejamento experimental em estrela com ponto central.....	44
TABELA 4 - Resultados obtidos com planejamento em estrela.....	46
TABELA 5 - Efeitos principais e secundários dos fatores temperatura e concentração da enzima, para as variáveis rendimento, sólidos solúveis e compostos fenólicos.....	47
TABELA 6 – Resultados da modelagem matemática dos dados de rendimento.....	48
TABELA 7 – Coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão dos dados de rendimento....	48
TABELA 8 – Análise de variância dos dados de rendimento.....	49
TABELA 9 – Resultados da modelagem matemática para os valores de sólidos solúveis.....	51
TABELA 10 - Coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão para os valores de sólidos solúveis.....	51
TABELA 11 - Análise de variância para os valores de sólidos solúveis.....	52
TABELA 12 – Resultados para os compostos fenólicos a partir da modelagem matemática..	54
TABELA 13 – Coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão.....	54
TABELA 14 – Análise de variância dos dados.....	55
TABELA 15 - Resultados de rendimento, sólidos solúveis e compostos fenólicos obtidos em estudo cinético.....	57
TABELA 16 - Características de qualidade dos sucos de maçã.....	59
TABELA 17 - Características de qualidade dos bagaços.....	63
TABELA 18 – Tempos de retenção para os padrões de açúcares neutros convertidos em acetatos de alditóis.....	68
TABELA 19 - Composição dos fragmentos principais dos padrões dos açúcares neutros.....	68

TABELA 20 - Composição dos fragmentos principais dos açúcares neutros para os bagaços obtidos por prensagem e liquefação.....	69
TABELA 21 - Quantificação dos açúcares neutros presentes nos bagaços obtidos por prensagem e liquefação.....	69
TABELA 22 - Perfil microbiológico do bagaço liquefeito transformado em farinha.....	72
TABELA 23 - Evolução dos álcoois superiores no processo fermentativo com mosto obtido por liquefação.....	77
TABELA 24 - Evolução dos álcoois superiores no processo fermentativo com mosto obtido por prensagem.....	77
TABELA 25 - Valores de metanol obtidos durante a cinética de fermentação dos mostos obtidos por liquefação e prensagem.....	79

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1 CULTIVAR CATARINA.....	16
2.2 PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS.....	17
2.3 LIQUEFAÇÃO ENZIMÁTICA.....	21
2.3.1 Celulases.....	22
2.3.2 Pectinases.....	24
2.4 PRODUÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ.....	25
2.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	27
2.5.1 Produtos formados pelo metabolismo celular.....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 MATERIAL.....	36
4.2 MÉTODOS.....	36
4.2.1 Processos.....	36
4.2.1.1 Obtenção de suco de maçã por prensagem.....	37
4.2.1.2 Obtenção de suco de maçã por liquefação.....	38
4.2.2 Análises.....	39
4.2.2.1 Físico-químicas.....	39
4.2.2.2 Cromatográficas.....	40
4.2.2.3 Estatísticas.....	42
4.2.2.4 Microbiológicas.....	43

4.2.3 Experimentos.....	43
4.2.3.1 Modelagem do processo de extração do suco por liquefação.....	43
4.2.3.2 Obtenção de suco por liquefação em escala piloto.....	45
4.2.3.3 Caracterização dos produtos obtidos por liquefação ou prensagem.....	45
4.2.3.4 Cinética de fermentação e formação de compostos de aroma.....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
5.1 MODELAGEM DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR LIQUEFAÇÃO.....	46
5.1.1 Análises de dados do rendimento.....	47
5.1.2 Análise de dados dos sólidos solúveis.....	50
5.1.3 Análise de dados dos compostos fenólicos.....	53
5.2 OBTENÇÃO DE SUCO POR LIQUEFAÇÃO EM ESCALA PILOTO.....	56
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS OBTIDOS POR LIQUEFAÇÃO OU PRENSAGEM.....	58
5.3.1 Suco.....	58
5.3.2 Bagaço.....	63
5.4 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO E FORMAÇÃO DOS COMPOSTOS DE AROMA.....	73
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A cultura da maçã é uma atividade econômica relevante na Região Sul do país, com repercussão no cenário internacional, contribuindo com cerca de 1,5% da produção mundial. É uma cultura de alta qualidade e, comparada com outros países produtores, o Brasil ocupa a 8ª posição em eficiência, 8ª em infra-estrutura, 26ª no setor econômico e de marketing e 17ª sob um ponto de vista geral (WORLD, 2005).

No Brasil, a produção das frutas visa atender o mercado consumidor *in natura*. Os pomares comerciais, atualmente com plantio adensado de árvores de pequeno porte, são conduzidos de forma a produzir frutas de coloração uniforme, com tamanho e formato adequados e boa aparência. Maçãs que não se apresentam dentro dos padrões são de baixa cotação no mercado consumidor e, por conseqüência, consideradas frutas industriais.

Essas frutas podem representar 30% da produção total, segundo Wosiacki et al. (2002), sendo inicialmente, comercializadas com baixo preço e/ou destinadas à alimentação animal. Porém com o aumento da produção, unidades industriais classificadoras foram reconvertidas e passaram a processá-las agregando valor, já que na composição do custo industrial do produto final 25% é derivado da matéria prima (SILVA, 2004).

Segundo Wosiacki et al. (2002), cerca de 2/3 dos frutos rejeitados como frutas para consumo *in natura* ainda são adequados para o processamento. Após esses frutos passarem pela segunda etapa de seleção, onde são descartados aqueles portadores de doenças ou mesmo apodrecidos, recebem a denominação de maçãs industriais.

Parte da industrialização de maçãs está relacionada à produção de suco, que tem apresentado demanda nos últimos anos. Os resíduos gerados por essa industrialização necessitam de um gerenciamento adequado, preconizado pela Organização das Nações Unidas, a fim de minimizar o impacto ambiental (GIORDANO, 2002).

A moderna gestão agroindustrial preconiza uma tecnologia limpa com o gerenciamento adequado dos resíduos produzidos em meio agrícola e nas indústrias derivadas. De modo a se adequar várias propostas emergentes à proteção ambiental e a lançar um novo desafio às indústrias processadoras de frutas frescas no Brasil, torna-se necessária a minimização de resíduos agroindustriais (SCHEMIN, 2003).

Uma tecnologia limpa aplicada ao processamento de suco de maçã pode visar à minimização da produção de bagaço, ou seja, otimizar o processo para que o máximo de suco seja extraído, diminuindo as perdas do processo, bem como a utilização desse resíduo que tem se tornado um problema mundial, para obtenção de produtos com maior valor agregado. A introdução de um sistema enzimático de extração de suco de maçã minimiza expressivamente a eliminação de resíduos sólidos de natureza pécica, responsável pela elevada retenção de água nos sistemas de extração convencionais (ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE; AMANTE, 2002).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CULTIVAR CATARINA

A cultivar (cv.) Catarina se originou do cruzamento FUJI x PWR37T133 efetuado na Estação Experimental de Caçador (SC), em 1982. As sementes dos frutos oriundos deste cruzamento foram enviadas para serem semeadas na Estação Experimental de São Joaquim (SC). Após uma série de avaliações quanto a sua aptidão com relação à resistência à sarna, as plântulas resistentes foram inseridas sobre o porta-enxerto EM26, para acelerar a frutificação e avaliar as características agronômicas. Dentre estas pré-seleções foi selecionada a cultivar EPAGRI 402-Catarina, denominada até então F44P4 (BONETTI et al., 1996).

No campo, esta cultivar tem sido mantida sem tratamentos com fungicidas por mais de dez anos e nunca foi observada a presença de lesões de sarna (*Venturia inaequalis*), tanto nas folhas quanto nos frutos. Durante este período também se observou que a planta apresenta uma boa resistência ao oídio (*Podosphaeria leucotricha*), mas mostrou ser suscetível à podridão branca causada por *Botryosphaeria dothidea* (BONETTI et al., 1996).

A planta apresenta uma boa brotação e formação dos órgãos frutíferos com alto potencial de produção e de qualidade dos frutos. Tem melhor adaptação climática do que a cultivar Fuji na região de São Joaquim (1.400m de altitude) com uma exigência média de frio hibernal. O período de floração ocorre entre a segunda quinzena de setembro e a primeira quinzena de outubro, a maturação ocorre entre a segunda quinzena de março até início de abril, coincidindo com a variedade Fuji (BONETTI et al., 1996).

Os frutos são de tamanho médio a grande, com peso entre 180 a 200 gramas, de formato arredondado cônico. A coloração da epiderme é vermelha rajada com fundo verde-amarelado, a polpa é esbranquiçada, suculenta e um pouco mais firme que a da variedade Fuji e os frutos



podem ser conservados em câmara frigorífica por até oito meses. Os sólidos solúveis totais podem chegar até 17,3%, o grau de acidez total titulável de até 4,9 g.L<sup>-1</sup> em ácido málico e a firmeza da polpa fica em torno de 17,9 lbf.cm<sup>-2</sup> (BONETI et al., 1996).

Czelusniak et al. (2003) analisaram o suco clarificado da variedade Catarina, safra 2001/2002, determinando acidez total titulável e açúcares redutores totais com concentração de 3,4g.L<sup>-1</sup> e 127,0 g.L<sup>-1</sup>. Na classificação que relaciona acidez total titulável e compostos fenólicos, a cultivar Catarina foi colocada entre as variedades amargas e doces.

## 2.2 PAREDE CELULAR DE VEGETAIS

A estrutura celular consiste em uma parede com uma composição que varia na mesma fruta durante o amadurecimento, composta por um complexo de celulose e hemicelulose em uma proporção de aproximadamente 57%. Há também uma quantidade de pectina com alto grau de esterificação, um fator decisivo para a firmeza da fruta. O citoplasma, estratificado na parede celular, contém o núcleo, os plastídios, as enzimas, os fatores de crescimento e os vacúolos, nos quais estão dissolvidos os açúcares, ácidos, sais, polifenóis e pigmentos (LANZARINI; PIFFERI, 1989).

A parede celular é uma estrutura rígida que delimita o tamanho do protoplasto, evitando a ruptura da membrana plasmática quando ocorre turgidez devido à captação de água pela célula. Determina a forma da célula, a textura do tecido e a forma final do órgão vegetal. Apresenta funções específicas e essenciais, sendo uma estrutura dinâmica, cuja forma, composição e propriedades são constantemente alteradas em resposta ao crescimento, diferenciação, ambiente e atividades da célula. Parede celular primária é o termo usado para denominar a parede celular das plantas em crescimento, as células de tecidos vegetais suculentos e as células parenquimáticas de folhas e frutos (MARCON, 2004). De acordo com Reid et al. (1999), a parede primária das

dicotiledôneas é composta de cerca de 95% de polissacarídeos e 5% de glicoproteína, com pequenas quantidades de ésteres de metila, acetila e feruloíla.

De acordo com Capek, Renard e Thibault (1995), a parede celular de plantas compreende um complexo de polímeros tais como polissacarídeos, proteínas e lignina mutuamente conectados em uma estrutura rígida. A estrutura química da porção de carboidratos da parede celular já foi em grande parte estabelecida, mas pouco se sabe das ligações cruzadas que mantêm os polímeros da parede celular unidos. A arquitetura é descrita como um esqueleto de celulose e hemiceluloses em ligações cruzadas, imersas em uma matriz de substâncias pécticas e reforçadas com proteínas estruturais e substâncias aromáticas (ALBERSHEIM; DARVILL; O'NEILL, 1996). O modelo, mais aceito para a parede celular primária de vegetais é apresentado na FIGURA 1.

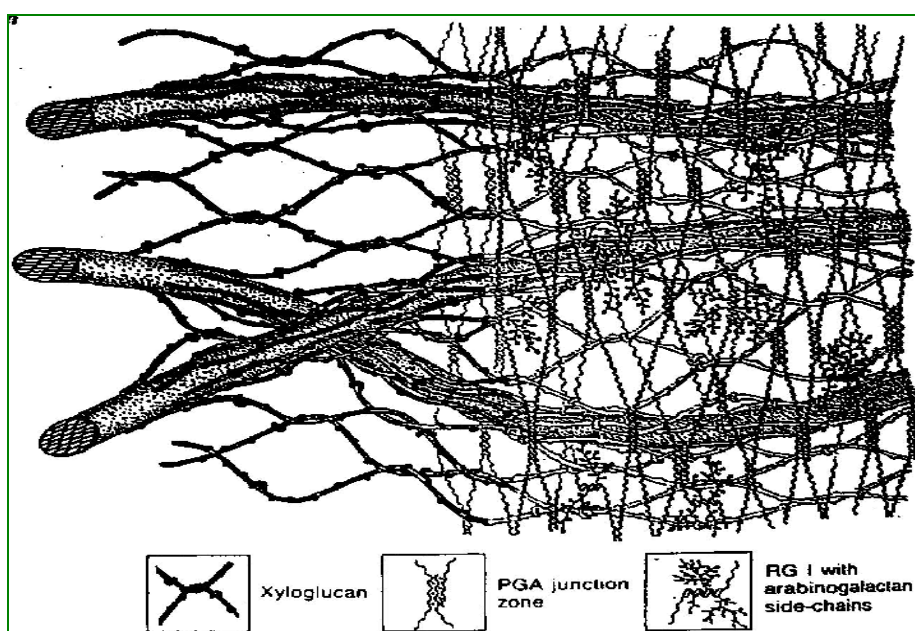


FIGURA 1 - Modelo da parede celular primária de vegetais.  
Fonte: (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

A celulose, polissacarídeo das paredes celulares de plantas é abundante em parede secundária e corresponde à cerca de 20-30% da massa seca da maioria das paredes primárias (McNEIL et al., 1984). De acordo com Reid (1997), a análise da celulose mostra que a estrutura primária da molécula é muito simples: uma longa seqüência linear de resíduos de D-glucose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). O grau médio de polimerização de celulose nas paredes secundárias é próximo a 10.000 daltons. Alguns estudos relataram que o grau de polimerização da celulose de parede primária varia de 2.000 a 6.000 resíduos de D-glucose. A cadeia polimérica de celulose é apresentada na FIGURA 2, devido às ligações equatoriais, é linear e, portanto tende a formar cristais. As moléculas de celulose se mantêm unidas por pontes de hidrogênio e outras forças não covalentes formando microfibrilas. Ao longo destas microfibrilas existem regiões cristalinas altamente ordenadas, intercaladas com regiões amorfas, mais abertas (ROBINSON, 1991)

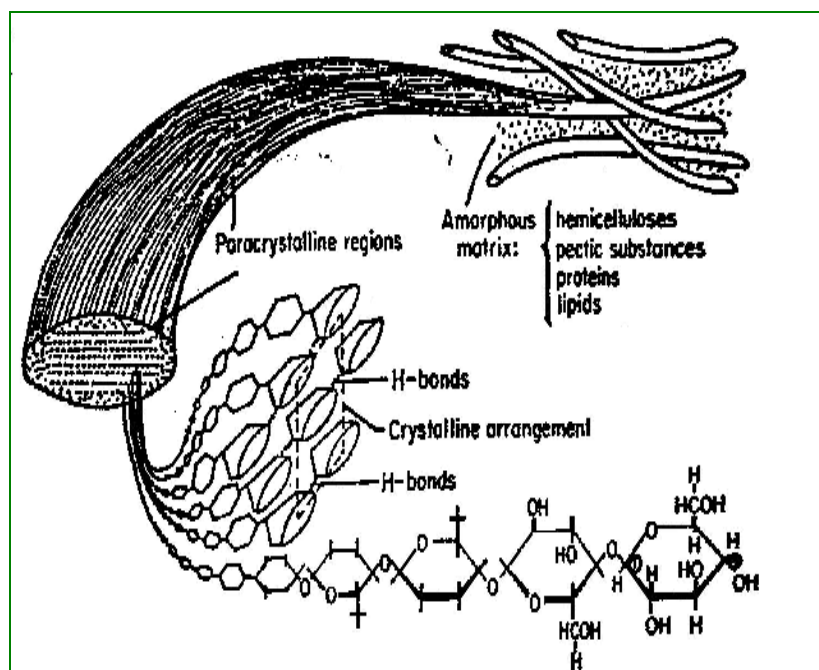


FIGURA 2 - Detalhes estruturais da fibra de celulose. Fonte: (REID, 1997).

Segundo Buckeridge e Tiné (2000), o domínio celulose/hemicelulose tem a função de coordenar a forma celular, pois as hemiceluloses interagem especificamente com a celulose, orientando suas microfibrilas durante o processo de biossíntese e determinando também a orientação do crescimento.

A xiloglucana, uma hemicelulose, corresponde a 20% do peso seco da parede primária das dicotiledôneas e 2% das monocotiledôneas. Apresenta como estrutura básica uma cadeia principal composta de resíduos de D-glucose ligados em  $\beta(1\rightarrow4)$ , sendo ligada uma cadeia lateral de resíduos de D-xilose; em algumas destas cadeias laterais podem estar presentes resíduos de D-galactose e/ou L-fucose (McNEIL et al., 1984).

A parede celular primária contém pequena quantidade de polissacarídeos neutros como arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (VARNER; LIN, 1989).

As homogalacturonanas, junto com a ramnogalacturonanas I (RGI) e ramnogalacturonanas II (RGII), compreendem a maior parte da pectina das dicotiledôneas (Varner; Lin, 1989). Segundo Lanzarini e Pifferi (1989), as substâncias pécticas são heteropolissacarídeos encontrados na lamela média e na parede primária do mesocarpo de frutas polposas, com um peso molecular de 30.000-400.000 daltons e consistem de uma cadeia de  $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-galacturonana parcialmente metoxilada. Um determinado número de resíduos de L-ramnose está ligado pelos carbonos C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> na cadeia principal; cadeias laterais de açúcares neutros, principalmente D-galactose, D-arabinose e D-xilose estão ligadas covalentemente aos carbonos C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> de ácido D-galacturônico ou em carbono C<sub>4</sub> da L-ramnose. O grau de estereificação com metanol varia de acordo com o grau de maturação da fruta (ex.: maçã 85-90%, uva 44-65% e laranja 47-60%).

As proteínas estruturais inseridas na parede agem como elementos de reforço em conjunto com a microfibrilas de celulose (REID et al.,1999). De acordo com Varner e Lin (1989), a proteína estrutural das dicotiledôneas é a extensina, classificada como uma glicoproteína rica em hidroxiprolina. Esta proteína é constituída de cerca de 40% de hidroxiprolina e outros aminoácidos como lisina e serina tem a tirosina envolvida em ligações cruzadas com compostos fenólicos contribuindo para a insolubilidade da proteína na parede (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

### 2.3 LIQUEFAÇÃO ENZIMÁTICA

A parede celular de maçãs consiste de diferentes polissacarídeos, especialmente pectina, hemicelulose e celulose, bem como proteínas estruturais e lignina (DONGOWSKI; SEMBRIES, 2001).

A produção de sucos de frutas e hortaliças envolve a transformação de tecidos sólidos, intactos e organizados em um sistema semifluido de células e fragmentos de paredes celulares suspensas em um líquido celular. No processamento destes sucos, enzimas são usadas para aumentar o rendimento, reduzir o tempo de operação, melhorar a extração de alguns componentes (aroma e cor) e obter uma liquefação parcial ou total do tecido (LANZARINI; PIFERI, 1989). No processamento de suco de maçã a tecnologia enzimática é aplicada para despectinização do suco prensado. Em polpas, é usada para melhorar a etapa de prensagem e em tortas provenientes do primeiro ciclo de prensagem para aumentar o rendimento em suco no segundo ciclo. É também utilizada no tratamento do bagaço de maçã depois de extração com água para melhorar a prensabilidade e a liquefação de polpa (SCHOLS et al., 1991).

De acordo com Grassin e Fauquembergue (1996), o objetivo da liquefação é degradar os polissacarídeos da parede celular a compostos solúveis, em especial ácido D-galacturônico e

açúcares neutros. Na liquefação da polpa, a hidrólise da pectina e celulose juntas é melhorada por atividades de poligalacturonase, pectinaliase, pectinesterase e celulase. A partir do efeito destas enzimas sobre a parede celular, açúcares neutros como D-arabinose, D-galactose, L-ramnose e D-xilose, que estão ligados nas substâncias pécicas, são liberados e se tornam solúveis (ACAR, 1999).

O complexo celulose-xiloglucana representa aproximadamente 57% da matriz da parede celular da maçã. No processo de liquefação da maçã, a degradação eficiente deste complexo é muito importante (GRASSIN; FAUQUEMBERGUE, 1996).

### 2.3.1 Celulases

De acordo com Da Silva, Franco e Gomes (1997), acredita-se que a degradação da celulose requer um complexo enzimático envolvendo quatro enzimas, como apresenta a FIGURA 3.

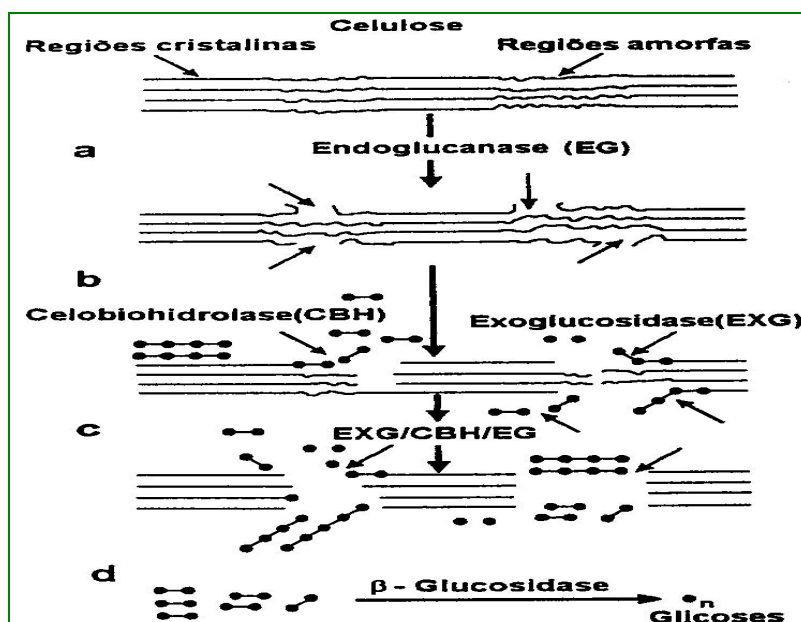


FIGURA 3 - Complexo enzimático que degrada a celulose.  
 Fonte: (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

A endoglucanase (EG), ou endo- $\beta(1\rightarrow4)$ -glucanase (EC 3.2.1.4), catalisa aleatoriamente a hidrólise das ligações internas nas regiões amorfas da molécula liberando celo-oligossacarídeos com vários graus de polimerização e celobioses. Da ação desta enzima resultam terminais livres para a ação da exoglucanase, ou exo- $\beta(1\rightarrow4)$ -glucanase ou celobiohidrolase (CBH) (EC 3.2.1.91), que promove a hidrólise seqüencial da segunda ligação glicosídica a partir da extremidade não redutora da molécula produzindo celobiose. A celobiase, ou  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21), catalisa a hidrólise da celobiose e, numa velocidade menor, degrada também pequenos oligossacarídeos, nos dois casos liberando D-glucose. A remoção das unidades de D-glucose a partir da extremidade não redutora da molécula caracteriza a exoglucosidase (EXG) também chamada de exo- $\beta(1\rightarrow4)$ -glucosidase (EC 3.2.1.74).

No caso da hemicelulose, constituída por vários polímeros formados por diferentes resíduos de açúcares, a degradação completa necessita várias enzimas específicas. A xilanase (EC 3.2.1.8), endo-enzima que degrada aleatoriamente a xilana liberando xilo-oligossacarídeos, hidrolisados a partir da extremidade não redutora, formam resíduos de D-xilose pela ação posterior da  $\beta$ -xilosidase ou exo- $\beta(1\rightarrow4)$ -D-xilosidase (EC 3.2.1.37). A arabinofuranosidase, ou  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase arabinofuranohidrolase (EC 3.2.1.55), catalisa a hidrólise da ligação glicosídica do terminal não redutor nas arabinanas e outros polissacarídeos contendo D-arabinose. A hidrólise das galactomananas e outros polissacarídeos contendo D-galactose é feita pela  $\alpha$ -galactosidase, ou  $\alpha$ -D-galactosidase galactohidrolase (EC 3.2.1.22), e a mananase, também chamada de endo- $\beta(1\rightarrow4)$ -manosidase (EC 3.2.1.78), promove a remoção de D-manose a partir do terminal não redutor das mananas e outros polissacarídeos com resíduos deste açúcar (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

### 2.3.2 Pectinases

Enzimas pectinolíticas misturadas a celulases permitem uma liquefação quase que total de polpa de frutas e hortaliças. Dependendo da matéria prima, sucos podem ser obtidos parcialmente límpidos (mamão, pepino), turvos (pêssego) ou na forma de polpa (maçã, cenoura, damasco) (LANZARINI; PIFFERI, 1989).

As pectinases são classificadas em desmetoxilantes e despolimerizantes de acordo com seus mecanismos de ação, como mostrada na FIGURA 4.

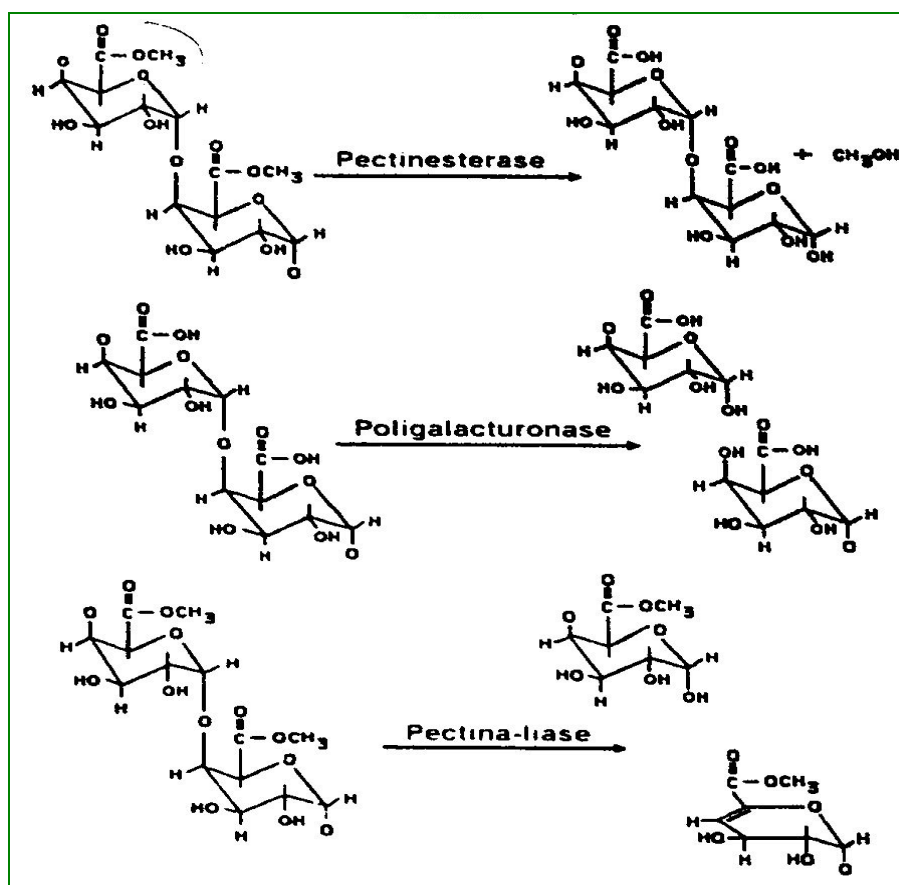


FIGURA 4 - Mecanismo de ação das pectinases.  
Fonte: (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).



A pectinesterase, ou pectina metil-esterase (EC 3.1.1.11), remove os grupos metoxílicos das substâncias pécticas e por isto é classificada como desmetoxilante, e atua sobre a pectina liberando metanol e  $H^+$ . As despolimerizantes são subdivididas em hidrolases e liases. A poligalacturonase (EC 3.2.1.15) hidrolisa de forma aleatória as ligações entre os resíduos de ácidos D-galacturônicos, causando a despolimerização da molécula. As exo-poligalacturonases são divididas em exo-PG-1 (EC 3.2.1.67), que hidrolisa as ligações do ácido poli galacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos D-galacturônicos livres. A exo-PG-2 (EC 3.2.1.82) que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres. A pectina-liase (EC 4.2.2.10) rompe a ligação glicosídica entre os resíduos de ácidos D-galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio dos carbonos das posições  $C_4$  e  $C_5$  do ácido D-galacturônico, degrada pectinas de alta metoxilação. A pectato-liase ou poligalacturonato-liase tem ação similar à pectina-liase, porém atua sobre o substrato desmetoxilado (poligalacturonato) e divide-se em exo-pectato-liase que hidrolisa as ligações do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando principalmente ácidos digalacturônicos insaturados e endo-pectato-liase, que elimina as ligações internas do ácido poligalacturônico, liberando oligogalacturonatos insaturados (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

## 2.4 PRODUÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ

De acordo com Silva (1997), o suco está contido no vacúolo de cada célula parenquimatosa do tecido comestível da maçã. Para extrair o suco é preciso desorganizar os tecidos obtendo-se a polpa composta de paredes celulares e de líquido e existem técnicas distintas, que começaram com o uso do pilão, passaram pelas prensas e chegaram até as enzimas pectinolíticas e celulolíticas.

Na indústria, o método tradicional empregado na extração de suco de maçã inicia pela trituração da fruta em moinhos de martelo e para obtenção de maior rendimento de suco a etapa de trituração da fruta é crucial. Em frutas com estrutura rígida, colhidas durante a safra, pequenas partículas facilitam a prensagem e promovem um elevado rendimento de suco (BINNING; POSSMANN, 1993). Entretanto, em frutas com amadurecimento avançado, oriundas de câmaras de conservação, a prensagem não é eficiente (BUMP, 1989).

Após a moagem, pode ser adicionada a enzima pectinolítica com o objetivo de facilitar a operação de prensagem e prensas hidráulicas do tipo vertical ou horizontal (batelada), esteira (contínua), parafuso (batelada) e pneumática (batelada) são as mais empregadas (NOGUEIRA et al., 2005). A escolha da prensa depende de vários fatores, como: forma de operação, capacidade, custos, rendimento de extração e utilização de auxiliares de prensagem (VICENZI; BILHALVA, 1998). De acordo com Gonçalves (1992), quando a pressão é aplicada sobre a polpa triturada dentro de uma câmara, a falta de volume prejudica a prensagem, dificultando a extração do suco. Assim, são necessários auxiliares de prensagem para dar firmeza á polpa triturada e formar canais no interior da massa, facilitando a drenagem do suco. O uso e quantidade de auxiliares de prensagem são indicados, geralmente, em função do grau de maturação das frutas.

O bagaço resultante segue, muitas vezes, para o descarte e o suco integral obtido, pode ser clarificado através do emprego de enzimas pectinolíticas, quando não foram utilizadas antes da prensagem, da bentonite ativada e da gelatina. A operação de filtração com terras diatomáceas de várias granulometrias deve ser feita para o polimento do produto acabado.

Os métodos de conservação mais empregados para o suco de maçã são a pasteurização aliada à adição de agentes químicos como metabissulfito ou sorbato de potássio e a concentração seguida pela adição de agentes químicos e/ou refrigeração. De acordo com Janzantti, Franco e Wosiacki (2003) as diferentes etapas do processamento do suco de maçã podem causar mudanças

no perfil do aroma do produto final quando comparado com a fruta fresca. O tratamento térmico foi a etapa que mais afetou a composição, causando perda qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis (PÉREDI; VÁMOS-VIGYAXÓL; KISS-KUTZ, 1981).

No Brasil, aproximadamente 200.000 mil ton de maçãs, provenientes do descarte comercial, são processadas por fragmentação e prensagem para obtenção de mosto, para ser transformado em sucos, sidras, vinagres e destilados (PAGANINI et al., 2004).

## 2.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica constitui uma das etapas mais importantes para elaboração de vinhos e bebidas fermentadas, podendo ser conduzida com várias leveduras. Mesmo que, em maior ou em menor quantidade, possa intervir certo número de espécies e inclusive de gêneros de leveduras, o papel principal é desempenhado pela *Saccharomyces cerevisiae* (BARRE et al., 2000). Esta fermentação se desenvolve em condições de parcial anaerobiose (quantidade de oxigênio disponível no meio, no início da fermentação, é inferior a  $10\text{mg.L}^{-1}$  de oxigênio), sendo que o metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* em tais condições é estritamente fermentativo.

Os açúcares consumidos pelas leveduras, durante a fermentação, são exclusivamente a D-glucose e D-frutose. Nestas condições, o transporte destas hexoses até o interior da célula é feito por meio de sistemas caracterizados por uma alta afinidade pela D-glucose ( $K_M = 10$  a  $20\text{mM}$ ) e D-frutose ( $K_M = 50$  a  $70\text{mM}$ ) (SERRANO; DELAFUENTE, 1974). Esta atividade de transporte está regulada pela disponibilidade de nitrogênio assimilável no meio externo e pela atividade de síntese protéica das células: no momento em que a síntese protéica diminui ou pára, é observada uma diminuição do sistema de transporte. Este fenômeno é denominado de inibição catabólica, sendo especialmente acelerado quando existe carência em nitrogênio assimilável no

meio. É considerada muito importante, já que nas condições de elaboração de uma bebida fermentada, esta atividade de transporte representa o principal fator limitante da fermentação alcoólica em fase estacionária: próximo de 50 a 70% da fermentação alcoólica é realizada por células na fase estacionária (SALMON; MAURICIO, 1994). A adição de nitrogênio assimilável durante esta fase, se não for realizada de forma tardia, permite restaurar parcialmente uma atividade de síntese protéica e, conseqüentemente uma reativação dos sistemas transportadores das hexoses, restaurando em parte a atividade fermentativa (BELY; SALMON; BARRE, 1994).

A *Saccharomyces cerevisiae* requer necessariamente as seguintes vitaminas para seu crescimento: biotina, ácido pantotênico, mioinositol e ácido nicotínico. A tiamina é um caso particular já que a levedura, embora seja capaz de sintetizá-la, tem seu crescimento acelerado na presença. O sistema de transporte requer uma atenção particular pela sua rapidez e eficácia: uma população de *Saccharomyces cerevisiae* de  $10^6$  a  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup> pode esgotar a tiamina de um mosto em somente 2 e 12 horas, respectivamente (BATAILLON et al., 1996).

De acordo com Barre et al. (2000), os compostos nitrogenados que podem ser assimilados pelas leveduras são os íons de amônio livres (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), aminoácidos, peptídeos e polipeptídeos pequenos, podendo ser incorporados na célula e posteriormente metabolizados. As diferenças observadas entre as velocidades de absorção dos diversos aminoácidos e do íon amônio, permitem classificar estes compostos em quatro grupos, que se correspondem com velocidades decrescentes, como apresenta a TABELA 1. Existem poucos dados disponíveis sobre o transporte de oligo e polipeptídeos na *Saccharomyces cerevisiae*, sabe-se que numerosos di e tripeptídeos podem ser utilizados pela levedura, assim como certos polipeptídeos com, até cinco resíduos de aminoácidos.

TABELA 1 - Classificação dos aminoácidos segundo sua velocidade de assimilação por *Saccharomyces cerevisiae*.

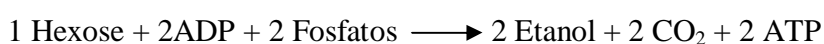
<b>Grupos</b>	<b>Características</b>	<b>Compostos</b>
A	Rapidamente absorvidos	Arginina, Ácido Aspártico, Asparagina, Glutamina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Serina, Treonina e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
B	Lentamente absorvidos	Ácido Glutâmico, Alanina, Histidina, Metionina, Fenilalanina, Valina
C	Absorvidos unicamente após esgotar o mosto em compostos dos grupos A e B	Glicina, Triptofano e Tirosina
D	Absorção parcial ou nula	Prolina

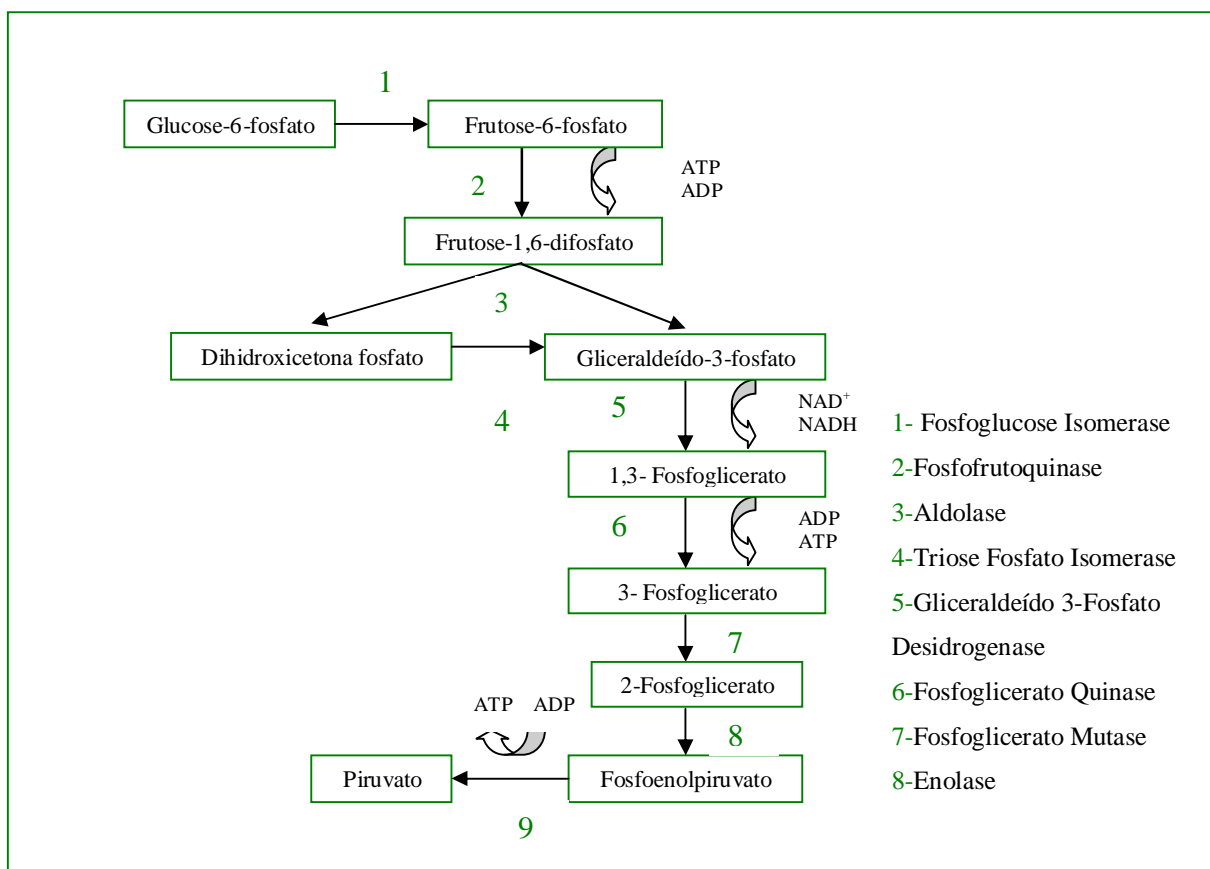
Fonte: (BARRE et al., 2000).

A primeira etapa da fermentação alcoólica, uma vez efetuada a entrada de D-glucose ou de D-frutose na célula, é a fosforilação do açúcar. As enzimas hexoquinase PI e PII são capazes de fosforilar estes açúcares, porém com rendimentos diferentes (razão de 3:1 em favor da D-glucose) enquanto que a glucoquinase fosforila exclusivamente a D-glucose. Estas diferenças explicam por que a D-glucose é consumida a uma velocidade maior que a D-frutose no decorrer da fermentação, e como consequência, ao final da fermentação, a concentração relativa da pentose é mais elevada que a da hexose (D'AMORE; RUSSELL; STEWART, 1989).

O mecanismo metabólico dos açúcares fosforilados é baseado na sua transformação em piruvato através da via clássica da glicólise, como é mostrada na QUADRO 1.

Em anaerobiose, o piruvato está principalmente orientado à produção de etanol para regenerar o cofator NAD<sup>+</sup> consumido ao nível de gliceraldeído-3-fosfato. O piruvato é então descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, depois este é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. O balanço global da fermentação alcoólica é dado pela seguinte equação:





QUADRO 1 - Via glicolítica.

Fonte: (BARRE et al., 2000).

Durante a fermentação alcoólica também são produzidos outros metabólitos fermentativos e biomassa. Sua produção sempre é pequena quando comparada com a quantidade de açúcares convertidos em etanol e gás carbônico (BARRE et al., 2000).

### 2.5.1 Produtos formados pelo metabolismo celular

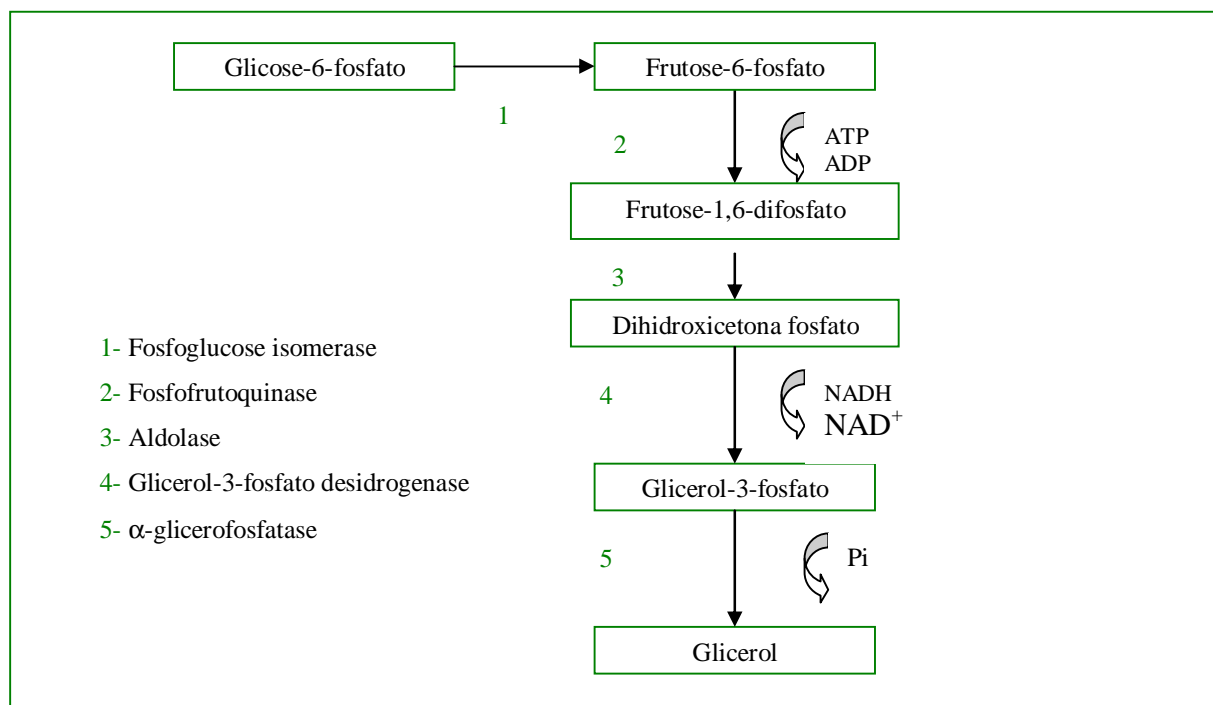
Quando o mosto é inoculado com uma levedura, a produção de etanol não é imediata, certas enzimas essenciais na fermentação alcoólica (piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase I) são induzidas pela D-glucose e não estão em seus níveis máximos no princípio da fermentação alcoólica. Em conseqüência, numerosos compostos além do etanol são formados

no começo da fermentação: glicerol, piruvato, succinato e outros ácidos orgânicos. A síntese dos elementos carbonados (aminoácidos e açúcares) necessários na formação de biomassa é a partir do metabolismo das hexoses e não conduz à formação de etanol. Nestas condições, formam-se numerosos produtos fermentativos a fim de restabelecer o equilíbrio químico na célula (BARRE et al., 2000).

De acordo com Barre et al. (2000), a fase de crescimento e a estacionária são muito distintas. As leveduras durante a fase de crescimento somente se multiplicam durante seis ou sete gerações, gerando assim uma população máxima ao redor de  $120$  a  $130 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para uma inoculação inicial próxima de  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. A fase estacionária representa uma etapa muito importante no processo fermentativo, pois é neste momento em que ocorre grande parte da fermentação alcoólica.

O etanol representa o produto principal da fermentação alcoólica e pode alcançar concentrações extracelulares de até 12 a 14% de volume em fermentação normal. Segundo Dombek e Ingram (1986), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não acumula etanol no interior de seu citoplasma durante a fermentação. O gás carbônico, segundo produto da fermentação alcoólica, tem um rendimento médio de 0,4 a 0,5 gramas de CO<sub>2</sub> por grama de açúcar degradado. Valores de pressão parcial de CO<sub>2</sub> entre 0,15 a 0,2 atmosferas, não afetam o crescimento e a atividade da levedura, mas ao contrário têm efeito estimulante, entretanto, se a pressão for superior aos valores mencionados tanto o crescimento quanto à atividade metabólica são reduzidos (BARRE et al., 2000).

Na biossíntese de glicerol o NADH é oxidado pela redução da dihidroxicetona-fosfato em glicerol-fosfato, que por sua vez é convertido em glicerol, como representado no QUADRO 2.



QUADRO 2 - Biossíntese de glicerol.

Fonte: (BARRE et al., 2000).

O glicerol, depois de produzido, sai da célula por difusão passiva, sendo que sua concentração varia entre 5 e 11 g.L<sup>-1</sup>, sendo dependente da levedura utilizada, (LUYTEN et al., 1995). A sua formação está ligada a produção de succinato e de acetato, compostos cuja síntese está acompanhada de uma produção de NADH (BARRE et al., 2000).

Durante a fermentação alcoólica são formados mais de uma centena de ácidos orgânicos, sendo que sua origem depende principalmente de três vias do metabolismo da levedura. Um determinado número de compostos como acetato, succinato,  $\alpha$ -cetogluturato, malato e citrato derivam diretamente do piruvato pelo funcionamento limitado do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, sendo que estes ácidos orgânicos têm um efeito direto sobre as características organolépticas do produto acabado, e intervêm no valor do pH da bebida fermentada. Outros ácidos orgânicos (ácidos isovalérico e isobutírico) derivam das vias de síntese dos aminoácidos e dos álcoois



superiores. A maioria dos ácidos orgânicos restante é produzido durante a via de síntese dos ácidos graxos, a partir de Malonil-CoA.

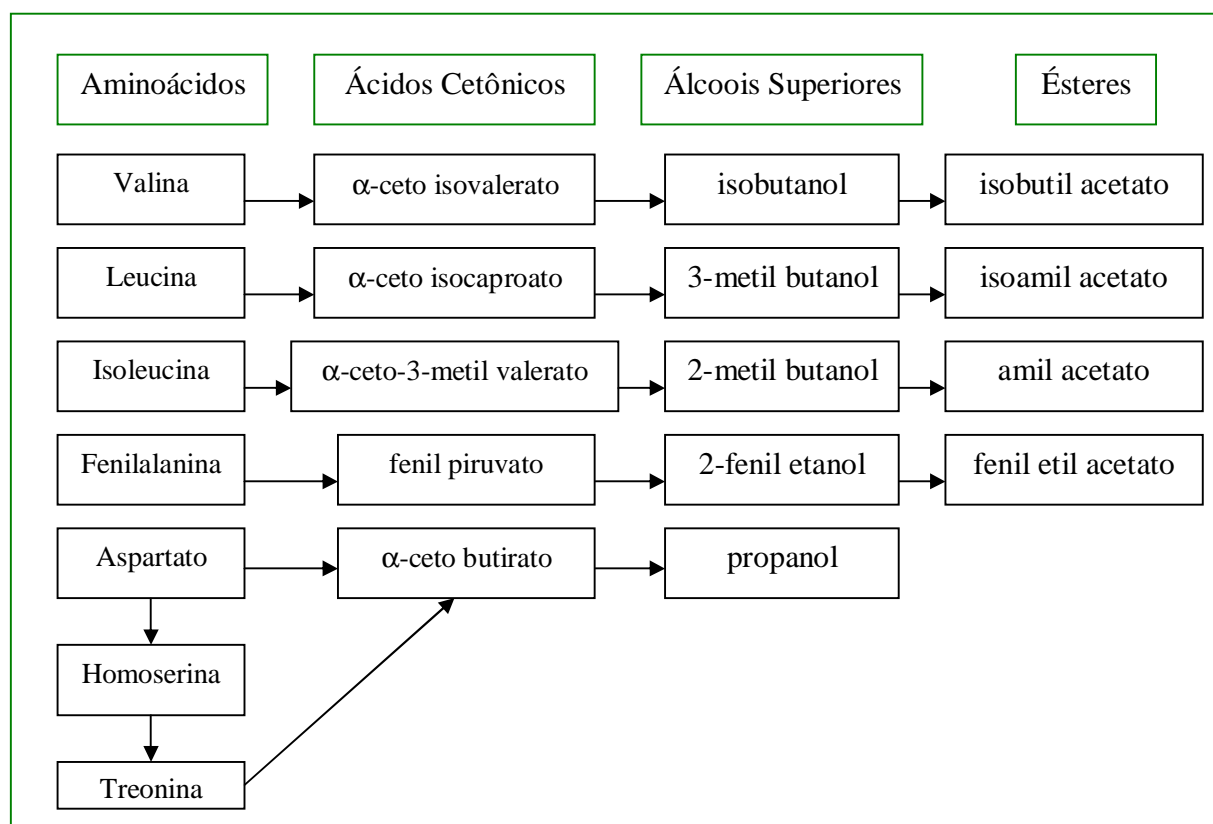
Os principais ácidos graxos produzidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica são os ácidos palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0) e oléico (C18:1). Os ácidos de cadeia carbonada mais curta como ácido caprótico (C6:0), ácido caprílico (C8:1) e ácido cáprico (C10:0) são também produzidos por esta via, embora também possam ser derivados pela oxidação de ácidos graxos de cadeia mais longa. São considerados os precursores dos ésteres, compostos de forte impacto sensorial, que representam o maior grupo de substâncias químicas produzidas na fermentação alcoólica.

A acetoína, um composto produzido pelas leveduras durante a fermentação, intervém no *bouquet* dos vinhos, porém atua como precursor na biossíntese do 2,3-butanodiol e do diacetil. Embora a formação do 2,3-butanodiol possa contribuir ao equilíbrio aromático geral do vinho, a presença de diacetil, pelo contrário, é considerada um defeito sensorial, especialmente devido ao seu odor característico e ao seu alto nível de percepção (DUBOIS, 1994).

A formação de álcoois superiores nos vinhos depende de vários fatores, entre os quais podem ser citados a composição do mosto original (pH, concentração de açúcares, conteúdo de nitrogênio), o tipo de levedura utilizada na fermentação, condições em que ocorre a fermentação como temperatura, o nível de aeração (OUGH, 1996). Os principais álcoois superiores sintetizados durante a fermentação alcoólica são o 1-propanol ou n-propanol, 2-metil-1-propanol ou isobutanol, 2-metil-1-butanol ou álcool amílico ativo e 3-metil-1-butanol ou álcool isoamílico e o feniletanol (BARRE et al., 2000). Os álcoois superiores podem ser produzidos pela levedura a partir de esqueletos carbonados dos aminoácidos, assimilados durante a fermentação alcoólica. O grupamento amina dos aminoácidos é removido por transaminação, e o ácido cetônico correspondente é descarboxilado em aldeído que pode ser reduzido pela álcool desidrogenase

promovendo assim a formação de álcool superior com um carbono a menos que o aminoácido de origem (BARRE et al., 2000). Segundo Dias (1996), o maior percentual de álcoois superiores nos vinhos é formado a partir dos carboidratos e somente uma pequena quantidade é gerada através do mecanismo de Ehrlich (oxidação de aminoácidos seguida de descarboxilação e redução). Barre et al. (2000) também afirmam que duas vias conduzem à biossíntese dos álcoois superiores, sendo uma parte formada pela via catabólica dos aminoácidos (Mecanismo de Ehrlich) e outra parte formada pela via anabólica dos aminoácidos via dos  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes a partir dos açúcares.

O QUADRO 3 demonstra a interrelação metabólica de aminoácidos, ácidos cetônicos, álcoois superiores e ésteres formados durante a fermentação.



QUADRO 3 – Interrelação metabólica de aminoácidos, ácidos cetônicos, álcoois superiores e ésteres formados durante a fermentação.

Fonte: (BARRE et al., 2000).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o processo de fermentação de suco de maçã obtido por liquefação enzimática.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estabelecer as condições dos parâmetros temperatura, tempo e concentração da enzima para maximizar o processo extração do suco por liquefação enzimática.

Obter o suco pelo método da liquefação e caracterizar em termos físico-químicos e cromatográficos os produtos, suco e bagaço.

Obter suco de maçã pelo processo de prensagem tradicional e caracterizar os indicadores físico-químicos e cromatográficos do suco e bagaço.

Analisar o comportamento cinético de fermentações de mostos preparados por prensagem e por liquefação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Maçãs da cultivar Catarina, safra 2003/2004 e 2004/2005, cedidas pela Estação Experimental de São Joaquim da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri).

O complexo enzimático comercial Ultrazym AFP-L, fabricado pela NovoZymes do Brasil e cedido por LNF (importadora) de Bento Gonçalves (RS). Enzima pectinolítica Pectinex 100L, da NovoZymes do Brasil. Levedura comercial Lalvin D47 (*Saccharomyces cerevisiae*), da empresa canadense Lallemand.

Os Reagentes químicos e os padrões microbiológicos eram de qualidade P.A ou cromatográfica.

### 4.2 MÉTODOS

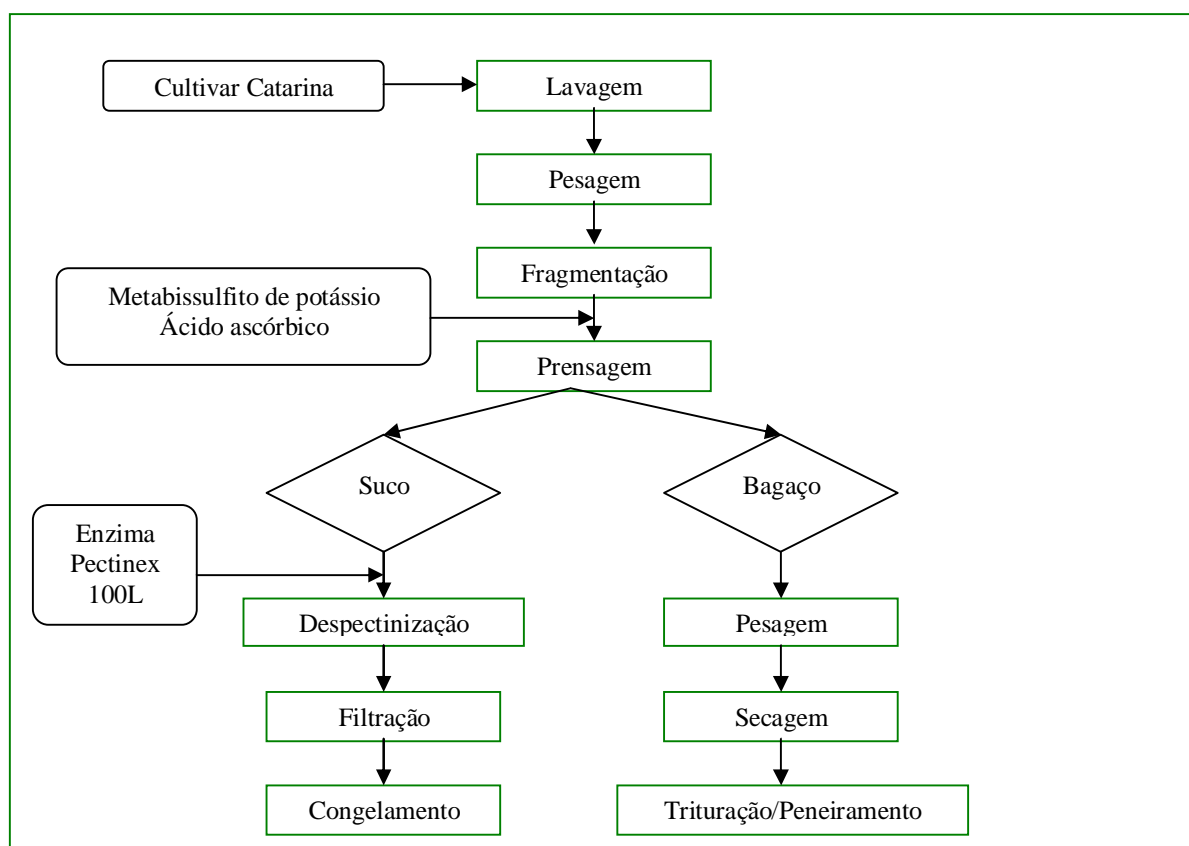
Os métodos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho são descritos a seguir, e compreendem os processos para extração de suco por prensagem e liquefação, as análises empregadas para avaliar as características dos produtos e os experimentos realizados.

#### 4.2.1 Processos

Os processos empregados para a extração do suco de maçã compreenderam o método de prensagem utilizando uma enzima pectinolítica e o método da liquefação enzimática que emprega a adição um complexo enzimático diretamente na polpa, sendo a separação feita por centrifugação.

#### 4.2.1.1 Obtenção de suco de maçã por prensagem

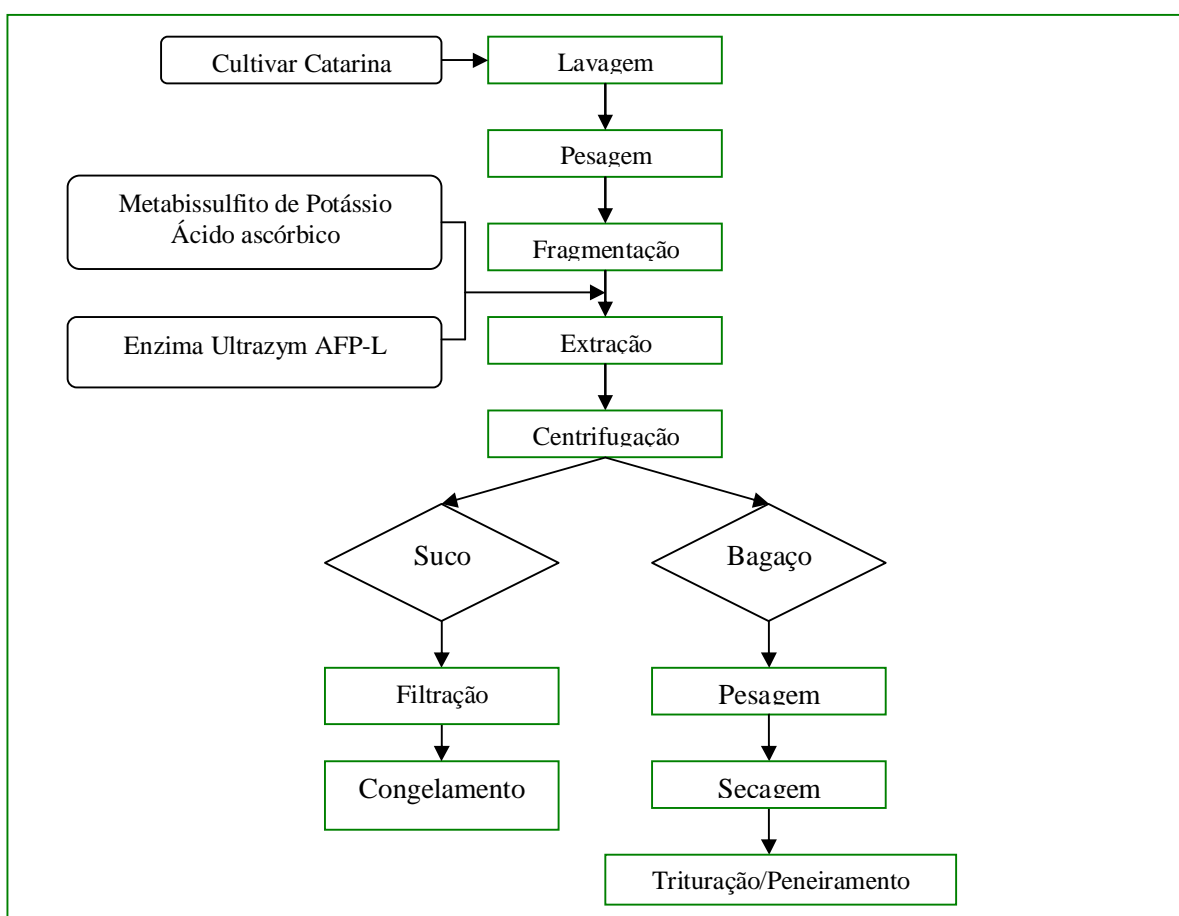
As maçãs, depois de lavadas e pesadas, foram trituradas em multiprocessador doméstico (WALITA) com a menor faca, tendo sido adicionados após esta etapa metabissulfito de potássio ( $100\text{mg.Kg}^{-1}$  de  $\text{SO}_2$  livre) e ácido ascórbico ( $342,5\text{mg.Kg}^{-1}$ ) com a finalidade de obter o efeito antioxidante e inibidor de fermentação. A polpa de maçã foi prensada em equipamento hidráulico marca (SENGER EUREKA), com aproximadamente  $3\text{Kg.f.cm}^{-2}$ . No suco foi adicionada a preparação enzimática Pectinex 100L na concentração de  $0,3\text{mL}$  por litro e, após 2 horas à temperatura ambiente, foi filtrado em papel à pressão atmosférica e congelado. O bagaço, depois de desidratado em estufa de circulação de ar (TECNAL TE 394/1) a  $60^\circ\text{C}$  por 2 dias, triturado e tamisado a 28 MESH foi armazenado em sacos plásticos e mantido em temperatura ambiente. O fluxograma de extração de suco por prensagem é apresentado no QUADRO 4.



QUADRO 4 – Fluxograma de extração do suco por prensagem.

#### 4.2.1.2 Obtenção de suco de maçã por liquefação

As maçãs após, lavadas e pesadas foram fragmentadas em multiprocessador (WALITA) com faca menor, tendo sido adicionado após a fragmentação o metabissulfito de potássio ( $100\text{mg.Kg}^{-1}$  de  $\text{SO}_2$  livre) e ácido ascórbico ( $342,5\text{mg.Kg}^{-1}$ ). O complexo enzimático de liquefação, Ultrazym AFP-L, foi adicionado e o sistema incubado sob agitação e temperatura controlada em banho-maria (DUBNOFF, modelo TE-053) durante o tempo estabelecido no delineamento experimental. O suco foi submetido à separação em equipamento centrífugo (ARNO) durante 20 minutos, depois filtrado em papel sob pressão atmosférica e congelado. O fluxograma de processo a seguir ilustra os procedimentos utilizados para obtenção de suco de maçã pelo método de liquefação.



QUADRO 5 - Fluxograma de extração do suco por liquefação.

## 4.2.2 Análises

### 4.2.2.1 Físico-químicas

O pH foi determinado em potenciômetro digital, marca HANNA Instruments modelo HI 84249 (OUGH e AMERINE, 1988) e a acidez total, titulometricamente de acordo com procedimentos oficiais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Os teores de nitrogênio total foram determinados pelo método de Kjeldahl, e a proteína bruta foi estimada usando o fator 6,25 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

A umidade foi determinada por perda termogravimétrica a 104° C até peso constante e as cinzas, a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Os sólidos solúveis foram determinados por refratometria em equipamento (ABBE modelo WY1A) de bancada respeitada a temperatura de 20° C e expressos em graus Brix (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Os teores de açúcares redutores foram determinados pelo método colorimétrico de Somogy-Nelson (SOMOGY, 1952), os redutores totais, após a hidrólise da sacarose com HCl 1N a 60°C por 5 min, da mesma forma, e os de D-glucose, por técnica enzimática (glucose oxidase) com leitura colorimétrica feita em 520 nm, tendo sido todos os carboidratos expressos como monossacarídeo em g.100 mL<sup>-1</sup> (padrão glucose).

Os teores de compostos fenólicos foram determinados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, tendo sido os resultados expressos em ppm ou mg.L<sup>-1</sup> de catequina.

O extrato etéreo, obtido em extrator de Soxhlet com éter de petróleo, representa o teor de lipídios da amostra após remoção do solvente por evaporação (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

A fibra alimentar total foi determinada por perda gravimétrica após hidrólise enzimática (AOAC, 2000).

Os teores de pectina no bagaço foram determinados após hidrólise dos polissacarídeos da parede celular com HCl 0,05N, precipitação com etanol e saponificação com hidróxido de sódio, e quantificados por medida gravimétrica do ácido péctico precipitado com cloreto de cálcio, e expressos como pectato de cálcio (KERTESZ, 1951).

O etanol foi quantificado por método de dosagem química, Cordebard e o resultado expresso em graus Gay-Lussac (°GL) (SILVA, 1997).

A biomassa seca foi determinada mediante três ciclos de centrifugação a 3400rpm, em centrífuga de laboratório (CELM, modelo COMBATE). O primeiro ciclo foi de 30 minutos, sendo obtida a separação da biomassa a partir de 30 mL de fermentado, e nos dois ciclos seguintes de 10 minutos, foi realizada a lavagem do material depositado no fundo do frasco de centrífuga, com 20 mL de água destilada. Os tubos contendo biomassa foram deixados em estufa para secagem à 60°C até peso constante, e determinada a perda termogravimétrica.

O rendimento em base úmida foi determinado pela diferença de peso entre a polpa inicial e o bagaço úmido final.

#### 4.2.2.2 Cromatográficas

Os compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa (PERKIN ELMER modelo AutoSystem XL) utilizando coluna capilar Varian com fase estacionária de polietileno glicol de alta polaridade (CPWAX 57CB) com 50 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram 160°C e 210°C, respectivamente. A coluna foi operada em isoterma por 5 minutos a 40°C, seguido de um gradiente de 2°C.min<sup>-1</sup> até 60°C e de 8°C.min<sup>-1</sup> até 200°C. Foi utilizado hélio, numa vazão de 30 psi, como gás de arraste.



A amostra, preparada a partir de um volume inicial de 100 mL de fermentado, foi destilada em equipamento eletrônico enoquímico (GIBERTINI), e acrescida uma solução 10% de 4-metil-2-pentanol como padrão interno, foi injetado o volume de 1 $\mu$ L para realização da análise.

Para determinação das concentrações dos componentes foi utilizada a relação:

$$C = A \times \frac{h}{H} \times \frac{I}{i}$$

Onde:

C= concentração do componente (mg.L<sup>-1</sup>)

A= concentração da substância na solução referência

h= área do pico da substância na amostra

H= área do pico da substância na referência

I= área do pico do padrão interno na referência

i= área do pico do padrão interno na amostra

Para determinação dos açúcares neutros do bagaço, a amostra foi derivatizada, sendo convertidos os açúcares neutros em acetatos de alditóis, em duas etapas. Na primeira, chamada de pré-hidólise, foi adicionado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% (m.m<sup>-1</sup>) em 2 mg de amostra que permaneceu em agitação em vórtex, durante 2 horas, intercalando com banho de gelo. A seguir foi colocado H<sub>2</sub>O no material diluído até concentração de 8% (m.v<sup>-1</sup>), esta solução foi mantida em banho-maria fervente por 5 horas. A seguir o material foi neutralizado com BaCO<sub>3</sub>, filtrado em algodão compactado, para se obter um líquido límpido e incolor. A amostra foi então reduzida com NaBH<sub>4</sub> até pH alcalino, e mantida em repouso por 2 horas para completa transformação dos

açúcares em alditóis. O excesso de agente redutor foi decomposto e os cátions de  $\text{Na}^+$ , removidos com resina trocadora de cátions (Lewatit) na forma ácida. Após filtração, a solução foi evaporada até secura em evaporador rotatório, seguido da adição de metanol para remoção do boro na forma de triborato de trimetila. Os alditóis resultantes foram acetilados pela adição de mistura de piridina: anidrido acético (1:1 v.v<sup>-1</sup>), por 16 horas. A reação foi interrompida pela adição de gelo moído. Os produtos acetilados foram extraídos da solução por adição de clorofórmio e lavados com solução de sulfato de cobre a 5% para eliminar a piridina (MARCON, 2004).

Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. O cromatógrafo (VARIAN modelo 2000R) estava equipado com coluna capilar de sílica fundida com comprimento de 30m e diâmetro interno de 0,25mm revestida com DB-23. O espectrômetro de massa (VARIAN SATURN modelo 2000R) foi programado um gradiente de temperatura na coluna iniciando com 100°C por 1 minuto, em seguida um aumento gradativo de 40°C.min<sup>-1</sup> até 215°C, sendo mantida em isoterma até o final da análise. O gás de arraste utilizado na coluna foi hélio ultra puro com uma vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2.3 Estatísticas

Os dados obtidos com o planejamento experimental programado foram analisados com o software proposto por Neto, Scarminio e Bruns (1995) para cálculo do modelo matemático e análise de variância. O programa Statistica 5.0 foi utilizado para construção dos gráficos em curva de nível, a análise de variância (ANOVA) calculada para os dados físico-químicos foi obtida utilizando programa Excel 2003.

#### 4.2.2.4 Microbiológicas

As análises empregadas para a determinação do perfil microbiológico do bagaço obtido pelo processo de liquefação compreendem pesquisa de *Bacillus cereus*, Coliformes a 45°C, *Salmonella sp.* e bolores e leveduras (SILVA; JUNQUEIRA, 1995).

#### 4.2.3 Experimentos

##### 4.2.3.1 Modelagem do processo de extração do suco por liquefação

O fabricante sugere duas adições do complexo enzimático para extração do suco, a primeira adição diretamente na polpa, 500 mL.ton<sup>-1</sup> a 20-30°C ou 250-300 mL.ton<sup>-1</sup> a 40-55°C durante 1-2 horas com agitação constante. A segunda adição, no bagaço obtido depois da primeira extração, diluído em água na proporção de (1:0,8-1,0). Para este bagaço deve ser utilizado 300-500 mL.ton<sup>-1</sup> a 20-30°C ou 200-300 mL.ton<sup>-1</sup> a 40-55°C durante 1-2 horas de aquecimento com agitação.

Foi determinado realizar somente a extração a partir da polpa, portanto as dosagens iniciais 0,5 mL.Kg<sup>-1</sup> e 0,9 mL.Kg<sup>-1</sup> utilizadas no planejamento experimental correspondem à média seguida de somatório das duas aplicações recomendadas pela Novozymes.

O planejamento utilizado para definir as melhores condições de obtenção do suco por liquefação utilizando duas variáveis independentes está caracterizado na TABELA 2 no que diz respeito à região de domínio experimental e na TABELA 3, aos ensaios programados. Os resultados foram avaliados de acordo com os efeitos de cada variável de entrada e suas interações verificando a validade da equação quadrática obtida tanto em termos de coeficiente de determinação quanto de falta de adequação. O sistema foi mantido sob agitação constante a

70rpm durante o experimento e o tempo de reação foi de 42 minutos de acordo com experimentos preliminares.

TABELA 2 - Região de domínio do modelo experimental.

Fatores	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Temperatura (°C)	20	26	40	54	60
Concentração da enzima (mL.Kg <sup>-1</sup> )	0,01	0,15	0,50	0,85	0,99

Após terem sido estabelecidas as condições de concentração da enzima e de temperatura, estes parâmetros foram mantidos constantes e foi realizado um estudo cinético com os tempos de 30; 40; 50; 60; 90 e 120 minutos.

TABELA 3 - Planejamento experimental em estrela com ponto central

Ensaio	Valores Codificados		Valores Decodificados	
	Temperatura (°C)	Concentração da enzima (mL.Kg <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Concentração da enzima (mL.Kg <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	26	0,15
2	-1	+1	26	0,85
3	+1	-1	54	0,15
4	+1	+1	54	0,85
5	0	0	40	0,5
6	0	0	40	0,5
7	0	-1,414	40	0,01
8	+1,414	0	60	0,5
9	0	1,414	40	0,99
10	-1,414	0	20	0,5

#### 4.2.3.2 Obtenção de suco por liquefação em escala piloto.

O processo de obtenção de suco por liquefação foi conduzido em escala piloto utilizando-se os parâmetros de incubação: temperatura (50°C), tempo (75 minutos) sob agitação e 0,1 mL de enzima Ultrazym AFP-L por quilo de matéria prima. A etapa de extração foi feita em tanque encamisado (SOTRONIC) com capacidade para 40 Kg de polpa, com circulação de água, dotado de resistências para aquecimento, controle digital de temperatura e sistema de agitação de 35 rpm realizado com pás conectadas em um eixo central. O suco depois de separado por centrifugação foi resfriado em câmara frigorífica até 10°C, filtrado em papel em condições normais de pressão e em seguida congelado. O bagaço obtido foi processado à semelhança do anteriormente descrito.

#### 4.2.3.3 Caracterização dos produtos obtidos por liquefação ou prensagem

Os produtos obtidos a partir dos processos de liquefação e prensagem foram avaliados quanto às suas características físico-químicas e microbiológicas.

#### 4.2.3.4 Cinética de fermentação e formação de compostos de aroma

Os sucos obtidos pelos tratamentos de prensagem e liquefação foram submetidos à fermentação alcoólica. Os biorreatores foram montados com 200mL de suco contidos em frascos de erlenmeyer de 250 mL dotados de batoque hidráulico. A levedura empregada foi Lalvin D-47 na quantidade de 0,2g de levedura para litro de suco. A fermentação foi conduzida à temperatura de 20°C em uma câmara climatizada (TECNAL modelo TE-391), sendo interrompida após 8 dias. O fermentado obtido foi filtrado em papel sob condições normais de pressão e congelado.

As cinéticas de formação de biomassa e etanol, e o consumo de açúcares redutores totais foram avaliados durante os dias de fermentação para ambos os mostos.

A formação dos compostos de aroma, durante o período fermentativo, foi avaliada para os fermentados obtidos pelos processos de prensagem e liquefação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MODELAGEM DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR LIQUEFAÇÃO

O planejamento em estrela foi elaborado considerando os fatores de entrada, temperatura e concentração de enzima e como variáveis de saída rendimento em base úmida que avalia a eficiência do processo, sólidos solúveis e compostos fenólicos que representam uma mudança de caráter físico-químico ocorrido nas amostras, o tempo e agitação foram mantidos constante. Na TABELA 4 são apresentados os resultados obtidos com este delineamento experimental.

TABELA 4 - Resultados obtidos com o delineamento experimental.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração da enzima (mL.Kg <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Sólidos solúveis (°Brix)	Compostos fenólicos (mg.L <sup>-1</sup> )
1	28	0,15	86	19,0	598,59
2	28	0,85	86	15,0	385,10
3	54	0,15	84	23,0	1244,65
4	54	0,85	86	22,5	1205,33
5	40	0,5	84	19,0	1244,65
6	40	0,5	82	20,5	1503,08
7	40	0,01	82	24,5	1413,19
8	60	0,5	84	24,0	1576,12
9	40	0,99	86	21,0	1222,18
10	20	0,5	84	17,0	357,01

Os efeitos principais e secundários dos fatores temperatura e concentração da enzima, para as variáveis rendimento, sólidos solúveis e compostos fenólicos estão detalhados na TABELA 5.

TABELA 5 – Efeitos principais e secundários dos fatores temperatura e concentração da enzima, para as variáveis rendimento, sólidos solúveis e compostos fenólicos.

Efeito	Rendimento (%)	Sólidos solúveis (°Brix)	Compostos fenólicos (mg.L <sup>-1</sup> )
Temperatura (T)	-0,5	5,35	797,54
Concentração da enzima (E)	1,91	-2,36	-131,04
Interação TxE	1,0	1,75	87,0

A análise dos efeitos principais demonstrou que a variação da temperatura mostrou-se mais importante nas respostas das variáveis, pois acarretou um aumento 5,35°Brix nos sólidos solúveis e 797,54 mg.L<sup>-1</sup> de fenóis totais enquanto que a concentração da enzima aumentou em 1,91% o rendimento, porém diminuiu em 2,36°Brix os sólidos solúveis e em 131,04mg.L<sup>-1</sup> os compostos fenólicos.

#### 5.1.1 Análise de dados do rendimento

A análise dos dados de rendimento deste planejamento está distribuída na TABELA 6 com os resultados da modelagem matemática, na TABELA 7 que apresenta os coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão e na TABELA 8 com a análise de variância dos dados.

TABELA 6 – Resultados da modelagem matemática dos dados de rendimento

Ensaio	Resposta (%)	Resposta prevista (%)	Resíduo
1	86,0	84,54	1,46
2	86,0	85,46	0,54
3	84,0	83,04	0,97
4	86,0	85,96	0,04
5	84,0	82,99	1,0
6	82,0	82,99	-0,99
7	82,0	83,39	-1,39
8	84,0	84,39	-0,39
9	86,0	86,10	-0,10
10	84,0	85,10	-1,10

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística e modelagem matemática que calcula a resposta prevista para a variável de saída de acordo com o modelo construído. Os coeficientes que compõem o modelo matemático seguido do erro padrão estão apresentados na tabela a seguir.

TABELA 7 – Coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão dos dados de rendimento

Interações	Coeficientes	Erro Padrão
Média	82,99	1,04
T	-0,25	0,52
E	0,96	0,69
T <sup>2</sup>	0,87	0,52
E <sup>2</sup>	0,87	0,69
TxE	0,5	0,74



Para verificar se o modelo construído é significativo ou preditivo, é necessário fazer a análise de variância e através do fator F calculado e definir a validade da modelagem.

TABELA 8 – Análise de variância dos dados de rendimento

Fonte de liberdade	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média variação
Regressão	13,73	5	2,75
Resíduos	8,67	4	2,17
Falta de ajuste	6,67	3	2,22
Erro Puro	2,0	1	2,0
Total	22,4	9	
% de variância explicada = 61,31%		$F_{\text{calculado}} = 1,27$	
% máximo de variância explicável = 91,07%			

O fator F tabelado para 95% de confiança é de 6,26 sendo superior ao valor calculado de 1,27, portanto o modelo construído para a variável de saída rendimento não é significativo sendo sua explicação para somente 61,31% dos dados. A baixa capacidade de explicação por parte do modelo pode estar relacionada com a ligação direta da determinação de rendimento com a eficiência do equipamento empregado no processo de separação do suco do bagaço.

A FIGURA 5 apresenta as curvas de nível obtidas a partir dos resultados de rendimento e é possível notar que um aumento nesta variável pode ser verificado no sentido tanto dos valores máximos quanto dos mínimos para os fatores temperatura e concentração da enzima. Portanto este gráfico não foi suficiente para verificar quais seriam as melhores condições de extração.

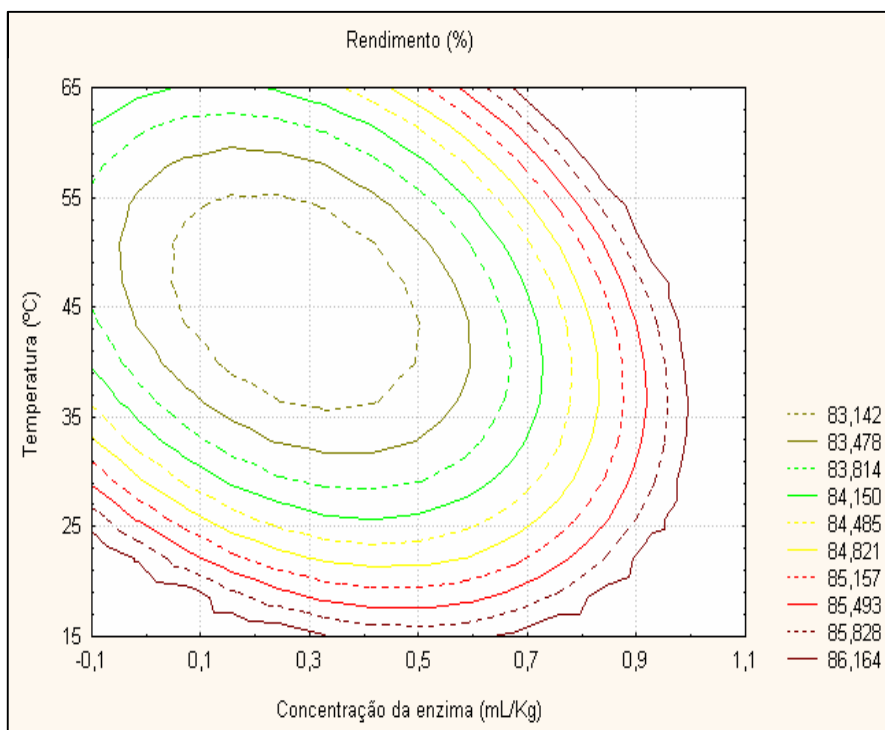


FIGURA 5 - Curvas de nível obtidas para os valores de rendimento.

### 5.1.2 Análise de dados dos sólidos solúveis

As TABELAS 9, 10 e 11 apresentam os resultados da modelagem matemática, coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão e a análise de variância para os valores de sólidos solúveis, respectivamente.

TABELA 9 – Resultados da modelagem matemática para os valores de sólidos solúveis.

Ensaio	Resposta (°Brix)	Resposta prevista (°Brix)	Resíduo
1	19,0	20,13	-1,13
2	15,0	16,02	-1,02
3	23,0	23,73	-0,73
4	22,5	23,12	-0,62
5	19,0	19,75	-0,75
6	20,5	19,75	0,75
7	24,5	23,54	0,95
8	24,0	23,41	0,59
9	21,0	20,20	0,79
10	17,0	15,84	1,16

TABELA 10 – Coeficientes do polinômio ajustado e o erro padrão para os valores de sólidos solúveis.

Interações	Coeficientes	Erro Padrão
Média	19,75	0,97
T	2,67	0,49
E	-1,18	0,64
T <sup>2</sup>	-0,63	0,49
E <sup>2</sup>	1,06	0,64
TxE	0,84	0,68

TABELA 11 – Análise de variância para os valores de sólidos solúveis.

Fonte de liberdade	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média variação
Regressão	78,13	5	15,63
Resíduos	7,59	4	1,89
Falta de ajuste	6,47	3	2,16
Erro Puro	1,12	1	1,12
Total	85,72	9	
% de variância explicada = 91,14%		$F_{\text{calculado}} = 8,23$	
% máximo de variância explicável = 98,69%			

Para os sólidos solúveis o modelo calculado explica 91,14% dos dados, sendo significativo para as condições empregadas, já que o fator F calculado foi superior a F tabelado de 6,26. Os coeficientes calculados apresentam uma relação direta da concentração dos sólidos solúveis com a variação da temperatura. Este resultado pode ser explicado pela aproximação das temperaturas ótimas de atividade das enzimas do complexo, estando diretamente relacionado com a intensidade da hidrólise na parede celular, possibilitando a saída das substâncias contidas no vacúolo e liberando compostos da parede celular.

A FIGURA 6, que apresenta a relação dos sólidos solúveis com as variáveis de entrada temperatura e concentração da enzima, indica uma tendência acentuada, quando feita uma extrapolação dos dados da temperatura, para o aumento dos sólidos solúveis quando a temperatura estiver entre 40 e 65°C e a concentração da enzima estiver em uma faixa entre os valores de 0,2-0,6 mL.Kg<sup>-1</sup>.

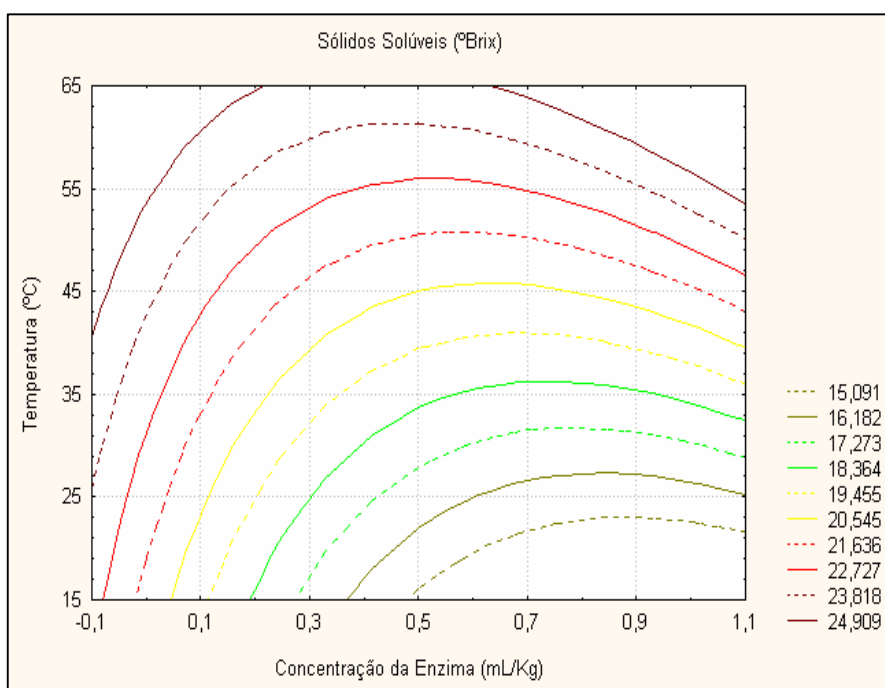


FIGURA 6 - Curvas de nível obtidas para os valores de sólidos solúveis.

### 5.1.3 Análise de dados dos compostos fenólicos

A análise estatística para os compostos fenólicos está descrita na TABELA 12 que apresenta os resultados para os compostos fenólicos a partir da modelagem matemática na TABELA 13 que traz os coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão e na TABELA 14 que apresenta a análise de variância dos dados.

TABELA 12 – Resultados para os compostos fenólicos a partir da modelagem matemática.

Ensaio	Resposta (mg.L <sup>-1</sup> )	Resposta prevista (mg.L <sup>-1</sup> )	Resíduo
1	599,0	710,42	-111,43
2	385,0	492,38	-107,39
3	1245,0	1420,96	-175,95
4	1205,0	1376,92	-171,92
5	1245,0	1374,09	-129,09
6	1503,0	1374,09	128,91
7	1413,0	1268,43	144,57
8	1576,0	1388,64	187,36
9	1222,0	1083,14	138,86
10	357,0	260,93	96,07

TABELA 13 – Coeficientes do polinômio ajustado e erro padrão

Interações	Coeficientes	Erro Padrão
Média	1374,09	159,14
T	398,77	79,58
E	-65,52	105,28
T <sup>2</sup>	-274,73	79,58
E <sup>2</sup>	-99,18	105,28
TxE	43,5	112,53

TABELA 14 – Análise de variância dos dados

Fonte de liberdade	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média variação
Regressão	1660685,56	5	332137,11
Resíduos	202260,0	4	50565,0
Falta de ajuste	168978,0	3	56326,0
Erro Puro	33282,0	1	33282,0
Total	1862945,56	9	
% de variância explicada = 89,14%		$F_{\text{calculado}} = 6,57$	
% máximo de variância explicável = 98,21%			

Para os compostos fenólicos, a equação modelada é capaz de explicar com 95% de confiança, 89,14% dos dados. Esta explicação inferior a 95% pode estar relacionada com o efeito antagônico dos fatores temperatura e concentração da enzima. Embora o efeito da temperatura, em módulo, seja aproximadamente 6 vezes maior que o da concentração da enzima pode ter ocorrido uma interferência na explicação dos dados no modelo. A FIGURA 7, que corresponde às curvas obtidas para os valores de compostos fenólicos, apresenta como a região do ótimo as concentrações de enzima de 0,1 a 0,8 mL.Kg<sup>-1</sup> e as temperaturas na faixa de 42 a 59°C.

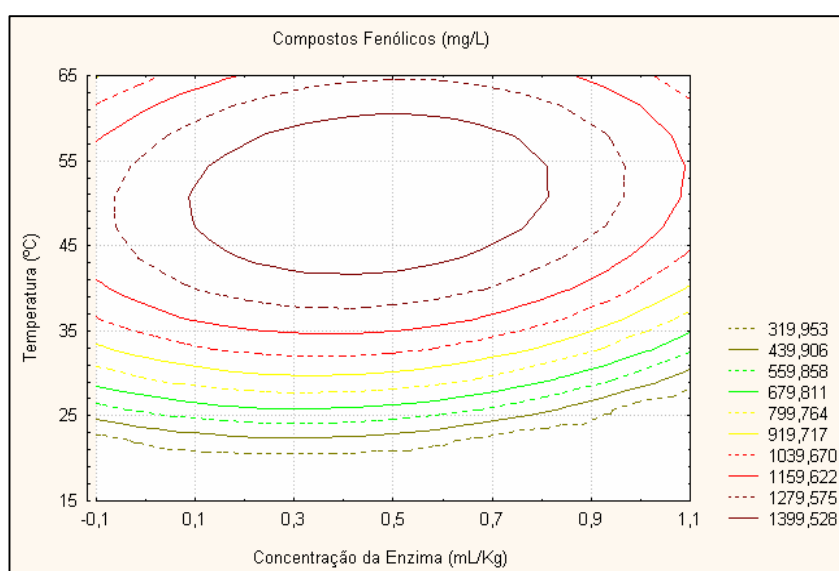


FIGURA 7 - Curvas de nível obtidas para os valores de compostos fenólicos.

A partir dos gráficos de curva de nível obtidos para sólidos solúveis e compostos fenólicos foi estipulada à condição ideal para a extração de suco liquefeito em escala piloto. As condições finais de extração foram definidas sendo respeitadas as tendências dos modelos estabelecidos para as variáveis compostos fenólicos e sólidos solúveis, tendo sido levado em conta a preferência em se obter um produto com altos teores de compostos fenólicos e a utilização de temperaturas amenas para não degradar os compostos de aroma e de sabor do produto. As condições de 50°C de temperatura e 0,1 mL.Kg<sup>-1</sup> de concentração de enzima indicaram, pelos gráficos, que os maiores teores de sólidos solúveis estão na região de 23,8°Brix e os de compostos fenólicos, próximos de 1399 mg.L<sup>-1</sup>.

## 5.2 OBTENÇÃO DE SUCO POR LIQUEFAÇÃO EM ESCALA PILOTO

Em um planejamento experimental, construído em testes preliminares, foi definido o tempo de 42 minutos para o processo de liquefação com polpa de maçã, porém trata-se de um tempo muito curto para operacionalizar a extração em nível de escala piloto ou industrial. Foi feito, portanto, um estudo cinético com maior amplitude sendo mantidas as condições de temperatura e concentração da enzima já definidas. Os resultados de rendimento, sólidos solúveis e fenóis totais deste estudo cinético são apresentados na TABELA 15.



TABELA 15 - Resultados de rendimento, sólidos solúveis e compostos fenólicos obtidos em estudo cinético.

Tempo (minutos)	Rendimento (%)	Sólidos solúveis (°Brix)	Compostos fenólicos (mg.L <sup>-1</sup> )
30	84	17,75	1637,85
40	84	21,0	1801,87
55	84	21,0	1960,60
75	86	21,5	2166,95
100	86	16,0	1812,46
135	86	21,5	2077,01

O objetivo deste estudo cinético foi estabelecer o tempo no quais os maiores valores das respostas de compostos fenólicos e sólidos solúveis fossem encontrados, que foi aos 75 minutos de reação, mais adequado para a prática operacional da extração em escala piloto.

O rendimento de bagaço em base úmida foi de 86 e 83,5% para as escalas de bancada e piloto, respectivamente. Essa variação de rendimento é devida aos problemas intrínsecos à mudança de escala, como a eficiência dos sistemas de agitação e de aquecimento. Houve uma queda de 2,5% no rendimento para o aumento de escala. No processo de obtenção de suco por prensagem o rendimento foi de 64,5%, que pode estar relacionado com a eficiência da prensa utilizada e com certeza à ausência da enzima de liquefação.

O aumento de 18,95% no rendimento do suco obtido pelo processo de liquefação é interessante economicamente para a indústria, mesmo com o custo adicional da aquisição da enzima.

Acar (1999) obteve resultados semelhantes obtendo um aumento de 73,02% para 86% com a modificação do processo de prensagem por liquefação, sob condições de 1g.L<sup>-1</sup> de enzima, 50°C por 30 minutos.

Uma das conseqüências do aumento no rendimento é a diminuição da quantidade de bagaço, que passa a corresponder com 16,5% da matéria-prima, menor do que no processo de prensagem, de 35,5%. Este resíduo consiste em um problema para as processadoras de suco de maçã, pois não se tem um destino definido para este material que apresenta umidade elevada e nutrientes residuais, tendendo a se tornar um foco passível de contaminação se não for removido imediatamente.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS OBTIDOS POR LIQUEFAÇÃO OU PRENSAGEM

#### 5.3.1 Suco

Na TABELA 16 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas dos sucos obtidos por prensagem e por liquefação.

Nos sucos obtidos por prensagem e por liquefação a acidez total foi 2,92 e 4,08 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, expressa como ácido málico. Esta diferença de 28,43% está relacionada à liberação de ácido galacturônico proveniente da hidrólise da cadeia de pectina, já que na preparação comercial de enzimas estava declarada a atividade de poligalacturonase. Poll (1993) verificou que ao adicionar uma enzima de liquefação total em polpa de maçã houve um aumento no teor de ácidos em decorrência da liberação de ácido galacturônico pela hidrólise da pectina, sendo que os estudos realizados por Stutz (1996) corroboram com estes resultados. Schols et al. (1991) determinaram acidez total igual a 2,9 g.L<sup>-1</sup> e de 4,4 g.L<sup>-1</sup> em sucos obtidos por prensagem e por liquefação, respectivamente. O aumento de 34% foi superior ao descrito neste trabalho. Em um estudo com resultados mais expressivos, Drilleau, Massiot e Le Queré (1994), ao analisarem especificamente as alterações dos teores de ácido galacturônico liberados durante os processos de

prensagem e liquefação, obtiveram valores de 0,7 g.L<sup>-1</sup> e 9,4 g.L<sup>-1</sup> respectivamente, confirmando a causa do aumento da acidez total titulável.

TABELA 16 – Características de qualidade dos sucos de maçã

Indicadores	Prensagem	Liquefação
pH	3,68	3,0
Acidez total (g.L <sup>-1</sup> )	2,92	4,08
Sólidos solúveis (°Brix)	15,75	16,75
ART* (g.L <sup>-1</sup> )	137,38 <sup>a</sup> ±0,36	137,56 <sup>a</sup> ±0,16
Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	20,28 <sup>a</sup> ±0,03	23,05 <sup>b</sup> ±0,04
Cinzas (g.L <sup>-1</sup> )	3,64 <sup>a</sup> ±0,06	8,67 <sup>b</sup> ±0,21
Nitrogênio total (mg.L <sup>-1</sup> )	139,9 <sup>a</sup> ±0,01	179,9 <sup>a</sup> ±0,01
Proteína total (mg.L <sup>-1</sup> )	874 <sup>a</sup> ±0,01	1124 <sup>b</sup> ±0,01
Compostos fenólicos (mg.L <sup>-1</sup> )	1309,64 <sup>a</sup> ±7,23	1826,2 <sup>b</sup> ±121,6

\*ART – Açúcares redutores totais; <sup>a,b</sup> – diferença significativa a nível de 95% de confiança

A medida de pH obtida para os sucos em estudo demonstra um aumento de 0,68 para o suco liquefeito, o que não acompanha a variação obtida para a acidez total. Segundo Acar (1999) os componentes do suco apresentam propriedade tampão, não podendo ser verificadas mudanças aparentes para os valores de pH das amostras. Os valores encontrados de pH foram de 3,34 para o processo de prensagem e 3,2 para suco liquefeito. Os valores de pH relatados por Schols et al. (1991) também apresentam a mesma tendência, variando de 3,4 para suco obtido por prensagem e 3,5 para o obtido por liquefação. Drilleau, Massiot e Le Queré (1994) determinaram para os

sucos provenientes de liquefação enzimática e prensagem valores de pH 3,7 e 4,5, respectivamente.

Com uma atividade declarada de celulase no complexo enzimático era esperado um aumento significativo na concentração de sólidos solúveis, D-glucose e açúcares redutores totais no suco obtido por liquefação em comparação com o obtido por prensagem. Embora tenha sido verificado um ligeiro aumento no teor de D-glucose, que variou de 20,28 g.L<sup>-1</sup> para 23,05 g.L<sup>-1</sup>, e nos sólidos solúveis de 15,75 °Brix para 16,75°Brix, os açúcares totais não apresentaram diferença significativa entre si. Como a maior variação encontrada foi nos teores de D-glucose, é de se esperar que as enzimas celulolíticas estejam sendo mobilizadas neste processo. De acordo com Spagnuolo et al. (1997), as condições ótimas de atividade da celulase são temperatura de 50°C e pH de 4,8 e, embora a temperatura tenha sido a mesma, o pH de 3,0 pode ter causado uma inibição parcial. Pilnik e Voragen (1993) já haviam relatado que as enzimas podem ser inativadas por polifenóis presente no suco, e Acar (1999) obteve um ligeiro aumento de 126,20 para 130,80 g.L<sup>-1</sup> na concentração de açúcares totais devido ao tratamento de liquefação. Drilleau, Massiot e Le Queré (1994) detectaram um aumento nos teores de D-frutose e D-glucose, sendo que esta variou de 23,5 g.L<sup>-1</sup> para 34,4 g.L<sup>-1</sup> enquanto a sacarose diminuiu de 151,3 g.L<sup>-1</sup> para 138,6 g.L<sup>-1</sup>, devido à presença de invertase na preparação enzimática. O complexo enzimático usado pelos autores continha duas enzimas comerciais, com atividades de poligalacturonase, pectinametilesterase, pectinase, galactanase, endoglucanase, celobiohidrolase e β-glucosidase. A composição da preparação comercial utilizada neste trabalho não contém indicações da presença de atividades secundárias, porém deve ser levado em conta que não se trata de enzimas purificadas e sim de extratos padronizados obtidos a partir de fermentação submersa dos microrganismos *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, de acordo com o

laudo técnico do fabricante. A caracterização das atividades enzimáticas deste complexo pode resultar em informações importantes para o entendimento dos resultados obtidos com suas aplicações. De acordo com Spagnuolo et al. (1997), as preparações enzimáticas comerciais são obtidas a partir de fungos e bactérias, microrganismos capazes de produzir mais que uma enzima, nem sempre atendendo os objetivos desejados e Mihalev et al. (2004) afirmaram que preparações enzimáticas comerciais pectinolíticas apresentam, pelo menos, atividades secundárias de proteases.

Os teores de nitrogênio total obtidos apresentaram 28,6% de aumento para o suco liquefeito, considerando-se as quantidades de 0,03 mL.L<sup>-1</sup> de enzima pectinolítica no processo de prensagem e 0,1 mL.L<sup>-1</sup> de enzima de liquefação para o suco liquefeito. Drilleau, Massiot e Le Queré (1994) avaliaram a concentração de nitrogênio total dos sucos obtidos e detectaram um aumento de 28% para o suco resultante da liquefação. Os autores relataram que os valores de 210 mg.L<sup>-1</sup> para o processo de prensagem e 260 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total para o processo de liquefação são elevados pela origem da matéria prima, existe uma forte influência sob o aspecto da adubação nitrogenada na determinação do teor de nitrogênio total em vegetais. Beveridge e Weintraub (1997) encontraram teores mais elevados de nitrogênio protéico e proteína total para as amostras tratadas com pectinases.

O aumento do conteúdo protéico pode ser causado por uma ação sinérgica das atividades pectinolítica e proteolítica que ressaltam a degradação dos constituintes da matriz celular (MIHALEV et al., 2004).

O conteúdo de cinzas encontrado em suco de maçã produzido a partir de um tratamento com enzimas de liquefação foi maior que para as amostras produzidas sem tratamento enzimático. Foi determinado, por pré-tratamentos, que os minerais da matéria prima passam para os sucos de fruta em quantidades superiores de acordo com a hidrólise do tecido vegetal após a

liquefação da polpa (ACAR, 1999). Os valores obtidos para o teor de cinzas estão de acordo com esta afirmação, pois houve um aumento de  $5,03 \text{ g.L}^{-1}$  para o suco liquefeito.

Schols et al. (1991) afirmaram que o teor dos vários compostos fenólicos analisados havia sido influenciado pelo método de obtenção do suco. Os resultados obtidos neste experimento também demonstraram que ocorreu um aumento de 39,38% para os teores de compostos fenólicos para o suco obtido por liquefação. Esse resultado é provavelmente devido ao aumento da intensidade da liberação dos compostos fenólicos a partir da degradação enzimática da parede celular. Os teores dos compostos fenólicos obtidos foram elevados, quando comparados aos valores de  $425 \text{ mg.L}^{-1}$  para o suco resultante da prensagem da cultivar Catarina relatado por (CZELUSNIAK et al., 2003). O escurecimento enzimático promovido pelo sistema polifenoloxidase (PPO) da maçã estava parcialmente inibido pela adição de dois agentes antioxidantes, o metabissulfito de potássio e o ácido ascórbico. De acordo com Lachman et al. (1992), o escurecimento de maçãs depende de muitos fatores além do descascamento e ação do oxigênio do ar; tais como a concentração e o tipo de compostos fenólicos presentes na maçã, concentração e substrato específico das PPOs encontradas na maçã, concentração de inibidores naturais do escurecimento (ex. ácido ascórbico), valores de pH, temperatura e concentração de oxigênio na atmosfera de armazenamento e presença de compostos lipídicos no substrato.

Os compostos fenólicos encontrados na casca da maçã têm alto grau de contribuição para as atividades antioxidante total e antiproliferativa, quando comparados com os encontrados na polpa. Podem fornecer grande proteção frente aos danos causados pelos radicais livres no corpo humano (LEE et al., 2003). Os fenóis são importantes, também, devido a sua contribuição para a cor, gosto e *flavor* das frutas (CHINNICI, et al., 2004). De acordo com Berregi et al. (2003), os compostos fenólicos embora presentes em baixas concentrações, são muito importantes por estarem associados com o amargor e adstringência dos sucos, e contribuir para o *flavor* de

produtos processados de maçã e sidras. Os principais compostos fenólicos da maçã são os ésteres dos ácidos caféico e p-coumárico com ácido quínico, monômeros, dímeros e oligômeros de flavonol, glicosídeo quercitina e dihidrochalconas (SCHIEBER; KELLER; CARLE, 2001).

### 5.3.2 Bagaço

O bagaço de maçã é uma mistura heterogênea consistindo principalmente de casca, polpa e semente (ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE; AMANTE, 2002).

Na indústria processadora de maçã, o suco é considerado um dos principais produtos, e do resultado de sua extração surge o bagaço, chamado de descarte sólido. De acordo com Raupp et al. (2000), o bagaço pode ser considerado uma matéria sólida despectinizada ou não, que permanece depois da extração do suco, e apresenta alta proporção de carboidratos insolúveis, quantidades menores de proteína, minerais e algum suco remanescente, contendo açúcares e outras substâncias solúveis.

As características de qualidade físico-química dos bagaços resultantes dos processos de liquefação e prensagem são apresentadas na TABELA 17.

TABELA 17 - Características de qualidade físico-química dos bagaços.

Processo	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Nitrogênio Total (%)	Proteína Total (%)	Pectina (%)	Fibra Alimentar Total (%)
Prensagem	1,66 <sup>a</sup> ± 0,02	1,56 <sup>a</sup> ± 0,14	0,42 <sup>a</sup> ± 0,01	2,65 <sup>a</sup> ± 0,02	13,15 <sup>a</sup> ± 1,3	31,91 <sup>a</sup> ± 1,06
Liquefação	1,41 <sup>b</sup> ± 0,03	2,53 <sup>b</sup> ± 0,17	0,57 <sup>b</sup> ± 0,01	3,57 <sup>b</sup> ± 0,01	10,08 <sup>b</sup> ± 0,94	31,98 <sup>a</sup> ± 1,83

\*a,b – diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Os teores de nitrogênio total e proteína resultaram em um aumento de 36% para o bagaço liquefeito quando comparado ao bagaço obtido por prensagem.

O teor de cinzas, que representa a totalidade de minerais que permanecem depois da incineração da amostra, diminuiu em 15% para o bagaço obtido por liquefação.

A pectina expressa como pectato de cálcio, diminuiu em 23,35% para o bagaço liquefeito. Este valor representa a atividade da poligalacturonase sobre a região lisa da cadeia péctica. Entretanto, não significa que será verificado um aumento nas mesmas proporções para o ácido D-galacturônico, pois a enzima pode quebrar a cadeia de pectina em várias regiões formando colóides como arabinanas, arabinogalactanas e ramnogalacturonanas, além de dímeros e trímeros de ácido D-galacturônico. Endreß (2000) detectou teores de pectina entre 10-15%, em base seca, para bagaço de maçã.

Spagnuolo et al. (1997) submeteram enzimas pectinolíticas a teste de estabilidade térmica durante sete dias e verificaram que uma perdeu 40% de sua atividade a 30°C e outras duas mantiveram 30 e 85% da atividade a 40°C. Porém, Will et al. (2002), mencionaram em seus experimentos uma atividade ótima para as enzimas pectinolíticas a 50°C.

De acordo com Jorge e Monteiro (2005), a fibra alimentar é constituída pela soma de polissacarídeos e lignina de vegetais que não são digeridos pelas enzimas digestivas do ser humano e, podem ser classificadas quanto à sua solubilidade em água, como fibras solúveis e insolúveis. A fração solúvel é composta por pectinas, betaglicanas, gomas, mucilagens, polissacarídeos e algumas hemiceluloses. Os componentes insolúveis são lignina, protopectinas, celulose e hemiceluloses. Wang e Thomas (1989) determinaram os constituintes da fração insolúvel, já desidratada, remanescente da extração do suco de maçã e encontraram 33,2-35,3% de fibra alimentar. A normalidade digestiva, bem como, a prevenção e o tratamento de doenças como a constipação, a diverticulite, a hipercolesterolemia, a hiperglicemia, a obesidade, o câncer



do intestino grosso e da mama, estão relacionados em parte, à ingestão de fibra alimentar (RAUPP et al., 2000). A recomendação da *American Dietetic Association*, é de um consumo mínimo de fibras entre 20 a 35 gramas por dia, sendo um quarto dessas na forma de fibra solúvel. A fibra alimentar exerce influência ao longo de todo trato gastrointestinal, desde a ingestão até a excreção, através da mastigação induzida pela fibra, há um aumento no fluxo gástrico, que unido ao aumento da secreção salivar hidrata a fibra alimentar, produzindo um aumento do volume do bolo alimentar que acelera e mantém a sensação de saciedade (JORGE; MONTEIRO, 2005). Para os bagaços obtidos por prensagem e liquefação os teores obtidos foram de 31,91 e 31,98% respectivamente, não tendo sido encontrada diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Pela presença de uma celulase no complexo enzimático, era esperada uma diminuição no teor de fibra alimentar para o bagaço proveniente do processo de liquefação. Grassin e Fauquembergue (1996) afirmam que a degradação da celulose foi mais eficiente quando o revestimento de xiloglucana foi removido por uma endoglucanase com atividade xiloglucanase.

Os cromatogramas resultantes das análises de quantificação dos açúcares neutros, transformados em acetatos de alditóis, dos bagaços obtidos por liquefação e prensagem são mostrados nas FIGURAS 8 e 9 respectivamente.

A TABELA 18 apresenta os tempos de retenção, nas mesmas condições de operação, para os padrões de açúcares neutros convertidos em acetatos de alditóis.

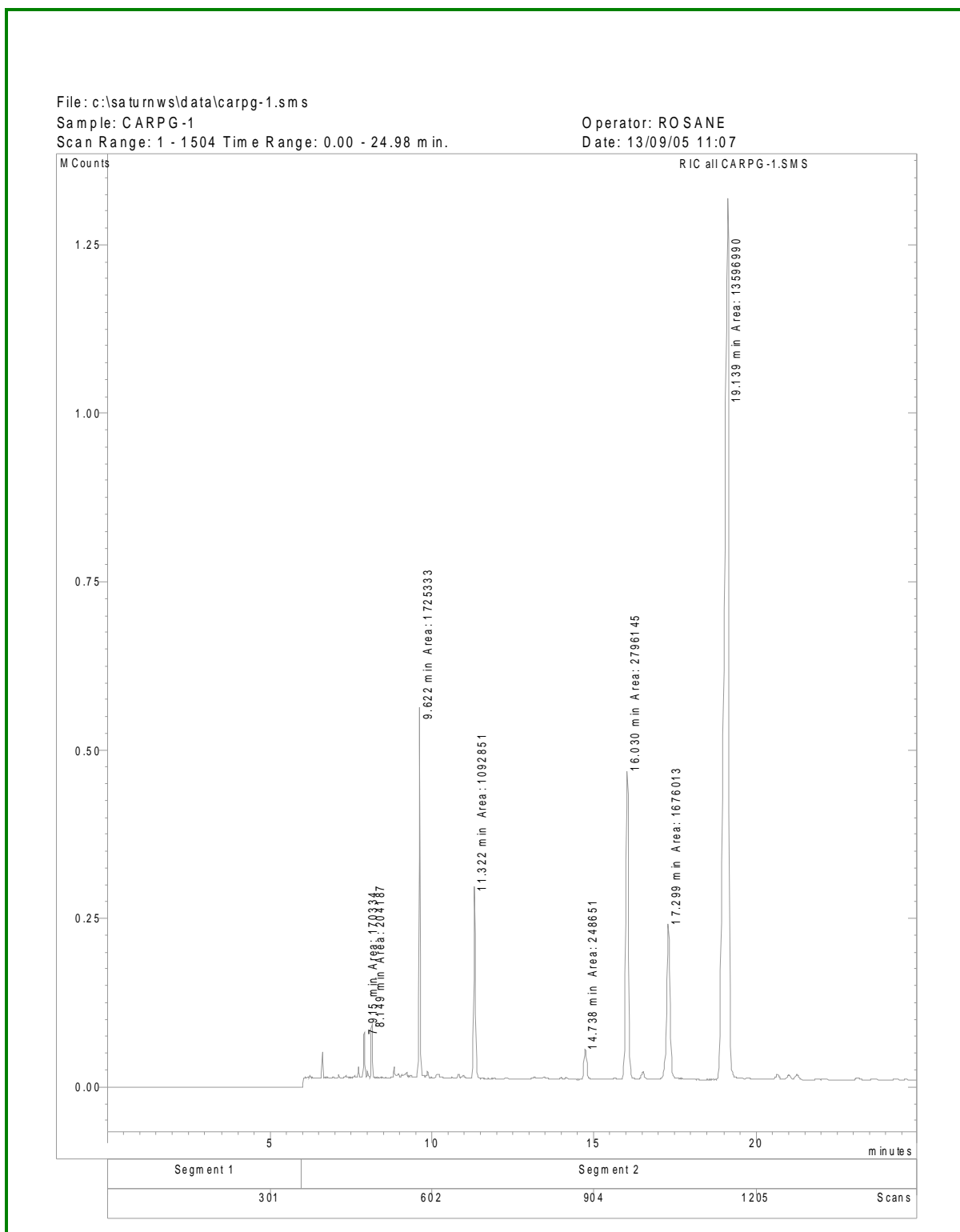


FIGURA 8. Cromatograma de acetatos de alditóis dos açúcares neutros do bagaço proveniente de liquefação.

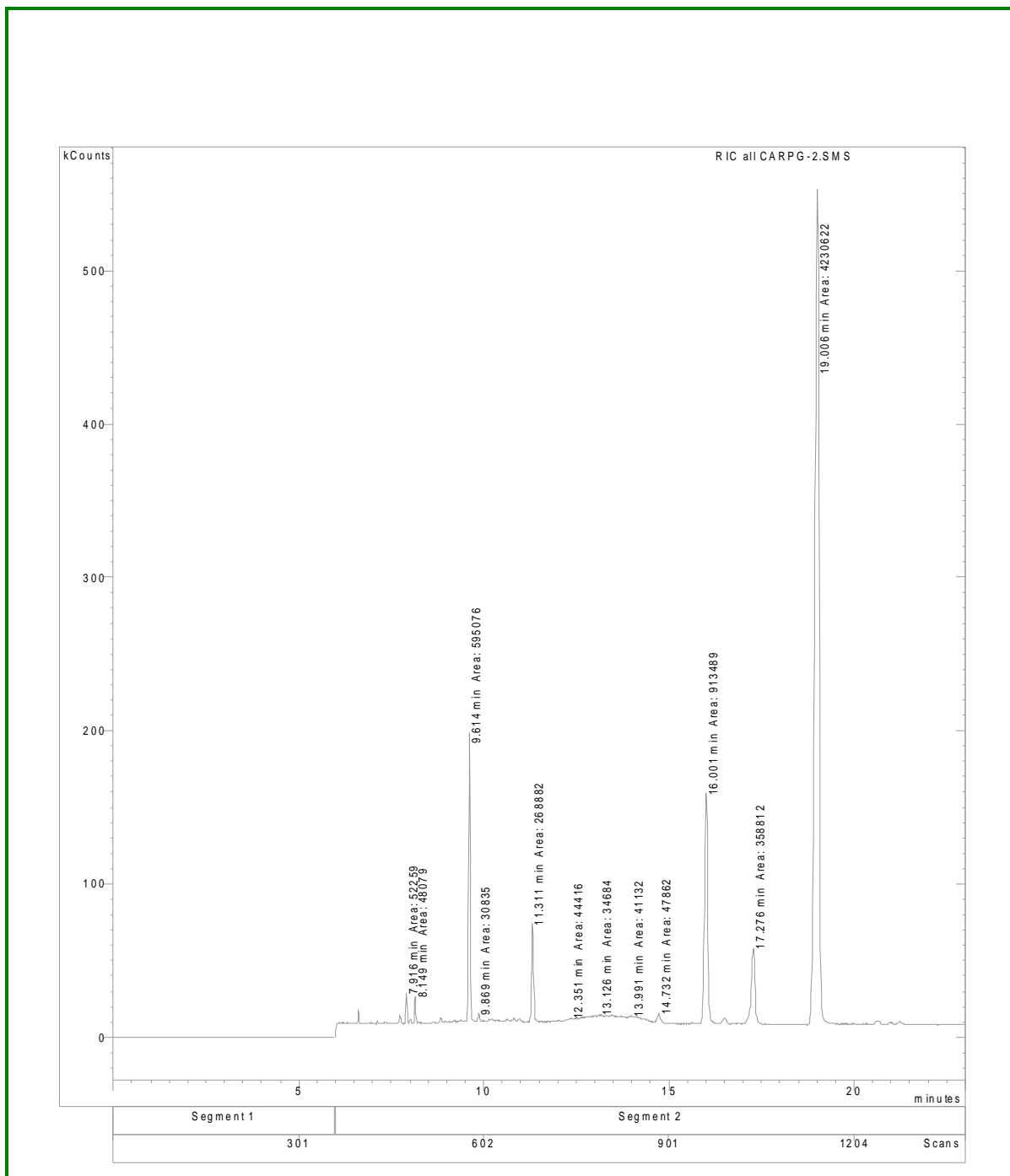


FIGURA 9. Cromatograma de acetatos de alditóis dos açúcares neutros do bagaço proveniente de prensagem.

TABELA 18 – Tempos de retenção para os padrões de açúcares neutros convertidos em acetatos de alditóis.

Padrões de açúcares neutros	Tempo de retenção (minutos)
L-Ramnose	7,91
L-Fucose	8,15
D-Ribose	9,12
L-Arabinose	9,62
D-Xilose	11,32
D-Manose	16,01
D-Galactose	17,28
D-Glucose	18,96

Os monossacarídeos analisados, após terem seus tempos de retenção comparados aos padrões, foram submetidos à confirmação de sua identidade por comparação dos fragmentos dos componentes principais dos padrões dos acetatos de alditóis que estão na TABELA 19, com a composição dos fragmentos principais obtidos, por espectrometria de massa, para as amostras de bagaço como apresenta a TABELA 20.

TABELA 19 - Composição dos fragmentos principais dos padrões dos açúcares neutros.

L-Ramnose	L-Fucose	L-Arabinose	D-Xilose	D-Manose	D-Galactose	D-Glucose
m/z						
85; 99; 115;128	85;115; 128;187	85;115;127 187;145;	85;115 145	115;139 187	85;97;115 127;139;187	85;97;115; 127;139;187

TABELA 20 - Composição dos fragmentos principais dos açúcares neutros para os bagaços obtidos por prensagem e liquefação.

	L-Ramnose	L-Fucose	L-Arabinose	D-Xilose	D-Manose	D-Galactose	D-Glucose
	m/z						
Prensagem	86; 115; 128;	85; 115; 128; 187;	85; 115; 127; 187.	85; 115;	115; 139; 187;	85; 97; 115; 127; 139; 187;	85; 97; 115; 127; 139; 187;
Liquefação	86; 115; 128;	85; 115; 128; 187;	85; 115; 127; 187;	85; 115;	115; 139; 187;	85; 97; 115; 127; 139; 187;	85; 97; 115; 127; 139; 187;

Ao se comparar os fragmentos principais dos padrões de açúcares neutros derivatizados, com os dos açúcares das amostras, é observado que existe, uma concordância entre os fragmentos.

Os açúcares neutros, componentes fundamentais dos domínios péctico e celulósico/hemicelulósico presentes nos bagaços obtidos por liquefação ou prensagem estão quantificados na TABELA 21.

TABELA 21 - Proposição dos açúcares neutros presentes nos bagaços obtidos por prensagem e liquefação.

	L-Ramnose (%)	L-Fucose (%)	L-Arabinose (%)	D-Xilose (%)	D-Manose (%)	D-Galactose (%)	D-Glucose (%)
Prensagem	0,81	0,74	9,20	4,16	14,12	5,55	65,42
Liquefação	0,81	0,96	8,11	5,14	13,15	7,88	63,95

A celulose, polissacarídeo mais abundante da parede celular, é composta basicamente por resíduos de D-glucose ligados em  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). A presença de D-glucose em concentrações elevadas nos bagaços de ambos os tratamentos demonstra que não houve uma atividade intensa da enzima glucanase no processo de liquefação, sendo que houve somente uma redução de 1,47% no teor de D-glucose para este bagaço. Entretanto, podem ter sido formadas unidades estruturais maiores que a D-glucose, como oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e celobiose.

As substâncias pécnicas são formadas por frações interligadas: a ramnogalacturonana I e II e a homogalacturonana. De acordo com McNeil et al. (1984), o grau de polimerização da ramnogalacturonana I é de aproximadamente 2.000, sendo composta por resíduos de ácido D-galacturônico, L-ramnose, D-galactose, L-arabinose e pequenas quantidades de L-fucose. As homogalacturonanas são polímeros formados por unidades de ácido D-galacturônico ligadas em  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4).

A parede celular das dicotiledôneas é composta por aproximadamente 20% de hemicelulose, que é representada em grande parte pela xiloglucana. Este polímero é composto por uma cadeia principal formada por resíduos de D-glucose ligados em  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), com cadeias laterais de D-xilose adicionada de D-galactose e L-fucose (McNEIL et al., 1984).

Os açúcares L-ramnose e L-arabinose encontrados nos bagaços podem ser provenientes da ramnogalacturonana I, sendo que não houve liberação de L-ramnose por parte do processo de liquefação para a fração solúvel e para a L-arabinose somente uma diminuição 1,09% foi detectada.

A molécula de D-galactose encontrada nos bagaços pode ser proveniente dos polímeros ramnogalacturonana I e da xiloglucana. Os galactanos são formados por resíduos de D-galactose ligados em  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) ou  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) com ramificações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6). Sua importância no que concerne às fibras alimentares está no fato de que são fontes abundantes de D-galactose e podem ser

importantes na dieta de pacientes que possuem deficiência de galactose-1-fosfato-uridil transferase (BUCKERIDGE; TINÉ, 2000).

O galactomanano, polissacarídeo típico do domínio celulose/hemicelulose, é formado por uma cadeia principal de D-manose ligada em  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com graus variados de ramificação com galactose ligada em  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (BUCKERIDGE; TINÉ, 2000). O bagaço obtido pela liquefação apresentou uma diminuição de 0,97% nos teores de D-manose em relação ao bagaço prensado.

A D-xilose é um monossacarídeo oriundo da xiloglucana. Os valores detectados para este açúcar demonstram que não houve atividade de xiloglucanase no complexo enzimático. Com esta constatação, é possível levantar a hipótese de que a celulose não foi extensivamente hidrolisada em suas unidades estruturais por não haver no complexo de enzimas uma atividade secundária de xiloglucanase (GRASSIN; FAUQUEMBERGUE, 1996).

De acordo com Kravtchenko, Voragen e Pilnik (1992), a L-fucose, apiose e alguns outros açúcares raros foram encontrados como constituintes traços em certas substâncias pécnicas, mas não há informação disponível sobre sua localização estrutural. O monossacarídeo L-fucose pode ser encontrado na fração ramnogalacturonana I da pectina e nas cadeias laterais da xiloglucana. Em estudos sobre a composição monossacarídica da fração pécnica da maçã, foram encontrados elementos traços de L-fucose, como relatam Capek; Renard e Thibault (1995) e Marcon (2004). Os teores de L-fucose encontrados nos bagaços provenientes da liquefação e prensagem podem ser provenientes das cadeias laterais da xiloglucana, e podem estar relacionados com a cultivar de maçã utilizada no presente.

O bagaço proveniente do processo de liquefação, após passar por etapas de desidratação e moagem, poderá ter várias aplicações tecnológicas. Pelo seu elevado teor de fibra alimentar, pectina e pelas suas características físico-químicas, poderá ser aplicado em biscoitos, pães, barra de cereais e até mesmo em produtos lácteos.

De acordo com Protzek, Freitas e Wasczynskj (1998) já foram encontrados estudos visando à aplicação do bagaço seco de maçã, depois de transformado em farinha, em produtos de panificação como pães, biscoitos, “cookies”, “muffins” e massas alimentícias. Biscoitos amanteigados foram elaborados com 20, 30, 40 e 50% de substituição de farinha de trigo por farinha obtida com bagaço de maçã, todas as formulações foram submetidas à análise sensorial e obtiveram bons índices de aceitação, sendo que a formulação com 20% de farinha de bagaço de maçã obteve nota 7,17 na escala hedônica (PROTZEK; FREITAS; WASCZYNSKJ, 1998).

De acordo com Chen et al. (1988), a fibra de maçã apresentou uma maior capacidade de hidratação, quando comparada ao farelo de trigo e aveia. Protzek, Freitas e Wasczynskj (1998) encontraram o valor de 4,78g de água/g de amostra seca para o bagaço de maçã, quando avaliado sua capacidade de absorção de água.

O perfil microbiológico do bagaço liquefeito transformado em farinha foi avaliado, como apresenta a TABELA 22, de acordo com os padrões determinados pela Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005).

TABELA 22 - Perfil microbiológico do bagaço liquefeito transformado em farinha.

	<i>Bacillus cereus</i>	Coliformes a 45°C	<i>Salmonella sp.</i>	Bolores e Leveduras
Bagaço	< 10,0 UFC.g <sup>-1</sup>	<1,0 NMP.g <sup>-1</sup>	Ausência em 25g	<10,0 UFC.g <sup>-1</sup>
Padrão microbiológico	-	10 <sup>2</sup> NMP.g <sup>-1</sup>	Ausência em 25g	-

Ao comparar os resultados obtidos com os padrões legais foi verificado que o bagaço de maçã, após 5 meses de armazenamento em temperatura ambiente manteve boa qualidade microbiológica, podendo ser aplicado em produtos alimentícios sem causar riscos à segurança alimentar.



#### 5.4 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO E FORMAÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA

Com o objetivo de verificar o desempenho fermentativo, os sucos obtidos pelos processos de prensagem e liquefação foram conduzidos a um ensaio biológico em condições padrões.

A FIGURA 10 apresenta as curvas ajustadas, por linhas logarítmicas de tendência, de produção de biomassa para os mostos obtidos por liquefação e prensagem.

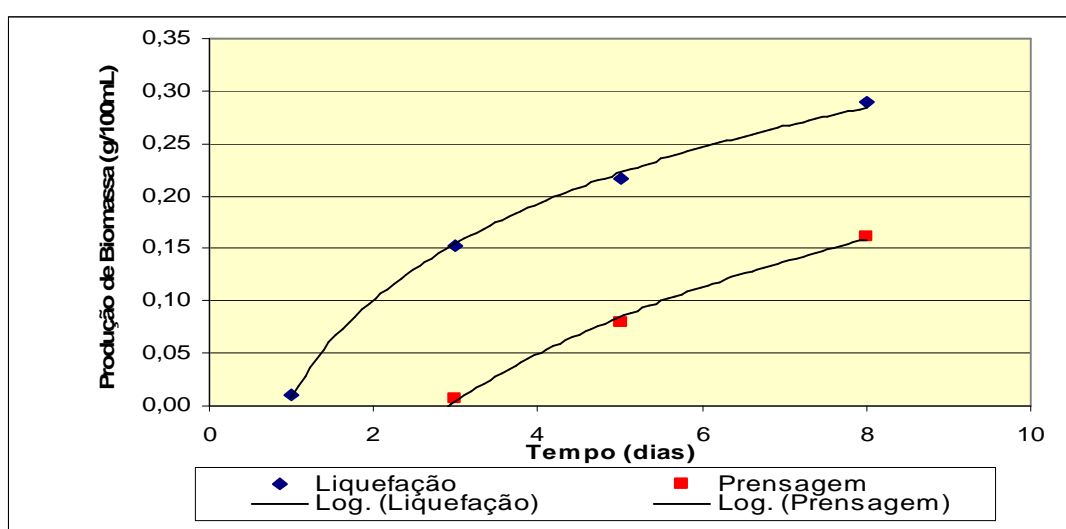


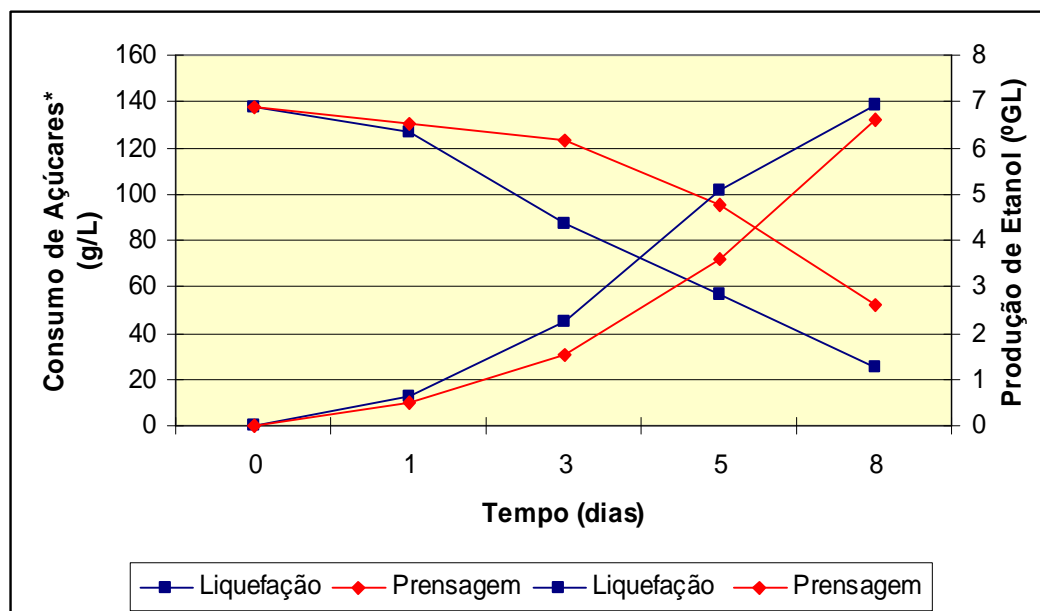
FIGURA 10. Curvas ajustadas, de produção de biomassa dos mostos obtidos por liquefação e prensagem.

O ajuste da curva de crescimento para o processo conduzido com o mosto obtido por liquefação tem um coeficiente de determinação de 99,88% e o modelo é  $y=0,132\text{Ln}(x)+0,0095$  e para o caso do mosto obtido por prensagem, 99,61% e a  $y=0,1569\text{Ln}(x)-0,168$ .

O ensaio fermentativo, em temperatura de 20° C e com *Saccharomyces cerevisiae*, foi conduzido visando discriminar o comportamento celular frente aos mostos obtidos por liquefação e por prensagem, e foi interrompido aos 8 dias. Embora o processo fermentativo tenha sido interrompido durante a fase logarítmica de crescimento, é nítida a diferença entre as curvas

obtidas com a produção de biomassa. De acordo com Barre et al. (2000), o crescimento das leveduras é dependente de carências nutricionais, especialmente em nitrogênio assimilável, em vitaminas e mais particularmente em tiamina. O oxigênio em pequenas quantidades é necessário para um bom crescimento celular, intervém na síntese dos esteróis e dos ácidos graxos insaturados, constituintes da membrana plasmática. A diferença verificada foi  $0,138 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$  de biomassa produzida a mais no suco proveniente da liquefação, aumento que pode ter sido ocasionado, principalmente, pelos teores elevados de nitrogênio total e de minerais em relação ao suco obtido por prensagem. Outro ponto a se ponderar é a presença de oxigênio dissolvido, mais elevada no suco liquefeito, que esteve sob agitação constante durante o processo de ação enzimática. Na FIGURA 11, estão representadas as curvas de consumo de açúcares e produção de etanol para o experimento, sendo que as diferenças verificadas, para o comportamento cinético nas duas amostras, corroboram com o obtido para a curva de produção de biomassa.

De acordo com Willians (1974), durante a fermentação alcoólica, as leveduras transformam a maioria dos açúcares (D-frutose, D-glucose e sacarose) em etanol e gás carbônico pela via de Embden-Meyerhof-Parnas. Esta é a biorreação fundamental, porém não é a única, pois ao mesmo tempo numerosos produtos secundários estão sendo formados. Do ponto de vista sensorial, os compostos mais importantes são os ácidos orgânicos, álcoois superiores e ésteres (ROZA et al., 2003).



\* açúcares em ART

FIGURA 11. Consumo de açúcares e produção de etanol durante a fermentação alcoólica.

O conteúdo de sólidos insolúveis durante a fermentação influencia o teor de álcoois superiores e de ésteres voláteis nos vinhos e, de acordo com Dias (1996), além dos álcoois superiores, os ésteres de ácidos graxos também são fatores que definem a qualidade e contribuem com a formação do *bouquet*. Portanto, a clarificação dos mostos ou qualquer outro tratamento realizado para diminuir o conteúdo de materiais insolúveis, proteínas principalmente, pode causar modificações nos teores finais de álcoois superiores nos vinhos (ANCÍN et al., 1996).

O suco obtido por liquefação se apresenta como um produto turvo, resultado dos elevados teores de proteína. Devido aos elevados teores de sólidos insolúveis, foram analisados os álcoois superiores e outros compostos voláteis importantes para o aroma do produto, sendo os resultados da análise por cromatografia em fase gasosa, de uma amostra de fermentado de maçã, apresentados na FIGURA 12.

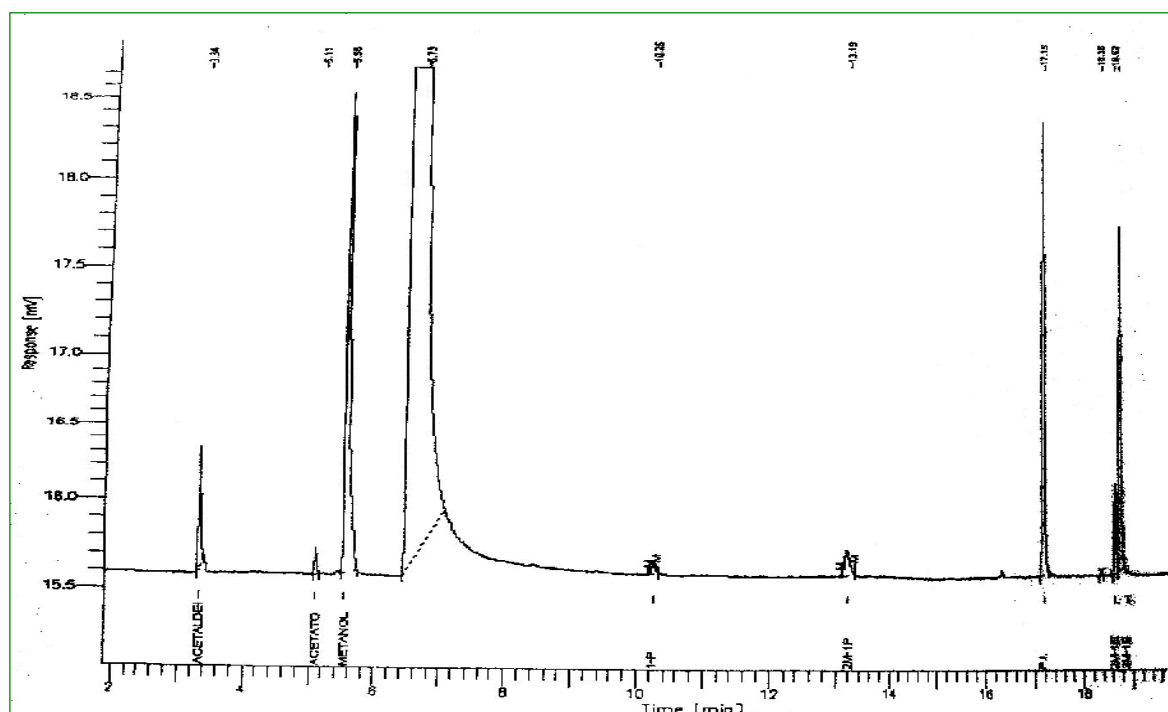


FIGURA 12. Análise por cromatografia em fase gasosa dos compostos voláteis do aroma.

A FIGURA 13 apresenta a soma dos álcoois superiores para os sucos obtidos por liquefação e prensagem durante a cinética.

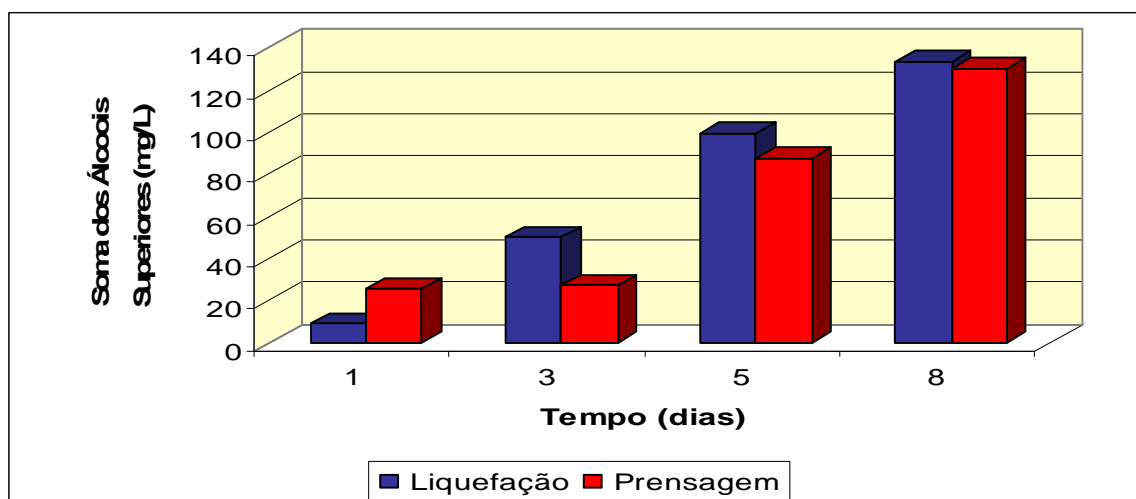


FIGURA 13. Soma dos álcoois superiores para os sucos obtidos por liquefação e prensagem durante a cinética.

A análise da evolução de álcoois superiores específicos nos mostos obtidos por liquefação e por prensagem durante o processo fermentativo está apresentada na TABELA 23 e 24, respectivamente.

TABELA 23 - Evolução dos álcoois superiores no processo fermentativo do mosto obtido por liquefação.

Tempo de fermentação (dias)	1- Propanol (mg.L <sup>-1</sup> )	2-Metil, 1- Propanol (mg.L <sup>-1</sup> )	2-Metil, 1- Butanol (mg.L <sup>-1</sup> )	3- Metil, 1-Butanol (mg.L <sup>-1</sup> )
1	ND	ND	5,0	4,3
3	4,3	5,4	11,2	29,5
5	5,5	10,3	18,7	65,1
8	4,9	13,1	24,3	91,3
Média	3,67	7,2	14,8	47,55
Desvio	2,49	5,75	8,45	38,38
Variação	67,84	79,86	57,09	80,69

TABELA 24 - Evolução dos álcoois superiores no processo fermentativo com mosto obtido por prensagem.

Tempo de fermentação (dias)	1- Propanol (mg.L <sup>-1</sup> )	2-Metil, 1- Propanol (mg.L <sup>-1</sup> )	2-Metil, 1-Butanol (mg.L <sup>-1</sup> )	3- Metil, 1-Butanol (mg.L <sup>-1</sup> )
1	ND	ND	10,9	14,6
3	ND	ND	11,7	15,8
5	5,0	7,4	19,9	55,5
8	5,3	10,9	25,7	88,5
Média	2,58	4,57	17,05	43,6
Desvio	2,97	5,47	7,056	35,46
Variação	115,16	119,70	41,38	81,33

De acordo com Silva (1997), os álcoois superiores são os principais componentes característicos do aroma de sidras, sendo formados ao mesmo tempo em que o etanol. Beech (1972), ao avaliar o efeito da temperatura, constatou que a produção de álcoois superiores é máxima quando a temperatura em que é conduzida a fermentação se situa entre 15 e 25°C e Barre et al (2000) estabeleceu que em condições enológicas, as concentrações dos álcoois superiores pode variar de 50 a 300 mg.L<sup>-1</sup>.

A soma dos álcoois superiores ao final da fermentação de 8 dias foi de 133,6 mg.L<sup>-1</sup> e de 130,4 mg.L<sup>-1</sup> para o mosto obtido por liquefação e por prensagem, respectivamente, resultados que confirmam as afirmações dos últimos autores.

Os álcoois superiores podem ser provenientes do mecanismo de Erlich que atua sobre os aminoácidos disponíveis no meio de fermentação, ou pela via dos carboidratos. O mosto proveniente da liquefação apresentou concentrações mais elevadas de nitrogênio e açúcares totais em relação ao mosto prensado. Entretanto a diferença na formação dos álcoois superiores foi de apenas 3,2 mg.L<sup>-1</sup>. Este incremento pode estar relacionado com a diferença encontrada nos teores de açúcares totais ou em um possível aumento, pelo processo de liquefação, nos aminoácidos disponíveis à via de Erlich.

De acordo com Ribereau-Gayon e Peynaud (1961), os álcoois superiores dos vinhos são constituídos pelo álcool isoamílico (100-400 mg.L<sup>-1</sup>) e pelo álcool isobutílico (30-200 mg.L<sup>-1</sup>). Como, para este experimento, a fermentação foi interrompida não houve a formação total dos álcoois. O álcool isoamílico representa 68,56% e o álcool isobutílico (2-metil, 1-propanol) 9,8% dos álcoois superiores para o mosto liquefeito. Para o mosto obtido por prensagem o álcool isobutílico representa 8,36% e o isoamílico 67,86% da soma dos álcoois superiores. Silva (1997) determinou que a concentração de álcool isobutílico no suco de maçã é de 1 mg.L<sup>-1</sup>. Após um processo fermentativo de 30 dias com mosto de maçã variedade Belgolden em temperatura entre

23-26°C e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin D-47), a concentração de álcool isobutílico foi de 10,05 mg.L<sup>-1</sup> (SILVA, 2004). Houve produção significativa deste composto, o mesmo tendo ocorrido neste experimento para ambos os mostos, mas em maior proporção no mosto obtido por prensagem.

A síntese de 1-propanol parece ser mais estimulada pela adição de nitrogênio amoniacal no mosto que pelo enriquecimento do mosto em nitrogênio  $\alpha$ -aminado (BARRE et al., 2000). Os valores obtidos para o 1-propanol praticamente não diferem entre si, portanto baseando-se na afirmação acima é possível analisar que o aumento no nitrogênio total pode estar mais relacionado com um aumento na fração orgânica do que no nitrogênio amoniacal.

O teor máximo permitido de metanol em vinhos, de acordo com regulamentação da Portaria 229 de 25 de outubro de 1988, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento que complementa os padrões de identidade e qualidade de vinhos, é de 350 mg.L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005). O metanol é um componente tóxico que pode causar cegueira e sérios problemas neurológicos (DIAS, 1996). A TABELA 25 apresenta os valores de metanol obtidos durante a cinética de fermentação para os mostos obtidos por liquefação e prensagem.

TABELA 25 - Valores de metanol obtidos durante a cinética de fermentação dos mostos obtidos por liquefação e prensagem.

<i>Tempo de fermentação</i> (dias)	<i>Metanol (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	
	Liquefação	Prensagem
1	508,1	14,2
3	453,0	12,8
5	477,5	16,2
8	506,3	12,6
Média	486,24	13,95
Desvio	26,71	1,66
Variação	5,49%	11,89%

O metanol é um álcool liberado pela reação de hidrólise catalisada pela pectinesterase e ao analisar a tabela acima é possível verificar que não houve evolução significativa durante o período fermentativo. Nas informações disponíveis sobre a preparação enzimática comercial não é declarada a atividade desta enzima. Ao contrário da possibilidade da existência de outras atividades secundárias como protease, invertase e xiloglucanase que foi levantada no decorrer desta discussão, a presença da pectinesterase fica confirmada. O problema da liberação de metanol em sucos obtidos por liquefação enzimática já foi levantado por Acar (1999), podendo ser resolvido por um processo de evaporação, dada a sua alta volatilidade. Porém para sucos comercializados na forma “in natura”, o problema ainda não pode ser resolvido.

O acetaldeído (aldeído acético ou etanal), etanol e gás carbônico são produzidos pelo metabolismo normal do ácido pirúvico. A partir da ação de uma carboxilase, o piruvato sofre uma descarboxilação gerando gás carbônico e etanal, sendo que este sob ação do  $\text{NADH}_2$  é reduzido a etanol (DIAS, 1996).

Dentre os compostos carbonílicos identificados em sidras o acetaldeído é quantitativamente o mais importante, sendo considerado um composto indesejável, que confere sabor oxidado aos vinhos (SILVA, 1997). No caso das sidras, uma produção anormal e alta pode resultar no efeito conhecido como *mal du framboise* e confere ao produto um gosto de banana e de limão podre (SILVA, 1997).

A FIGURA 14 representa a formação de acetaldeído durante a cinética de fermentação.



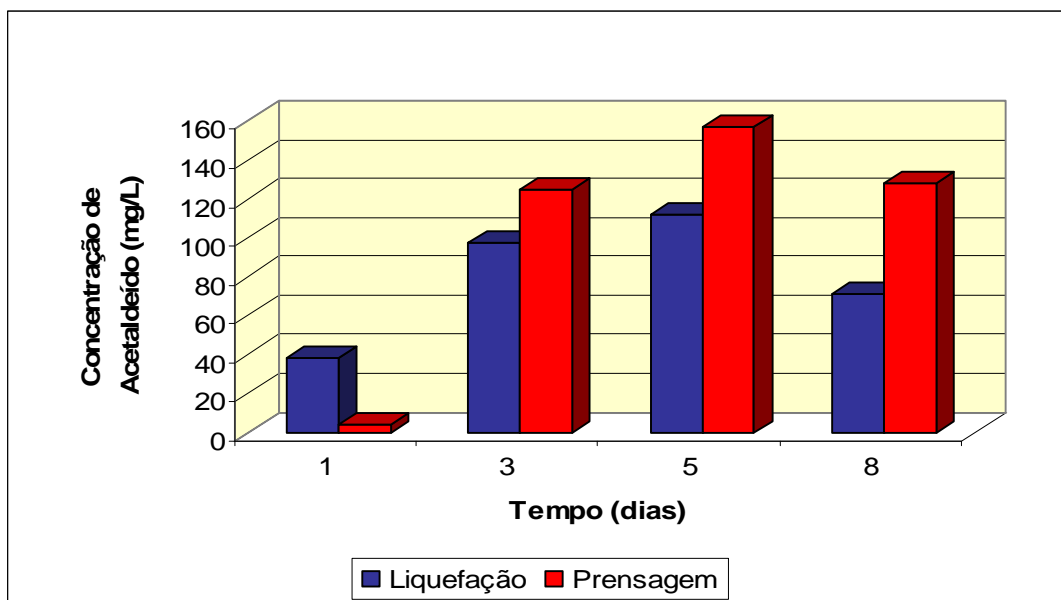


FIGURA 14. Formação de acetaldeído durante a cinética de fermentação.

De acordo com Silva (2004), o acetaldeído é originário do processo fermentativo e é intermediário na produção de etanol a partir de açúcares. Os resultados obtidos corroboram com esta afirmação, pois no período final da cinética ocorre uma diminuição dos teores de acetaldeído pela redução em etanol. Na legislação brasileira não existem parâmetros com relação ao teor máximo de acetaldeído permitido em bebidas fermentadas. De acordo com Drilleau (1977), a concentração máxima permitida pela legislação francesa é de  $200\text{mg.L}^{-1}$ . Silva (2004) em seus experimentos de fermentação de mosto obtido da prensagem de maçã cultivar Belgoden, detectou valores de  $64,73\text{mg.L}^{-1}$  após 30 dias de fermentação a temperatura entre  $23\text{-}26^{\circ}\text{C}$ .

Os ésteres, considerados compostos responsáveis pela qualidade aromática dos vinhos jovens, têm como seu principal representante, quantitativamente, o acetato de etila. Em contraste com outros ésteres etílicos de peso molecular superior, o acetato de etila confere um odor desagradável (ROZA, et al., 2003).

Na FIGURA 15 são apresentados os teores de acetato de etila determinados durante a fermentação.

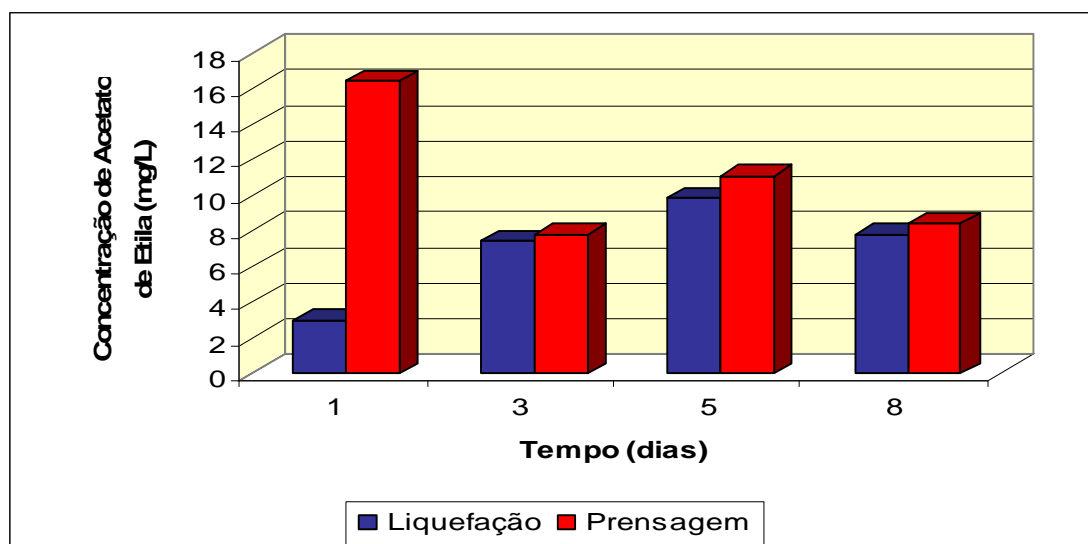


FIGURA 15. Teores de acetato de etila determinados durante a fermentação.

O acetato de etila em concentrações superiores a  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  influencia negativamente na qualidade dos vinhos e o mesmo ocorre em sidras, que parece ressaltar a intensidade do aroma e *flavour* acéticos (AMERINE et al., 1982). Durante os oito dias de fermentação, o teor desse composto tanto para o mosto obtido por prensagem quanto para o obtido por liquefação, foi da ordem de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , portanto não causa influência negativa sensorial. Exceção deve ser feita para o primeiro ponto do mosto obtido por prensagem em que o valor de  $16,4 \text{ mg.L}^{-1}$  parece representar um erro.

Williams (1974) relata concentrações de acetato de etila de 35 a  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  para sidras, sendo que para vinhos a concentração máxima encontrada foi de  $190 \text{ mg.L}^{-1}$  (ROZA et al., 2003). Para concentrações inferiores a  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ , o odor do acetato de etila é mascarado por outros

aromas, sendo que para concentrações inferiores a  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  sua presença pode ser benéfica, pois participa do *bouquet* agradável dos vinhos (ROSIER, 1992).

## 6 CONCLUSÕES

1. Os padrões estabelecidos com a melhor condição de extração de suco de maçã por liquefação enzimática foram, tempo de 75 minutos, concentração da enzima de 0,1 mL/Kg e 50°C de temperatura.
2. Houve um aumento de 18,5% no rendimento para o processo de liquefação quando comparado ao processo de prensagem.
3. O suco obtido por liquefação enzimática apresentou valores mais elevados para os indicadores físico-químicos, quando comparado ao suco obtido por prensagem.
4. A liquefação enzimática apresentou maior rendimento em base úmida, portanto, a produção de bagaço foi menor e os parâmetros físico-químicos e cromatográficos foram mais elevados quando comparados ao bagaço obtido pelo processo de prensagem.
5. O processo de fermentação alcoólica do mosto de maçã obtido pela liquefação enzimática, apresentou as cinéticas de consumo de substrato e formação de produtos principais, mais aceleradas quando comparado o mosto obtido por prensagem.
6. Os compostos de aroma formados durante a fermentação apresentaram pequenas diferenças, em termos de concentração, nos produtos finais.

## REFERÊNCIAS

ACAR, J. The production of cloudy apple néctar using total liquefaction enzymes. **Fruit Processing**, Oberhonnerfeld, v. 8, p.314-317, 1999.

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; O'NEILL, M.A. et al. An hypothesis: the same mix polysaccharides are components of the primary cell walls higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A.G.J. **Pectins and Pectinases**. Amsterdam, v.14, p.47-55, 1996.

ALBUQUERQUE, P.M.; ALBUQUERQUE, C.T.; AMANTE, E.R. Aplicações para os resíduos sólidos da obtenção do suco de maçã. **Engarrafador Moderno**, v.12, p.12-16, 2002.

AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; KUNKEE, R.E.; OUGH, C.S.; SINGLETON, U.L.; WEBB, A.D. **Technology of wine making**. Connecticut: The AVI Publishing Company, 1982.

ANCIN, C.; AYESTARAN, B.; CORROZA, M.; GARRIDO, J.; GONZALEZ, A. Influence of prefermentation clarification on the higher alcohol contents of wine. **Food Chemistry**, Grã Bretanha, v.55, p.241-249, 1996.

AOAC Official Methods of Analysis. **AOAC Official Method 985.29**: Total dietary fiber in foods. [s.l.], 2000.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; SALMON, J.M. La levadura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos e tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, 2000, p. 274-315.

BATAILLON, M.; RICO, A.; SABLAYROLLES, I.M.; SALMON, J.M. BARRE, P. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.82, p.101-106, 1996.

BEECH, F.W. The yeast flora of apple juices and ciders. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.78, p.477-491, 1972.

BELY, M.; SALMON, J.M.; BARRE, P. Assimilable nitrogen addition and hexose transport activity during enological fermentations. **Journal of the Institute Brewing**, v.100, p 279-282, 1994.

BERREGI, I.; SANTOS, J.I.; DEL CAMPO, G.; MIRANDA, J.I. Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by HNMR. **Talanta**, v.61, p.139-145, 2003.

BEVERIDGE, T.; WEINTRAUB, S.E. Protein extraction during production of varietally derived apple juice using a "macerase" enzyme. **Food Research Institute**, v.30, p.231-234, 1997.

BINNING, R.; POSSMANN, P. Apple juice. In: NAGY, S.; CHEN, C.S.; SHAW, P.E. **Fruit Juice Processing Technology**. Agscience: Florida, 1993.

BONETI, J. I. da S.; RIBEIRO, P.de A.; DENARDI, F.; CAMILO, A.P.; BRIGHENTI, E.; PEREIRA, A.J. EPAGRI 402-Catarina: nova cultivar de macieira resistente à sarna. **Agropecuária Catarinense**. Florianópolis, v.9, n.2, p.51-54, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Complementação dos padrões de identidade e qualidade de vinhos**. Disponível em: < [http:// agricultura.gov.br](http://agricultura.gov.br)>. Acesso em: 18 nov. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padrões Microbiológicos para alimentos**. Disponível em: < [http:// anvisa.gov.br](http://anvisa.gov.br)>. Acesso em: 18 nov. 2005.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S. Polissacarídeos da parede da célula vegetal e sua importância como fibras alimentares. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Fibra Alimentar em Iberoamérica**, 2000. Disponível em <[http:// ibot.sp.gov.br](http://ibot.sp.gov.br)>. Acesso em: 06 nov.2005.

BUMP, V.L. Apple pressing and juice extraction. In: DOWING, D.L. **Processed apple products**. Van Nostrand Reinhold: New York, 1989, p.53-84.

CAPEK, P.; RENARD, C.M.G.C.; THIBAUT, J-F. Enzymatic degradation of cell walls of apples and characterization of solubilized products. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v.17, n.6, p.337-340, 1995.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**. v.3, p.1-30, 1993

CHEN, H.; RUBENTHALER, G.L.; LEUNG, H.K.; BARANOWSKI, J.D. Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. **Cereal Chemistry**, v.65, p.244-247, 1988.

CHINNICI, F.; GAIANI, A.; NATALI, N.; RIPONI, C.; GALASSI, S. Improved HPLC determination of phenolic compounds in cv. Golden Delicious apple using a monolithic column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.3-7, 2004.

CZELUSNIACK, C.; OLIVEIRA, M.C.S; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C; WOSIACKI, G. Qualidade de maçãs comerciais produzidas no Brasil: aspectos físico-químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v.6, p.25-31, 2003.

DA SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim do SBCTA**, Campinas, v.31, n.2, p.249-260, 1997.

D' AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 4, p.315-324, 1989.

DIAS, A.L.M. **Influência de diferentes cepas de leveduras e mostos na formação dos compostos voláteis majoritários em vinhos de caju (*Anacardium occidentale, L.*)**. 1996, 94f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

DOMBEK, K.M.; INGRAM, L.O. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.197-200, 1986.

DONGOWSKI, G.; SEMBRIES, S. Effects of commercial pectolytic and cellulolytic enzyme preparations on the apple cell wall. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4236-4242, 2001.

DRILLEAU, J.-F.; MASSIOT, P.; LE QUÉRÉ, J.M. Biochemical characteristics of apple juices and fermented from musts obtained enzymatically. **Fruit Processing**, Oberhonnerfeld, v. 4, p.108-112, 1994.

DRILLEAU, J.-F. Le framboisé dans les cidres. **Bios**, n.1, p.37-44, 1977.

DUBOIS, P. Les aromes des vins et leur défauts. **Revue Française du OEnologie**, v.145, p.27-40, 1994.

ENDREß, H.-U. High quality resulting from product integrated environment protection-PIUS. **Fruit Processing**, Oberhonnerfeld, v.10, p.273-276, 2000.

GIORDANO, S.R. Gestão ambiental no sistema agroindustrial. In: **Economia e Gestão dos Negócios Agroalimentares**. São Paulo: Pioneira, v.7, p.255-281, 2002.

GONÇALVES, C.A.D. **Extração de suco e maçãs (*Malus domestica*, Borkh.) e suas qualidades sensoriais**.1992, 82fls. Dissertação (Mestrado em Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Apple pomace liquefaction: a new technology. **Fruit Processing**, Oberhonnerfeld, v.12, p.490-495, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed. São Paulo: O Instituto, 1985.

JANZANTTI, N.S.; FRANCO, M.R.B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.523-528, 2003.

JORGE, J.dos S.; MONTEIRO, J.B.R O efeito das fibras alimentares na ingestão, digestão e absorção dos nutrientes. **Nutrição Brasil**, v.4, n.4.p.218-229, 2005.

KERTESZ, Z.I. **The pectic substances**. New York: Interscience, 1951.

KRAVTCHENKO, T.P.; VORAGEN, A.G.J.; PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, Grã Bretanha, v.18. p.17-25, 1992.

LACHMAN, J.; PIVEC, V.; ORSÁK, M.; KUČERA, J. Enzymic browning of apples by polyphenol oxidases. **Czech Journal of Food Science**, v.18, n.6, p.213-218, 1992.



LANZARINI, G.; PIFFERI, P.G. Enzymes in the fruit juice industry. In: CANTARELLI, C.; LANZARINI, G. **Biotechnology applications in beverage production**. London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 189-222.

LEE, K.W.; KIM, Y.J.; KIM, D.O.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6516-6520, 2003.

LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBLE, F.; PRIOR, B.A.; RAMOS, J. THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S. FPS1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. **EMBO Journal**, v.14, p.1360-1371, 1995.

MARCON, M.V. **Extração e caracterização de pectinas obtidas de farinha de bagaço de maçã**. 2004, 150f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

MASSIOT, P.; BARON, A.; DRILLEAU, J-F. Characterisation and enzymatic hydrolysis of cell-wall polysaccharides from different tissue zones of apple. **Carbohydrate Polymers**, Grã Bretanha, v.25, p.145-154, 1994.

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.53, p.625-663, 1984.

MIHALEV, K.; SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p.7306-7310, 2004.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C.; OLIVEIRA, M.C. de; PASSOS, M.; WOSIACKI, G. Avaliação da trituração e de tratamentos enzimáticos na obtenção de suco de maçã por centrifugação. **Publicatio UEPG Ciências Exatas Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**. Ponta Grossa, v.11, p.7-12, 2005.

OUGH, C.S.; AMERINE, M.A. **Methods for analyses of musts and wines**. 2.ed. [ S.l.]: John Wiley & Sons, 1988.

OUGH, C.S. **Tratado básico de enología**. Zaragoza: Acribia, 1996, 294p.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001/20020). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, p.1336-1343, 2004.

PÉREDI, K.; VÁMOS-VIGYAXÓL, KISS-KUTZ, N. Flavor losses in apple juice manufacture. **Die Nahrung**, v.25, n.6, p.573-582, 1981.

PILNIK, W.; VORAGEN, A.G.J. Pectic enzymes in fruit and vegetable manufacture. In: NAGADAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in food processing**. New York: Academic Press, 1993.

POLL, L. The effect of pulp holding time and pectolytic enzyme treatment on the acid content in apple juice. **Food Chemistry**, v.47, p.73-75, 1993.

PROTZEK, E.C.; FREITAS, R.J.S.de; WASCZYNSKJ, N. Aproveitamento de bagaço de maçã na elaboração de biscoitos ricos em fibra alimentar. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.16, n.2, p.263-275, 1998.

RAUPP, D.da.S.; CARRIJO, K.C.R.; COSTA, L.L.F.C.; MENDES, S.D.C.; BANZATTO, D.A. Propriedades funcionais-digestivas e nutricionais de polpa-refinada da maçã. **Scientia Agrícola**, v.57, n.3, p.395-402, 2000.

REID, S.; et al. Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*). **Carbohydrate Polymers**, v.39, p.369-376, 1999.

REID, J.S.G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: **PLANT Biochemistry**. New York: Academic Press, 1997.

RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. **Traité d'œnologie I: maturation du raisin, fermentation alcoolique, vinification**. Paris: Dunod, 1961.

RONBINSON, D.S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991.

ROSIER, J.P. **Interpretation des caracteres analytiques et sensoriels de vins blancs de la region des graves en fonction de certains facteurs culturaux de la vigne**. 1992, 252f. Thèse (Doctorat en Oenologie-Ampelologie) - Université de Bourdeaux II. Bourdeaux.

ROZA, C de la; LACA, A.; GARCÍA, L.A.; DÍAZ, M. Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. **Process Biochemistry**, v.38, p.1451-1456, 2003.

SALMON, J.M.; MAURICIO, J.C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v.16, p.89-84, 1994.

SCHEMIN, M.H.C. **Obtenção de pectina alimentícia a partir de bagaço de maçã**. 2003, 70f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determinations of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.910, p.265-273, 2001.

SCHOLS, H.A. et al. The effect of the manufacturing method on the characteristics of apple juice. **Z Lebensm Unters Forsch**, v.192, p.142-148, 1991.

SERRANO, R.; DELAFUENTE, G. Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.5, p.161-171, 1974.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. (Manual Técnico, nº14).

SILVA, N.C.C. **Produto vinificado espumante de maçã obtido com células imobilizadas**. 1997, 102f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, N.C.C. **Avaliação do processo de desalcolização de bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã**. 2004, 107f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.195, p.19-23, 1952.

SPAGNUOLO, M.; CRECCHIO, C.; PIZZIGALLO, M.D.R.; RUGGIERO, P. Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, Grã Bretanha, v.60, p.215-222, 1997.

STUTZ, C. Ezymatic liquefaction: dream or reality? **Fruit Processing**, Oberhonnefeld, v.9, p.358-362, 1996.

VARNER, J.E.; LIN, L.S. Plant cell wall architecture: review. **Cell**, v.56, p.231-239, 1989.

VICENZI, R.; BILHALVA, A.B. Casca de arroz como coadjuvante de prensagem na extração de suco de maçã (*Malus domestica*, Borkh). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n.2, p.89-94, 1998.

WANG, H.J.; THOMAS, R.L. Direct use of apple pomace in bakery products. **Journal of Food Science**, v.54, p.618-620, 1989.

WILL, F.; SCHULZ, K.; LUDWIG, M.; OTTO, K. DIETRICH, H. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **Internacional Journal of Food Science and Techonolgy**, v.37, p.653-660, 2002.

WILLIAMS, A.A. Flavour research and the cider industry. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.80, p.455-470, 1974.

**WORLD**, apple review. Pullman: Belrose, 2005

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Apple varieties growing in subtropical áreas: the situation in Santa Catarina – Brazil. **Fruit Processing**, Oberhonnefeld, v.12, p.19-28, 2002.